



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome: Amagliani Giulia

ISTITUTO/OSPEDALE: Centro di Biotechnologie e Istituto di Scienze Tossicologiche, Igienistiche e Ambientali Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

Indirizzo: via S. Chiara, 25 Città: Urbino (PU)

Tel. 0722 303540 Fax. 0722 303541 CELL. 340 2762051 E mail giulia.amagliani@uniurb.it

RILEVAZIONE DI SALMONELLA E LISTERIA MONOCYTOGENES MEDIANTE NANOBEADS MAGNETICHE E REAL TIME PCR

G. Amagliani*[#], E. Omiccioli*, G. Brandi*[#], I.J. Bruce[^], M. Magnani*[§]

**Centro di Biotechnologie*, [#]*Istituto di Scienze Tossicologiche, Igienistiche e Ambientali*, [§]*Istituto di Chimica Biologica, Università di Urbino "Carlo Bo"*; [^]*University of Kent*

Scopi della ricerca: L'identificazione rapida dei microrganismi patogeni è un punto critico per il monitoraggio ed il controllo delle malattie infettive. I metodi attualmente in uso sono rappresentati da classici protocolli colturali che possono impiegare diversi giorni per la diagnosi definitiva. Una efficace alternativa è offerta dai metodi molecolari, in particolare in PCR, che forniscono elevate sensibilità e specificità in tempi rapidi. L'applicazione di queste tecniche tuttavia è limitata dalla qualità del DNA che, se ottenuto da matrici biologiche complesse, può contenere inibitori della reazione di amplificazione. L'utilizzo di nanobeads magnetiche funzionalizzate con specifici ligandi permette di isolare determinate sequenze di DNA in forma pura e quindi adatto per l'analisi molecolare.

Metodi impiegati: Due sonde cattura di DNA, specifiche per i patogeni *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, sono state disegnate ed immobilizzate a nanobeads magnetiche NH₂-modificate, utilizzando una reazione mediata da glutaraldeide (Bruce and Sen, 2005. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy silanes and their application in magnetic bioseparations. Langmuir 21: 7029-7035). L'efficienza dell'immobilizzazione è stata verificata utilizzando sonde complementari e marcate in fluorescenza. Tali supporti sono stati quindi impiegati per l'isolamento del DNA dei patogeni da coltura (magnetic capture hybridization, MCH). Parallelamente sono stati ottimizzati saggi in Real Time PCR per l'identificazione degli stessi. La specificità del metodo MCH seguito da Real Time PCR è stata testata su 16 specie batteriche. La sensibilità è stata infine verificata sottoponendo all'intera procedura diagnostica diluizioni seriali di sospensioni batteriche delle due specie target, da 10³ a 10 CFU.

Risultati e conclusioni: Il processo di immobilizzazione delle sonde cattura sui supporti magnetici si è dimostrato efficiente e riproducibile (efficienza di cattura 61% ± 3). La procedura MCH è risultata altamente specifica, rilevando solo le specie target, tra tutte quelle testate. I saggi di Real Time PCR, effettuati su DNA genomico purificato, hanno mostrato elevata sensibilità, fino ad un limite di detection di 10 equivalenti genomici. Quando eseguiti sui complessi nanobeads + DNA batterico dopo isolamento in MCH, questa sensibilità è stata confermata nel caso di *Salmonella*, mentre per *L. monocytogenes* è stato possibile rilevare fino a 25 CFU nel 20% dei campioni esaminati e 100 CFU nel 100%. Il metodo sviluppato permette l'identificazione delle specie selezionate in un solo giorno lavorativo. Le fasi successive di questo progetto prevedono di utilizzare contemporaneamente le nanobeads con entrambe le sonde per la purificazione del DNA dei due patogeni dallo stesso campione (multiplex MCH), da identificare poi in multiplex Real Time PCR.

Lavoro realizzato nell'ambito del progetto EU FP6 NACBO Contr. n. 500804-2



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome : BIGIANI NAZZARENA ISTITUTO/OSPEDALE: Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Modena - Sez. di Anatomia Patologica
Indirizzo Ospedale: VIA DEL POZZO, 71 Città: MODENA (CAP.41100)
Tel.: 059-4223297. Fax: 059-4223313 CELL.: 347/3092107 E mail: nazzarena.bigiani@libero.it

Titolo	→	CORRELAZIONE FRA NUMERO DI COPIE DEL GENE EGFR E RISPOSTA AL CETUXIMAB IN PAZIENTI CON CARCINOMA DEL COLON-RETTO METASTATICO
Autori	→	N Bigiani, L Schirosi, S Bettelli, G Sartori, F Bertolini*, C Bengala*, PF Conte*, A Maiorana
Ospedale o Istituto	→	<i>Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Modena – Sez. Anatomia Patologica e *Oncologia, Modena</i>
Inizio testo	→	<p>Il recettore transmembrana tirosinchinasico EGFR (epidermal growth factor receptor), rappresenta un elemento chiave nella carcinogenesi del colon-retto. La sua attivazione induce proliferazione cellulare, angiogenesi, motilità cellulare e inibizione dell'apoptosi. Esso risulta iperespresso nel 60-80% dei pazienti affetti da carcinoma del colon-retto (CCR) e il dominio extracellulare del recettore rappresenta il bersaglio per anticorpi monoclonali anti-EGFR quali il cetuximab. Nel trattamento del CCR metastatico l'associazione del cetuximab al chemioterapico si è vista essere vantaggiosa rispetto alla sola chemioterapia ed un fattore predittivo di risposta al cetuximab sembra essere rappresentato da un elevato numero di copie del gene (NCG) EGFR. Scopo della ricerca: questo studio è stato svolto con l'obiettivo di valutare la correlazione fra grado di regressione del tumore (GRT) e NCG EGFR in pazienti affetti da CCR metastatico trattati, prima dell'intervento chirurgico, con il solo cetuximab per 3 settimane e di seguito con cetuximab associato al chemioterapico (5 fluorouracile) e a radioterapia. Il GRT è stato valutato su resezione chirurgica secondo il criterio di "gradazione" di Dworak (Int J Colorectal Dis. 2006; 21(7):645-51.). Metodi impiegati: Sono stati studiati 26 casi di CCR metastatico fissati in formalina ed inclusi in paraffina mediante metodica FISH con sonda LSI EGFR Spectrum Orange/CEP 7 Spectrum Green (Vysis), per valutare l'NCG di EGFR. Sono stati analizzati i campioni considerando come alto NCG le condizioni di amplificazione del gene (EGFR/CEP7\geq2), di polisomia (n° di segnali CEP7 \geq 3 in oltre il 50% delle cellule) e di rapporto EGFR/n° nuclei \geq 3 (J Clin Oncol. 2007; 25(22): 3238-3245). Risultati: Dei 26 casi indagati, soltanto uno è risultato non valutabile per inadeguatezza del preparato. Diciotto su 25 pazienti (72%) mostrano alto NCG, presentando sia un rapporto EGFR/n° nuclei \geq3, che un n° di segnali CEP7 \geq 3 in oltre il 50% delle cellule. Fra questi, 10 (55.5%) mostrano GRT 3-4 e rispettivamente 7 GRT 3 e 3 GRT 4. Dei 7 pazienti con basso NCG nessuno ha mostrato GRT 3-4. Conclusioni: Nonostante l'esiguo numero dei casi analizzati i dati dell'analisi confermano che in pazienti con CCR metastatico, l'NCG del gene EGFR è predittivo di un elevato grado di regressione del tumore dopo trattamento con cetuximab associato a chemioterapia e radioterapia.</p>



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome ...BONDIOLI ELENA.....
ISTITUTO/OSPEDALE...BANCA DELLA CUTE E CENTRO GRANDI USTIONATI OSPEDALE M. BUFALINI- CESENA
Indirizzo Ospedale ...VIALE GHIROTTI 286.....CittàCESENA.....
Tel. 0547/352919...Fax 0547/352718...CELL 339/3599812...E mail elena.bondioli@ausl-cesena.emr.it.

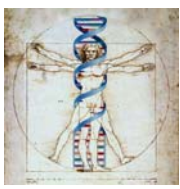
**Titolo → “PROGETTAZIONE E PRODUZIONE DI UNO SCAFFOLD CELL -FREE
BIOCOMPATIBILE DA CUTE DI DONATORE”**

**Autori → E. Bondioli¹, D. Melandri¹, A. Benini¹, C. D’Acunto¹, R. Orioli¹, M. Fini²,
R. Giardino², R. Rotini², P.M. Fornasari², A. Castagna³**

**Ospedale o Istituto → ¹ Centro Grandi Ustionati e Banca della Cute – Ospedale M. Bufalini, Cesena
² Istituti Ortopedici Rizzoli (IOR)- Bologna
³ Chirurgia della spalla - Istituto Clinico Humanitas, Milano**

Inizio testo →

Negli ultimi anni il settore dell’ingegneria tissutale, grazie all’ausilio delle Biotecnologie in concerto con le altre scienze, ha compiuto una rapida crescita; in commercio sono ampiamente diffusi molteplici sostituti cutanei bioingegnerizzati di natura sintetica e biosintetica, utilizzati sempre più frequentemente per il trattamento di ustioni e ulcere cutanee croniche a varia eziologia. Presso la Banca Regionale della Cute del Centro Grandi Ustionati è nato, grazie alla collaborazione di alcuni Centri di Ricerca, un Progetto di ricerca applicata, mirato alla creazione e produzione di un sostituto cutaneo decellularizzato, unicamente biologico e biocompatibile a partire da derma omologo di donatore multiorgano e multitessuto. I risultati ad oggi ottenuti negli studi condotti in vitro, ex-vivo con colture cellulari e in vivo sul modello animale sono promettenti e fanno sperare in un prossimo utilizzo clinico di questo scaffold in ambito dermatologico e soprattutto in campo ortopedico per la riparazione della cuffia dei rotatori della spalla.



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome Bortolotti Massimo ISTITUTO/OSPEDALE Dip.Patologia Sperimentale-Università di Bologna
Indirizzo Ospedale via San Giacomo 14 Città Bologna
Tel 051/2094713 Fax 0512094746 CELL E mail massimo.bortolotti2@unibo.it

Titolo → **hLL2/SAPORIN-S6: UN'IMMUNOTOSSINA ANTI-CD22 CON POTENTE ATTIVITÀ ANTITUMORALE**

Autori → M Bortolotti, L Polito, V Farini e A Bolognesi

Ospedale o Istituto → Dipartimento di Patologia Sperimentale, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Italia

Inizio testo →

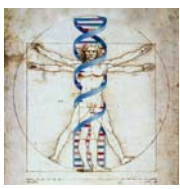
Le immunotossine sono molecole chimeriche, che associano la specificità di un anticorpo per un dato bersaglio cellulare all'efficacia citocida di una tossina. I numerosi studi clinici finora condotti con immunotossine ne hanno dimostrato la loro efficacia antitumorale, soprattutto nelle neoplasie ematologiche.

1. Scopo della ricerca - L'antigene CD22 è espresso ad alti livelli in molti linfomi B. In questo lavoro abbiamo coniugato l'anticorpo umanizzato hLL2 (antiCD22) ad una tossina vegetale, la saporina-S6, appartenente al gruppo delle ribosome-inactivating protein (RIP) monocatenarie.

2. Metodi impiegati - L'immunotossina è stata ottenuta mediante modificazione chimica di RIP e anticorpo e l'inserzione di un ponte disolfuro e successiva purificazione tramite cromatografia per gel filtrazione. L'attività antitumorale del coniugato è stata valutata *in vitro*, in linee *target* derivate da linfomi umani CD22+ (BJAB, REH, D430B, Raji e Ramos), e *in vivo*, in un modello di topo SCID trapiantato con cellule Raji.

3. Risultati e conclusioni - La saporina-S6 e l'hLL2, dopo coniugazione, hanno mantenuto le loro rispettive attività biologiche. L'immunotossina è risultata in grado di bloccare completamente, e in modo irreversibile, la sintesi proteica in tutte le linee *target*, con IC₅₀ nell'ordine di 10 pM. Questi dati sono stati confermati da test di citotossicità. Infine, avendo l'immunoterapia il fine ultimo di eliminare completamente la popolazione responsabile della patologia, è stata valutata la capacità clonogenica nelle linee cellulari BJAB e Raji dopo incubazione con la saporina-S6 coniugata e libera. L'immunotossina è risultata molto attiva, riuscendo ad abolire totalmente la capacità clonogenica delle linee cellulari contro solo un 25% di inibizione della RIP non coniugata. L'efficacia anti-tumorale è stata confermata dagli esperimenti *in vivo*. Il trattamento con l'immunotossina ha portato alla completa sopravvivenza (a 180 giorni) degli animali trattati. Gli animali di controllo trattati con l'anticorpo non coniugato morivano entro i 40 giorni dal trapianto.

I risultati fin qui ottenuti dimostrano elevata citotossicità e selettività dell'immunotossina hLL2/saporina-S6 nei confronti della popolazione *target*, permettendo di prospettare un impiego del coniugato per il trattamento dei linfomi.



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome: Carla Alba Cabras	ISTITUTO/OSPEDALE: Bio-ker S.r.l.
Indirizzo Ospedale: c/o Sardegna Ricerche – Loc. Piscinamanna	Città: Pula (Cagliari)
Tel : 0709251225 Fax : 0709251202 CELL : 3490584171	E mail : a.cabras@bioker.it.

Titolo → PREPARAZIONI FARMACEUTICHE A LUNGA EMIVITA DI MUTANTI DELL'ORMONE DELLA CRESCITA UMANO COVALENTEMENTE CONIUGATI CON POLIETILENGLICOLE

Autori → C. A. Cabras, C. Maullu, F. Caboi, B. Salis, M. Bossi, F. Selis, R. Schrepfer

Ospedale o Istituto → Bio-ker S.r.l. c/o Sardegna Ricerche - Loc. Piscinamanna, Pula (CA)

Inizio testo →

L'ormone della crescita (growth hormone, GH), è una glicoproteina di 191 amminoacidi sintetizzata, accumulata e secreta dalle cellule della adenoipofisi, capace di stimolare lo sviluppo dell'organismo umano. Dal 1985 è autorizzata la somministrazione per il trattamento del nanismo ipofisario nel bambino (GHD), e più recentemente per altre indicazioni terapeutiche quali la sindrome di Turner, insufficienza renale cronica nel bambino, GHD nell'adulto, cachessia nell'AIDS.

La terapia consiste nell'utilizzo dell'ormone ricombinante (r-h-GH) che viene somministrato una volta al giorno; tuttavia tale frequenza risulta particolarmente sconveniente per pazienti in età pediatrica a causa dell'elevato dosaggio, della somministrazione ripetuta per molti anni, della tossicità ed immunogenicità, fenomeni che aumentano la probabilità di un'interruzione prematura del trattamento.

L'obiettivo del nostro lavoro è focalizzato sullo sviluppo di una forma ad azione prolungata di r-h-GH mediante coniugazione della proteina con polietilenglicole (PEG), che consente una diminuzione della clearance renale e quindi una maggiore emivita plasmatica. A tale scopo è stata utilizzata una metodica di PEGhilazione sito specifica realizzata tramite la formazione di un legame covalente stabile tra PEG-maleimmide (peso molecolare 20000 Da) ed un residuo di cisteina libero introdotto, tramite la produzione di diversi mutanti, in aggiunta alle quattro cisteine impegnate in ponti disolfuro. La coniugazione selettiva con PEG-maleimmide nei mutanti ha portato sempre a mono-PEGhilati all'-SH cisteinico con rese variabili in funzione della posizione della cisteina.

Presso i nostri laboratori è stato messo a punto un processo per l'espressione e la purificazione di r-h-GH e suoi mutanti.

L'attività *in vitro* dei derivati PEGhilati, valutata con un test di proliferazione cellulare (Nb2-11), è risultata in tutti i mutanti notevolmente ridotta (4-16%) rispetto alla proteina nativa, mentre i valori di farmacocinetica indicano una maggiore persistenza nei livelli sierici e una aumentata biodisponibilità (AUC). In prove di attività *in vivo*, basate sull'accrescimento del peso nel ratto ipofisectomizzato, due coniugati hanno dimostrato un prolungamento dell'efficacia fino a tre giorni, rispetto alla singola somministrazione della proteina nativa. La riduzione dell'attività *in vitro* viene quindi compensata dall'aumento della biodisponibilità, per cui i coniugati sono da considerare equiefficaci rispetto al h-GH. I risultati ottenuti nel ratto hanno inoltre dimostrato che la singola somministrazione di un mutante coniugato con PEG è equivalente a tre somministrazioni giornaliere della proteina nativa.



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome Orlacchio Aldo..... .ISTITUTO/OSPEDALE Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di
Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche
Indirizzo Ospedale .via del Giochetto, 06126.....Città Perugia.

Tel. 0755852187. Fax 0755852187.CELL..... E mail orly@unipg.it

- Titolo** → **LE CELLULE STAMINALI STROMALI DI MIDOLLO OSSEO UMANE SONO ORIENTATE DA NANOTOPOGRAFIE DI CARBONIO AMORFO IDROGENATO**
- Autori** → F. D'Angelo*, R. Tiribuzi*, I. Armentano**, E. Pennacchi**, J.M. Kenny**, F. Fantasia***, A. Caraffa***, G. Cerulli***, S. Martino* e A. Orlacchio*,
- Ospedale o Istituto** → *Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Perugia.
**Materials Engineering Centre, UdR INSTM, NIPLAB, University of Perugia, Terni.
- Inizio testo** → ***Department of Orthopaedics, University of Perugia, Perugia.
- In questo lavoro abbiamo caratterizzato la biocompatibilità e i fenomeni di *cell guidance* di film nanostrutturati di carbonio amorfo idrogenato (a-C:H) con nanotopografie a canali e griglie per applicazioni nel settore dell'ingegneria tessutale, valutando come parametri di riferimento l'adesione, la proliferazione e il ciclo cellulare delle cellule staminali-stromali di midollo osseo umane (hBMSCs). I film di a-C:H sono stati ottenuti mediante deposizione chimica da fase vapore assistita da un plasma a radio frequenza (rf PECVD), come substrato è stato utilizzato vetro del diametro di 13 mm. Sono stati realizzati film uniformi, e nanotopografie a canali e griglie utilizzando delle maschere di rame. Le proprietà superficiali dei film sottili sono state investigate analizzando morfologia, topografia e energia superficiale, mediante microscopia elettronica (SEM), microscopia a forza atomica (AFM) e misure di angolo di contatto. Le hBMSCs sono state isolate dal midollo osseo di pazienti sani durante interventi protesici, previo consenso informato. Le hBMSCs sono state isolate dalla popolazione eterogenea per adesione dopo 10 giorni di coltura ed espanse. Tutti gli esperimenti sono stati condotti piastrando le cellule direttamente sui coprioggetto rivestiti di a-C:H e coltivate per 3 e 7 giorni. Tutti i film sottili di a-C:H analizzati hanno mostrato una deposizione e rugosità uniforme, inoltre sulle superfici nanotopografiche è stato misurato un rivestimento di 30 nm. Abbiamo scelto dimensioni di lavoro di 40/30 µm (larghezza canali/spazio tra i canali), e 40/20 µm (lunghezza quadrato/spazio tra i quadrati), basandoci su studi precedenti. I nostri risultati hanno dimostrato che la diversa topografia non influenza la proliferazione delle hBMSCs, tuttavia, le superfici nanostrutturate (canali e griglie) orientano le hBMSCs e guidano l'estensione dei loro processi cellulari lungo i canali e intorno ai quadrati di a-C:H, rispetto alle cellule piastrate su film uniformi di a-C:H. Infatti, l'analisi dei processi di adesione cellulare ha dimostrato che le cellule preferiscono aderire al a-C:H piuttosto che alla superficie di vetro. Nel complesso è emerso che le nanotopografie modulano il comportamento delle cellule staminali. Questo progetto è finanziato dal MIUR-FIRB Idea Progettuale RBIP06FH7J_002.



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome: Omiccioli Enrica.

ISTITUTO/OSPEDALE: Diatheva srl

Indirizzo: viale Piceno 137/F Città: Fano (PU)

Tel. 0721 830605.... Fax .0721 837154.....CELL..339 5081227..... E mail enrica.omiccioli@uniurb.it

Titolo→ SVILUPPO DI UN SAGGIO PER LA RILEVAZIONE DI MICRORGANISMI PATOGENI IN REAL TIME PCR

Autori→ E. Omiccioli^b, G. Amagliani^{a,c}, G. Brandi^{a,c}, M. Magnani^{a,e}

^a Centro di Biotechnologie, Università di Urbino, via Campanella 1, 61032 Fano (PU), Italy

^b Diatheva srl, viale Piceno 137/F, 61032 Fano (PU), Italy

^c Istituto di Scienze Tossicologiche, Igienistiche e Ambientali, Università di Urbino, via S. Chiara 23, 61029 Urbino (PU), Italy

^d Department of Biosciences, University of Kent, Giles Lane, Canterbury, CT2 7NJ, UK

^e Istituto di Chimica Biologica "G. Fornaini", Università di Urbino, via Saffi 2, 61029 Urbino (PU), Italy

Ospedale o Istituto→ Diatheva srl

Inizio testo:

Scopi della ricerca: L'attenzione generale sulla sicurezza alimentare è in costante crescita poichè le patologie correlate rappresentano una delle problematiche più diffuse al mondo (Wallace et al., 2000. Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. J Food Prot 63: 807-809). Il consumo di alimenti contaminati ha un notevole impatto sia sulla salute pubblica che sul piano economico; il Centre for Disease Control and Prevention (CDC) valuta che le malattie trasmesse dagli alimenti sono responsabili di circa 76 milioni di casi, con 325000 ospedalizzazioni e 5000 morti ogni anno solo negli USA (Mead et al., 1999. Food-related illness and death in US. Emerging Infect Dis 5: 607-625). Identificare i patogeni responsabili richiede tempi piuttosto lunghi e procedure colturali indaginose, mentre si potrebbero trarre notevoli vantaggi dall'applicazione di metodi molecolari più rapidi. Pertanto, l'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di sviluppare un saggio diagnostico per la rilevazione sensibile e specifica di *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* O157 in Real Time PCR.

Metodi impiegati: Mediante ricerca con strumenti bioinformatici sono state selezionate sequenze di DNA altamente specifiche per le specie patogene ricercate, sulle quali sono stati disegnati primers e probes utilizzando il software Primer Express (Applied Biosystems). Quindi sono stati valutati tutti i parametri di reazione per l'ottimizzazione di un saggio diagnostico in Real Time PCR, dapprima con target singolo e chimica SybrGreen, per la rilevazione separata delle tre specie, quindi in multiplex e chimica TaqMan, per la detection simultanea degli stessi. Il saggio prevederà la presenza di un controllo interno di amplificazione (IAC), costituito da un plasmide ricombinante con i relativi primer (Casabianca et al., 2003. A new one step RT-PCR method for virus quantitation in murine AIDS. J Virol Methods 10: 81-90).

Risultati e conclusioni: Lo studio ha permesso di selezionare nuove sequenze target nell'ambito dei geni *ttrC* (per *Salmonella* spp.), *hlyA* (per *L. monocytogenes*) e *RfbE* (per *E. coli* O157), con elevata specificità. Sono stati ottimizzati tre saggi in Real Time PCR a singolo target per la rilevazione dei patogeni citati, con sensibilità pari a 10⁻¹ CFU. Con l'utilizzo delle sonde TaqMan progettate, potranno essere combinati in una multiplex Real Time PCR con tre target batterici e IAC, necessario per evidenziare eventuali risultati falsi negativi. In questa prima fase è disponibile un saggio duplex per *Salmonella* spp. più IAC, con specificità dimostrata su 49 ceppi batterici e sensibilità pari a 10 CFU. La multiplex Real Time PCR sarà completata con l'introduzione di primer e probes per *L. monocytogenes* ed *E. coli* O157. A tutt'oggi, non siamo a conoscenza di altri metodi molecolari per l'identificazione simultanea dei patogeni citati in Real Time PCR. La presenza del IAC rende inoltre il sistema utilizzabile da laboratori con certificazione di qualità.

Lavoro realizzato nell'ambito del progetto EU FP6 DIAGNOSIS Contr. n. 037212



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome	BETTA Pier-Giacomo		
ISTITUTO/OSPEDALE	S.O.C. Anatomia Patologica Azienda Sanitaria Ospedaliera di Alessandria		
Indirizzo Ospedale	Via Venezia 16	Città	15100 Alessandria
Tel. 0131-206205	Fax 0131-206912	CELL 339-8007413	E mail pgbetta@ospedale.al.it

Titolo → UNA BANCA BIOLOGICA DEL MESOTELIOMA MALIGNO. Una opportunità di ricerca scientifica e di promozione e tutela della salute pubblica.

Autori → S. Orecchia*, M. Salvio*, E. Arnolfo*, A. Patrucco*, N. Gastaldo*, R. Libener*, PG Betta*^o

**Ospedale o Istituto → *S.O.C. Anatomia Patologica. Azienda Ospedaliera Nazionale di Alessandria.
^o Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori – Sezione provinciale di Alessandria**

Inizio testo →

Il mesotelioma maligno pleurico (MMP) è una neoplasia altamente aggressiva del mesotelio pleurico e meno frequentemente peritoneale, la cui incidenza nella maggior parte dei Paesi occidentali è ancora in crescita, seppur ultimamente rallentata, e prevede un picco nel prossimo decennio. La provincia di Alessandria, soprattutto per la presenza nel suo ambito del comune di Casale M.to, sede di un'attività di lavorazione del cemento-amianto dal 1910 al 1975, è tra quelle che maggiormente concorrono ad elevare il livello della mortalità per MMP della pleura in Italia. Per i suoi numeri relativamente piccoli, il MMP è stato praticamente ignorato fino a 10-15 anni or sono. I pazienti sono curati con una varietà di approcci singoli o combinati (chirurgia, radio-chemio- e immunoterapia) e con risultati tuttora per lo più scarsi e poco soddisfacenti (sopravvivenza media 275 gg; sopravvivenza cumulativa 35.9% a 1 anno e 14.2% a 2 anni). Molta ricerca sperimentale e clinica deve essere ancora condotta sul MMP ai fini di una diagnosi più precoce e di una più efficace terapia. All'uopo è apparso di importanza fondamentale disporre di una banca di dati clinici per approfondire la conoscenza della storia naturale della malattia, per valutare meglio i benefici dei vari metodi attuali di trattamento e per verificare l'efficacia delle future nuove terapie. Inoltre, una raccolta contestuale di campioni biologici (tessuti, sangue e liquido di versamento) è inestimabile nella conoscenza della biopatologia del MMP per una più razionale programmazione dei futuri trattamenti. L'operatività della banca biologica istituita prevede: 1. la raccolta, l'identificazione e lo stoccaggio di campioni tissutali tumorali (mediamente circa 40 casi/anno) chirurgici o, prevalentemente, toracoscopici con le informazioni non sensibili ad essi correlate; 2. la raccolta di materiale biologico accessorio di questi pazienti e di soggetti di controllo sani o con patologie pleuro-polmonari benigne, correlate o non alla esposizione all'amianto (versamenti sierosi, sangue in toto, plasma, linfociti del sangue periferico); 3. l'allestimento di culture cellulari primarie e di linee cellulari stabilizzate di MMP a partire dai versamenti sierosi. Il registro dei pazienti con MMP e la banca biologica costituiscono oggi una risorsa per la comunità scientifica e inoltre hanno consolidato il ruolo della locale istituzione sanitaria pubblica nella promozione e tutela della salute, aumentando la percezione di qualità e innovazione scientifica in ambito sanitario da parte della popolazione in un'area ad alto rischio di tumori da amianto. (L'attività della banca biologica è sostenuta finanziariamente, in parte, dalla sezione LILT di Alessandria)

Parole chiave: *Ricerca applicata*



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome: Salis Barbara	ISTITUTO/OSPEDALE: Bio-ker S.r.l.
Indirizzo Ospedale: c/o Sardegna Ricerche Loc.Piscinamanna	Città: Pula (CA)
Tel: 0709251225 Fax: 0709251202 CELL: 3289122181	E mail: b.salis@bioker.it

Titolo → **USO DI TRANSGLUTAMINASI MICROBICA NELLA PEGHILAZIONE DI r-h-G-CSF**

Autori → B. Salis, C. Maullu, M. Sergi, C. A. Cabras, S.Scaramuzza, M.Contis, G. Taylor

Ospedale o Istituto → *Bio-ker S.r.l. c/o Sardegna Ricerche - Loc. Piscinamanna, Pula (CA)*

Inizio testo →
Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor (h-G-CSF) è una glicoproteina ematopoietica di 174 aminoacidi, che stimola la proliferazione e differenziazione dei precursori cellulari in granulociti e attiva la funzionalità dei neutrofili maturi. La forma ricombinante non glicosilata a cui è stato aggiunto un residuo di metionina nella porzione amino-terminale (r-met-h-G-CSF o Filgrastim), nota in commercio come Neupogen®, viene prodotta tramite un sistema di espressione procariotico in *Escherichia coli* e trova impiego in oncologia ed ematologia nel trattamento delle neutropenie severe associate a terapie con chemioterapici. Nei nostri laboratori è stato messo a punto un processo per l'espressione costitutiva di r-met-h-G-CSF in fusione con un residuo di purina nucleoside fosforilasi (PNP) sotto forma di corpi di inclusione. Una volta estratta, la proteina viene successivamente purificata, rinaturata e tagliata nella sua forma biologicamente attiva. Come la maggior parte delle proteine terapeutiche, il r-met-h-G-CSF ha una breve emivita a causa della bassa stabilità e della rapida eliminazione renale; uno dei metodi più efficaci per ottenere un prodotto ad azione prolungata consiste nella coniugazione chimica della proteina con il polietilenglicole (PEG). Le proteine PEGhilate hanno un miglior profilo farmacocinetico e ciò consente una riduzione del numero di somministrazioni nel paziente. Nel caso del r-met-h-G-CSF, la modifica con il PEG di peso molecolare di 20000Da ha dato luogo a un prodotto commercializzato come Neulasta®, in cui una catena di PEG è stata legata per via chimica all'aminoacido N-terminale della proteina. Nel nostro caso si è studiata la PEGhilazione del r-met-h-G-CSF attraverso una reazione enzimatica catalizzata da una transglutaminasi batterica (mTGase). È stato osservato che mTGase catalizza la coniugazione di una singola catena di PEG con una delle 17 glutamine presenti. Per individuare il sito di PEGhilazione nella proteina nativa e per studiare nuovi possibili siti di attacco da parte dell'enzima, sono stati prodotti diversi mutanti di r-met-h-G-CSF mediante sostituzione di alcuni residui aminoacidici. I mutanti sono stati realizzati tramite mutagenesi sito-specifica, le proteine sono state purificate ed è stata valutata la resa di PEGhilazione. In base ai risultati ottenuti abbiamo individuato che la reazione di PEGhilazione avviene nel residuo di glutamina 135 ed abbiamo trovato altri mutanti di r-met-h-G-CSF in grado di subire mono PEGhilazione per via enzimatica.



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome : SCHIROSI LAURA ISTITUTO/OSPEDALE: Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia- Azienda Policlinico- Sez. di Anatomia Patologica
Indirizzo Ospedale: VIA DEL POZZO, 71 Città: MODENA (CAP.41100)
Tel.: 059-4223297. Fax: 059-4223313 CELL.: 338-4259447 E mail: laura.schirosi@unimore.it

Titolo →

**STUDIO MOLECOLARE DI MELANOMI PRIMITIVI MEDIANTE
MULTIPLEX-LIGATION DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)**

Autori →

L Schirosi, N Bigiani, G Sartori, A Maiorana

Ospedale o Istituto →

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia-Sez. di Anatomia Patologica, Modena

Inizio testo →

I complessi meccanismi eziopatogenetici alla base del melanoma cutaneo (MC) rendono difficile l'identificazione di alterazioni molecolari riproducibili, responsabili della tumorigenesi e dello sviluppo di metastasi, che possono altrettanto influenzare la scelta di terapie più mirate ed efficaci ed un'accurata valutazione prognostica. Uno dei loci genici maggiormente coinvolti (deleto in circa il 20% dei MC) è il 9p21, a livello del quale mappano diversi geni, che codificano per proteine oncosoppressori, tra cui *CDKN2A* che codifica sia per la proteina INK4a (p16) che per ARF (p14), *CDKN2B* (p15) e *MTAP* (metiltioadenosina fosforilasi) che codifica, invece, per un enzima coinvolto nella sintesi delle poliamine, la cui perdita di funzione compromette lo stato di risposta alla terapia con interferone. **Scopo della ricerca:** Il presente studio è stato svolto con l'obiettivo di riuscire a caratterizzare in modo preciso le alterazioni del numero di copie dei principali geni situati nel locus 9p21, in un piccolo gruppo di MC, avvalendosi di una recente tecnica di biologia molecolare, la Multiplex-Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) (Schouten et al.,2002). **Metodi impiegati:** Sono stati analizzati 19 casi di MC, fissati in formalina ed inclusi in paraffina, con il Kit SALSA MLPA P024 9p21 (MRC Holland) che consente di indagare l'alterazione del numero di copie di 39 sequenze di acido nucleico in una singola reazione, di cui 24 corrispondono ai principali geni del locus 9p21 (tra cui *CDKN2A*, *CDKN2B* e *MTAP*). Questo metodo si basa sull'ibridazione di sonde specifiche con le corrispondenti sequenze di DNA genomico, seguita poi da una PCR multiplex delle sonde ibridizzate e successiva analisi semiquantitativa dei prodotti di amplificazione (van Dijk et al.,2005; <http://www.mlpa.com>). **Risultati e conclusioni:** 6 casi su 19 sono risultati alterati. In particolare, 2 casi presentano delezione del gene *CDKN2A*, 1 caso è deleto sia per il gene *CDKN2A* che *CDKN2B* mentre 3 casi evidenziano contemporaneamente la delezione dei geni *CDKN2A*, *CDKN2B* e *MTAP*. Questa tecnica risulta di facile applicazione, grazie anche all'utilizzo di pochi ng di DNA (da 50 a 200ng), fornisce in una singola reazione informazioni sull'assetto di più geni in tempi brevi (48 ore) e con costi contenuti (circa 20 euro a reazione). Per queste caratteristiche, l'MLPA appare una metodica ottimale per ottenere una caratterizzazione dettagliata del locus 9p21 nei MC. I risultati ottenuti possono certamente assistere il clinico in una valutazione prognostica migliore della neoplasia e soprattutto rappresentare un parametro importante nella scelta mirata del trattamento terapeutico nel singolo paziente.



RECAPITO PER LA CORRISPONDENZA

Cognome e Nome Scicchitano Vittoria ISTITUTO/OSPEDALE Dip.Patologia Sperimentale-Università di Bologna
Indirizzo Ospedale via San Giacomo 14 Città Bologna
Tel 051/2094700 Fax 0512094746 CELL 3205544379 E mail vittoria_sc82@libero.it

Titolo →

ENDOCITOSI E TRAFFICO INTRACELLULARE DELLA SAPORINA-S6

Autori →

V Scicchitano¹, L Polito¹, G Pasquinelli¹, M Bortolotti¹ e MG Battelli¹

Ospedale o Istituto →

¹Dipartimento di Patologia Sperimentale, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Italia

Inizio testo →

Le *ribosome-inactivating proteins* (RIP) sono proteine vegetali con attività *N*-glicosidasica, che depurinano l'RNA della subunità 60 S dei ribosomi, bloccando le sintesi proteiche e provocando la morte cellulare. Inoltre, le RIP depurinano anche il DNA e sono pertanto delle polinucleotide glicosilasi. Le RIP sono distinte in due tipi: tipo 1, monocatenarie e tipo 2, costituite da una catena ad azione catalitica ed una lectinica che media il legame alle cellule. La maggior parte della letteratura disponibile sul traffico intracellulare delle RIP riguarda quelle di tipo 2, in particolare la ricina, mentre relativamente poco è noto sulle RIP monocatenarie. Queste ultime, tra cui è classificata la saporina-S6, possiedono una tossicità molto bassa, quando non vengono veicolate su un bersaglio cellulare da uno specifico carrier. Sono quindi particolarmente interessanti ai fini della costruzione di immunotossine a scopo terapeutico.

Scopo di questo studio è acquisire informazioni relative alla modalità di ingresso e al destino intracellulare delle RIP monocatenarie, in particolare della saporina-S6, all'interno delle cellule. Sono stati effettuati studi su cellule HeLa mediante immunofluorescenza indiretta e con microscopia elettronica.

Le analisi di immunofluorescenza, eseguite al microscopio confocale, mostrano una colocalizzazione del 30% tra la saporina e il marcatore del RER e del 7% tra la RIP e il Golgi. Alcuni *spots* fluorescenti sono presenti anche nel nucleo, tuttavia questo dato non può confermare l'eventuale presenza della RIP nell'area nucleare, a causa dei limiti di risoluzione della microscopia confocale.

La valutazione al microscopio elettronico del destino intracellulare della RIP viene effettuata sia con esperimenti di *pre-embedding*, che prevedono l'uso del coniugato saporina-oro, sia con un metodo di immunoelettroscopia indiretto, *post-embedding*. I risultati in entrambi i casi dimostrano che la RIP viene internalizzata in endosomi. La saporina-S6 prosegue il suo percorso intracellulare e si localizza in prossimità del nucleo e delle cisterne perinucleari del RER, racchiusa all'interno di vescicole lisosomiali. Gli esperimenti di *post-embedding* hanno inoltre mostrato la presenza, nel 10% delle cellule intossicate, di molecole d'oro nel nucleo, localizzazione mai osservata negli esperimenti di *pre-embedding*. Questo dato suggerisce che il legame della RIP all'oro ne altera il *routing*. Inoltre, la presenza della saporina-S6 nel nucleo suggerisce che il danno al DNA può rappresentare uno dei meccanismi attraverso cui queste proteine uccidono le cellule, in particolare inducendo la morte apoptotica DNA-dipendente.