

Una ricerca approfondisce gli aspetti clinici ed eziopatogenetici che sono alla base di una delle complicanze più frequenti del diabete in gravidanza: la macrosomia fetale e neonatale, discriminando la macrosomia dovuta a determinanti genetici da quella dovuta realmente agli effetti della patologia glico metabolica materna in gravidanza. Tale studio si propone di individuare parametri biochimici e biofisici atti ad identificare precocemente le anomalie della crescita feto-neonatale, definizione di protocolli di assistenza alla gravida diabetica, ed auxologici neonatali con programmazione della nutrizione neonatale volta ad una profilassi dell'obesità. È stata completata la raccolta di un primo gruppo di dati biometrici fetali su 159 rilievi considerato come controllo. Analogamente sono in via di raccolta i dati di pazienti affetti da diabete mellito. Sono stati prodotti i primi valori delle curve di crescita fetale del gruppo di controllo. Il metabolismo materno è stato valutato attraverso l'emoglobina glicosilata, quello fetale attraverso il dosaggio del peptide C plasmatico fetale. Sono iniziati i controlli longitudinali neonatali.

Gli studi sull'obesità infantile si propongono di approntare protocolli diagnostici, e classificativi innovativi per prevenire e classificare l'obesità; di studiare i soggetti a rischio e di determinare la necessità effettiva dell'apporto calorico giornaliero, proporzionato alla spesa energetica ed alle necessità del bambino obeso. Si concentra l'attenzione sullo studio del metabolismo a riposo, della termogenesi indotta dalla dieta e del quoziente respiratorio mediante calorimetria indiretta in bambini obesi. Lo studio prevede il campionamento di due distretti scolastici con randomizzazione di bambini prepuberi, normopeso e obesi. Sul campione selezionato è stata rilevata l'anamnesi alimentare, dell'attività fisica abituale, le misurazioni antropometriche, il metabolismo a riposo con calorimetria indiretta.

L'identificazione dei marker precoci a rischio per obesità viene prevista attraverso impedenziometria, plicometria, circonferenze corporee ed altre misure antropometriche. Allo scopo è stato estratto dalla popolazione scolastica romana un campione di 1717 casi validi sui quali sono stati valutati dati antropometrici e valore impedenziometrico; su 558 casi è stata valutata una inchiesta alimentare.

Infine un campione di circa 400 bambini è stato arruolato per la valutazione longitudinale delle caratteristiche antropometriche. Si è verificato su 108 soggetti seguiti longitudinalmente dall'età di 9-10 anni i dati auxologi e di impedenziometria totale e parziale (braccia, gambe, tronco). Sono stati avviati studi per il bilancio energetico, l'assorbimento dei grassi, l'assorbimento e ritenzione di azoto, l'assorbimento dei carboidrati, l'assorbimento e la ritenzione degli oligoelementi, test dinamici ormonali. È stata messa a punto una metodica di studio delle interazioni tra obesità materna e neonatale ed accrescimento post-natale, attraverso la misurazione ecografica degli strati di tessuto adiposo in varie sedi attraverso la messa a punto della metodica in maniera da ridurre la variazione intra ed interoperatore.

Infezioni, immunologia e trasmissibilità: un obiettivo di ricerca è il rilevamento di antigeni del complesso TORCH attraverso metodiche immunoenzimatiche e di fluorimetria nel liquido amniotico e/o annessi embrionali in rapporto alla patologia immune specifica materna, fetale e neonatale. È stato effettuato uno screening a random per rilevare le IgM sieriche specifiche anticitomegalovirus in sieri funicolari da neonati e nei sieri delle rispettive madri. Si è rilevata una elevata e preoccupante percentuale di positività nei sieri dei neonati. Analizzando con immunoblot le proteine immunogene che avevano dato positività per le IgM specifiche anti CMV, si è evinto che i sieri funicolari sviluppano anticorpi contro due

proteine che non risultano immunogene nei confronti delle madri. Questi dati, controllati su casistiche più ampie, potranno essere utili in sede di diagnosi prenatale di infezione da CMV in utero, e le proteine immunogene solo per il feto potrebbero essere scelte quali proteine d'elezione per la preparazione degli anticorpi monoclonali dei kit diagnostici. Ci si propone di chiarire le correlazioni esistenti tra trasmissibilità dei microorganismi cariogeni nel bambino e nei genitori allo scopo di accettare l'esistenza di meccanismi immunologici deficitari trasmessi verticalmente. Si è valutata nel primo anno di attività la tecnica del deep-slide dello streptococco mutans con dei kit attualmente disponibili. La valutazione semiquantitativa è stata condotta su un primo gruppo campione di 22 bambini e dei loro genitori. Un altro obiettivo riguarda lo studio delle infezioni ospedaliere associate a procedure invasive nei centri di terapia intensiva neonatale, valutando la stima dei rischi attribuibili a ciascun trattamento, la stima della percentuale di infezioni ospedaliere prevenibili attraverso la riduzione delle procedure invasive non necessarie e la stima dei costi associati alla insorgenza di infezioni. È stato definito un protocollo per la prevenzione delle infezioni ospedaliere da adottare in tutti i centri partecipanti.

Si accentrano le ricerche, anche, sulle infezioni materno fetali e sul miglioramento delle possibilità diagnostiche in tema di rosolia congenita, infezione da CMV, da virus della varicella, da parvovirus, da Chlamydia, studiate attraverso tecniche di ibridazione DNA e PCR. Sono stati testati per anticorpi IgM ed IgA verso il Cytomegalovirus (CMV) 152 campioni di siero ottenuti da 71 lattanti escretori di CMV e 163 campioni di siero da 97 lattanti non escretori, ma che mostravano segni e/o sintomi di malattia citomegalica congenita. Sono stati usati un metodo immunoenzimatico sperimentale (CMV-MA-EIA) ed un ELISA a

cattura. Nei bambini CMV-positivi gli anticorpi IgM furono evidenziati più frequentemente delle IgA ($p < 0,001$) nei sieri ottenuti entro il 10 mese di vita, mentre gli anticorpi IgA risultarono prevalenti ($p < 0,05$) nei sieri prelevati successivamente. Nei soggetti, invece, con colture negative gli anti corpi IgA furono evidenziati più frequentemente delle IgM, sia nei sieri ottenuti entro il 10 mese di vita, che in quelli prelevati dopo. In 21 bambini negativi, sia alla coltura del CMV che al dosaggio di anticorpi IgM CMV-specifiche, la presenza di IgA specifiche è risultata un dato diagnostico precoce confermato dalla successiva elezione di IgG e di Ig totali CMV specifici che. Infine si sta sviluppando l'applicazione di un nuovo metodo immuno enzimatico per la valutazione dei livelli circolanti di inibina nell'ovulazione indotta. Si sono caratterizzati e prodotti gli anticorpi antiinibina umana attraverso metodiche sperimentali nel topo. Si sta procedendo alla messa a punto e alla valutazione di un nuovo metodo immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo dell'inibina umana attraverso una competizione del complesso peptide enzima con l'inibina del campione verso l'anticorpo monoclonale prodotto.

Sottoprogetto 8. Linee di ricerca:

- Sindromi trombotiche;
- Cardiopatia ischemica;
- Ipertensione arteriosa;
- Miocardiopatie;
- Patologia cardiopolmonare.

Sindromi Trombotiche: per quel che riguarda le interazioni tra lipidi e sistema coagulatorio sono state validate le metodiche di laboratorio ed è iniziato il reclutamento dei pazienti dislipidemicici. Inoltre in relazione alle interazioni tra leucociti e piastrine si sono messe a punto e validate le metodiche di laboratorio. Si è definito un protocollo per test da sforzo ed iniziato lo studio di

volontari sani.

Cardiopatia Ischemica: ci si occupa dello stress ossidativo miocardico e degli effetti della PTCA. è stato messo a punto e validato le metodiche di laboratorio per lo studio della lipoperossidazione miocardica, del glutathione ridotto ed ossidato nel plasma e negli eritrociti. È a buon punto la realizzazione di uno strumento ESR a bassa frequenza e di uno spettrometro NMR per lo studio di cuori di ratto e miocellule isolate. È stato avviato il reclutamento della casistica di pazienti sottoposti a PTCA. è stato messo a punto un metodo per lo studio del metabolismo miocardico mediante SPET e gammacamera rotante. Sono in corso di sviluppo protocolli per l'acquisizione ed il confronto di dati da tomografi diversi (SPET, PET, RM). è iniziato il reclutamento di pazienti coronaropatici per lo studio del flusso coronarico a riposo e sotto sforzo statico e quello della casistica, costituita da pazienti sottoposti a trapianto cardiaco ortotopico, affetti da malattia di Chagas e patologia neurologica primaria, nella quale eseguire registrazioni Holter. È stata altresì iniziata l'analisi spettrale delle registrazioni e predisposto un software dedicato.

Ipertensione Arteriosa: si sta procedendo a trasferire gli algoritmi per l'analisi spettrale a personal computer, di più larga disponibilità. Al tempo stesso è in corso il reclutamento della casistica per il confronto della variabilità pressoria circadiana con quella prodotta da stimoli specifici eseguito in laboratorio. Si è verificato il comportamento delle catecolamine plasmatiche e della dopamina circolante durante test ergometrici nei soggetti normali. è iniziata la valutazione della risposta dei soggetti ipertesi. È iniziato lo studio della perfusione miocardica con PET in condizioni basali, dopo dipiridamolo e dopo pacing atriale massimale, in 20 pazienti ipertesi.

Miocardipatie: sono state approntate cartelle

cliniche, data base, protocolli diagnostici e terapeutici, in corso di validazione, per le miocardiopatie primitive dilatative ed aritmogene. è stata raccomandata, ma ancora non avviata, la standardizzazione della raccolta dei dati, per consentire la creazione di data base ampi e confrontabili. è a buon punto lo studio della regolazione della secrezione del ANF nell'animale da esperimento, nel soggetto sano e nel paziente con cardiopatia in scompenso. È stato messo a punto un protocollo per lo studio della capacità funzionale nella valutazione della gravità e della prognosi del paziente con miocardiopatia dilatativa. Si sta studiando un modello sperimentale animale di infezione da virus Coxackie B3. Nel frattempo sta raccogliendo materiale biotipico umano su cui ricercare, dopo amplificazione con la tecnica del Polymerase Chain Reaction, sequenze RNA e DNA virali.

Patologia Cardiopolmonare: si è completata la messa a punto delle metodiche di studio in vitro della risposta piastrinica, del metabolismo del fosfatidilino sitolo, della regolazione della fosfolipasi A2 e C della membrana piastrinica. Inoltre si è iniziato l'arruolamento dei pazienti con insufficienza respiratoria cronica. Si sono stabiliti i protocolli diagnostici e terapeutici da applicare ai pazienti con embolia polmonare acuta ed avviato la raccolta di un data base da cui valutare i principali fattori di rischio della embolia polmonare. Al tempo stesso sta studiando un modello sperimentale animale di edema polmonare lesionale. è stato allestito un protocollo diagnostico e terapeutico per i pazienti con patologia disventilatoria nel sonno ed è stato messo a punto un ergometro statico e dinamico per lo studio della fisiopatologia cardiocircolatoria e respiratoria.

Sottoprogetto 9. Linee di ricerca:

- Sintesi di nuovi farmaci;
- Sviluppo di nuove terapie;
- Monitoraggio clinico-epidemiologico di popolazioni a

rischio.

Sono state valutate l'attività antiretrovirale di 30 ansamicine (composti derivati dalle rifamicine) di cui sono risultati più attivi, in termini di capacità inibente, la trascrittasi inversa di M-MLV, RAV-2 e HIV-1, alcuni derivati aventi come sostituenti alchilamine, idrazoni e ossime, e quelli che presentano su una catena laterale basi nucleiche modificate; questi ultimi inol tre hanno dimostrato una minore tossicità su linee di natura linfoblastoide (H9). Parte dell'attività di ricerca è stata finalizzata alla produzione di alcuni (23) derivati pirimidinici di cui 15 hanno dimostrato possedere una buona attività in vitro contro HIV con una ED90 compresa tra 2,5 e 0,8 microgrammi/ml e una dose tossica superiore a 200 microgrammi/ml.

È stato prodotto, purificato e saggiato oligonucleotidi anti-rev e anti-gag fosforotioati che hanno dimostrato una notevole capacità di inibire la replicazione di HIV in colture cronicamente infette. Minore attività antiretrovirale hanno dimostrato possedere alcuni desossinucleotidi ciclici; attualmente si sta procedendo alla sintesi di oligomeri antisenso contro le sequenze VPR, VIF, REV, e NEF del virus. Si sono prodotti plasmidi contenenti il gene tat o rientato in senso e anti-senso con l'intento di ottenere cloni di cellule delle linee 293 e Jurkat, esprimenti tat, da utilizzarsi per studiare l'inibizione della funzione del gene tat, nonché l'effetto transattivante che esso possiede nei confronti di altri geni cellulari codificanti per alcune linfocine, o nei confronti di oncogeni.

Si è prodotto, purificato e verificato l'attività di sequenze della glicoproteina 120 di HIV a partire da 3 differenti ceppi virali (uno di laboratorio e 2 isolati selvaggi), dimostrando per alcuni di questi peptidi un'elevata capacità di potenziare l'infettività di HIV su cellule della

linea H9. L'attività di ricerca di questa unità ha portato inoltre alla sintesi di sequenze della molecola CD4 che inibiscono in vitro l'infezione da HIV in linee suscettibili e non hanno mostrato attività citotossica. Si è prodotto e testato l'efficacia di 2 oligopeptidi corrispondenti ai residui (37-53) e (37-55) del domain V1 di CD4 che alla concentrazione di 10 microg/ml mostravano una notevole attività inibitoria sull'infezione da HIV-1, dimostrata l'assenza di produzione di p24 e di trascrittasi inversa nel sovrannatante delle colture saggiate. Si è proceduto alla purificazione e al lavoro di caratterizzazione di una glicoproteina a basso P.M. isolata dal plasma seminale, capace di legarsi alla molecola CD4; si è prodotto e purificato anticorpi monoclonali contro la proteina gp41 di HIV potenzialmente utilizzabili sia per saggi farmacologici che per l'allestimento di metodiche diagnostiche per il rilievo di anticorpi sierici.

Per quanto riguarda i saggi di attività-tossicità in vitro di nuovi composti si sono realizzati servizi per screening farmacologico. Rientrano nelle tematiche di questo obiettivo alcune metodologie di reverse-transcription-polymerase chain reaction (PCR) quantitativa per il dosaggio di RNA genomico extracellulare in colture infette. Si sono individuate, mediante test in vitro, nuove molecole potenzialmente attive contro HIV e alla valutazione dell'attività di associazione di farmaci e citochine: delle molecole testate si sono dimostrati efficaci alcuni farmaci inibitori di superficie (CD4 solubile, immunoglobuline), alcuni inibitori della trascrittasi inversa (9-(2-fosfonil-metossietil)adenina e alcuni dideossinucleosidi) e antineoplastici come l'adriamicina; per quanto riguarda la valutazione di efficacia di associazioni farmacologiche è stato dimostrato un potenziamento dell'attività della zidovudina da parte di GM-CSF. è stato realizzato un modello

animale per lo studio dell'attività immunofarmacologica di composti attivi contro HIV ed uno studio di farmacocinetica della zidovudina confrontando un gruppo di pazienti con AIDS epatopatici con un gruppo di pazienti con AIDS e senza epatopatia dimostrando solo modeste e non significative differenze nella farmacocinetica della zidovudina tra i 2 gruppi.

È in corso di realizzazione uno studio multicentrico per la valutazione dell'uso della zidovudina in una popolazione di sieropositivi asintomatici ad alto rischio; è stato portato a termine un primo studio pilota per la verifica dell'efficacia dell'associazione zidovudina - interferon - timosina alfa1 in HIV- sieropositivi asintomatici. I risultati, sebbene preliminari, indicano come potenzialmente vantaggioso il trattamento combinato. È in corso la validazione un questionario di carattere epidemiologico, sociale e psicologico, di cui lo studio di una popolazione di ben 1532 tossicodipendenti sieronegativi ha permesso di ottenere dati sull'incidenza dell'infezione da HIV, che nella popolazione suddetta è stata di 3,7 per 100 persone anno tra i maschi eterosessuali, di 4,5 tra le donne e 11,4 tra i maschi omosessuali, e sui fattori a maggior rischio di sieroconversione, che in questo studio sono stati individuati nell'età più giovane, nella tossicodipendenza recente o occasionale, nello scambio di siringhe e nell'essere partner sessuale di un soggetto sieropositivo. Sono disponibili dati preliminari sull'evolutiveità dell'infezione in 2 coorti di soggetti (una costituita da eterosessuali e una da tossicodipendenti), nell'ambito di studi finalizzati all'individuazione dei parametri clinico-laboratoristici di significato prognostico sul rischio di progressione di malattia e dell'efficacia di trattamenti antivirali. È stata sviluppata una tecnica di analisi sierologica time resolved fluoro-immunoassay utilizzando come antigeni peptidi sintetici

prodotti dalla stessa U.O.; questa metodica è applicabile per la diagnosi precoce di figli di madri infette, e sarà applicata anche in gruppi di soggetti sieronegativi con positività per la PCR. Sono terminati gli studi di standardizzazione di una tecnica per il monitoraggio della produzione in vitro di anticorpi HIV-specifici che potranno essere applicati negli studi di bambini sieronegativi nati da madri sieropositive, o di soggetti a rischio sieronegativi. Si sono studiati i fattori immunologici correlati con la progressione in AIDS di un gruppo di tossicodipendenti sieropositivi: la riduzione del numero dei CD4+, la presenza della p24 sierica e l'aumento delle beta 2 microglobuline sono correlati con un' aumentata possibilità di evoluzione in AIDS, mentre la presenza degli anticorpi anti-NEF riduce il rischio di progressione; questa U.O. sta inoltre studiando una popolazione di 1195 tossicodipendenti sieronegativi al fine di poter acquisire in formazione sui parametri immunologici predittivi del maggior rischio di acquisizione dell'infezione. È stata finalizzata alla realizzazione di questo obiettivo anche parte dell'attività volta alla standardizzazione della metodica della reverse-transcription-PCR semiquantitativa per la valutazione del RNA genomico di HIV nel plasma di pazienti sieropositivi e alla metodica di titolazione della viremia plasmatica da HIV, entrambe infatti potrebbero trovare valido impiego sia nel monitoraggio clinico che terapeutico di soggetti HIV- sieropositivi.

Attività di divulgazione dell'informazione e di trasferimento dei risultati.

Per quanto attiene alle iniziative riguardanti l'informazione ed il trasferimento dei risultati, vanno ricordati:

- Il Convegno di presentazione del Progetto (14/15 febbraio);
- Il Convegno del SP1: "La malnutrizione: ricerca e valutazione

clinica" (10/11 maggio);

- La Consensus Conference "Obesità e salute" (Roma 5/6 aprile). La conferenza, promossa dalla Direzione del PF FATMA, unitamente all'Unione Italiana contro l'obesità ha avuto l'attiva collaborazione del Coordinatore del Sottoprogetto 1 Alimentazione, nonché quella delle UU.OO. che in Sottoprogetto 1 si occupano di Obesità;
- La Giornata di Studio su "Stress, management e complessità: quadro di riferimento, ipotesi e metodologie per le indagini empiriche" (12 settembre);
- La riunione scientifica del SP4: "Metodologie ed obiettivi del sottoprogetto Stress" (Siena 1/2 luglio);
- Le due giornate di studio su "Linguaggio e sordità" e "La televisione per i sordi: pagina 777. Problemi e prospettive" (11/12 ottobre) organizzate in collaborazione con due importanti utenti finali: la RAI e l'Olivetti ed il coinvolgimento di alcune USL e del Ministero della Pubblica Istruzione;
- Il Convegno, nell'ambito del SP3: "Nuove metodologie nella diagnostica microbiologica" (Roma 6 dicembre).

È in fase di proposizione una FATMA-Newsletter, già prevista nel Programma triennale.

Attività di formazione.

Sono state assegnate n.108 borse di studio presso Organi di ricerca CNR, Università ed Altri enti con questa ripartizione per Sottoprogetto (SP1: n.10; SP2: n.16; SP3: n.7; SP4: n.14; SP5: n.6; SP6: n.13; SP7: n.17; SP8: n.17; SP9: n.8).

Sono previsti Corsi di formazione in alcuni settori di ricerca (Medicina Preventiva ed Epidemiologia in Odontoiatria ecc.).

Progetto Finalizzato - Ingegneria genetica.

Direttore: Prof. Glauco Tocchini Valentini

Le finalità so di affinare la tecnologia del DNA ricombinante ha assunto negli ultimi anni un ruolo determinante per la salute ed il benessere del genere umano. L'obiettivo preminente del Progetto Finalizzato è quello di fornire al Paese le conoscenze e le tecnologie indispensabili allo sviluppo di numerose iniziative esistenti o in corso di progettazione che richiedono le applicazioni proprie dell'Ingegneria Genetica, contribuendo in modo determinante alla preparazione e al perfezionamento di personale a livelli diversi. L'avanzamento delle conoscenze nell'ambito dei cinque Sottoprogetti porterà ad ulteriori progressi nel clonaggio e nel sequenziamento di geni, all'approfondimento delle conoscenze dei meccanismi di espressione ed amplificazione di una serie di prodotti utili all'uomo, sviluppando le metodologie e le strategie più opportune. Due specifici sottoprogetti riguardano, in un caso, la comprensione, la diagnosi e la cura di malattie, incluse quelle ereditarie, nell'altro caso lo studio ed il sequenziamento di una porzione del genoma umano.

Durata: 1991 - 1995

Il Progetto è articolato nei seguenti Sottoprogetti:

Sottoprogetto 1 - Nuovi vettori.

È dedicato produzione e manipolazione di vettori procariotici, per eucarioti semplici e per eucarioti superiori.

Sottoprogetto 2 - Espressione ed amplificazione.

È dedicato allo studio delle sequenze e delle proteine coinvolte nella regolazione della espressione genica, negli organismi procariotici, eucariotici superiori e microorganismi

eucariotici.

Sottoprogetto 3 - Ingegneria genetica degli organismi eucariotici.

È dedicato al miglioramento degli organismi eucariotici, costruzione di genoteche in cellule eucariotiche e costruzione di organismi transgenici.

Sottoprogetto 4 - Malattie ereditarie.

È dedicato all'analisi molecolare delle malattie ereditarie con difetto noto ed a difetto sconosciuto.

Sottoprogetto 5 - Mappaggio e sequenziamento del genoma umano.

È dedicato al sequenziamento con l'uso di tecniche genetiche della regione specifica Xq24-qter del genoma umano.

Stato di avanzamento 1991 (Primo anno di attività).

Risultati ottenuti.

L'attività di ricerca dei cinque Sottoprogetti in cui si articola il PF ha avuto inizio il 1 gennaio 1991. Il Sottoprogetto 5, "Mappaggio e sequenziamento del genoma umano" segue il progetto strategico dedicato allo stesso argomento.

Nel corso del 1991 sono stati messi a punto sistemi di espressione di geni umani di particolare interesse in batteri ed in lievito. In particolare è stato dimostrato che recettori umani, che attraversano sette volte la membrana, sono assemblati correttamente nella membrana di *E.coli* e *S.cerevisiae*. Questi sistemi possono trovare impiego nello screening di composti, per la selezione di farmaci specifici per un dato tipo recettoriale.

Sono state caratterizzate numerose sequenze regolative di geni procariotici ed eucariotici e studiata la loro interazione con fattori proteici specifici, per chiarire le leggi che governano l'espressione spazio-temporale. Alcuni di questi studi possono risultare particolarmente rilevanti per il chiarimento della base molecolare di malattie dei sistemi

immunitario e nervoso e della crescita tumorale.

Vari laboratori hanno messo a punto la tecnologia per la costruzione di topi transgenici ed alcuni di essi si sono impegnati nella costruzione di sistemi per la ricombinazione omologa ed il gene-targeting. Da alcuni di questi studi possono risultare modelli animali utili nello studio di particolari malattie dell'uomo e nella diagnostica.

Alcune Unità Operative sono state impegnate nello studio molecolare di RNA, per chiarire le regole che governano le interazioni con le proteine ed il processo di folding. Da questi studi, mediante l'utilizzo di metodi tipo "selex" può risultare la sintesi di particolari sequenze di RNA, capaci di riconoscere specificamente determinati ligandi.

Numerose Unità Operative sono state impegnate nella caratterizzazione dei determinanti genetici di alcune malattie ereditarie monogeniche e poligeniche.

È proseguito inoltre lo studio della regione q24-qter del cromosoma X umano. Alcune Unità hanno prodotto risultati particolarmente innovativi, utilizzabili per il miglioramento dei cloni ed il mappaggio in generale.

Con riferimento ai singoli Sottoprogetti si riportano nel seguito i risultati maggiormente significati e rispondenti agli obiettivi prefissati.

Sottoprogetto 1.

Il Sottoprogetto 1 si propone di indurre lo sviluppo di metodiche di clonaggio di geni omologhi ed eterologhi in una varietà di sistemi cellulari procariotici ed eucariotici, utilizzando una vasta gamma di strategie di clonaggio e di ospiti. Queste strategie di clonaggio permettono di contribuire in modo determinante ad obiettivi delle scienze biologiche applicate, quali la produzione per via fermentativa di sostanze di interesse alimentare e farmaceutico, compresi nuovi tipi di vaccini, e la correzione di difetti genetici di organismi superiori.

Alcune Unità Operative studiano i meccanismi con i quali i geni sono espressi, i meccanismi con cui proteine di fusione vengono secrete e i meccanismi di traduzione allo scopo di ottimizzare l'espressione dei geni clonati. Sono stati anche costruiti una serie di vettori di espressione che permettono la sintesi controllata di notevole quantità delle proteine rop e ferritina e sono stati costruiti e caratterizzati una serie di mutanti per identificare la regione di queste proteine che possono tollerare modificazioni ed inserzioni.

È stato modificato il gene codificante per una tossina, la recina, in maniera tale da poterlo esprimere in streptococco allo scopo di costruire vaccini vivi ricombinanti.

Per il tema vettori per eucarioti semplici sono stati clonati, inseriti ed espressi in *Saccharomyces diastaticus* il gene STAI codificante per la proteina glucoamiliasi II (GA) ed il gene cosificante per la Beta-galattosidasi di *Escherichia coli*. È in corso lo studio della produzione di queste proteine e la capacità di *Saccharomyces* di secernele nel terreno di coltura. Sono stati ottenuti risultati sui meccanismi molecolari di amplificazione del DNA in lieviti e mammiferi mediante il sistema modello del gene *mdr1* in cellule linfoblastoidi umane.

L'attività delle Unità Operative appartenenti al tema vettori per eucarioti superiori, è stata concentrata sulla messa a punto di metodi di clonaggio in alcuni sistemi di eucarioti superiori e cellule in coltura. La comprensione del meccanismo di origine della replicazione è essenziale per lo sviluppo di vettori capaci di persistere in cellule di organismi superiori ed in particolare umane. È stata studiata pertanto l'origine della replicazione del DNA umano ed i rapporti tra tale processo e la trascrizione, sono stati analizzati i prodotti genici interessati alla regione di

origine ed il ruolo di interazione DNA-proteine nell'origine della replicazione. Sono stati infine studiati plasmidi e vettori lineari eucariotici mediante l'isolamento e lo studio di telomeri, centromeri e sequenze di origine della replicazione da uomo e da topo. È stato isolato un frammento di DNA che viene replicato nella prima ora della fase S della mitosi; la sequenza è stata studiata nel suo contesto genomico, ed è stato dimostrato che la regione cromosomica che la contiene è attivamente trascritta. Usando una coltura cellulare ottenuta da un paziente con malformazioni multiple che contiene un mini cromosoma umano, questo è stato clonato ed è stato dimostrato che deriva dalla regione p13-cen del cromosoma 9. Il promotore per il gene delle metallotionine umane può diventare molto importante per vettori di espressione nei mammiferi; i risultati ottenuti indicano che è una proteina di circa 150.000 Daltons che interagisce con il promotore.

Sottoprogetto 2.

Il Sottoprogetto 2 ha affrontato una serie di problematiche relative alla espressione genica e alla plasticità del genoma principalmente negli organismi eucariotici. Risultati significativi sono stati ottenuti da diverse Unità Operative (U.O.) sulla regolazione dei geni di numerosi fattori di crescita (IGFII, TGF- 1, 4GM-CSF) degli interferoni e di alcune interleuchine umane. Gli studi sulla tessuto-specificità dell'espressione genica hanno riguardato i geni delle ferritine, degli enzimi delle glicosilasi, delle RNasi e dei geni epatici cosiddetti di fase acuta, in fegato, nel tessuto nervoso, nel pancreas e in linee cellulari appropriate. Le suddette ricerche sono integrate da numerosi studi sulle sequenze di regolazione presenti in promotori ed enhancers e sul ruolo di fattori di trascrizione e dei recettori degli ormoni nella trascrizione.

Un piccolo numero di U.O. ha indagato i meccanismi di