



UNIVERSITÀ DI MILANO
“CENTRO DINO FERRARI”
PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

CONSUNTIVO DELLA RICERCA

SCIENTIFICA

2012

SEZIONI DEL “CENTRO DINO FERRARI”

- GRUPPO DI RICERCA – LABORATORIO DI CELLULE STAMINALI Pag. 3

- LABORATORIO RADIOISOTOPI DI BIOCHIMICA E GENETICA Pag. 12

- UNITA’ OPERATIVA DIPARTIMENTALE “DIAGNOSTICA DELLE MALATTIE NEUROMUSCOLARI E RARE” Pag. 32

- UNITA’ OPERATIVA SEMPLICE MALATTIE NEURODEGENERATIVE E DEMIELINIZZANTI Pag. 40

- SEDE DISTACCATA DEL “CENTRO DINO FERRARI” PRESSO I.R.C.C.S. ISTITUTO AUXOLOGICO ITALIANO – UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI MILANO – U.O. NEUROLOGIA – STROKE UNIT E LABORATORIO DI NEUROSCIENZE Pag. 57

- SEDE DISTACCATA DEL “CENTRO DINO FERRARI” PRESSO IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE, CITOGENETICA, ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE, BIOINFORMATICA – I.R.C.C.S. E. MEDEA Pag. 81

LABORATORIO CELLULE STAMINALI

Responsabile:

- **Dottor Yvan Torrente**, Neurologo Universitario in convenzione

Personale:

- Marzia Belicchi biologa con contratto a tempo indeterminato di tecnico di laboratorio laureato universitario
- Mirella Meregalli biologa con contratto a tempo determinato di tecnico di laboratorio laureato universitario (fino a settembre 2012) e poi assegnista universitaria
- Federica Colleoni biologa contrattista pluriennale universitario,
- Paola Razini biotecnologo con borsa ospedaliera
- Andrea Farini biologo, PostDoc contrattista pluriennale universitario
- Daniele Parolini biotecnologa, Phd/student contrattista pluriennale universitario
- Simona Maciotta biotecnologa, Phd/student contrattista pluriennale universitario
- Silvia Erratico biotecnologa, contrattista annuale
- Letizia Cassinelli, biologa con contratto a termine universitario (UNISTEM)
- Clementina Sitzia, biotecnologa, studentessa della facoltà di Medicina e Chirurgia, con borsa ospedaliera
- Chiara Villa, bioingegnere, Phd/student contrattista pluriennale universitario
- Jacopo Zini, studente della facoltà di Biotecnologie tirocinio per tesi triennale
- Filippo Manenti studente della facoltà di Biotecnologie tirocinante per tesi triennale
- Alessandro Genna studente della facoltà di Biotecnologie , tirocinante per tesi magistrale dei 5 anni
- Alessia Emilio, studente tirocinante del corso di laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico
- Naima Guarrata, dottore in economia, project manager contrattista annuale

Consuntivo dell'attività di ricerca svolta nel corso dell'anno 2012 da parte del Gruppo di lavoro, diretto dal Dr. Yvan Torrente, attivo presso il Laboratorio Cellule Staminali - "Centro Dino Ferrari" dell'Università degli Studi di Milano.

L'attività di ricerca svolta nell'anno 2012 dal gruppo di lavoro diretto dal dott. Torrente ha avuto come interesse primario lo studio di cellule staminali adulte e la loro possibile applicazione nello sviluppo di nuove terapie cellulari per le distrofie muscolari, in particolare per la distrofia muscolare di Duchenne. Nonostante i numerosi criteri terapeutici seguiti nel corso degli anni, la distrofia muscolare di Duchenne (DMD) rimane ad oggi una patologia priva di cure efficaci e risolutive preso atto che, sfortunatamente, la maggior parte delle strategie terapeutiche si rivelano più dei palliativi che delle vere e proprie cure.

Da alcuni anni la letteratura scientifica ha più volte sottolineato come l'approccio più promettente per questo tipo di patologie sia la combinazione di terapia genica e terapia cellulare. In tal senso, il nostro gruppo quest'anno ha realizzato una review pubblicata sulla rivista scientifica "Current Gene Therapy" in cui ha descritto diverse tipologie di cellule staminali isolate dal tessuto muscolare e da altri tessuti, mostrandone le caratteristiche e sottolineando il loro possibile utilizzo per il trattamento delle distrofie muscolari. In questo lavoro, inoltre, è stato messo in risalto come la combinazione di terapia genica e terapia cellulare con utilizzo di cellule staminali consenta, ad oggi, di avere discrete chances per la gestione e la terapia della DMD.

Non a caso, negli ultimi decenni differenti tecnologie, quali ad esempio la modificazione genetica mediata da vettori virali, sono state oggetto di indagine tesa a risolvere il deficit di distrofina che causa la DMD. Sono stati fatti enormi sforzi per migliorare la terapia genica in termini di efficacia e di sicurezza in particolare per superare gli ostacoli minimi costituiti dal ridotto trasferimento genico, dal basso livello di espressione della proteina, dal rischio di mutagenesi per l'integrazione casuale del vettore virale, dall'immunogenicità dei vettori stessi e, qualche volta, dello stesso transgene. In tal senso la tecnologia "exon skipping" rappresenta un approccio alternativo di terapia genica: l'utilizzo di cellule "corrette" con la suddetta metodologia, che fa uso di oligonucleotidi antisenso specifici, consente di "forzare" la macchina di lettura dell'informazione genica in modo tale che la stessa esegua una lettura alternativa che "salta" la mutazione permettendo la trascrizione di una proteina distrofina più corta ma funzionale.

Il gruppo di ricerca diretto dal dott. Torrente negli ultimi anni ha studiato anche un'altra tipologia di distrofia muscolare, la distrofia dei cingoli (LGMD), un gruppo eterogeneo di malattie geneticamente determinate coinvolgenti in maniera primitiva la muscolatura dei cingoli, sia pelvico (inferiore) che scapolare (superiore).

I risultati di questo studio sono stati oggetto di pubblicazione sulla rivista scientifica "Experimental Cell Research".

In sintesi: abbiamo focalizzato l'attenzione sulle disferlinopatie, malattie da deficit di disferlina, e, al fine di determinare il ruolo assunto dai linfociti e dall'intero sistema immunitario nella patologia, abbiamo realizzato un topo transgenico disferlinopatico, il topo Scid/ A/J., e lo abbiamo confrontato con il topo distrofico A/J. I risultati ottenuti dimostrano che questo topo transgenico, in cui sono assenti linfociti T e B, presenta un incremento della rigenerazione muscolare con relativo aumento della forza nelle fibre miosina-positivo del diaframma e dei muscoli addominali. Inoltre, è stata osservata in questo modello animale una riduzione della deposizione del complemento ed una diminuzione dei macrofagi pro-infiammatori M1; in vero la conoscenza del coinvolgimento del sistema immunitario nello sviluppo di patologie quali le disferlinopatie potrebbe essere un utile strumento per riuscire a trovare una nuova terapia per questa patologia andando ad agire sui diversi componenti del sistema immunitario.

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nelle conoscenze biologiche, biomediche e tecnologiche legate alle cellule staminali, al muscolo e alle patologie neuromuscolari. I recenti sviluppi nell'uso delle nanotecnologie hanno contribuito al progresso delle metodiche di imaging in vivo ad alta risoluzione, tra cui si possono citare la tomografia ad emissione di positroni,

l'emissione di singoli fotoni, la risonanza magnetica e la tomografia microcomputerizzata. Quest'ultima tecnica è stata oggetto di studio e di pubblicazione sulla rivista scientifica "International Journal of Nanomedicine" in cui si è descritto un sistema per poter monitorare la cinetica di distribuzione di cellule staminali in grado di migrare dopo iniezione intraarteria in un modello animale di distrofia muscolare (il topo scid/mdx). Si è infatti utilizzata la microtomografia computerizzata X-ray per dimostrare che le cellule staminali circolanti CD133+, marcate con nanoparticelle di ferro (Endorem) ed iniettate nella circolazione di un topo distrofico, non raggiungono i muscoli immediatamente dopo la loro iniezione ma sono necessarie alcune ore in cui fanno molteplici giri nel flusso circolatorio del topo prima di raggiungere il comparto muscolare distrofico. Questa tecnologia di imaging tridimensionale, altamente sofisticata, potrebbe fornire importanti informazioni per future applicazioni cliniche in cui si preveda di iniettare intraarteria cellule staminali, rendendo possibile la valutazione della loro distribuzione in vivo e una stima della loro cinetica di migrazione.

Un altro studio pubblicato quest'anno sulla rivista scientifica "PLOS ONE" ha identificato un gruppo di miRNA, piccole molecole endogene di RNA non codificante, maggiormente coinvolto nella rigenerazione muscolare. I miRNA fanno parte di una grande rete di geni regolatori e svolgono diverse funzioni; la più nota, attualmente, è quella di regolazione post-trascrizionale, in cui vanno a inibire la traduzione di determinati RNA messaggeri (mRNA).

Abbiamo analizzato il profilo di miRNAs di singole fibre muscolari isolate da muscoli di topi distrofici, utilizzati quale modello di danno muscolare cronico. Sono stati identificati nelle fibre distrofiche 14 miRNAs responsabili della rigenerazione e del rimodellamento del muscolo; inoltre, si è confermata la over-espressione di myomiR-206 che in letteratura era già stato associato alla rigenerazione muscolare. Abbiamo osservato che durante la rigenerazione muscolare delle singole fibre l'miRNA di Hmgb3 e la proteina stessa vengono parzialmente ridotte e contemporaneamente si verifica la up-regolazione di miR-206. L'analisi dei risultati ottenuti, quindi, fa pensare all'esistenza di un circuito a feedback negativo in cui, in seguito a un danno muscolare acuto e cronico, myomiR-206 reprime l'espressione di Hmgb3 per modulare la rigenerazione delle singole fibre muscolari, così da far ragionevolmente supporre che myomiR-206 potrebbe rappresentare un potenziale target terapeutico in molte patologie muscolari.

Il gruppo di ricerca del dott. Torrente durante quest'anno ha studiato altresì il muscolo di soggetti sani e distrofici con analisi molecolari, biochimiche e istologiche al fine di incrementarne la conoscenza di base e dei meccanismi che ne regolano le funzioni principali. Una di queste ricerche ci ha portato alla pubblicazione di un lavoro sulla rivista scientifica "The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology", lavoro in cui viene descritta l'espressione del CD20 nel muscolo scheletrico, verificandone la presenza a livello della membrana di mioblasti e nelle fibre del muscolo adulto. In particolare, in questo lavoro si mostra come l'inibizione del CD20, utilizzando un anticorpo o silenziando il gene, possa portare ad una diminuzione dell'ingresso di calcio store-operato (SOCE) nella linea di mioblasti murini C2C12. I nostri risultati forniscono importanti informazioni relative al pattern di espressione del CD20 e contribuiscono ad identificare nuovi meccanismi e nuove molecole coinvolti nella regolazione del SOCE nel muscolo scheletrico.

Durante quest'ultimo anno il team del dott. Torrente ha continuato a collaborare con diversi gruppi di ricerca nazionali ed internazionali sia per studi clinici sia per sviluppare temi importanti per la ricerca di base nel campo delle malattie neuromuscolari. Così, ad esempio, in collaborazione con l'equipe del Dott. Cossu si è realizzato un lavoro, pubblicato sulla rivista scientifica "Science Translational Medicine", in cui viene mostrato come pazienti affetti da distrofia muscolare LGMD2D, distrofia causata da mutazioni nel gene che codifica per la proteina α -sarcoglicano, presentino un ridotto numero di periciti e per questo generino pochi mesangioblasti da poter essere utilizzati eventualmente in una terapia cellulare autologa. Per questo motivo si sono riprogrammati fibroblasti e mioblasti isolati da pazienti LGMD2D al fine di generare cellule staminali pluripotenti umane (iPSCs) e sviluppare un protocollo per ottenere da queste iPSCs cellule simili a mesangioblasti. I mesangioblasti ottenuti da iPSCs sono stati espansi in vitro e trasdotti con un

vettore lentivirale che trasporta un gene che codifica per l' α -sarcoglicano ed un promotore che ne controlla l'espressione solo a livello del muscolo scheletrico.

Il trapianto di queste cellule modificate in un topo immunodeficiente che non esprime l' α -sarcoglicano è in grado di generare fibre α -sarcoglicano positive e di migliorare il fenotipo distrofico con una reintegrazione del numero di progenitori. Questi risultati suggeriscono che il trapianto di mesangioblasti geneticamente modificati generati da iPSCs di pazienti affetti da LGMD2D potrebbe costituire un importante approccio terapeutico per trattare questo tipo di distrofie muscolari e, probabilmente, anche per altri tipi di patologie neuromuscolari.

Un'altra ricerca, legata all'attività clinica del Dott. Torrente presso la Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico e realizzata in collaborazione con altri centri italiani specializzati in malattie neuromuscolari, ha permesso la pubblicazione di una ricerca clinica sulla rivista scientifica "Neurology"; in questo lavoro viene descritto uno studio condotto su un gruppo di pazienti, provenienti da diversi centri neuromuscolari italiani, affetti da distrofia muscolare di Duchenne ed ancora in grado di ambulare. I pazienti sono stati valutati con misurazioni quali the North Star Ambulatory Assessment (NSAA) and il 6-Minute Walk Test (6MWT) all'inizio dello studio e dopo 12 mesi.

Per valutare l'effetto del polimorfismo di un singolo nucleotide T>G nel gene dell'osteopontina (SPP1) in misurazioni funzionali muscolari i pazienti DMD sono stati suddivisi in diversi gruppi: TT omozigote vs TG eterozigote e GG omozigote; i dati clinici sono stati retrospettivamente analizzati e comparati in base ai suddetti gruppi. Si è osservato una differenza significativa tra le valutazioni funzionali basali e il follow-up dopo 12 mesi nei pazienti DMD che portano l'allele G, la stessa differenza non è risultata statisticamente rilevante nei DMD con l'allele T. Questi dati mettono in evidenza il ruolo del genotipo SPP1 quale modificatore della malattia nei pazienti DMD e sottolineano la sua rilevanza durante la selezione di un gruppo omogeneo di pazienti per futuri studi clinici.

Un altro studio clinico in collaborazione con il San Raffaele ha portato alla pubblicazione sulla rivista scientifica "BMC Neurology" di uno studio il cui scopo è stato quello di eseguire, su un gruppo di pazienti tra i 5 e i 12 anni affetti da distrofia muscolare di Duchenne ed ancora in grado di camminare, una valutazione longitudinale utilizzando un test muscolare quantitativo (QMT) e successivamente correlare i risultati del QMT con misurazioni funzionali quali North Star Ambulatory Assessment (NSAA) o il 6-min walk test (6MWT). Per queste valutazioni si è utilizzato un dinamometro, la macchina Kin Com W 125, ed i bambini sono stati seguiti per 1 anno osservando una buona correlazione tra i test quantitativi e le altre misurazioni effettuate. Pertanto i dati ottenuti con QMT potrebbero rappresentare un ottimo strumento per monitorare i pazienti distrofici selezionati per un trapianto, consentendo di valutare in modo oggettivo e quantitativo la loro performance muscolare prima e dopo il trattamento.

Questo strumento all'avanguardia ha i più alti coefficienti di correlazione per affidabilità, accuratezza, validità e ripetibilità ed è pertanto in grado di fornire una valutazione oggettiva della forza muscolare, elemento viepiù importante in un eventuale studio su pazienti affetti da distrofia muscolare che abbiano già perduto la capacità di deambulare. A ciò si aggiunga che questa macchina, in grado di misurare la forza di distretti muscolari specifici, può rappresentare un elemento vantaggioso anche per altre ricerche in campo neurologico, quali ad esempio studi clinici della Sclerosi Laterale Amiotrofica e della Sclerosi Multipla.

In conclusione, come si evince dalla letteratura scientifica sempre in evoluzione e, in minima parte, anche dall'esperienza del nostro gruppo di lavoro, ogni anno i risultati della ricerca scientifica nel campo delle cellule staminali e in particolare della terapia cellulare apportano rilevanti informazioni e nuove conoscenze circa il metabolismo, le potenzialità differenziative e la capacità di potere ingegnerizzare queste cellule per correggerne specifici difetti genetici: tutto questo ci fa sperare di essere sempre più vicini ad un'applicazione delle cellule staminali adulte in trials clinici di fase II nel campo di patologie in cui non esiste ancora una cura, come la distrofia muscolare di Duchenne.

**PRODUTTIVITA' SCIENTIFICA 2012 - LABORATORIO CELLULE STAMINALI -
DOTT.YVAN TORRENTE**

ELENCO PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI RECENSITE

1) Absence of T and B lymphocytes modulates dystrophic features in dysferlin deficient animal model

Andrea Farini, Clementina Sitzia, Claire Navarro, Giuseppe D'Antona, Marzia Belicchi, Daniele Parolini, Giulia Del Fraro, Paola Razini, Roberto Bottinelli, Mirella Meregalli, Yvan Torrente

Stem Cell Laboratory, Department of Neurological Sciences, Centro Dino Ferrari, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Cà Granda,

Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Italy

UNISTEM, Centro Interdipartimentale di Ricerca sulle Cellule Staminali, Università di Milano, via Balzaretti 9, 20133 Milan, Italy

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 318 (2012) 1160 – 1174 I.F.: 3,609

2) Quantitative muscle strength assessment in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal study and correlation with functional measures

Alberto Lerario, Serena Bonfiglio, MariaPia Sormani, Andrea Tettamanti, Sarah Markt, Sara Napolitano, Stefano Previtali, Marina Scarlato, MariaGrazia Natali-Sora, Eugenio Mercuri, Nereo Bresolin, Tiziana Mongini, Giancarlo Comi, Roberto Gatti, Fabio Ciceri, Giulio Cossu and Yvan Torrente

Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei Trapianti, Centro Dino Ferrari, Università di Milano, Fondazione, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Via F. Sforza n 35, Milano 20122, Italy

BMC NEUROLOGY 2012, 12:91 I.F.: 2,17

3) Hmgb3 Is Regulated by MicroRNA-206 during Muscle Regeneration

Simona Maciotta, Mirella Meregalli, Letizia Cassinelli, Daniele Parolini, Andrea Farini, Giulia Del Fraro, Francesco Gandolfi, Mattia Forcato, Sergio Ferrari, Davide Gabellini, Silvio Bicciato, Giulio Cossu, Yvan Torrente

Stem Cell Laboratory, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Centro Dino Ferrari, Milano, Italy

PLOS ONE August 2012 | Volume 7 | Issue 8 I.F.: 4,411

4) Importance of SPP1 genotype as a covariate in clinical trials in Duchenne muscular dystrophy

Luca Bello, Luisa Piva, Andrea Barp, Antonella Taglia, Esther Picillo, Gessica Vasco, Marika Pane, Stefano C. Previtali, Yvan Torrente, Elisabetta Gazzero, Maria Chiara Motta, Gaetano S. Grieco, Sara Napolitano, Francesca Magri, Adele D'Amico, Guja Astrea, Sonia Messina, Maria Sframeli, Gian Luca Vita, Patrizia Boffi, Tiziana Mongini, Alessandra Ferlini, Francesca Gualandi, Gianni Soraru', MD, Mario Ermani, Giuseppe Vita, Roberta Battini, Enrico Bertini, Giacomo P. Comi, Angela Berardinelli, Carlo Minetti, Claudio Bruno, Eugenio Mercuri, Luisa Politano, Corrado Angelini, Eric P. Hoffman, Elena Pegoraro

Dino Ferrari Centre, Department of Neurological Sciences, University of Milano, I.R.C.C.S. Foundation Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milan

NEUROLOGY, 2012;79;159 I.F.: 11,089

5) Novel insight into stem cell trafficking in dystrophic muscles

Andrea Farini, Chiara Villa, Adrian Manescu, Fabrizio Fiori, Alessandra Giuliani, Paola Razini, Clementina Sitzia, Giulia Del Fraro, Marzia Belicchi, Mirella Meregalli, Franco Rustichelli, Yvan Torrente

Stem Cell Laboratory, Department of Neurological Sciences, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Centro Dino Ferrari, Università di Milano, Milano, Italy
INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE 2012;7 3059–3067 I.F.: 4.976

6) Expression of CD20 reveals a new store-operated calcium entry modulator in skeletal Muscle

Daniele Parolini, Letizia Cassinelli, Paola Razini, Clementina Sitzia, Noemi Tonna, Silvia Erratico, Federica Colleoni, Valentina Angeloni, Elisa Maffioli, Andrea Farini, Simona Maciotta, Laura Porretti, Marzia Belicchi, Fabio Bianco, Gabriella Tedeschi, Mirella Meregalli, Yvan Torrente

Stem Cell Laboratory, Dept. of Pathophysiology and Transplantation, Fondazione IRCCS Ca'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Centro Dino Ferrari, Università degli Studi di Milano, via F. Sforza 35, 20122 Milan, Italy

UNISTEM, Centro Interdipartimentale di Ricerca sulle Cellule Staminali, Università degli Studi di Milano, via Balzaretti 9, 20133 Milan, Italy

THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY 44 (2012) 2095–2105 I.F.: 4.634

7) Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy.

Tedesco FS, Gerli MF, Perani L, Benedetti S, Ungaro F, Cassano M, Antonini S, Tagliafico E, Artusi V, Longa E, Tonlorenzi R, Ragazzi M, Calderazzi G, Hoshiya H, Cappellari O, Mora M, Schoser B, Schneiderat P, Oshimura M, Bottinelli R, Sampaolesi M, Torrente Y, Broccoli V, Cossu G.

Department of Neurological Science, University of Milan, Fondazione IRCCS Policlinico Mangiagalli-Regina Elena, 20122 Milan, Italy

SCI TRANSL MED. 2012 Jun 27;4(140):140ra89 I.F.: 7,80

8) The role of stem cells in muscular dystrophies

Meregalli M, Farini A, Colleoni F, Cassinelli L, Torrente Y.

Stem Cell Laboratory, Department of Neurological Sciences, Centro Dino Ferrari, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Italy

CURR GENE THER. 2012 Jun;12(3):192-205 I.F.: 4,85

Impact factor totale: 43.54

ELENCO CONGRESSI 2012 (invited speaker)

- 1) Hmgb3 Is Regulated by MicroRNA-206 during Muscle Regeneration.
S. Maciotta, M. Meregalli, L. Cassinelli, D. Parolini, A. Farini, G. Del Fraro, F. Gandolfi, M. Forcato, S. Ferrari, D. Gabellini, S. Bicciato, G. Cossu, Y. Torrente.
Workshop "Exploring microRNA world: new frontiers and applications". Aula Nicoletta Milani, Università degli Studi di Milano. November 20, 2012
- 2) Preclinical experience and perspectives of a clinical trial using CD133 stem cells.
Y. Torrente. EMC 2012. Rhodes, Greece. September 1-5, 2012
- 3) Le cellule staminali nelle distrofinopatie.
Y. Torrente. XIV Corso Residenziale di Genetica Medica. Le malattie Genetiche come Malattie Sociali. Università degli Studi "G. D'Annunzio" Chieti-Pescara. July 12-13, 2012.

- 4) Immunity and stem cell transplantation in muscular dystrophy. Y. Torrente. Stem Cell Research Italy International Society For Cellular Therapy-Europe AICC - JOINT MEETING. Polo Chimico Biomedico, Ferrara. June 20-22, 2012.
- 5) Preclinical experience and perspectives of a clinical trial using CD133 stem cells. Y. Torrente. 2012 New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference, New Orleans, Louisiana. June 17-21, 2012
- 6) *Invited speaker* Il ruolo delle cellule staminali nelle malattie muscolari. Y. Torrente. Meeting "Le Cellule della Speranza". Ancona, June 14, 2012
- 7) *Chairman* Y. Torrente. Programmazione e Riprogrammazione: oltre le ips. 13^a Giornata di Studio sulle Cellule Staminali Unistem. Sala Napoleonica-Palazzo Greppi, Università degli Studi di Milano. June 8, 2012.
- 8) La distrofia muscolare. Y. Torrente. Casi clinici di pediatria. Clinica Pediatrica De Marchi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy. May 23, 2012
- 9) *Chairman* Y. Torrente. Giornata di studio Unistem "NUOVE TERAPIE CON CELLULE STAMINALI Dalla sperimentazione alla pratica clinica: nuovi protocolli terapeutici". Aula Mangiagalli, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy. May 21, 2012
- 10) *Chairman* Utilizzo di cellule staminali nelle malattie neuromuscolari. Y. Torrente. Giornata di studio Unistem "CELLULE STAMINALI Dalla sperimentazione alla pratica clinica: nuovi protocolli terapeutici". Aula Mangiagalli, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy. May 7, 2012
- 11) Thermoresponsive material for muscle cell sheet engineering. *C. Villa, S. Erratico, F. Martello, A. Tocchio, M. Belicchi, M. Meregalli, C. Lenardi, P. Milani, Y. Torrente*. Regenerative Tissue Engineering and Transplantation. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology. Beaver Run Resort, Breckenridge, Colorado, USA. April 1-6 2012.
- 12) Muscular dystrophies therapies by engineered stem cells. *M. Meregalli, A. Farini, M. Belicchi, D. Parolini, P. Razini, G. Del Fraro, L. Cassinelli, V. Angeloni, S. Maciotta, J.C. da Silva Bizario, L. Garcia, N. Bresolin, Y. Torrente*. Optistem Endostem Annual Meeting 2012. April 2-5, 2012. Sitges, Barcelona, Spain.

ELENCO CONGRESSI 2012 (poster)

- 1) Preclinical experience and perspectives of a clinical trial using cD133 stem cells. *M. Meregalli, A. Farini, M. Belicchi, J. Luciana, D. Parolini, C. Sitzia, P. Razini, L. Cassinelli, M. Baruffi, L. Garcia, Y. Torrente*. 8th World Stem Cell Summit, West Palm Beach, FL, USA. December 3-5, 2012
- 2) Proliferation and Clonal Analysis of Muscle Derived CD133+ Stem Cell Subpopulations Define a Depletion of Mesenchymal Population in DMD Patients. *A. Tavelli, P. Razini, M. Belicchi, M. Meregalli, A. Farini, S. Erratico, G. Del Fraro, V. Angeloni, A. Cattaneo and Y. Torrente*. Hydra VIII The European Summer School on Stem Cells & Regenerative Medicine. September 15-21, 2012. Hydra, Greece.

- 3) Mesenchymal stem cell role in adipose formation in dystrophic muscle. *S. Erratico, C. Villa, P. Razini, A. Farini, A. Tavelli, V. Angeloni, M. Meregalli, M. Belicchi, Y. Torrente*. Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells. Lucca, Italy. August 12-17, 2012
- 4) Proliferation and clonal characterization of human muscle derived CD133+ stem cell subpopulations define a depletion of mesenchymal population in Duchenne muscular dystrophy patients. *P. Razini, A. Tavelli, M. Belicchi, M. Meregalli, A. Farini, S. Erratico, G. Del Fraro, V. Angeloni, A. Cattaneo, Y. Torrente*. Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells. Lucca, Italy. August 12-17, 2012
- 5) Expression of CD20 reveals a new store-operated calcium entry modulator in skeletal muscle. *D. Parolini, L. Cassinelli, P. Razini, C. Sitzia, S. Erratico, F. Colleoni, V. Angeloni, E. Maffioli, A. Farini, S. Maciotta, L. Porretti, M. Belicchi, G. Tedeschi, M. Meregalli, Y. Torrente*. Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells. Lucca, Italy. August 12-17, 2012
- 6) Absence of T and B lymphocytes modulates dystrophic features in dysferlin deficient animal model. *A. Farini, C. Sitzia, G. D'Antona, M. Belicchi, D. Parolini, G. Del Fraro, P. Razini, R. Bottinelli, M. Meregalli, Y. Torrente*. Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells. Lucca, Italy. August 12-17, 2012
- 7) High Mobility group protein 3 (Hmgb3) is regulated by microRNA-206 during muscle regeneration. *L. Cassinelli, S. Maciotta, F. Gandolfi, M. Forcato, A. Farini, D. Parolini, S. Ferrari, S. Bicciato, G. Cossu, M. Meregalli, Y. Torrente*. Development, function and repair of the muscle cell. Society for Muscle Biology – Frontiers in Myogenesis. Kimmel Center – New York University, New York, NY, USA. June 4-8, 2012.
- 8) Absence of T and B lymphocytes modulates dystrophic features in dysferlin deficient animal model. *C. Sitzia, A. Farini, G. D'Antona, C. Navarro, M. Belicchi, P. Razini, G. Del Fraro, D. Parolini, R. Bottinelli, M. Meregalli, Y. Torrente*. Development, function and repair of the muscle cell. Society for Muscle Biology – Frontiers in Myogenesis. Kimmel Center – New York University, New York, NY, USA. June 4-8, 2012.
- 9) Mesenchymal and myogenic precursor cells: old partners for few interactions. *S. Erratico, C. Villa, P. Razini, M. Meregalli, M. Belicchi, Y. Torrente*. Development, function and repair of the muscle cell. Society for Muscle Biology – Frontiers in Myogenesis. Kimmel Center – New York University, New York, NY, USA. June 4-8, 2012.
- 10) The myomiR-206 participate to muscle-regeneration by sculpting the chromatin through the down-regulation of the non-histone chromatin-associated protein High Mobility group protein 3 (Hmgb3). *S. Maciotta, F. Gandolfi, M. Forcato, L. Cassinelli, A. Farini, D. Parolini, S. Ferrari, S. Bicciato, G. Cossu, M. Meregalli, Y. Torrente*. Keystone Symposia, Epigenomics Keystone, Colorado USA, 17-22 January, 2012
- 11) Predicted miRNAs in murine dystrophin gene. *V. Angeloni, M.L. Cassinelli, S. Maciotta, F. Gandolfi, M. Forcato, S. Bocciato, M. Meregalli, Y. Torrente*. Keystone Symposia, Epigenomics Keystone, Colorado USA, 17-22 January, 2012

ELENCO DEI PROGETTI DI RICERCA FINANZIATI ED ANCORA IN CORSO

- 1) Comunità Europea - Optistem 223098-FP7_Health-2007-1.4-66 n°223098 (2009–2013)
 “Optimization of stem cell therapy for degenerative epithelial and muscle diseases”
Finanziamento totale 548.4000 Euro, rimanenti 95.000 Euro

- 2) Bando Giovani Ricercatori 2008 del Ministero della Salute (2011-2013)– “New assays for evaluation of Tumorigenic potential of malignant brain tumor Cancer Stem cells clonal derivatives and identification of molecular targets for pharmacological interventions”
Finanziamento totale 527.330 Euro, rimanenti 120.221,45 Euro
- 3) Ricerca Corrente 2012 della Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico “Sviluppo di protocolli espansivi cellulari al fine di un trattamento autologo con cellule staminali muscolari in pazienti distrofici”.
Finanziamento 33.000 Euro
- 4) Ricerca Finalizzata Ref. n. RF-2009-1547384 (2012-2014) "Design of a clinical trial using CD133-LV(U7)"
Finanziamento totale 600.000 Euro (I tranche 240.000 Euro erogata nel 2013)
- 5) Progetto Provincia di Trento-Unistem (2010-2012) "Cellule staminali nella terapia delle distrofie muscolari", Finanziamento totale 600.000 Euro, ultima tranche 200.000 erogata a ottobre 2012

**CENTRO DINO FERRARI
LABORATORIO RADIOISOTOPI DI BIOCHIMICA E GENETICA**

Produttività Scientifica 2012

Responsabile:

Prof. Giacomo P. Comi, Professore Associato

Medici:

Dott. Stefania Corti
Dott. Francesca Magri
Dott. Alessandra Govoni
Dott. Giulietta Riboldi
Dott. Michela Ranieri
Dott. Alessio Di Fonzo
Dott. Sara Bonato

Biologi:

Dott. Roberto Del Bo
Dott. Sabrina Lucchiari
Dott. Sabrina Salani
Dott. Chiara Simone
Dott. Marianna Falcone
Dott. Gianna Ulzi
Dott. Domenica Saccomanno
Dott. Federica Rizzo
Dott. Daniela Piga

Biotechnologi

Dott. Monica Nizzardo
Dott. Serena Pagliarani
Dott. Dario Ronchi
Dott. Mafalda Rizzuti
Dott. Margherita Ruggieri
Dott. Valentina Melzi

Tecnici

Sig.ra Andreina Bordoni
Sig. Francesco Fortunato

Indice dei progetti di ricerca

1. Studio di nuovi approcci terapeutici con cellule staminali nelle malattie neurodegenerative e del motoneurone
2. Genetica della Sclerosi Laterale Amiotrofica
3. Altre malattie del motoneurone
4. Malattie mitocondriali
5. Malattie neurodegenerative: ruolo dei mitocondri
6. Canalopatie muscolari
7. Glicogenosi/Malattie metaboliche
8. Distrofinopatie
9. Miopatie congenite
10. Trial clinici
11. Neuroimmunologia Clinica

1. Utilizzo di cellule staminali per lo sviluppo di nuove terapie cellulo-mediate per le malattie del motoneurone

Cellule staminali neuronali derivate dalle iPSC per lo sviluppo di una terapia cellulo-mediate dell'Atrofia Muscolare Spinale

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una malattia neurodegenerativa relativamente frequente nonché la prima causa di morte per malattia genetica nell'infanzia. E' una patologia genetica autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene SMN 1 (Survival Motor Neuron 1) che causano la deplezione della proteina SMN a cui consegue la degenerazione selettiva dei motoneuroni del midollo spinale. I pazienti affetti da SMA sono caratterizzati clinicamente da ipostenia muscolare, ipotonia e paralisi progressiva. Attualmente non esistono cure efficaci per questa malattia.

Nel genoma umano sono presenti due copie del gene SMN: SMN1 e SMN2. Il gene SMN2 differisce dal gene SMN1 per pochi nucleotidi tra cui un nucleotide specifico nell'esone 7 che causa un'alterazione di splicing. Di conseguenza è prodotto solo il 10% della proteina full-length e il restante 90% è un trascritto mancante dell'esone 7 (SMN Δ 7) non funzionale. Sebbene i modelli animali siano molto utili per lo studio della patogenesi e per lo screening farmacologico, presentano importanti limitazioni nel ricapitolare la malattia in quanto non possiedono il gene SMN2, che di conseguenza deve essere introdotto artificialmente. Le recenti tecniche di riprogrammazione utilizzate per ottenere cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) da cellule umane adulte permettono di ottenere cellule paziente specifiche da utilizzare come modello di malattia, come sorgente cellulare per strategie cellulo-mediate e per lo studio di terapie geniche. In questo lavoro abbiamo generato iPSC con metodo non virale da pazienti SMA di tipo 1 e da soggetti eterozigoti e sani e abbiamo dimostrato il loro differenziamento in motoneuroni. Inoltre abbiamo corretto geneticamente le iPSC utilizzando un oligonucleotide single-strand che si lega in modo specifico alla sequenza target (SMN2) e agisce come stampo per la correzione nucleotidica. Le iPSC sottoposte a questa modificazione genetica risultano corrette, non contengono sequenze esogene e sono indistinguibili dalle iPSC sane. Dato che le iPSC rappresentano una promettente fonte cellulare sia per lo studio patogenetico delle malattie motoneuronali, che per lo sviluppo di strategie di trapianto abbiamo generato motoneuroni dalle iPSC-SMA, iPSC-corrette e iPSC-WT utilizzando un protocollo di differenziamento precedentemente sviluppato per le cellule staminali embrionali umane (hES). Successivamente abbiamo determinato se i motoneuroni derivati dalle iPSC potessero integrarsi e sopravvivere nel midollo spinale di un modello murino di SMA, l'effetto dell'ambiente malato sulle cellule trapiantate e vice-versa, e infine se il trapianto potesse migliorare il fenotipo della malattia. Abbiamo effettuato il trapianto nel midollo spinale di topi SMA di un giorno di vita, osservando che il trapianto di motoneuroni wild-type e corretti migliora

la sopravvivenza e il fenotipo dei topi SMA. Abbiamo inoltre valutato la sopravvivenza e il mantenimento di un appropriato fenotipo delle cellule trapiantate.

In conclusione tutti questi risultati dimostrano la possibilità di ottenere iPSC paziente specifiche prive di elementi esogeni, la loro correzione e il loro differenziamento in motoneuroni. Abbiamo inoltre dimostrato che il trapianto di quest'ultimi migliora il fenotipo SMA e che possono quindi essere utilizzati per lo sviluppo di un'efficace terapia per la SMA e le altre malattie del motoneurone.

Pubblicazioni :

Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Nardini M, Ronchi D, Donadoni C, Salani S, Riboldi G, Magri F, Menozzi G, Bonaglia C, Rizzo F, Bresolin N, Comi GP. Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med.* 2012 Dec 19;4(165):165ra162.

Terapia morfolino mediata per il trattamento dell'Atrofia Muscolare Spinale

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA, acronimo di Spinal Muscular Atrophy) è una malattia a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata dalla progressiva perdita dei motoneuroni spinali. La SMA costituisce la causa genetica più comune di mortalità infantile. Essa è dovuta a mutazioni del gene "Survival Motor Neuron 1" (SMN1), che portano ad una deplezione dei livelli cellulari della proteina SMN. Nel genoma umano sono presenti due copie del gene SMN: SMN1 e SMN2. Il gene SMN2 differisce dal gene SMN1 per pochi nucleotidi tra cui un nucleotide specifico nell'esone 7 che causa un'alterazione di splicing. Di conseguenza è prodotto solo il 10% della proteina full-length e il restante 90% è un trascritto mancante dell'esone 7 (SMN Δ 7) non funzionale. Non esistendo una terapia della SMA, la ricerca di nuove strategie terapeutiche è fondamentale.

Un promettente approccio terapeutico è l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (ASO) o del morfolino (MO) per correggere lo splicing del gene paralogo SMN2 in modo da aumentare la produzione della proteina SMN funzionale. Sono presenti in letteratura eccellenti risultati ottenuti nei modelli animali utilizzando questo tipo di approccio.

In questo progetto abbiamo intenzione di disegnare e testare una molecola di morfolino di 25 nucleotidi, che si appaia alla regione ISS-N1 del gene SMN2, sul modello murino di SMA. Da esperimenti preliminari abbiamo verificato che questa sequenza è in grado di aumentare i livelli di espressione della proteina SMN funzionale e inoltre di migliorare la sopravvivenza e la forza neuromuscolare dei topi SMA (modello animale della patologia) trattati. L'efficacia e la distribuzione del morfolino è in gran parte determinata dalla struttura chimica della molecola. In questo progetto ci proponiamo quindi di aumentare il numero di topi trattati e di effettuare ulteriori esperimenti per confermarne la sua efficacia e per verificare la biodistribuzione e la presenza di eventuali effetti collaterali.

Il progetto descritto in questa proposta esplorerà le modalità con cui il morfolino possa essere usato per lo sviluppo di approcci terapeutici della SMA e contribuirà al progresso di un approccio terapeutico per questa malattia del motoneurone che potrà essere poi applicato con le dovute modifiche ad altre malattie neurodegenerative.

Pubblicazioni :

Monica Nizzardo, Chiara Simone, Sabrina Salani, Marc-David Ruepp, Federica Rizzo, Margherita Ruggieri, Simona Brajkovic, Hong Moulton, Oliver Muehlemann, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi and Stefania Corti, Combined systemic and local morpholino treatment rescues the phenotype of SMA Delta7 mouse model, submitted to NAR

Sviluppo di una terapia cellulo-mediata per la Atrofia Muscolare Spinale con Distress Respiratorio di tipo 1 (SMARD1)

L' Atrofia Muscolare Spinale con Distress Respiratorio di tipo 1 (SMARD1) è la seconda malattia del motoneurone dell'infanzia, dopo la SMA, in cui sia stato identificato il difetto genico. Si distingue dalla SMA (5q) per il coinvolgimento della muscolatura respiratoria e della muscolatura artuale prevalentemente distale.

L'obiettivo di questo progetto è di contribuire allo sviluppo di modelli in vitro e di un approccio terapeutico basato sull'utilizzo di cellule staminali per la SMARD1. Studieremo il potenziale delle cellule staminali neuronali (NSC) derivate dalle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) di soggetti sani e di pazienti come "strumento" per studi biologici e terapeutici. Questo programma di ricerca fornirà conoscenze di base e dati pre-clinici che potrebbero essere traslati in trials clinici in pazienti affetti da SMARD1 e altre malattie del motoneurone (MNDs).

Ad oggi abbiamo generato cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), libere da vettori e sequenze transgeniche, partendo da fibroblasti primari di un paziente SMARD1 e da soggetti sani, usando un metodo non virale già noto in letteratura. Le cellule così ottenute sono state caratterizzate verificando se possedessero una morfologia tipica delle cellule embrionali umane (hES) (formazione di colonie compatte con un elevato rapporto nucleo-citoplasma e nucleoli prominenti) e se presentassero i classici marcatori di pluripotenza. Queste cellule sono utili come modello in vitro della patologia e possono essere utilizzate per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche e molecolari, inoltre possono essere utilizzate come sorgente per terapie cellulo-mediate.

Nel proseguimento di questo progetto studieremo il potenziale terapeutico che il trapianto cellulare (NSCs o motoneuroni) ha sul fenotipo della malattia motoneuronale in modelli murini di SMARD1.

In particolare determineremo il tipo cellulare più efficace nel trapianto, il protocollo ottimale di somministrazione, l'attecchimento cellulare e l'efficacia terapeutica.

Sviluppo di una terapia cellulo-mediata per la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)

La SLA è una malattia degenerativa e progressiva del sistema nervoso, che colpisce selettivamente i motoneuroni, sia il I motoneurone a livello della corteccia cerebrale, che il II motoneurone, a livello del tronco encefalico e del midollo spinale. Tale patologia ad esito fatale insorge in età adulta e colpisce 1-3 individui ogni 100.000 persone/anno con una prevalenza di 4-13 casi per 100.000.

L'obiettivo di questo progetto è di contribuire allo sviluppo di un modello in vitro di questa patologia e di un approccio terapeutico basato sull'utilizzo di cellule staminali per il trattamento della SLA.

Ad oggi abbiamo generato linee cellulari iPS da pazienti SLA con un metodo non virale e non integrante e le abbiamo caratterizzate verificando la loro pluripotenza e l'espressione di marker specifici di staminalità. Le cellule da noi ottenute inoltre sono in grado di differenziarsi nei derivati dei tre foglietti embrionali in vitro e di originare teratomi in vivo. Il DNA fingerprinting ha poi confermato la loro origine dai fibroblasti cutanei.

Con questo progetto oltre a generare un modello in vitro della patologia, utile per testare nuovi farmaci e per lo studio della patogenesi, vogliamo contribuire allo sviluppo di un approccio terapeutico basato sull'utilizzo di cellule staminali per il trattamento della SLA. A questo scopo abbiamo isolato una sottopopolazione di cellule iPS derivate da un soggetto sano utilizzando il marcatore VLA4. Le cellule selezionate in questo modo hanno una maggiore capacità di raggiungere il sistema nervoso centrale. Dopo aver differenziato le iPSC in cellule staminali neuronali (NSC) abbiamo iniziato a fare i primi trapianti a livello sistemico nel modello animale di SLA riscontrando un aumento di sopravvivenza. Il nostro obiettivo è quello di perfezionare il protocollo di trapianto e aumentare il numero di animali trattati per studiare il potenziale delle NSC derivate dalle iPSC come strumento di neuro-protezione ed eventualmente di sostituzione delle cellule endogene danneggiate. Dopo il trapianto valuteremo la migrazione, la sopravvivenza e l'attecchimento delle NSC. Indagheremo inoltre i meccanismi legati all'effetto del trapianto cellulare che sono responsabili della protezione dei motoneuroni.

Questo progetto permetterà l'ottenimento di un modello in vitro della patologia, lo screening di nuovi farmaci e un set di esperimenti pre-clinici basati sull'utilizzo di cellule staminali come approccio terapeutico. I risultati ottenuti oltre a essere utili per lo sviluppo di un approccio terapeutico per la SLA, forniranno informazioni e conoscenze utili anche per altre patologie del motoneurone.

Pubblicazioni :

Monica Nizzardo, Chiara Simone, Federica Rizzo, Margherita Ruggieri, Sabrina Salani, Giulietta Riboldi, Irene Faravelli, Chiara Zanetta, Simona Brajkovic, Nereo Bresolin and Giacomo P. Comi
Stefania Corti Systemic transplantation of human VLA4+ Neural Stem Cells from induced pluripotent stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model

Manuscript in preparation

2. La genetica della SLA familiare e sporadica

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da una perdita progressiva di motoneuroni che porta a paralisi e morte. Attualmente non ci sono terapie efficaci per questa malattia che ha un grave impatto sulla vita personale e socio-economica di migliaia di pazienti e dei loro caregiver. Le cause della SLA sono in gran parte sconosciute, sebbene siano stati identificati recentemente, grazie alla diffusione di nuove tecnologie di screening massivo, diversi geni causativi. Nel novembre 2011 l'evidenza sperimentale tra la presenza dell'espansione intronica nel gene C9orf72 e lo sviluppo della malattia ha di fatto cambiato lo scenario fino ad allora conosciuto. Circa il 90% delle forme di SLA sono di tipo sporadico (SALS) e senza alcuna eziologia nota. Le forme familiari (FALS) rappresentano circa il 5%-10% dei casi e sono molto eterogenee dal punto di vista genetico. I meccanismi genetici coinvolti nella SLA sono probabilmente più complessi di quanto inizialmente ipotizzato. Si rende quanto mai necessaria una conoscenza approfondita delle componenti genetiche della SLA per indagare i processi che portano allo sviluppo della malattia e per fornire nello stesso tempo nuovi bersagli terapeutici molecolari. Con la scoperta di C9orf72 quale principale gene causativo nella SLA, le cause genetiche di questa malattia sono ora riscontrabili nel 60% delle forme familiari.

Negli ultimi anni molte evidenze cliniche, genetiche e istopatologiche hanno portato ad ipotizzare che processi patologici simili siano alla base della SLA e nello stesso tempo di alcuni tipi di demenza lobo frontotemporale (FTD). Sebbene vi sia una grande diversità/variabilità nelle cause genetiche, è stato evidenziato dal punto di vista istopatologico un alto grado di sovrapposizione tra queste patologie. Geni legati a casi di SLA e/o FTD, quali C9ORF72 (soprattutto), TARDBP, FUS, OPTN, VCP, PFN1 e UBQLN2, possono comunque convergere su un percorso patogenico unificante e, quindi, fornire nuovi bersagli terapeutici comuni a un ampio spettro di forme eziologicamente diverse di SLA e SLA-FTD.

Durante questo ultimo anno l'attività di ricerca è stata volta a caratterizzare geneticamente un'ampia coorte di pazienti affetti da SLA reclutati presso l'ambulatorio malattie del motoneurone afferente al Unità di Neurologia dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti dell'Università degli Studi di Milano. Il Dipartimento rappresenta un centro di riferimento per la diagnosi e il trattamento delle malattie del motoneurone. Tutti i pazienti inclusi nello studio hanno soddisfatto i criteri di El Escorial per la SLA probabile o definitiva; un consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti arruolati. I risultati ottenuti dal nostro gruppo di pazienti sono stati inclusi in studi genetici indipendenti su larga scala che includono i dati raccolti da altri 5 "Centri SLA" afferenti al "Consorzio SLAGEN italiano".

Il DNA è stato isolato da sangue periferico secondo protocolli standardizzati ((IsoQuick Nucleic Acid Extraction kit, ORCA Research, Inc., Bothell, WA, USA). Mediante tecnica di PCR sono stati amplificati singolarmente gli esoni di tutti i geni coinvolti includendo almeno 40 nucleotidi delle

regioni introniche adiacenti. Gli amplificati sono stati successivamente sequenziati mediante il protocollo BigDyeTerminator v3.1 TM su un sequenziatore 3100 ABI Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA; USA). Tutte le variazioni identificate sono quindi state confermate mediante nuova PCR e successivo sequenziamento degli ampliconi così ottenuti.

C9orf72

L'espansione esanucleotidica (GGGGCC) a livello del primo introne del gene C9ORF72 è stata riportata ad alta frequenza in numerosissime coorti indipendenti di pazienti affetti da SLA e da FTD; a tutt'oggi essa rappresenta la più comune causa genetica di queste malattie neurodegenerative.

L'espansione intronica è stata indagata mediante tecnica di repeat-primed PCR che permette di ottenere un elettroferogramma con un tipico profilo caratterizzato da una serie di picchi che si susseguono con una periodicità corrispondente a 6 paia di basi. In breve, 100ng di DNA genomico di alta qualità sono stati amplificati in presenza dei seguenti primer:

MRX-For_FAM: tgtaaacgacggccagtCAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC;

MRX-Rev1 caggaaacagctatgaccGGGCCCGCCCCGACCACGCCCGGCCCGGCCCGG;

MRX-M13-Revlinker caggaaacagctatgacc;

La mix dei dNTP utilizzati conteneva 5mM di dCTP, dATP, dTTP e di 7-deaza-2-deoxy GTP (Roche) in totale sostituzione di dGTP. Il protocollo di PCR prevedeva una denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti (Taq FastStart), quindi 10 cicli di amplificazione così composti: denaturazione a 95°C per 35 secondi, annealing a 64°C per 2 minuti e estensione a 72°C per 8 minuti. A seguire 25 cicli formati da denaturazione a 95°C per 35 secondi, annealing a 64°C per 2 minuti e estensione a 72°C per 8 minuti con incremento di ulteriori 20 secondi ad ogni ciclo. Una volta completato il protocollo di amplificazione, 1µl di PCR è stata diluita in 5µl di acqua; 2µl di PCR così diluita sono stati uniti a 10µl di formamide (Applied Biosystems) in presenza di GeneScan500LIZ size-standard (Applied Biosystems). I campioni sono stati denaturati a 95°C per 2 minuti e caricati sul sequenziatore 3100 DNA Analyzer con capillare di 36cm. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante software Gene Mapper (Applied Biosystems).

Nella precedente relazione annuale erano stati descritti alcuni risultati preliminari derivanti dall'analisi eseguita su una casistica ristretta di pazienti. Di seguito riportiamo i dati complessivi ottenuti dall'analisi di 204 pazienti FALS (10 dei quali presentano anche demenza), 1230 SALS (66 con demenza) con nessun altro gene causativo SLA mutato. L'espansione è stata osservata in 61/204 (29.9%) FALS e in 65/1230 (5.3%) SALS. In 4 casi familiari in cui il DNA di più membri della famiglia era disponibile, l'espansione mostrava una chiara segregazione con la malattia. Analizzando ulteriori 55 pazienti FALS e 45 SALS con mutazioni in altri geni causativi, l'espansione di C9orf72 è stata osservata in un soggetto FALS positivo per p.A382T in TARDBP e in un soggetto SALS con la mutazione p.R133P sul gene PRPH. L'espansione è stata inoltre osservata in 2/862 (0.2%) soggetti sani.

Interessanti anche le evidenze derivanti dalla correlazione genotipo-fenotipo: tra i soggetti positivi per C9orf72, è stata osservata una proporzione più alta di di pazienti con insorgenza bulbare (34% vs 23%; p=0.03). Tra i soggetti con insorgenza spinale, i pazienti con espansione mostrano un coinvolgimento iniziale meno frequente degli arti superiori (26% vs 36%; p=0.04). Inoltre i soggetti portatori di espansione hanno una durata della malattia ridotta rispetto ai non espansi (media 22.7 mesi vs 40.1 mesi). Infine 15/128 (11.8%) soggetti presenta in anamnesi una positività familiare per altre patologie neurodegenerative (M di Alzheimer e Parkinson).

In conclusione i dati riportati nello studio hanno confermato come C9orf72 rappresenti la causa principale di SLA sia familiare che sporadica.

UBQLN2

Ubiquilina-2, codificata dal gene UBQLN2 (localizzato sul cromosoma X), è una proteina di 624 aminoacidi e appartiene alla famiglia delle proteine ubiquitina-simili. Recentemente, alcune

mutazioni a carico del gene UBQLN2 sono state osservate in casi di SLA e SLA/demenza. La maggior parte delle mutazioni individuate coinvolgono residui prolinici all'interno della regione ripetuta PXX che è unica per il gene UBQLN2. L'analisi funzionale ha dimostrato che le mutazioni nel gene UBQLN2 portano ad un'alterazione del processo della degradazione delle proteine.

Pertanto abbiamo analizzato il gene UBQLN2 in 819 casi sporadici di SLA (SALS), in 226 casi di SLA familiare (FALS), in 53 pazienti affetti da SLA associata anche a demenza frontotemporale (ALS-FTD) e in 63 pazienti affetti da demenza frontotemporale (FTD). Abbiamo anche incluso nell'analisi del gene UBQLN2 55 pazienti FALS portatori di mutazioni in altri geni responsabili della SLA (classificati come FALS-G). Inoltre, è stata effettuata l'analisi molecolare soltanto per la regione ripetuta PXX in 845 controlli sani.

Abbiamo trovato cinque varianti nel gene UBQLN2 in altrettanti casi di SLA indipendenti. Queste varianti sono mutazioni missenso che determinano differenti sostituzioni amonoacidiche. Tre di loro (2 nuove e 1 già riportata in precedenza in letteratura) coinvolgono un residuo di prolina all'interno della regione ripetuta PXX (c.1490C>A p.P479H; c.1516C>T p.P506S; c.1598C>T p.P533L) e sono state trovate in casi FALS. Le altre due varianti sono state identificate in un paziente SALS (in questo caso è coinvolto il residuo valina in posizione 538, c.1612G>C p.V538L) e, in un paziente FALS-G (c.1337T>G p.M446R) portatore, tra l'altro, anche della mutazione p.M337V sul gene TARDBP. Nessuna delle varianti è risultata essere presente nei soggetti controllo analizzati. Per quanto riguarda la clinica dei pazienti con mutazioni sul gene UBQLN2, i soggetti FALS mostrano un'età di insorgenza abbastanza anticipata (media 32 anni, range 30-43 anni) se confrontata al resto della coorte di pazienti FALS negativi (media 52 anni, range 20-85 anni). La progressione della malattia è invece molto eterogenea tra i soggetti positivi (range 6 mesi-5 anni). Il fenotipo clinico si manifesta in tutti i casi con una predominanza di segni di primo motoneurone.

In conclusione, l'analisi genetica ha evidenziato che nella nostra coorte di pazienti le mutazioni di UBQLN2 coinvolgono circa il 2% dei casi di FALS. Al contrario, UBQLN2 rappresenterebbe una causa genetica rara nei soggetti SALS. Sebbene l'esatto ruolo di ubiquilina 2 non sia ancora stato definito, si pensa che la sua associazione con il sistema del proteasoma dell'ubiquitina (UPS) giochi un ruolo importante nella patogenesi della SLA. Infatti mutazioni associate a SLA sono state identificate in altri geni (OPTN, VCP) codificanti proteine coinvolte nello stesso sistema UPS: differenti genotipi potrebbero dunque convergere nello stesso fenotipo clinico attraverso pathways comuni.

PFN1

Mutazioni nel gene PFN1 codificante profilina 1, una proteina che regola la crescita dei filamenti di actina attraverso la sua capacità di legarsi all'actina-G monomerica, sono state recentemente descritte in pazienti affetti da SLA familiare mediante tecnica di sequenziamento massivo dell'esoma. Studi funzionali hanno inoltre dimostrato che la forma di PFN1 mutata porta alla formazione di aggregati citoplasmatici insolubili ubiquitinati, contenenti tra l'altro la proteina TDP-43, e ad alterati livelli di actina. Nel loro insieme queste evidenze sperimentali sottolineano l'importanza di specifiche alterazioni del citoscheletro nella patogenesi della SLA.

In questo studio abbiamo valutato il ruolo di di PFN1 in una larga coorte di pazienti SLA sporadici di origine italiana. Lo studio è stata arricchito dall'analisi molecolare condotta su una coorte di pazienti FTD (n=203). Dei 1168 casi SALS analizzati, 49 soggetti mostravano un quadro clinico riconducibile al fenotipo ALS-FTD.

Lo screening genetico ha evidenziato la presenza della sola variante p.E117G (già riportata in letteratura) in un unico paziente SALS con insorgenza bulbare all'età di 73 anni. La patogenicità di tale mutazione deve essere ancora del tutto chiarita dal momento che la stessa variante è stata osservata anche in soggetti sani (3 su 7560 individui analizzati). Inoltre è stata osservata in un paziente SALS la seguente variante sinonima (c.45G>C p.G15G). Infine il polimorfismo rs13204

(c.334C>T p.L112L) è stato osservato nella stessa frequenza nel gruppo SLA e nel gruppo soggetti sani (n=1512). Nessun soggetto FTD è risultato essere portatore di alcuna mutazione. Possiamo dunque concludere che, alla luce dei risultati ottenuti dallo screening molecolare, le mutazioni di PFN1 rappresentano una causa molto rara per lo sviluppo della SLA sporadica nella popolazione italiana. Il contributo di PFN1 nella genetica della FTD necessita di ulteriori approfondimenti.

SOD1

C9orf72 rappresenta ormai il gene causativo principale della SLA; tuttavia una ragione per eseguire lo screening del gene SOD1, che codifica per la superossido dismutasi rame-zinco, in pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA) risiede, oltre che in ragioni diagnostiche, nella possibilità di identificare nuove mutazioni con caratteristiche tali da poter dare informazioni utili sulla patogenesi della malattia.

In questo studio internazionale abbiamo identificato una nuova mutazione nel gene SOD1, la variante c.352C>G (L117V), in due famiglie di origine siriana affette da SLA che vivono in Europa. La malattia mostra in maniera insolita una bassa penetranza e una lenta progressione. Negli eritrociti, l'attività totale dell'enzima SOD è risultata paragonabile a quella dosata nei portatori della mutazione e nei controlli familiari senza mutazioni nel gene SOD1. La stabilità strutturale delle proteine mutate L117V e wild-type in condizioni denaturanti erano invece paragonabili ma considerevolmente inferiori rispetto alla SOD1 murina. Usando un saggio ELISA specifico per le specie SOD1 misfolded, non abbiamo trovato differenze nel contenuto della proteina SOD1 misfolded tra estratti di fibroblasti da controlli e da pazienti portatori della variante L117V. Al contrario, elevati livelli di proteina SOD1 misfolded sono stati ritrovati in fibroblasti di pazienti SLA portatori di sette altre mutazioni nel gene SOD1. Queste evidenze ci permettono di affermare che le mutazioni nel gene SOD1 che si traducono in una proteina pienamente stabile sono associate a bassa penetranza della malattia e possono essere identificate anche in casi apparentemente sporadici di SLA. La SOD1 umana wild-type è moderatamente stabile ed è stata ritrovata all'interno del range di stabilità delle varianti SOD1 note per causare la SLA. Questi elementi supportano l'ipotesi generale che la SOD1 wild-type possa essere implicata nella patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica.

Ratti A, Corrado L, Castellotti B, Del Bo R, Fogh I, Cereda C, Tiloca C, D'Ascenzo C, Bagarotti A, Pensato V, Ranieri M, Gagliardi S, Calini D, Mazzini L, Taroni F, Corti S, Ceroni M, Oggioni GD, Lin K, Powell JF, Sorarù G, Ticozzi N, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Silani V; *SLAGEN Consortium. C9ORF72 repeat expansion in a large Italian ALS cohort: evidence of a founder effect.*

Neurobiol Aging. 2012 Oct;33(10):2528.e7-14
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.008>
IF 6.189

Tiloca C, Ticozzi N, Pensato V, Corrado L, Del Bo R, Bertolin C, Fenoglio C, Gagliardi S, Calini D, Lauria G, Castellotti B, Bagarotti A, Corti S, Galimberti D, Cagnin A, Gabelli C, Ranieri M, Ceroni M, Siciliano G, Mazzini L, Cereda C, Scarpini E, Sorarù G, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Ratti A, Landers JE, Silani V; *SLAGEN Consortium. Screening of the PFN1 gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in frontotemporal dementia.*

Neurobiol Aging. 2012 Oct 11.
doi:pii: S0197-4580(12)00473-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.016>
IF 6.189

Gellera C, Tiloca C, Del Bo R, Corrado L, Pensato V, Agostini J, Cereda C, Ratti A, Castellotti B, Corti S, Bagarotti A, Cagnin A, Milani P, Gabelli C, Riboldi G, Mazzini L, Sorarù G, D'Alfonso S, Taroni F, Comi GP, Ticozzi N, Silani V;

The SLAGEN Consortium. Ubiquilin 2 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012 Nov 8.

doi:10.1136/jnnp-2012-303433

IF 4.764

Synofzik M, Ronchi D, Keskin I, Basak AN, Wilhelm C, Gobbi C, Birve A, Biskup S, Zecca C, Fernández-Santiago R, Kaugesaar T, Schöls L, Marklund SL, Andersen PM.

Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS.

Hum Mol Genet. 2012 Aug 15;21(16):3568-74. doi: 10.1093/hmg/dds188

IF 7.636

3. Altre malattie del motoneurone

La sindrome di Brown-Vialetto-Van Laere (BVVL) è una malattia rara caratterizzata da una paralisi progressiva pontobulbare e da sordità sensoriale. Mutazioni causative nei geni codificanti il trasportatore 2 (hRFT2) e 3 (hRFT3) della riboflavina sono state identificate in pazienti affetti da tale sindrome.

In questo studio abbiamo indagato le caratteristiche cliniche e molecolari di una paziente affetta da una grave forma di BVVL nella quale lo screening del gene SLC52A3/hRFT2 è risultato negativo. L'analisi di sequenza ha identificato due nuove mutazioni eterozigoti nel gene SLC52A2/hRFT3, precisamente c.155C>T e c.1255G>A, che producono, rispettivamente, i cambi amminoacidici p.S52F e p.G419S nella sequenza proteica. Abbiamo inoltre condotto una serie approfondita di studi di espressione e funzionali che ci hanno permesso di dimostrare che queste varianti alterano l'espressione del gene e del corrispondente trasportatore portando ad una riduzione significativa del trasporto di riboflavina.

I risultati di questa ricerca supportano il ruolo patogenetico di SLC52A2/hRFT3 nella sindrome di Brown-Vialetto-Van Laere con importanti implicazioni cliniche e terapeutiche.

Marianna Ciccolella, Stefania Corti, MD, Michela Catteruccia, Stefania Petrini Giulia Tozzi, Teresa Rizza, Rosalba Carrozzo, Monica Nizzardo, Andreina Bordoni, Dario Ronchi, Adele D'Amico, Cristiano Rizzo, Giacomo Pietro Comi, Enrico Bertini.

Riboflavin Transporter 3 involvement in Infantile Brown-Vialetto-van Laere Disease: two novel mutations.

J Med Genet. 2012 Dec 14. [Epub ahead of print]

4. Malattie mitocondriali

- Ronchi D, Garone C, Bordoni A, Gutierrez Rios P, Calvo SE, Ripolone M, Ranieri M, Rizzuti M, Villa L, Magri F, Corti S, Bresolin N, Mootha VK, Moggio M, Dimauro S, Comi GP, Sciacco M.

Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions.

Brain. 2012 Nov;135(Pt 11):3404-15. doi: 10.1093/brain/aws258. Epub 2012 Oct 4.

La diagnosi molecolare delle malattie mitocondriali rimane ancora un obiettivo difficilmente raggiungibile in una rilevante percentuale di pazienti. I recenti progressi nelle tecniche di sequenziamento di nuova generazione stanno migliorando considerevolmente le possibilità di ricercare mutazioni anche in pazienti sporadici. Le sindromi associate a delezioni multiple del DNA mitocondriale sono causate da diversi difetti molecolari che danno luogo a un ampio spettro di manifestazioni cliniche a insorgenza prevalentemente nell'età adulta, che vanno

dall'oftalmoplegia esterna progressiva a disordini multisistemici di gravità variabile. Nel 50% dei soggetti affetti le mutazioni causative di queste patologie sono tuttora sconosciute. In questo lavoro abbiamo applicato le tecniche di sequenziamento di nuova generazione limitatamente ai geni che codificano per prodotti a localizzazione mitocondriale (MitoEsoma), a un gruppo di pazienti affetti da miopatia mitocondriale ad esordio adulto con delezioni multiple del DNA mitocondriale nel muscolo scheletrico. Questo ci ha permesso di identificare mutazioni autosomiche recessive nel gene DGUOK (che codifica per la deossiguanosina chinasi mitocondriale). Tali mutazioni erano state in precedenza associate a una forma epatocerebrale infantile di deplezione del DNA mitocondriale. Le mutazioni del gene DGUOK sono state trovate in cinque probandi indipendenti, che costituiscono il 5.6% della nostra casistica totale di pazienti con delezioni multiple del mtDNA; tali mutazioni compromettono sia l'attività enzimatica sia la stabilità proteica della deossiguanosina chinasi. Le manifestazioni cliniche sono variabili e comprendono miopatia mitocondriale con o senza oftalmoplegia esterna progressiva, rabdomiolisi ricorrente in una giovane donna che è stata sottoposta a trapianto di fegato a nove mesi e malattia del secondo motoneurone a esordio adulto con un lieve deficit cognitivo. Queste scoperte rafforzano l'opinione che mutazioni nei geni coinvolti nel metabolismo dei deossiribonucleotidi possono causare fenotipi clinici molto eterogenei e suggeriscono che il gene DGUOK dovrebbe essere indagato nei pazienti che presentano un accumulo muscolare di delezioni multiple del DNA mitocondriale.

- M. Ranieri, D. Ronchi, A. Bordoni, M. Rizzuti, M.G. Moggio, M. Sciacco, A. Govoni, G. Riboldi, S. Messina, V. Silani, S.P. Corti, N. Bresolin, G. Comi
CPEO due to mutations in the tRNA for isoleucine: two additional Italian cases
XXII Meeting of The European Neurological Society, Prague 9-12 June 2012

Le mutazioni che risiedono nei geni che codificano per i tRNA mitocondriali sono tra i più comuni difetti trasmessi per via matrilineare. Essi comportano difetti nella sintesi proteica e portano allo sviluppo di fenotipi clinici eterogenei. In particolare il tRNA dell'isoleucina è un hot spot mutazionale e vari difetti sono stati associati a condizioni cliniche che includono l'oftalmoplegia e la cardiomiopatia.

In questo studio abbiamo indagato le caratteristiche cliniche, istologiche e molecolari di due pazienti, accomunati da mutazioni nel gene mitocondriale MT-tRNA(Ile). Il primo paziente è un uomo di 66 anni con oftalmoplegia esterna progressiva cronica (cPEO) dovuta alla nuova variante nucleotidica m.4267A>G.

Un secondo paziente, in precedenza diagnostico per la sindrome di Klippel-Feil presenta la variante nota m.4316A>G in associazione a eterogenee manifestazioni cliniche come un difetto cognitivo lieve, disartria, ptosi e oftalmoplegia.

Le analisi istologiche, condotte su muscolo scheletrico, hanno evidenziato fibre patologiche del tipo ragged-red nel primo paziente e fibre difettive per l'attività della citocromo c ossidasi in entrambi i probandi. Le analisi di Southern blot erano negative mentre un saggio specifico di PCR ci ha permesso di evidenziare la presenza di genomi mitocondriali deleti.

L'analisi di sequenza del DNA mitocondriale ci ha consentito di conseguire la diagnosi molecolare in entrambi i pazienti. Le due mutazioni sono presenti in posizioni conservate nelle regioni Acc e T-loop della struttura secondaria del tRNA. Mentre la variante m.4316G>A era presente in forma omoplasmica, abbiamo potuto evidenziare una eteroplasmia nel muscolo del 60% per la variante m.4267A>G.

Stiamo adesso conducendo analisi in fibre muscolari isolate per la valutazione della soglia mutazionale per le due varianti. La mutazione 4316G>A è stata recentemente identificata in un paziente con cardiomiopatia e grave sordità in associazione con una seconda variante che interessa il gene MT-ND1.

Questo studio espande lo spettro delle mutazioni puntiformi associate alla cPEO sporadica e sottolinea l'importanza di una completa analisi di sequenza del DNA mitocondriale come metodo di

screening. Inoltre il nostro studio corrobora il valore patogenetico della mutazione m.4316G>A avendola identificata in un secondo probando indipendente.

5. Mitocondrio e malattie neurodegenerative

- Rango M, Arighi A, Marotta G, Ronchi D, Bresolin N.

PINK1 parkinsonism and Parkinson disease: Distinguishable brain mitochondrial function and metabolomics.

Mitochondrion. 2012 Oct 10. doi:pii: S1567-7249(12)00225-5.10.1016/j.mito.2012.10.004. [Epub ahead of print]

Mutazioni nel gene PINK1 sono associate a parkinsonismo autosomico recessivo a esordio precoce (EOP), la cui manifestazione fenotipica, anche se variabile, generalmente è sovrapponibile a quella della malattia di Parkinson (PD) idiopatica. In questo lavoro è stato ampiamente caratterizzato un paziente portatore delle mutazioni eterozigoti composite A168P e W437X del gene PINK1 investigando le manifestazioni cliniche e gli aspetti molecolari del metabolismo cerebrale. A parte alcuni risultati tipici del parkinsonismo a esordio precoce, le caratteristiche cliniche e la SPECT si sovrappongono quasi del tutto con quelle tipiche della sindrome di Parkinson idiopatica (PD). L'importanza del nostro studio risiede nell'evidenza che gli studi metabolomici condotti sul cervello, compiuti mediante risonanza magnetica e PET, sono chiaramente distinguibili tra le due patologie ed identificano nel caso del parkinsonismo associato a mutazioni di PINK1 una precisa "firma" funzionale.

- Ronchi D Vallejo D, Ripolone M, Melzi V, Fagiolari G, Lucchini V, Violano R, Bordoni A, Lamperti C, Villa L, Corti S, Balottin U, Bresolin N, Sciacco M, Berardinelli A, Moggio M, Comi G

Muscle cytochrome c oxidase defect and mitochondrial DNA depletion in spinal muscular atrophy 42nd Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans 12-17 October 2012

L'amiotrofia spinale (SMA) è una malattia neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni del midollo spinale e si presenta con debolezza e atrofia muscolare. E' causata prevalentemente da mutazioni recessive nel gene SMN1. Sulla base dell'età d'esordio e del decorso clinico i pazienti sono suddivisi in tre gruppi principali (SMA di tipo 1, 2 e 3). La deplezione del DNA mitocondriale è stata precedentemente descritta nel muscolo di pazienti SMA e considerata secondaria all'atrofia del muscolo. I difetti nei complessi della catena respiratoria mitocondriale è stata parimenti osservata ma il loro significato patogenetico rimane non chiaro.

In questo studio abbiamo condotto una revisione sistematica di una serie di biopsie muscolari di pazienti SMA per investigare il possibile coinvolgimento del metabolismo mitocondriale. In tutto abbiamo indagato 15 pazienti con una diagnosi di SMA, confermata a livello molecolare. I nostri studi hanno permesso di evidenziare un importante difetto nell'attività della citocromo c ossidasi, particolarmente evidente nei pazienti SMA1, affetti dalla forma più grave di patologia. Le analisi molecolari condotte con PCR quantitativa hanno inoltre evidenziato una rilevante riduzione del DNA mitocondriale contenuto nel muscolo. Analisi preliminari di espressione genica hanno messo in luce una riduzione dei fattori associati alla biogenesi dei mitocondri. Ci proponiamo nei prossimi mesi di completare queste analisi, studiare i muscoli a livello di singole fibre isolate ed estendere queste importanti osservazioni anche al modello animale di SMA, già disponibile presso il nostro laboratorio.

6. Canalopatie muscolari

Ulzi G, Lecchi M, Sansone V, Redaelli E, Corti E, Saccomanno D, Pagliarani S, Corti S, Magri F, Raimondi M, D'Angelo G, Modoni A, Bresolin N, Meola G, Wanke E, Comi GP, Lucchiarri S.

Myotonia congenita: novel mutations in CLCN1 gene and functional characterizations in Italian patients.

J Neurol Sci. 2012 Jul 15;318(1-2):65-71.

Questo studio, effettuato su una coorte di oltre 70 pazienti, ha permesso di individuare 12 nuove mutazioni nel gene CLCN1, responsabile delle due forme di Miotonia Congenita, recessiva e dominante. Di sei di queste è stato valutato il comportamento del canale mediante elettrofisiologia cellulare: nel range fisiologico dei potenziali di membrana muscolare tutte le mutazioni testate riducono la probabilità d'apertura del canale, e ne modificano la cinetica di deattivazione.

7. Glicogenosi/Malattie metaboliche

Glicogenosi di tipo 3

La glicogenosi di tipo III è una rara malattia del metabolismo del glicogeno a trasmissione autosomica recessiva che comporta l'accumulo di glicogeno nei tessuti, in special modo fegato e muscolo scheletrico. L'accumulo è dovuto alla perdita dell'attività dell'enzima debranchificante, uno dei due enzimi deputati alla degradazione del glicogeno in glucosio. La diagnosi è confermata da un saggio enzimatico su tessuto, epatico o muscolare, o su sangue che misura l'attività dell'enzima debranchificante. La diagnosi genetica è importante per la consulenza genetica delle famiglie i cui figli sono affetti. In particolare, in alcune popolazioni la malattia è causata da una mutazione ricorrente come nella popolazione nord africana di origine ebraica.

In questo lavoro abbiamo collaborato alla caratterizzazione molecolare di una coorte di pazienti tunisini con glicogenosi di tipo III, riscontrando nuove mutazioni e ampliando così lo spettro delle mutazioni descritte in questa malattia.

Mili A, Ben Charfeddine I, Mami O, Abdelhak S, Adala L, Amara A, Pagliarani S, Lucchiari S, Ayadi A, Tebib N, Harbi A, Bouguila J, H'Mida D, Saad A, Limem K, Comi GP, Gribaa M. *Molecular and biochemical characterization of Tunisian patients with glycogen storage disease type III.*

J Hum Genet. 2012 Mar;57(3):170-5. doi: 10.1038/jhg.2011.122. Epub 2011 Nov 17. Erratum in: **J Hum Genet.** 2012 Mar;57(3):221.

Finanziamento per progetto di ricerca dal titolo:

Ente erogatore: Associazione Italiana Glicogenosi (AIG), via Roma, 2, Assago (MI), Italia.

“Generazione di un modello murino knockout per la Glicogenosi di tipo III (GSD III): Agl/23092010 project”.

Il progetto ha lo scopo di creare un modello animale della patologia umana, determinata da accumulo di glicogeno in tessuti specifici, dovuta al deficit di attività dell'enzima debranchificante il glicogeno (GBE). La generazione dell'animale knockout è stata ottenuta per ablazione del gene Agl, omologo murino del gene umano AGL. L'obiettivo dello studio è una più approfondita caratterizzazione fisiopatologica della malattia, che offra l'opportunità di testare terapie farmacologiche e non alternative alle attuali.

Ulteriore sviluppo:

“Crioconservazione degli embrioni”.

Malattia di Pompe

In questo studio abbiamo valutato la prevalenza dell'incontinenza fecale e urinaria in un gruppo di pazienti affetti da glicogenosi di tipo 2 ad esordio adulto. Volevamo inoltre valutare se i pazienti incontinenti presentassero un fenotipo più grave. In assenza di altri fattori che potessero spiegarla, abbiamo osservato incontinenza urinaria nel 25% dei soggetti affetti, un valore indicativamente superiore a quello della popolazione generale di pari età. Abbiamo quindi evidenziato una serie di fattori per il management di questa condizione nei pazienti con glicogenosi e descritto in modo

associate e sono contrastanti in merito alla risposta clinica e sierologica della patologia neurologica alla DSG.

I campioni di pazienti adulti celiaci con e senza complicanze neurologiche sono stati reclutati tramite la raccolta retrospettiva dei dati delle cartelle cliniche alla prima diagnosi e dopo almeno 1 anno di DSG. E' stata eseguita l'indagine degli anticorpi anti gangliosidi di classe IgG, IgM ed anche IgA, al fine di verificare una possibile origine mucosale, dato che i gangliosidi sono altamente espressi nelle membrane delle cellule epiteliali intestinali. Recentemente è stata infatti presa in considerazione l'ipotesi di un meccanismo immuno-mediato da anticorpi anti-gangliosidi.

Vista l'alta prevalenza di associazione tra MC e malattie autoimmuni, quali la tiroidite e il diabete mellito di tipo 1, sono stati inclusi nello studio pazienti anche con comorbidità autoimmune.

I pazienti adulti celiaci di prima diagnosi con riferita sintomatologia neurologica sono stati valutati ambulatorialmente al fine di reclutare quelli con le seguenti complicanze neurologiche: neuropatia periferica, epilessia, cefalea, atassia cerebellare e sospetta leucoencefalopatia multifocale.

I pazienti con interessamento neurologico hanno effettuato indagini strumentali secondo un protocollo in uso nella prassi clinica e una volta reclutati nello studio, i loro campioni di sangue sono stati raccolti per il dosaggio anticorpale.

I sieri di donatori sani ed i sieri di pazienti affetti da patologie neurologiche associate con anticorpi anti gangliosidi, rispettivamente come controlli negativi e positivi per patologia neurologica sono stati testati per tutte le classi di immunoglobuline.

LAVORI ESTESI SU RIVISTE INTERNAZIONALI PEER-REVIEWED INDICIZZATE

- 1) Pane M, Messina S, Vasco G, Foley AR, Morandi L, Pegoraro E, Mongini T, D'Amico A, Bianco F, Lombardo ME, Scalise R, Bruno C, Berardinelli A, Pini A, Moroni I, Mora M, Toscano A, Moggio M, Comi G, Santorelli FM, Bertini E, Muntoni F, Mercuri E. *Respiratory and cardiac function in congenital muscular dystrophies with alpha dystroglycan deficiency. Neuromuscul Disord.* 2012 Aug;22(8):685-9. doi: 10.1016/j.nmd.2012.05.006. Epub 2012 Jun 22. PubMed PMID: 22727687; **PubMed Central PMCID: PMC3476532.**
- 2) Catania C, Spitaleri G, Delmonte A, Giovannini M, Toffalorio F, Noberasco C, Bresolin N, Comi G, De Pas T. *Safety of systemic chemotherapy in a patient with mitochondrial myopathy and non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol.* 2012 Aug 20;30(24):e226-8. doi: 10.1200/JCO.2011.40.1828. Epub 2012 Jun 18. **PubMed PMID:22711848.**
- 3) Angelini C, Semplicini C, Ravaglia S, Bembi B, Servidei S, Pegoraro E, Moggio M, Filosto M, Sette E, Crescimanno G, Tonin P, Parini R, Morandi L, Marrosu G, Greco G, Musumeci O, Di Iorio G, Siciliano G, Donati MA, Carubbi F, Ermani M, Mongini T, Toscano A; Italian GSDII Group. Observational clinical study in juvenile-adult glycogenosis type 2 patients undergoing enzyme replacement therapy for up to 4 years. *J Neurol.* 2012 May;259(5):952-8. doi: 10.1007/s00415-011-6293-5. Epub 2011 Nov 12. PubMed PMID: 22081099;
- 4) Gellera C, Tiloca C, Del Bo R, Corrado L, Pensato V, Agostini J, Cereda C, Ratti A, Castellotti B, Corti S, Bagarotti A, Cagnin A, Milani P, Gabelli C, Riboldi G, Mazzini L, Sorarù G, D'Alfonso S, Taroni F, Comi GP, Ticozzi N, Silani V; The SLAGEN Consortium. *Ubiquilin 2 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012 Nov 8. doi:10.1136/jnnp-2012-303433
- 5) Tiloca C, Ticozzi N, Pensato V, Corrado L, Del Bo R, Bertolin C, Fenoglio C, Gagliardi S, Calini D, Lauria G, Castellotti B, Bagarotti A, Corti S, Galimberti D, Cagnin A, Gabelli C,

- Ranieri M, Ceroni M, Siciliano G, Mazzini L, Cereda C, Scarpini E, Sorarù G, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Ratti A, Landers JE, Silani V;
SLAGEN Consortium. Screening of the PFN1 gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in frontotemporal dementia.
Neurobiol Aging. 2012 Oct 11. doi:pii: S0197-4580(12)00473-3.
- 6) Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Riboldi G, Comi GP, Bresolin N, Corti S.
Direct reprogramming of adult somatic cells into other lineages: past evidence and future perspectives.
Cell Transplant. 2012 Oct 3. PMID: 23044010 [PubMed - as supplied by publisher]
- 7) Ronchi D, Garone C, Bordoni A, Gutierrez Rios P, Calvo SE, Ripolone M, Ranieri M, Rizzuti M, Villa L, Magri F, Corti S, Bresolin N, Mootha VK, Moggio M, Dimauro S, Comi GP, Sciacco M.
Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions.
Brain. 2012 Nov;135(Pt 11):3404-15 doi: 10.1093/brain/aws258.
- 8) Valenza F, Pizzocri M, Salice V, Chevallard G, Fossali T, Coppola S, Froio S, Polli F, Gatti S, Fortunato F, Comi GP, Gattinoni L.
Sodium Bicarbonate Treatment during Transient or Sustained Lactic Acidemia in Normoxic and Normotensive Rats.
PLoS One. 2012;7(9):e46035... doi: 10.1371/journal.pone.0046035
- 9) Protti A, Lecchi A, Fortunato F, Artoni A, Greppi N, Vecchio S, Fagiolari G, Moggio M, Comi GP, Mistraretti G, Lanticina B, Faraldi L, Gattinoni L.
Metformin overdose causes platelet mitochondrial dysfunction in humans.
Crit Care. 2012 Oct 3;16(5):R180 doi:10.1186/cc11663
- 10) Ratti A, Corrado L, Castellotti B, Del Bo R, Fogh I, Cereda C, Tiloca C, D'Ascenzo C, Bagarotti A, Pensato V, Ranieri M, Gagliardi S, Calini D, Mazzini L, Taroni F, Corti S, Ceroni M, Oggioni GD, Lin K, Powell JF, Sorarù G, Ticozzi N, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Silani V;
SLAGEN Consortium. C9ORF72 repeat expansion in a large Italian ALS cohort: evidence of a founder effect.
Neurobiol Aging. 2012 Oct;33(10):2528.e7-14
- 11) Remiche G, Herbaut AG, Ronchi D, Lamperti C, Magri F, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.
Incontinence in late-onset pompe disease: an underdiagnosed treatable condition.
EurNeurol. 2012;68(2):75-8. DOI: 10.1159/000338776
- 12) Bello L, Piva L, Barp A, Taglia A, Picillo E, Vasco G, Pane M, Previtali SC, Torrente Y, Gazzero E, Motta MC, Grieco GS, Napolitano S, Magri F, D'Amico A, Astrea G, Messina S, Sframeli M, Vita GL, Boffi P, Mongini T, Ferlini A, Gualandi F, Soraru' G, Ermani M, Vita G, Battini R, Bertini E, Comi GP, Berardinelli A, Minetti C, Bruno C, Mercuri E, Politano L, Angelini C, Hoffman EP, Pegoraro E.
Importance of SPP1 genotype as a covariate in clinical trials in Duchenne muscular dystrophy.
Neurology. 2012 Jul 10;79(2):159-62. doi: 10.1212/WNL.0b013e31825f04ea.
- 13) Magri F, Del Bo R, D'Angelo MG, Sciacco M, Gandossini S, Govoni A, Napoli L, Ciscato P, Fortunato F, Brighina E, Bonato S, Bordoni A, Lucchini V, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

Frequency and characterisation of anoctamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients.

Neuromuscul Disord. 2012 Nov;22(11):934-43 doi: 10.1016/j.nmd.2012.05.001.

- 14) Angelini C, Semplicini C, Ravaglia S, Moggio M, Comi GP, Musumeci O, Pegoraro E, Tonin P, Filosto M, Servidei S, Morandi L, Crescimanno G, Marrosu G, Siciliano G, Mongini T, Toscano A;
Italian Group on GSDII. New motor outcome function measures in evaluation of late-onset Pompe disease before and after enzyme replacement therapy.
Muscle Nerve. 2012 Jun;45(6):831-4 doi: 10.1002/mus.23340..
- 15) Protti A, Fortunato F, Monti M, Vecchio S, Gatti S, Comi GP, De Giuseppe R, Gattinoni L.
Metformin overdose, but not lactic acidosis per se, inhibits oxygen consumption in pigs.
Crit Care. 2012 May 8;16(3):R75 doi:10.1186/cc11332
- 16) Ulzi G, Lecchi M, Sansone V, Redaelli E, Corti E, Saccomanno D, Pagliarani S, Corti S, Magri F, Raimondi M, D'Angelo G, Modoni A, Bresolin N, Meola G, Wanke E, Comi GP, Lucchiari S.
Myotonia congenita: novel mutations in CLCN1 gene and functional characterizations in Italian patients.
J Neurol Sci. 2012 Jul 15;318(1-2):65-71. doi: 10.1016/j.jns.2012.03.024.
- 17) Fumagalli M, Fracassetti M, Cagliani R, Forni D, Pozzoli U, Comi GP, Marini F, Bresolin N, Clerici M, Sironi M.
An evolutionary history of the selectin gene cluster in humans.
Heredity (Edinb). 2012 Aug;109(2):117-26. doi: 10.1038/hdy.2012.20.
- 18) Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Donadoni C, Salani S, Rizzo F, Nardini M, Riboldi G, Magri F, Zanetta C, Faravelli I, Bresolin N, Comi GP.
Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.040
Exp Cell Res. 2012 Aug 1;318(13):1528-41.
- 19) Cagliani R, Guerini FR, Fumagalli M, Riva S, Agliardi C, Galimberti D, Pozzoli U, Goris A, Dubois B, Fenoglio C, Forni D, Sanna S, Zara I, Pitzalis M, Zoledziewska M, Cucca F, Marini F, Comi GP, Scarpini E, Bresolin N, Clerici M, Sironi M.
A trans-specific polymorphism in ZC3HAV1 is maintained by long-standing balancing selection and may confer susceptibility to multiple sclerosis.
Mol Biol Evol. 2012 Jun;29(6):1599-613 doi: 10.1093/molbev/mss002.
- 20) Romei M, D'Angelo MG, LoMauro A, Gandossini S, Bonato S, Brighina E, Marchi E, Comi GP, Turconi AC, Pedotti A, Bresolin N, Aliverti A.
Low abdominal contribution to breathing as daytime predictor of nocturnal desaturation in adolescents and young adults with Duchenne Muscular Dystrophy.
Respir Med. 2012 Feb;106(2):276-83. Epub 2011 Nov 13. ; doi: 10.1016/j.rmed.2011.10.010
- 21) Cagliani R, Fumagalli M, Guerini FR, Riva S, Galimberti D, Comi GP, Agliardi C, Scarpini E, Pozzoli U, Forni D, Caputo D, Asselta R, Biasin M, Paraboschi EM, Bresolin N, Clerici M, Sironi M.
Identification of a new susceptibility variant for multiple sclerosis in OAS1 by population genetics analysis.
Hum Genet. 2012 Jan;131(1):87-97. Epub 2011 Jul 7. doi: 10.1007/s00439-011-1053-2.

- 22) D'Angelo MG, Gandossini S, Martinelli Boneschi F, Sciorati C, Bonato S, Brighina E, Comi GP, Turconi AC, Magri F, Stefanoni G, Brunelli S, Bresolin N, Cattaneo D, Clementi E. *Nitric oxide donor and non steroidal anti inflammatory drugs as a therapy for muscular dystrophies: evidence from a safety study with pilot efficacy measures in adult dystrophic patients.* **Pharmacol Res.** 2012 Apr;65(4):472-9. doi: 10.1016/j.phrs.2012.01.006.
- 23) Guerini FR, Cagliani R, Forni D, Agliardi C, Caputo D, Cassinotti A, Galimberti D, Fenoglio C, Biasin M, Asselta R, Scarpini E, Comi GP, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. *A functional variant in ERAP1 predisposes to multiple sclerosis.* **PLoS One.** 2012;7(1):e29931 doi: 10.1371/journal.pone.0029931.
- 24) Ranieri M, Del Bo R, Bordoni A, Ronchi D, Colombo I, Riboldi G, Cosi A, Servida M, Magri F, Moggio M, Bresolin N, Comi GP, Corti S. *Optic atrophy plus phenotype due to mutations in the OPA1 gene: two more Italian families.* **J Neurol Sci.** 2012 Apr 15;315(1-2):146-9 doi: 10.1016/j.jns.2011.12.002.
- 25) Cagliani R, Riva S, Marino C, Fumagalli M, D'Angelo MG, Riva V, Comi GP, Pozzoli U, Forni D, Cáceres M, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. *Variants in SNAP25 are targets of natural selection and influence verbal performances in women.* **Cell Mol Life Sci.** 2012 May;69(10):1705-15. doi: 10.1007/s00018-011-0896-y
- 26) Ronchi D, Sciacco M, Bordoni A, Raimondi M, Ripolone M, Fassone E, Di Fonzo A, Rizzuti M, Ciscato P, Cosi A, Servida M, Moggio M, Corti S, Bresolin N, Comi GP. *The novel mitochondrial tRNAAsn gene mutation m.5709T>C produces ophthalmoparesis and respiratory impairment.* **Eur J Hum Genet.** 2012 Mar;20(3):357-60. doi: 10.1038/ejhg.2011.238
- 27) Tiloca C, Ratti A, Pensato V, Castucci A, Sorarù G, Del Bo R, Corrado L, Cereda C, D'Ascenzo C, Comi GP, Mazzini L, Castellotti B, Ticozzi N, Gellera C, Silani V; *SLAGEN Consortium. Mutational analysis of VCP gene in familial amyotrophic lateral sclerosis.* **Neurobiol Aging.** 2012 Mar;33(3):630.e1-2 doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.025.
- 28) Salani S, Donadoni C, Rizzo F, Bresolin N, Comi GP, Corti S. *Generation of skeletal muscle cells from embryonic and induced pluripotent stem cells as an in vitro model and for therapy of muscular dystrophies.* **J Cell Mol Med.** 2012 Jul;16(7):1353-64. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01498.x.
- 29) Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Riboldi G, Rizzo F, Magri F, Bresolin N, Comi GP, Corti S. *Research advances in gene therapy approaches for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis.* **Cell Mol Life Sci.** 2012 May;69(10):1641-50. doi: 10.1007/s00018-011-0881-5.
- 30) Mili A, Ben Charfeddine I, Mamaï O, Abdelhak S, Adala L, Amara A, Pagliarani S, Lucchiari S, Ayadi A, Tebib N, Harbi A, Bouguila J, H'Mida D, Saad A, Limem K, Comi GP, Gribaa M. *Molecular and biochemical characterization of Tunisian patients with glycogen storage disease type III. J Hum* 2012 Mar;57(3):170-5.. Epub 2011 Nov 17. Erratum in: **J Hum Genet.** 2012 Mar;57(3):221. doi: 10.1038/jhg.2011.122

- 31) Synofzik M, Ronchi D, Keskin I, Basak AN, Wilhelm C, Gobbi C, Birve A, Biskup S, Zecca C, Fernández-Santiago R, Kaugesaar T, Schöls L, Marklund SL, Andersen PM. *Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS.* **Hum Mol Genet.** 2012 Aug 15;21(16):3568-74. doi: 10.1093/hmg/dds188
- 32) Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Nardini M, Ronchi D, Donadoni C, Salani S, Riboldi G, Magri F, Menozzi G, Bonaglia C, Rizzo F, Bresolin N, Comi GP. *Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy.* **Sci Transl Med.** 2012 Dec 19;4(165):165ra162. doi: 10.1126/scitranslmed.3004108. PubMed PMID: 23253609;
- 33) Ciccolella M, Corti S, Catteruccia M, Petrini S, Tozzi G, Rizza T, Carrozzo R, Nizzardo M, Bordoni A, Ronchi D, D'Amico A, Rizzo C, Comi GP, Bertini E. *Riboflavin Transporter 3 involvement in Infantile Brown-Vialetto-van Laere Disease: two novel mutations.* **J Med Genet.** 2012 Dec 14. [Epub ahead of print] DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101204
- 34) Rango M, Arighi A, Marotta G, Ronchi D, Bresolin N. *PINK1 parkinsonism and Parkinson disease: Distinguishable brain mitochondrial function and metabolomics.* **Mitochondrion.** 2012 Oct 10. doi: 10.1016/j.mito.2012. pii: S1567-7249(12)00225-5. [Epub ahead of print]
- 35) Cagliani R, Guerini FR, Raquel RA, Francesca B, Diego F, Cristina A, Ludovica G, Matteo F, Pozzoli U, Stefania R, Elena C, Martin S, Ferran C, Comi GP, Bresolin N, Mario C, Mario C, Siorni M. *Long-Standing Balancing Selection in the THBS4 Gene: Influence on Sex-Specific Brain Expression and Grey Matter Volumes in Alzheimer Disease.* **Hum Mutat.** 2013 Feb 19. doi: 10.1002/humu.22301. [Epub ahead of print]
- 36) Cagliani R, Pozzoli U, Forni D, Cassinotti A, Fumagalli M, Giani M, Fichera M, Lombardini M, Ardizzone S, Asselta R, de Franchis R, Riva S, Biasin M, Comi GP, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. *Crohn's disease loci are common targets of protozoa-driven selection.* **Mol Biol Evol.** 2013 Feb 6. [Epub ahead of print]
- 37) Ronchi D, Di Fonzo A, Lin W, Bordoni A, Liu C, Fassone E, Pagliarani S, Rizzuti M, Zheng L, Filosto M, Ferrò MT, Ranieri M, Magri F, Peverelli L, Li H, Yuan YC, Corti S, Sciacco M, Moggio M, Bresolin N, Shen B, Comi GP. *Mutations in DNA2 Link Progressive Myopathy to Mitochondrial DNA Instability.* **Am J Hum Genet.** 2013 Feb 7;92(2):293-300. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.12.014. Epub 2013 Jan 24.
- 38) Mazzone ES, Pane M, Sormani MP, Scalise R, Berardinelli A, Messina S, Torrente Y, D'Amico A, Doglio L, Viggiano E, D'Ambrosio P, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Bonfiglio S, De Sanctis R, Rolle E, Bianco F, Magri F, Rossi F, Vasco G, Vita G, Motta MC, Donati MA, Sacchini M, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Previtali S, Napolitano S, Bruno C, Politano L, Comi GP, Bertini E, Mercuri E. *24 month longitudinal data in ambulant boys with duchenne muscular dystrophy.* **PLoS One.** 2013;8(1):e52512. doi: 10.1371/journal.pone.0052512. Epub 2013 Jan 11.

- 39) Cheldi A, Ronchi D, Bordoni A, Bordo B, Lanfranconi S, Bellotti MG, Corti S, Lucchini V, Sciacco M, Moggio M, Baron P, Comi GP, Colombo A, Bersano A; and on behalf of Lombardia GENS collaborators. POLG1 mutations and stroke like episodes: a distinct clinical entity rather than an atypical MELAS syndrome. *BMC Neurol.* 2013 Jan 15;13(1):8. PubMed PMID: 23324391; PubMed Central PMCID: PMC3570393.
- 40) Mancuso M, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Uziel G, Zeviani M, Siciliano G; *Nation-wide Italian Collaborative Network of Mitochondrial Diseases. Fatigue and exercise intolerance in mitochondrial diseases. Literature revision and experience of the Italian Network of mitochondrial diseases.* **Neuromuscul Disord.** 2012 Dec;22 Suppl 3:S226-9. doi: 10.1016/j.nmd.2012.10.012. PubMed PMID
- 41) Kornblum C, Nicholls TJ, Haack TB, Schöler S, Peeva V, Danhauser K, Hallmann K, Zsurka G, Rorbach J, Iuso A, Wieland T, Sciacco M, Ronchi D, Comi GP, Moggio M, Quinzii CM, Dimauro S, Calvo SE, Mootha VK, Klopstock T, Strom TM, Meitinger T, Minczuk M, Kunz WS, Prokisch H. *Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease.* **Nat Genet.** 2013 Feb;45(2):214-9. doi: 10.1038/ng.2501. Epub 2013 Jan 13. PubMed PMID: 23313956.
- 42) Dilella R, Abicht A, Sergi P, Comi GP, Fonzo AD, Chidini G, Natacci F, Barbieri S, Lochmüller H. *Congenital Myasthenic Syndrome Due to Choline Acetyltransferase Mutations in Infants: Clinical Suspicion and Comprehensive Electrophysiological Assessment Are Important for Early Diagnosis.* **J Child Neurol.** 2013 Jan 4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23292760.

Enti e Progetti finanziati

- 1) **Fondazione ARiSLA** 2010-2013 “iPS derived neural stem cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis” P.I. Prof. Comi
- 2) **Fondazione Telethon** 2010-2013 “Development of a therapeutic approach for Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress (SMARD1) using human induced pluripotent stem cell–derived neural stem cells and motor neurons” P.I. Prof. Comi
- 3) **Fondazione Telethon** 2010-2012 GGP09107 “Neuroprotection in Spinal Muscular Atrophy (SMA) using neural stem cells as a therapeutic approach”, P.I. Dott.ssa Corti
- 4) **Ministero dell’Istruzione, Università e Ricerca Scientifica (MIUR), FIRB Futuro in Ricerca** 2010-2015 “Development of a stem cell approach for motor neuron diseases”. PI Dott.ssa Corti
- 5) **Ministero della Salute, Ricerca Finalizzata**, 2012-2014 “iPS derived neural stem cells for Spinal Muscular Atrophy Therapy (SMAThera)” P.I. Dott.ssa Corti
- 6) **Fondation Thierry Latran (TLF)** 2013-2016 “Identification of oculomotor-restricted genes with motor neuron protective properties for the development of ALS therapeutics” P.I. Dott.ssa Corti
- 7) **Association Française contre les Myopathies (AFM)**, co-PI, 2013-2015 “SMN splicing correction mediated by Exon Specific U1 snRNA as therapy for spinal muscular atrophy” P.I. Dott.ssa Corti
- 8) **Fondazione Cariplo** 2013-2016 “Pathogenetic role of differentially expressed/spliced genes in Spinal Muscular Atrophy” P.I. Dott.ssa Corti
- 9) **Ministero della Salute**, Bando Giovani Ricercatori, 2013-2016: "Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1): gene therapy as novel therapeutic approach" P.I. Dott.ssa Nizzardo
- 10) **Fondazione ARiSLA** 2013 "ALSsiMO- Morpholino antisense oligomer against SOD1 for the development of ALS therapy", Pilot Grant AriSLA P.I. Dott.ssa Nizzardo

UNITA' OPERATIVA DIPARTIMENTALE

DIAGNOSTICA DELLE MALATTIE NEUROMUSCOLARI E RARE

Responsabile:

M. Moggio

Collaboratori:

M. Sciacco: Dirigente Medico Fondazione - neurologo, dottore di ricerca in scienze neurologiche, co-responsabile banca tessuti e DNA

G. Fagiolari: biologo - tecnico ospedaliero Fondazione

M. Ripolone: biologo borsista Fondazione

P. Ciscato: tecnico ospedaliero Fondazione

R. Violano: biologo - borsista Fondazione

L. Napoli: biologo - borsista Telethon

V. Lucchini: neurologa - dottore di ricerca in medicina molecolare - Borsista Fondazione

M. Servida: neurologa - Borsista Fondazione

I. Colombo: specializzanda in Neurologia

L. Peverelli: specializzando in Neurologia

L. Villa: specializzanda in Neurologia

P. Valentini: architetto - amministrativa - Borsista Telethon

R. Xhani: laureata in Medicina e Chirurgia

S. Testolin: studentessa, tesista in Medicina e Chirurgia

ATTIVITA' DIAGNOSTICA

Nell'anno 2012 l'attività ambulatoriale globale riguardante le malattie neuromuscolari e del motoneurone è sovrapponibile a quella dell'anno precedente.

In particolare, sono state effettuate n. 1.120 visite nell'ambulatorio per le malattie neuromuscolari delle UU.OO. Neurologia e Diagnostica Malattie Neuromuscolari.

Inoltre sono stati effettuati n. 209 accessi di DH per le suddette patologie.

Sono state studiate e refertate 227 biopsie muscolari e 18 biopsie di nervo.

I prelievi biotici afferiscono al laboratorio della UOD Diagnostica delle Malattie Neuromuscolari della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico provenienti da:

- UOC di Neurologia
- UOD Diagnostica delle Malattie Neuromuscolari
- Dipartimento di Medicina della Fondazione
- Altri Dipartimenti della Fondazione
- Altri Ospedali quali: Ospedale S. Gerardo di Monza, Istituto Auxologico-Ospedale San Luca, Istituto Mondino di Pavia, Istituto Humanitas, Istituto Don Gnocchi di Milano, Ospedale San Paolo, Ospedale Sacco, Ospedale Valduce di Como, Ospedale Cantonale di Lugano, Ospedale di Niguarda, Ospedale di Desio, Ospedale di Lugo di Romagna, Ospedale di Faenza, Ospedale di Ravenna, Ospedale di Rimini, Ospedale di Gallarate, Ospedale di Busto Arsizio, Ospedale di Melegnano, Ospedale di Ravenna, Ospedale di Vimercate, Ospedale di Legnano, Ospedale Policlinico di Pavia, Ospedale Santa Corona di Garbagnate e occasionalmente da altre strutture ospedaliere.

Regolari Convenzioni o rapporti di fatturazione intercorrono fra il Servizio di Diagnostica e i citati Enti ospedalieri.

Il laboratorio provvede alla tecnicazione delle biopsie, alla refertazione delle medesime, alla loro conservazione e alla spedizione dei referti ai vari enti ospedalieri.

- Dall'anno 1999 il Laboratorio ha avuto il riconoscimento di "Banca Telethon di DNA, tessuto muscolare scheletrico, nervo periferico e colture cellulari". I diversi campioni biologici stoccati nella banca sono a disposizione dei ricercatori italiani e stranieri interessati e sono elencati in un dedicato sito web: www.centrodinoferrari/neuromuscolari.
- Dall'anno 2001 la banca è parte dell'Eurobiobank, un network di banche di Istituti scientifici di diversi paesi della Comunità Europea.
- Dall'anno 2002 la banca è anche parte del Progetto Finalizzato dell'Ospedale Maggiore "Biorepository".
- Dal Luglio 2002 l'Unità operativa ha ottenuto la certificazione ISO 9001:2000.

Biopsie Muscolari

Microscopia ottica

Durante l'anno 2012 sono state eseguite N° 227 biopsie muscolari indagate con metodiche istologiche, istoenzimatiche e immunoistochimiche.

Tutte le biopsie di pazienti col sospetto clinico di distrofia sono state studiate anche con metodiche immunologiche con anticorpi contro le varie proteine coinvolte in queste patologie (distrofina, merosina, sarcoglicani, disferlina, caveolina, emerina, alfadistroglicano, miotilina, desmina, etc.).

Tutte le biopsie di pazienti col sospetto di patologia infiammatoria sono state studiate mediante specifici markers immunocitochimici. In particolare, sono stati utilizzati anticorpi anti-HLA 1 (A,B,C), anti-membrane attack complex, anti-linfociti T (CD4 e CD8) e anti-B (CD 19).

Biopsie con il sospetto di IBM vengono studiate con la colorazione Rosso Congo. In totale, relativamente a quanto sopra specificato, sono stati eseguiti 3.130 tests.

Microscopia elettronica

Le biopsie muscolari sono state studiate con metodiche ultrastrutturali quando ritenuto necessario e sono stati eseguiti 43 tests.

In particolare, vengono studiate tutte le biopsie di pazienti affetti da miopatie dismetaboliche per la conferma delle seguenti diagnosi: glicogenosi, lipidosi, mitocondriopatie, miopatie a corpi inclusi e miopatie congenite. Sono infine analizzate tutte le biopsie nelle quali gli studi istologici, istoenzimologici, biochimici e genetici non sono indicativi di una particolare miopatia.

Biopsie di nervo

Microscopia ottica

Durante l'anno 2012 sono state eseguite N° 18 biopsie di nervo periferico. Tutti i prelievi biopatici sono studiati su sezioni criostatiche con le comuni metodiche istologiche e su sezioni semifini incluse in resina per la microscopia elettronica colorate con blu di toluidina, sono stati eseguiti 40 tests (istologia e reazioni immunocitochimiche).

Viene eseguita una valutazione quantitativa della densità delle fibre mieliniche con apposito analizzatore di immagini su sezioni semifini.

Di tutte le biopsie vengono allestite apposite preparazioni atte all'analisi di singole fibre nervose isolate (metodica del teasing) e per ogni paziente se ne studiano almeno 100.

Nelle biopsie di nervo con sospetto di patologia infiammatoria vengono inoltre eseguiti studi immunoistochimici con Abs anti HLA, MAC e linfociti.

Nel sospetto di patologia da accumulo di amiloidosi viene eseguita la colorazione per il rosso congo.

Microscopia elettronica

Le biopsie di nervo sono state incluse in resine epossidiche e tecnicate per le osservazioni in microscopia elettronica, per l'isolamento delle singole fibre nervose e per la valutazione quantitativa della densità fibrale. A tal fine sono stati eseguiti circa 108 tests (sezioni semifini e griglie per ultrastruttura).

In particolare vengono studiate tutte le biopsie nelle quali gli esami istologici e quantitativi non riescono ad indirizzare la diagnosi verso una particolare neuropatia.

ATTIVITA' DI RICERCA

L'attività di ricerca è stata condotta, come del resto negli anni precedenti, utilizzando gli stessi laboratori e apparecchi impiegati per la diagnostica neuromuscolare. Anche i reagenti utilizzati sono, almeno per il 70-80%, quelli comunemente impiegati per la diagnostica.

L'attività di ricerca ha prodotto nel 2012 i seguenti risultati:

PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA ANNO 2012

Pubblicazioni originali su riviste censite:

Linea di ricerca ministeriale: Genomica, Epigenomica e Proteomica (Fisiopatologia dell'Espressione Genica)

De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, Vezzoli M, Rovere-Querini P, Moggio M, Ripolone M, Francolini M, Sandri M, Clementi E.

Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy.

Cell Death Dis. 2012 Nov 15;3:e418. doi: 10.1038/cddis.2012.159. - Impact Factor 5,333

Vengono presi in esame i meccanismi patogenetici della distrofia muscolare di Duchenne. Fra questi negli ultimi anni è stata data importanza al ruolo dei meccanismi autofagici. Il lavoro evidenzia una overexpression di fattori promuoventi l'autofagia e questi dati potranno essere utili nell'ambito di un approccio multifattoriale per la terapia della DMD.

Ronchi D, Garone C, Bordoni A, Gutierrez Rios P, Calvo SE, Ripolone M, Ranieri M, Rizzuti M, Villa L, Magri F, Corti S, Bresolin N, Mootha VK, Moggio M, Dimauro S, Comi GP, Sciacco M. *Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions.*

Brain. 2012 Nov;135(Pt 11):3404-15. doi: 10.1093/brain/aws258. - Impact Factor 9,457

Il lavoro descrive un nuovo fenotipo clinico di pazienti affetti da miopatia mitocondriale da alterazione del gene DGUOK. Contrariamente a quanto presente nella letteratura, i pazienti da noi descritti sono tutti adulti con un esordio della sintomatologia dopo i 20 anni. Il lavoro amplia quindi lo spettro della diagnostica differenziale di pazienti affetti da tale miopatia.

Protti A, Lecchi A, Fortunato F, Artoni A, Greppi N, Vecchio S, Fagiolari G, Moggio M, Comi GP, Mistraletti G, Lanticina B, Faraldi L, Gattinoni L.

Metformin overdose causes platelet mitochondrial dysfunction in humans.

Crit Care. 2012 Oct 3;16(5):R180. doi: 10.1186/cc11663. - Impact Factor 4,61

Il lavoro descrive alterazioni nel metabolismo ossidativo mitocondriale in pazienti ricoverati nelle unità di cure intensive e affetti da "Critical Illness Diseases". Abbiamo dimostrato un deficit della catena respiratoria mitocondriale sulle piastrine e questo dato è di grande importanza perché permette di arrivare ad una diagnosi corretta senza eseguire un'invasiva biopsia muscolare.

Magri F, Bo RD, D'Angelo MG, Sciacco M, Gandossini S, Govoni A, Napoli L, Ciscato P, Fortunato F, Brighina E, Bonato S, Bordoni A, Lucchini V, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

Frequency and characterisation of anoctamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients.

Neuromuscul Disord. 2012 (934-943). doi: 10.1016/j.nmd.2012.05.001. - Impact Factor 2,797

Il lavoro ha rivisitato la casistica delle UO Neurologia e UOD Malattie Neuromuscolari di pazienti affetti da distrofie dei cingoli per i quali non vi era alcuna precisazione diagnostica. Alla luce delle nuove acquisizioni scientifiche, il lavoro stima la frequenza in questa popolazione di difetti del gene ANO5.

Ranieri M, Del Bo R, Bordoni A, Ronchi D, Colombo I, Riboldi G, Cosi A, Servida M, Magri F, Moggio M, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

Optic atrophy plus phenotype due to mutations in the OPA1 gene: two more Italian families.

J Neurol Sci. 2012; 315(1-2):146-149. doi: 10.1016/j.jns.2011.12.002. - Impact Factor 2,353

Il lavoro amplia lo spettro del fenotipo clinico di pazienti affetti da una grave atrofia ottica dovuta a mutazioni nel gene OPA1 con la descrizione di due famiglie italiane.

Ronchi D, Sciacco M, Bordoni A, Raimondi M, Ripolone M, Fassone E, Di Fonzo A, Rizzuti M, Ciscato P, Cosi A, Servida M, Moggio M, Corti S, Bresolin N, Comi GP.

The novel mitochondrial tRNAAsn gene mutation m.5709T>C produces ophthalmoparesis and respiratory impairment.

Eur J Hum Genet. 2012;20(3):357-360. doi: 10.1038/ejhg.2011.238. - Impact Factor 4,400

Mutazioni nei geni che codificano per i t-RNA mitocondriali sono responsabili di una grave insufficienza respiratoria associata ad oftalmoparesi. Il presente lavoro descrive una nuova mutazione in tali geni migliorando quindi le possibilità diagnostiche di tali malattie.

Scionti I, Greco F, Ricci G, Govi M, Arashiro P, Vercelli L, Berardinelli A, Angelini C, Antonini G, Cao M, Di Muzio A, Moggio M, Morandi L, Ricci E, Rodolico C, Ruggiero L, Santoro L, Siciliano G, Tomelleri G, Trevisan CP, Galluzzi G, Wright W, Zatz M, Tupler R.

Large-scale population analysis challenges the current criteria for the molecular diagnosis of fascioscapulohumeral muscular dystrophy.

Am J Hum Genet. 2012;90(4):628-635. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.02.019. - Impact Factor 10,603

Il lavoro presenta l'analisi genetica eseguita su 700 pazienti affetti da distrofia facio-scapolo-omerale e le complesse relazioni con i diversi fenotipi clinici. Viene inoltre esaminata la frequenza di alterazioni nella sequenza ripetuta D4Z4 nell'ambito della popolazione normale.

Lunetta C, Serafini M, Prella A, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Sassone J, Colciago C, Moggio M, Corbo M, Silani V.

Impaired expression of insulin-like growth factor-1 system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients.

Muscle Nerve. 2012; 45(2):200-208. doi: 10.1002/mus.22288. - Impact Factor 2,367

La patogenesi della SLA è sconosciuta mentre numerose alterazioni genetiche sono state associate a tale miopatia. Negli anni alterazioni di diversi fattori legati al trofismo neuronale sono stati esaminati e in quest'ottica il nostro lavoro ha evidenziato alterazioni nell'espressione del fattore di crescita "Insulin-like".

Lettere su riviste censite (con dati sperimentali):

Linea di ricerca ministeriale: Epidemiologia Clinica

Remiche G, Herbaut AG, Ronchi D, Lamperti C, Magri F, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. *Incontinence in Late-Onset Pompe Disease: An Underdiagnosed Treatable Condition.*

Eur Neurol. 2012; 68(2):75-78. doi: 10.1159/000338776 - Impact Factor 1,811

Pubblicazioni originali di studi multicentrici:

Linea di ricerca ministeriale: Epidemiologia Clinica

Mancuso M, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Uziel G, Zeviani M, Siciliano G, The Nation-wide Italian Collaborative Network of Mitochondrial Diseases.

Fatigue and exercise intolerance in mitochondrial diseases. Literature revision and experience of the Italian Network of mitochondrial diseases.

Neuromuscular Disorders 22. 2012. S226-S229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2012.10.012>. - Impact Factor 2,797

Pane M, Messina S, Vasco G, Foley AR, Morandi L, Pegoraro E, Mongini T, D'Amico A, Bianco F, Lombardo ME, Scalise R, Bruno C, Berardinelli A, Pini A, Moroni I, Mora M, Toscano A, Moggio M, Comi G, Santorelli FM, Bertini E, Muntoni F, Mercuri E.

Respiratory and cardiac function in congenital muscular dystrophies with alpha dystroglycan deficiency.

Neuromuscul Disord. 2012; 22(8):685-989. doi: 10.1016/j.nmd.2012.05.006. - Impact Factor 2,797

Angelini C, Semplicini C, Ravaglia S, Moggio M, Comi GP, Musumeci O, Pegoraro E, Tonin P, Filosto M, Servidei S, Morandi L, Crescimanno G, Marrosu G, Siciliano G, Mongini T, Toscano A; *Italian Group on GSDII. New motor outcome function measures in evaluation of late-onset Pompe disease before and after enzyme replacement therapy.*

Muscle Nerve. 2012; 45(6):831-834. doi: 10.1002/mus.23340. - Impact Factor 2,367

Angelini C, Semplicini C, Ravaglia S, Bembi B, Servidei S, Pegoraro E, Moggio M, Filosto M, Sette E, Crescimanno G, Tonin P, Parini R, Morandi L, Marrosu G, Greco G, Musumeci O, Di Iorio G, Siciliano G, Donati MA, Carubbi F, Ermani M, Mongini T, Toscano A;

Italian GSDII Group. *Observational clinical study in juvenile-adult glycogenosis type 2 patients undergoing enzyme replacement therapy for up to 4 years.*

J Neurol. 2012; 259(5):952-958. doi: 10.1007/s00415-011-6293-5. - Impact Factor 3,473

Capitoli di libri:

Linea di ricerca ministeriale: Epidemiologia Clinica

Lamperti C, Crugnola V, Comi GP, Moggio M.

Juvenile and Adult Forms of Type II Glycogenosis: Clinical Aspects. In Advances in Diagnosis and Management of Glycogenosis II. 2012

Nova Science Publishers, Inc. Pp. 39-51. ISBN: 978-1-62100-515-5

Il capitolo prende in esame e riassume lo stato dell'arte delle conoscenze in merito alla eziologia, la patogenesi, le diverse forme cliniche e la terapia della malattia di Pompe.

Lavori presentati a congressi nazionali e internazionali

Genzyme Corporation, a Sanofi Company. Step Forward in Pompe Disease. 23-24/11/ 2012. Berlino.

Violano R, Ripolone M, Lucchini V, Villa L, Sciacco M, Comi G, Tonin P, Filosto M, Previtali S, Mongini T, Vercelli L, Vittonatto E, Toscano A, Musumeci O, Barca E, Angelini C, Ravaglia S, Lamperti C, Mora M, Morandi L and Moggio M. Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Centro Dino Ferrari - Università degli Studi di Milano.

“Evaluation of muscle biopsies in late-onset patients after ERT”.

42st Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, 13-17 October 2012.

Ronchi D, Vallejo D, Ripolone M, Melzi V, Fagiolari G, Lucchini V, Violano R, Bordoni A, Lamperti C, Villa L, Corti S, Balottin U, Bresolin N, Sciacco M, Berardinelli A, Moggio M, Comi G. Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Centro Dino Ferrari - Università degli Studi di Milano.

“Muscle cytochrome c oxidase defect and mitochondrial DNA depletion in spinal muscular atrophy”.

XII Congresso Nazionale Associazione Italiana di Miologia, Scicli-Ragusa, Italia, 17-19/05/2012.

Ripolone M, Fagiolari G, Vallejo D, Ronchi D, Lucchini V, Violano R, Bordoni A, Lamperti C, Villa L, Corti S, Balottin U, Bresolin N, Comi G, Sciacco M, Berardinelli A, Moggio M. Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Centro Dino Ferrari - Università degli Studi di Milano.

“Oxidative defects at muscle histochemistry in 15 genetically-determined SMA cases”.

Peverelli L, Ripolone M, Ciscato P, Del Bo R, Servida M, Crugnola V, Fortunato F, Villa L, Udd B, Comi G, Tupler R, Moggio M, Sciacco M. Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Centro Dino Ferrari - Università degli Studi di Milano.

“Intragenerational phenotype-genotype variability in FSHD: the D4Z4 short fragment might not be enough”.

G. Ricci, M. Ripolone, R. Violano, L. Villa, L. Napoli, P. Ciscato, G. Conti, D. Ronchi, A. Bordoni, E. Bertini, N. Bresolin, G. Siciliano, G. Comi, M. Moggio, M. Sciacco. Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Centro Dino Ferrari - Università degli Studi di Milano.

“Centronuclear myopathy with ragged red fibers and mtDNA multiple deletions: a case report”.

PROGETTI IN CORSO:

- Correlazioni genotipo fenotipo nella distrofia Facio Scapolo Omerale (FSHD) nell’ambito del Consorzio Italiano per la FSHD. Lo studio è condotto su circa 700 casi indice ed esteso ai familiari. Si tratta di un progetto in collaborazione con tutti i centri presenti in Italia che seguono pazienti affetti da tale malattia.
- Stiamo studiando una famiglia affetta da distrofia facio-scapolo omerale (FSHD) con caratteristiche atipiche dal punto di vista genotipo-fenotipo. Infatti, la famiglia è composta da sette germani, tre con test genetico negativo per FSHD e quattro portatori invece di un frammento patologico (frammento corto D4Z4 sul cromosoma 4q35). Solo uno dei soggetti con test genetico patologico è clinicamente affetto, mentre, dato alquanto interessante, due soggetti con test genetico positivo e uno con test genetico negativo presentano segni miopatici alla biopsia muscolare (microscopia ottica ed elettronica) in assenza di manifestazioni cliniche. E’ in corso uno studio di altri geni coinvolti in patologie muscolari di natura distrofica per evidenziare eventuali fattori co-responsabili delle atipie genotipo-fenotipo.
- Stiamo studiando una famiglia composta da due germani, un maschio di 30 anni e una femmina di 23 anni, entrambi affetti da distrofia facio-scapolo omerale (FSHD) con compromissione clinica rispettivamente moderata e lieve. Entrambi sono portatori di un frammento corto D4Z4 sul cromosoma 4q35 considerato diagnostico della patologia in questione. Anche la madre e il nonno materno presentano lo stesso difetto genetico, ma non sono clinicamente compromessi. Ciò potrebbe essere spiegato da una penetranza incompleta della patologia, in alternativa, potrebbe trattarsi di una forma a trasmissione autosomica recessiva nella quale il frammento corto D4Z4, ereditato in questo caso per via materna, unitamente ad un fattore genetico sconosciuto ereditato per via paterna, determina la malattia.
- Analisi biotiche morfologiche e biochimiche in pazienti affetti da Glicogenosi di tipo II e che assumono terapia con enzima ricombinante (ERT Therapy). Lo studio è coordinato dal nostro laboratorio assieme ai colleghi dell’Istituto Besta e prevede una analisi biotica muscolare dopo 6 mesi, un anno e due anni dall’inizio della terapia. Oltre alle valutazioni morfologiche ed ultrastrutturali classiche, verrà indagato il sistema fagosomi/lisosomi con reazioni immunocitochimiche nonché eseguito un dosaggio biochimico dell’enzima alpha glicosidasi. Si tratta di un progetto multicentrico che coinvolge tutte le UUOO che in Italia somministrano enzima ricombinante a pazienti affetti da glicogenosi tipo II. Il progetto, partito lo scorso anno, è proseguito nel 2011 con l’acquisizione di 14 seconde biopsie provenienti, oltre che dal nostro Istituto, dai centri nazionali parte del network. Sono in corso le valutazioni sopraindicate e disponiamo dei risultati preliminari che sembrano attestare l’efficacia della terapia.
- Continua il progetto relativo alla patogenesi della SCA I mediante analisi di DNA estratto da cellule del Purkinje del modello murino della malattia. A tal fine, mediante tecnica di micro dissezione laser, vengono individuate ed isolate cellule del Purkinje che presentano un difetto istochimico del complesso IV della citocromo c ossidasi e raccolte per le analisi molecolari. I risultati ottenuti permettono di associare il deficit di citocromo c ossidasi delle cellule del Purkinje ad una deplezione del DNA mitocondriale di tali cellule.

- In letteratura è stata riportata la presenza di deplezione del DNA mitocondriale (mtDNA) in soggetti affetti da atrofia muscolare spinale (SMA). Tale deplezione è ritenuta di tipo secondario, conseguente alla marcata ipotrofia muscolare indotta dalla patologia di base. Abbiamo pertanto iniziato una revisione sistematica di 15 biopsie muscolari provenienti da altrettanti pazienti affetti da SMA (tipo I, II o III). Dati preliminari mostrano come vi sia un deficit di citocromo c ossidasi (COX) nella maggior parte dei campioni biopsici, e come il deficit sia più marcato nella forma più grave e ad esordio precoce, la SMA I. Il deficit non interessa soltanto le fibre ipotrofiche, inoltre, lo studio parallelo di frammenti muscolari provenienti da pazienti pari-età affetti da altre patologie neurogene, mostra un'attività COX nella norma. Ciò supporta l'ipotesi che la disfunzione mitocondriale nella SMA non sia di tipo secondario, ma, piuttosto, contribuisca all'eziopatogenesi della malattia.
- E' iniziata la rivalutazione retrospettiva di biopsie muscolari della nostra banca per evidenziare miopatie causate da mutazioni nel gene dell'anotamina.
- Continua la rivalutazione retrospettiva di biopsie muscolari della nostra banca per evidenziare miopatie causate da mutazioni nei geni che causano " myofibrillar myopathy ".
- Studio istopatologico del modello animale Knock out per il gene Park1 in collaborazione con l' Istituto Besta (Dr. Zeviani).
- Analisi biochimica, istologica e test comportamentali per lo studio della glicogenosi di tipo III nel modello murino knockout Agl in collaborazione con il Prof. Comi Giacomo Pietro, laboratorio di Genetica e Biochimica - Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università di Milano – Fondazione IRCCS Cà Granda – Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.
- Studio istopatologico, morfometrico e ultrastrutturale del topo transgenico che overesprime DRP1, una proteina che svolge un ruolo critico nella fissione dei mitocondri; in collaborazione con il Prof. Clementi Emilio, Unità di Farmacologia, IRCCS San Raffaele, Milano.
- Studio dell'espressione dell'aciculina, una proteina legante la distrofina, nel muscolo scheletrico di pazienti affetti da Distrofia muscolare (DMD, BMD, LGMD2D e LGMD2E) usando Q-PCR, western blotting e immunofluorescenza; in collaborazione con il Prof. Alexey Belkin, University of Maryland School of Medicine; United States.

FINANZIAMENTI IN CORSO:

- Ministero della Salute Ricerca corrente 2013
"Diagnosi precoce della Malattia di Pompe ad esordio tardivo"
- Ministero della Salute Ricerca corrente 2013
"Implementazione Rete Malattie Rare Neuromuscolari"
- Telethon Network
"Progetto Telethon Network of Genetic Biobank"
- Telethon Network
"Development of the Italian National Registry for FSHD"

UNITÀ OPERATIVA SEMPLICE MALATTIE NEURODEGENERATIVE E DEMIELINIZZANTI

Responsabile:

Prof. Elio Scarpini

Dott.ssa Daniela Galimberti

Dott.ssa Chiara Fenoglio

Dott.ssa Elisa Ridolfi

Dott.ssa Rossana Bonsi

Dott.ssa Chiara Villa

Dott.ssa Maria Serpente

Dott.ssa Claudia Cantoni

Dott.ssa Elisa Brambilla

Dott.ssa Sara Cioffi

Dott.ssa Milena De Riz

Dott.ssa Anna Pietroboni

Dott.ssa Francesca Jacini

Dott. Andrea Arighi

Dott. Giorgio Fumagalli

Dott.ssa Laura Ghezzi

Dott. Alberto Calvi

Dott. Roberto Vimercati

Dr.ssa Emanuela Rotondo

Dr.ssa Priscilla Corti

Dott. Matteo Mercurio

Sig.ra Daniela Da Lisca

Sig.ra Mahin Fardipoor

Sig.ra Marta Ferrari

Sig.ra Virginia Maltese

Professore Associato di Neurologia

Dottore di Ricerca Scienze Neurologiche e del Dolore –
Tecnico Laureato Università di Milano

Dottore di Ricerca Scienze Neurologiche e del Dolore –
Assegnista Università di Milano

Dottore di Ricerca Medicina Molecolare – Borsista OMP
Dottoranda di Ricerca Medicina Molecolare – Università
di Milano

Dottore di Ricerca Medicina Molecolare, Assegnista
Università di Milano

Dottoranda di Ricerca Medicina Molecolare – Università
di Milano

Dottoranda di Ricerca Medicina Molecolare, Borsista
OMP

Biologa Borsista OMP

Biologa Borsista OMP

Neurologa Specialista–Dirigente medico OMP

Medico Specializzando

Medico Specializzando

Medico Specializzando

Medico Specializzando

Medico Specializzando

Medico frequentatore

Psicologo –Borsista OMP

Psicologa- Dottore di Ricerca - Borsista OMP

Psicologa- Dottoranda di Ricerca – Borsista OMP

Psicologo – Dottorando di Ricerca- Università di Milano

Segretaria – Borsista Ospedale

Tecnico Laboratorio Ospedaliero

Laureanda

Laureanda

1 - ATTIVITA' CLINICA ED ASSISTENZIALE

Dal punto di vista clinico, il gruppo si è occupato di ricerche cliniche nel campo della Sclerosi Multipla e della malattia di Alzheimer e demenze correlate. I pazienti sono stati seguiti dai componenti del gruppo presso i seguenti Ambulatori Specialistici di “secondo livello”:

1.1. Ambulatorio Malattie Demielinizzanti del Sistema Nervoso Centrale

Nel corso dell'anno 2012 sono giunti all'ambulatorio per le Malattie Demielinizzanti circa 100 nuovi pazienti.

Il numero totale di visite nel corso del 2012 è stato di più di 800 in ambulatori dedicati alla Sclerosi Multipla, attivi sia al mattino che al pomeriggio.

E' operativo un servizio di Day Hospital per consentire ai pazienti di sottoporsi a trattamenti quali la somministrazione di cortisonici ad alto dosaggio e. v. e l'infusione di Immunoglobuline e.v. nonché di effettuare tutte le procedure diagnostiche. Sono stati effettuati circa 250 ricoveri in Day Hospital.

Il Servizio è riconosciuto tra i Centri Provinciali autorizzati dalla Regione Lombardia alla dispensazione del beta-Interferone Ia e Ib, del Copaxone, del Tysabri (Natalizumab) e del Gylenia (Fingolimod). In particolare, sono al momento registrati in File F per il trattamento 260 pazienti.

1.2. Ambulatorio per la Diagnosi e la Terapia dei Disturbi Cognitivi e della Memoria

Nel corso dell'anno sono giunti all'ambulatorio per la Diagnosi e la Terapia dei Disturbi Cognitivi e della Memoria circa 250 nuovi pazienti. Complessivamente sono state eseguite circa 1200 visite, in ambulatori attivi dal lunedì al venerdì, sia mattina che pomeriggio.

Sono stati effettuati 250 ricoveri in regime di Day Hospital per accertamenti diagnostici.

Dall'ottobre 2000 il Centro è stato riconosciuto da parte della Regione Lombardia come “Unità Valutazione Alzheimer” (U.V.A) ed inserito nel Progetto CRONOS del Ministero della Sanità. Presso tale Centro afferiscono pazienti con sospetto decadimento cognitivo, inviati dal medico di base o dallo specialista, onde essere sottoposti ad un inquadramento diagnostico rivolto alla malattia di Alzheimer e demenze correlate, ai fini dell'inserimento nel progetto CRONOS che prevede l'erogazione gratuita dei nuovi farmaci anticolinesterasici. Nell'ambito del progetto CRONOS risultano al momento registrati per terapia con anticolinesterasici 260 pazienti. Inoltre, 8 pazienti sono registrati in File F per trattamento con memantina (Ebixa).

Riguardo gli esami diagnostici per Sclerosi Multipla, malattia di Alzheimer e Degenerazione Lobare Frontotemporale, sono state effettuate le seguenti prestazioni (sia per pazienti degenti che richieste da ospedali esterni):

- esame liquor, IEF per diagnosi di sclerosi multipla: 126
- dosaggio Amiloide, Tau totale e fosforilata nel liquor per diagnosi Alzheimer: 188
- progranulina plasmatica: 130
- estrazione DNA, mutazioni MAPT, progranulina, PS1 e 2, APP: 27.

2 - SPERIMENTAZIONI CLINICHE (multicentriche, randomizzate)

Efficacy , safety and tolerability of Atorvastatin 40 mg in patients with relapsing remitting multiple sclerosis in treatment with interferon-beta-(ARIANNA) – Multicenter, randomised, double blind, placebo controlled, parallel-group-study. Studio Schering – prot. DR04-07-02.

An active extension of LAQ/5062 study – multinational, multi-center, randomised, double-blind, parallel-group study, to evaluate the safety, tolerability and efficacy of two doses (0.3mg and

0.6mg) of laquinimod, orally administered in relapsing-remitting (R-R) multiple sclerosis (MS) subjects. Teva Pharmaceutical Industries. Prot. N. LAQ/5063

FORTE – GA/9016 A multinational, multicenter, randomized, parallel-group, double-blind study, to compare the efficacy, tollerabilità and safety of glatiramer acetate injection 40mg/ml to that of glatiramer acetate injection 20 mg/ml administered once daily by subcutaneous injection in subjects with relapsing remitting (R-R) multiple sclerosis (MS)

AVE625 Sanofi A double blind placebo-controlled study of the activity of AVE 1625 at dosis of 10 mg and 40 mg for 12 weeks in patients with mild to moderate Alzheimer's diseases. STUDY ACT10019

AVA102675 – Glaxo - A 52-week open-label extension study of the long-term safety and efficacy of rosiglitazone extended-release (RSG XR) as adjunctive therapy to acetylcholinesterase inhibitors in subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease (RFLECT-4)

ENA713 Exelon Patch Rivastigmine CENA 713D2340 - Novartis – A 48-week, multicenter, double-blind, parallel-group evaluation of the comparative efficacy, safety and tolerability of Exelon 10 and 15 cm² patch in patients with Alzheimer's disease showing cognitive decline during an initial open-label treatment phase.

Multicenter. Open-label, 12 weeks Phase IV study to assess adherence to treatment in relapsing multiple sclerosis (RMS) subjects switching from othr injectable DMDs using ReBiSmart to self-inject Rebif New Formulation (RNF) In a multi-dose cartriDGE – BRIDGE – Merck Serono prot. 701048-525

A double-blind, randomized, multicenter, placebo-controlled, parallel-group study comparing the efficacy and safety of 1,25 mg FTY20 administered orally once daily versus placebo in patients with primary progressive multiple sclerosis. Novartis Pharma, prot. CFTY720D2306

Studio multicentrico, a dosaggio differenziato, randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli, controllato verso placebo di RO5313534 quale aggiunta al trattamento con donepezil in pazienti affetti da malattia di Alzheimer con sintomatologia da lieve a moderata. Roche, prot. WN22018

Effect of passive immunization on the progression of Alzheimer's disease: LY2062430 versus placebo. Eli Lilly, prot. H8A-MC-LZAN

Effect of LY450139, a g-secretase inhibitor, on the progression of Alzheimer's disease as compared with placebo. Eli Lilly, prot. H6L-MC-LFBC

Randomised, double blind, parallel-group, placebo-controlled, fixed-dose study of Lu AE58054 in patients with moderate Alzheimer's disease treated with donepezil. Lundbeck, prot. 12936A

AZ3110866, Glaxo, prot. AZ3110866. A fixed dose study of SB-742457 versus placebo when added to existing donepezil treatment in subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease.

A 48-week, multicenter, double-blind, parallel-group evaluation of the comparative efficacy, safety and tolerability of Exelon 10 and 15 cm² patch in patients with Alzheimer's disease showing cognitive decline during an initial open-label treatment phase. Novartis, ENA713 Exelon Patch Rivastigmine, amendment to Clinical Tial Protocol CENA 713D2340

A randomised controlled trial to assess the efficacy of a food for special medical purposes (FSMP) in patients with mild Alzheimer's disease – Souvenir II trial – Danone, prot. Alz.1.C/D

A phase 2a study to evaluate the effect of rilapladib (SB-659032) on biomarkers related to the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease (LPZ114458)

A multinational, multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of the effect on cognitive performance, safety, and tolerability of SAR110894D at the doses of 0.5 mg, 2 mg, and 5mg/die for 24 weeks in patients with mild to moderate Alzheimer's disease

A randomized, placebo-controlled, multicenter study to evaluate the safety and tolerability of multiple dose regimens of CHF 5074 (200, 400, 600 mg/day for up to 12 weeks) and to explore the effects on potential markers of clinical efficacy in patients with mild cognitive impairment (CCD-1014-PR-0053)

3. ATTIVITA' DI RICERCA DI BASE

E' attualmente presente presso la UOS Malattie Neurodegenerative e Demielinizzanti una banca biologica comprendente:

1) circa 3300 campioni di DNA. Le patologie più rappresentate sono:

- 600 pazienti con diagnosi di Malattia di Alzheimer
- 400 con altri tipi di demenza (Degenerazione Lobare Frontotemporale, demenza a corpi di Lewy, demenza vascolare, paralisi soprannucleare progressiva, degenerazione corticobasale)
- 600 con diagnosi di Sclerosi Multipla

2) circa 400 campioni di liquido cerebrospinale, siero e plasma. Tra questi:

- 300 pazienti con Sclerosi Multipla
- 300 con patologie neurodegenerative (prevalentemente malattia di Alzheimer)

3) circa 500 cDNA ricavati da RNA estratto da cellule del sangue

Nel corso del 2012 l'attività del gruppo si è articolata sulle seguenti tematiche:

1) Ruolo dei microRNA nella Sclerosi Multipla (SM)

Sono state portate a termine le ricerche iniziate nel corso dello scorso anno, in particolare lo studio di espressione di una nuova classe di molecole, i microRNA (miRNA) che diverse evidenze sperimentali suggeriscono come possibili marcatori in patologie di varia natura ed eziogenesi. I miRNA sono dei modulatori trascrizionali di numerosissimi geni tra i quali anche geni propriamente implicati nella patogenesi della SM. Lo scopo di questo nuovo filone di ricerca recentemente intrapreso, è quello di verificare la funzione e il livello di espressione di queste molecole al fine di stabilire la loro possibile utilità come marcatore di patologia. Nel corso dell'anno abbiamo identificato alcuni microRNA deregolati nelle cellule circolanti di pazienti con SM (Fenoglio et al., under review). Abbiamo recentemente messo a punto una tecnica per dosare i livelli di miRNA circolanti, che permette di ottenere dati senza bisogno di isolare le cellule (Ridolfi et al., under review).

2) Analisi di mutazioni in pazienti con Degenerazione Lobare Frontotemporale

Sono state identificate diverse mutazioni a trasmissione autosomica dominante (Cerami et al., 2012; Galimberti et al., in press). Sulla popolazione di pazienti sporadici sono stati effettuati studi di associazione ed identificati fattori di rischio genetici.

3) Studi di associazione e di espressione in pazienti con malattia di Alzheimer

I progetti di ricerca sono stati sviluppati grazie alla collaborazione con Centri sia italiani che stranieri.

Tra i primi vi sono:

- prof. A. Maggi, Centro di Biotecnologie Farmacologiche, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano

- Prof. C. Mariani, Ospedale L. Sacco, Milano
- Dott. G. Forloni, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano
- Dr. G. Frisoni, IRCCS S. Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia
- Dr. S. Cappa, Ospedale S. Raffaele Ville Turro, Milano
- Prof. A. Padovani, Università di Brescia
- Prof. I. Rainero, prof.ssa M.T. Giordana, Università di Torino

Tra i centri esteri:

- Dr. R.P. Lisak, Dip. di Neurologia, Detroit (USA)
- Prof. G. Said, Service de Neurologie, Le Kremlin-Bicetre (Francia)
- Prof. P. Scheltens, Dept. of Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands
- Dr. Howard Feldman, Dept. of Neurology, University of British Columbia, Vancouver, Canada
- Prof. A. Compston, Dr. Steven Sawcer, Dept. of Neurology, Cambridge, UK
- Dr. A. Reif, Dept. Of Psychiatry and Psychotherapy, Julius-Maximilians-University, Wurzburg, Germany
- Dr. Anne Cross, University of Saint Louis, USA
- Prof. Philippe Amouyel, Lille, France

4.PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI CENSITE 2012

1. Caso F, Villa C, Fenoglio C, Santangelo R, Agosta F, Coppi E, Falautano M, Comi G, Filippi M, Scarpini E, Magnani G, Galimberti D. *The GRN Cys157LysfsX97 Mutation is Associated with Nonfluent Variant of Primary Progressive Aphasia Clinical Phenotype.*
Journal of Alzheimer's Disease 2012; 28: 759-63.
IF=3.745
2. Arighi A, Fumagalli GG, Jacini F, Fenoglio C, Ghezzi L, Pietroboni AM, De Riz M, Serpente M, Ridolfi E, Bonsi R, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. *Early Onset Behavioral Variant Frontotemporal Dementia due to the C9ORF72 Hexanucleotide Repeat Expansion: Psychiatric Clinical Presentations.*
Journal of Alzheimer's Disease 2012; 31(2):447-52.
IF=3.745
3. Comi C, Cappellano G, Chiocchetti A, Orilieri E, Buttini S, Ghezzi L, Galimberti D, Guerini F, Barizzone N, Perla F, Leone M, D'Alfonso S, Caputo D, Scarpini E, Cantello R, Dianzani U. *The impact of osteopontin gene variations on multiple sclerosis development and progression.*
Clinical and Developmental Immunology 2012;2012:212893. Epub 2012 Sep 11.
IF=3.360
4. Villa C, Ghezzi L, Fenoglio C, Clerici F, Marcone A, Benussi L, Ghidoni R, Gallone S, Serpente M, Cantoni C, Ridolfi E, Bonsi R, Cerami C, Cappa S, Binetti G, Franceschi M, Rainero I, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. *Genetics and Expression Analysis of the Specificity Protein 4 Gene (SP4) in Patients with Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration.*
Journal of Alzheimer's Disease 2012; 31(3):537-42.
IF=3.745

5. Scheltens P, Twisk JW, Blesa R, Scarpini E, von Arnim CA, Bongers A, Harrison J, Swinkels SH, Stam CJ, de Waal H, Wurtman RJ, Wiegers RL, Vellas B, Kamphuis PJ. *Efficacy of Souvenaid in mild Alzheimer's disease: results from a randomized, controlled trial.* **Journal of Alzheimer's Disease** 2012;31(1):225-36.
IF=3.745
6. D'Addario C, Di Francesco A, Arosio B, Gussago C, Dell'osso B, Bari M, Galimberti D, Scarpini E, Altamura AC, Mari D, Maccarrone M. *Epigenetic regulation of Fatty Acid amide hydrolase in Alzheimer disease.* **PLoS One** 2012;7(6):e39186.
IF=4.092
7. Taipa R, Tuna A, Damásio J, Pinto PS, Cavaco S, Pereira S, Milterberger-Miltenyi G, Galimberti D, Melo-Pires M. *Clinical, Neuropathological, and Genetic Characteristics of the Novel IVS9+1delG GRN Mutation in a Patient with Frontotemporal Dementia.* **Journal of Alzheimer's Disease** 2012; 30(1):83-90.
IF=3.745
8. Galimberti D, Dell'osso B, Fenoglio C, Villa C, Cortini F, Serpente M, Kittel-Schneider S, Weigl J, Neuner M, Volkert J, Leonhard C, Olmes DG, Kopf J, Cantoni C, Ridolfi E, Palazzo C, Ghezzi L, Bresolin N, Altamura AC, Scarpini E, Reif A. *Progranulin gene variability and plasma levels in bipolar disorder and schizophrenia.* **PLoS One** 2012;7(4):e32164.
IF=4.092
9. Martinelli Boneschi F, Fenoglio C, Brambilla P, Sorosina M, Giacalone G, Esposito F, Serpente M, Cantoni C, Ridolfi E, Rodegher M, Moiola L, Colombo B, De Riz M, Martinelli V, Scarpini E, Comi G, Galimberti D. *MicroRNA and mRNA expression profile screening in multiple sclerosis patients to unravel novel pathogenic steps and identify potential biomarkers.* **Neuroscience Letters** 2012; 508(1): 4-8.
IF=2.105
10. Galimberti D, Scarpini E. *Progress in Alzheimer's disease.* **Journal of Neurology** 2012; 259(2): 201-11.
IF=3.473
11. Galimberti D, Scarpini E. *Clinical phenotypes and genetic biomarkers of FTL D.* **Journal of Neural Transmission** 2012; 119(7):851-60.
IF=2.730
12. Di Maria E, Giorgio E, Uliana V, Bonvicini C, Faravelli F, Cammarata S, Galimberti D, Scarpini E, Zanetti O, Gennarelli M, Tabaton M. *Possible Influence of a Non-Synonymous Polymorphism Located in the NGF Precursor on Susceptibility to Late-Onset Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment.* **Journal of Alzheimer's Disease** 2012; 29(3):699-705.
IF=3.745
13. Galimberti D, Scarpini E. *Progress in multiple sclerosis research in the last year.* **Journal of Neurology** 2012; 259(7):1497-501.
IF=3.473

14. Albani D, Boneschi FM, Biella G, Giacalone G, Lupoli S, Clerici F, Benussi L, Ghidoni R, Galimberti D, Squitti R, Mariani S, Confaloni A, Bruno G, Mariani C, Scarpini E, Binetti G, Magnani G, Franceschi M, Forloni G.
Replication Study to Confirm the Role of CYP2D6 Polymorphism rs1080985 on Donepezil Efficacy in Alzheimer's Disease Patients.
Journal of Alzheimer's Disease 2012; 30(4):745-9.
IF=3.745

15. Cerami C, Scarpini E, Cappa SF, Galimberti D.
Frontotemporal lobar degeneration: current knowledge and future challenges.
Journal of Neurology 2012; 259: 2278-86.
IF=3.473

16. Mancardi GL, Sormani MP, Di Gioia M, Vuolo L, Gualandi F, Amato MP, Capello E, Currò D, Uccelli A, Bertolotto A, Gasperini C, Lugaresi A, Merelli E, Meucci G, Motti L, Tola MR, Scarpini E, Repice AM, Massacesi L, Saccardi R;
Italian BMT Study Group. Autologous haematopoietic stem cell transplantation with an intermediate intensity conditioning regimen in multiple sclerosis: the Italian multi-centre experience.
Multiple Sclerosis Journal 2012;18(6):835-42.
IF=4.255

17. Fenoglio C, Ridolfi E, Galimberti D, Scarpini E.
MicroRNAs as Active Players in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis.
International Journal of Molecular Science 2012;13(10):13227-39.
IF=2.598

18. Cagliani R, Fumagalli M, Guerini FR, Riva S, Galimberti D, Comi GP, Agliardi C, Scarpini E, Pozzoli U, Forni D, Caputo D, Asselta R, Biasin M, Paraboschi EM, Bresolin N, Clerici M, Sironi M.
Identification of a new susceptibility variant for multiple sclerosis in OAS1 by population genetics analysis.
Human Genetics 2012; 131(1): 87-97.
IF=5.079

19. Ghidoni R, Stoppani E, Rossi G, Piccoli E, Albertini V, Paterlini A, Glionna M, Pegoiani E, Agnati LF, Fenoglio C, Scarpini E, Galimberti D, Morbin M, Tagliavini F, Binetti G, Benussi L.
Optimal Plasma Progranulin Cutoff Value for Predicting Null Progranulin Mutations in Neurodegenerative Diseases: A Multicenter Italian Study.
Neurodegenerative Diseases 2012; 9(3):121-7.
IF=3.056

20. Ghezzi L, Arighi A, Pietroboni AM, Jacini F, Fumagalli GG, Esposito A, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E.
Sciatic endometriosis presenting as periodic (catamenial) sciatic radiculopathy.
Journal of Neurology 2012; 259(7):1470-1.
IF=3.473

21. Guerini FR, Cagliani R, Forni D, Agliardi C, Caputo D, Cassinotti A, Galimberti D, Fenoglio C, Biasin M, Asselta R, Scarpini E, Comi GP, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. *A Functional Variant in ERAP1 Predisposes to Multiple Sclerosis.*
PLoS One 2012;7(1):e29931.

IF=4.092

22. Arosio B, Bulbarelli A, Bastias Candia S, Lonati E, Mastronardi L, Romualdi P, Candeletti S, Gussago C, Galimberti D, Scarpini E, Dell'osso B, Altamura C, Maccarrone M, Bergamaschini L, D'Addario C, Mari D.

Pin1 Contribution to Alzheimer's Disease: Transcriptional and Epigenetic Mechanisms in Patients with Late-Onset Alzheimer's Disease.

Neurodegenerative Diseases 2012; 10(1-4):207-11.

IF=3.056

23. Cagliani R, Guerini FR, Fumagalli M, Riva S, Agliardi C, Galimberti D, Pozzoli U, Goris A, Dubois B, Fenoglio C, Forni D, Sanna S, Zara I, Pitzalis M, Zoledziewska M, Cucca F, Marini F, Comi GP, Scarpini E, Bresolin N, Clerici M, Sironi M.

A trans-specific polymorphism in ZC3HAV1 is maintained by long-standing balancing selection and may confer susceptibility to multiple sclerosis.

Molecular Biology and Evolution 2012; 29(6):1599-613.

IF=5.550

24. D'Addario C, Dell'osso B, Palazzo MC, Benatti B, Lietti L, Cattaneo E, Galimberti D, Fenoglio C, Cortini F, Scarpini E, Arosio B, Di Francesco A, Di Benedetto M, Romualdi P, Candeletti S, Mari D, Bergamaschini L, Bresolin N, Maccarrone M, Altamura AC.

Selective DNA Methylation of BDNF Promoter in Bipolar Disorder: Differences Among Patients with BDI and BDII.

Neuropsychopharmacology 2012; 37(7):1647-55.

IF=7.991

25. Rubino E, Rainero I, Chiò A, Rogaeva E, Galimberti D, Fenoglio P, Grinberg Y, Isaia G, Calvo A, Gentile S, Bruni AC, St George-Hyslop PH, Scarpini E, Gallone S, Pinessi L; For the *TODEM Study Group*. *SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.*

Neurology 2012; 79(15): 1556-1562.

IF=8.312

26. Brambilla P, Esposito F, Lindstrom E, Sorosina M, Giacalone G, Clarelli F, Rodegher M, Colombo B, Moiola L, Ghezzi A, Capra R, Collimedaglia L, Coniglio G, Celius EG, Galimberti D, Sørensen PS, Martinelli V, Oturai AB, Harbo HF, Hillert J, Comi G, Boneschi FM.

Association between DPP6 polymorphism and the risk of progressive multiple sclerosis in Northern and Southern Europeans.

Neuroscience Letters 2012; 530(2):155-60.

IF=2.105

27. Ghezzi L, Scarpini E, Rango M, Arighi A, Bassi MT, Tenderini E, De Riz M, Jacini F, Fumagalli GG, Pietroboni AM, Galimberti D, Bresolin N.

A 66-year-old patient with vanishing white matter disease due to the p.Ala87Val EIF2B3 mutation.

Neurology 2012, 79(20):2077-8.

IF=8.312

28. Clerici F, Caracciolo B, Cova I, Fusari Imperatori S, Maggiore L, Galimberti D, Scarpini E, Mariani C, Fratiglioni L.

Does Vascular Burden Contribute to the Progression of Mild Cognitive Impairment to Dementia?

Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 2012;34(3-4):235-243.
IF=2.141

29. Comi G, Jeffery D, Kappos L, Montalban X, Boyko A, Rocca MA, Filippi M; ALLEGRO Study Group (including E. Scarpini).
Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis.
New England Journal of Medicine 2012;366(11):1000-9.
IF=53.298
30. Lugaresi A, Florio C, Brescia-Morra V, Cottone S, Bellantonio P, Clerico M, Centonze D, Uccelli A, di Ioia M, De Luca G, Marcellusi A, Paolillo A;
BRIDGE study group (including E. Scarpini). Patient adherence to and tolerability of self-administered interferon β -1a using an electronic autoinjection device: a multicentre, open-label, phase IV study.
BMC Neurology 2012;12:7.
IF=2.167
31. Musicco M, Padovani A, Sorbi S, Scarpini E, Caffarra P, Cappa S, Clerici F, Tabaton M, Caltagirone C, Bonavita V, Bruni AC, Bruno G, Federico A, Ferrarese C, Marra C, Nacmias B, Parnetti L, Pettenati C, Sorrentino G, Tagliavini F, Mariani C.
Position paper of the Italian Society for the study of Dementias (SINDEM) on the proposal of a new lexicon on Alzheimer disease.
Neurological Sciences 2012;33(1):201-8.
IF=1.315
32. Xi Z, Zinman L, Grinberg Y, Moreno D, Sato C, Bilbao JM, Ghani M, Hernández I, Ruiz A, Boada M, Morón FJ, Lang AE, Marras C, Bruni A, Colao R, Maletta RG, Puccio G, Rainero I, Pinessi L, Galimberti D, Morrison KE, Moorby C, Stockton JD, Masellis M, Black SE, Hazrati LN, Liang Y, van Haersma de With J, Fornazzari L, Villagra R, Rojas-Garcia R, Clarimón J, Mayeux R, Robertson J, St George-Hyslop P, Rogaeva E.
Investigation of C9orf72 in 4 Neurodegenerative Disorders.
Archives of Neurology 2012; 69(12):1583-1590.
IF=7.584

5. PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI NON CENSITE 2012

1. Galimberti D, Scarpini E. Genetics of frontotemporal lobar degeneration. **Frontiers in Neurology** 2012;3:52.
2. Galimberti D, Scarpini E. Behavioral Genetics of Neurodegenerative Disorders. **Current Topics in Behavioral Neurosciences** 2012; 12: 615–631.

6. COMUNICAZIONI SU RIVISTE CENSITE 2012

1. Arighi A, Galimberti D, Jacini F, Fumagalli GG, Ghezzi L, Pietroboni AM, De Riz M, Fenoglio C, Serpente M, Ridolfi E, Bresolin N, Scarpini E.
Two cases of early onset FTL D due to chromosome 9 hexanucleotide repeats.
Journal of Alzheimer's disease 29, Suppl. 1: 46-7, 2012. VII SINdem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
2. Corti P, Rotondo E, Vimercati R, Jacini F, Fumagalli GG, Arighi A, Ghezzi L, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E.
Cognitive predictors and correlations with biomarkers and functional imaging in patients with Primary Progressive Aphasia.

- Journal of Alzheimer's disease** 29, Suppl. 1: 57, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
3. Fumagalli GG, Arighi A, Galimberti D, Jacini F, Ghezzi L, Pietroboni AM, De Riz M, Fenoglio C, Serpente M, Ridolfi E, Bresolin N, Scarpini E.
Frequency of autosomal dominant mutations in an Italian population of patients with Frontotemporal Lobar Degeneration.
Journal of Alzheimer's disease 29, Suppl. 1: 66-7, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
 4. Galimberti D, fenoglio C, Serpente M, Del Bo R, Clerici F, Benussi L, Ghidoni R, Binetti G, Nacmias B, Sorbi S, Marcone A, Cappa S, Magnani G, Filippi M, Agosta F, Comi G, Franceschi M, Rainero I, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, Cagnin A, Mariani C, Comi GP, Bresolin N, Scarpini E.
Frequency of the chromosome 9 hexanucleotide repeats in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration.
Journal of Alzheimer's disease 29, Suppl. 1: 67, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
 5. Ghezzi L, Bassi MT, Pietroboni AM, Fumagalli GG, Arighi A, Rango M, De Riz M, jacini F, Galimberti D, Bresolin N, Scarpini E.
A case of Vanishing White Matter Disease due to the c.260C>T (p.Ala87Val) EIF2B3 mutation.
Journal of Alzheimer's disease 29, Suppl. 1: 69, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
 6. Grande G, Fusari Imperatori S, pomati S, Maggiore L, Cova I, Cucumo V, Finotto S, Ghiretti R, Forcella M, Galimberti D, Scarpini E, Clerici F, Vanacore N, Mariani C.
Does social network influence the progression of MCI to dementia?
Journal of Alzheimer's disease 29, Suppl. 1: 70-1, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
 7. Mercurio M, Rotondo E, Corti P, Vimercati R, Jacini F, Fumagalli GG, Arighi A, Ghezzi L, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E.
Validation of the Italian Addenbrooke's cognitive examination revise (ACE-R) as a screening test.
Journal of Alzheimer's disease 29, Suppl. 1: 75-6, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
 8. Piscopo P, Rivabene R, Galimberti D, Crestini A, Talarico G, Vanacore N, Scarpini E, Bruno G, Confaloni A. Progranulin plasma levels and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease** 29, Suppl. 1: 80-1, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
 9. Rotondo E, Galimberti D, Vimercati R, Corti P, Marcurio M, Fenoglio C, Serpente M, Ridolfi E, Bresolin N, Scarpini E.
Cognitive testing in subjects with MCI: prediction of conversion to AD and correlation with cerebrospinal fluid biomarker levels.
Journal of Alzheimer's disease 29, Suppl. 1: 87, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.

10. Serpente M, Fenoglio C, Villa C, Bonsi R, Cantoni C, Ridolfi E, Clerici F, Ghidoni R, Benussi L, Marcone A, Cerami C, Franceschi M, Gallone S, Cappa S, Binetti G, Rainero I, Bresolin N, Mariani C, Scarpini E, Galimberti D.
TMEM106B genetic variability in patients with Alzheimer's disease.
Journal of Alzheimer's disease 29, Suppl. 1: 91-2, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
11. Villa C, Fenoglio C, Serpente M, Clerici F, Benussi L, Ghidoni R, Marcone A, Cappa S, Franceschi M, Rainero I, Gallone S, Ridolfi E, Ghezzi L, Bonsi R, Cerami C, Binetti G, Bresolin N, Mariani C, Scarpini E, Galimberti D.
Genetics and expression analysis of the transcription factor Sp4 in patients with Alzheimer's disease and Frontotemporal Lobar Degeneration.
Journal of Alzheimer's disease 29, Suppl. 1: 96-7, 2012. VII SINDem meeting, March 22-24, Naples, Italy.
12. Galimberti D.
Biomarkers for Alzheimer's disease and related dementias.
Clinical Neuropathology 31(3): 166 (2012).XLVIII Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology (AINP) – XXXVIII Meeting of the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), May 24-26, 2012, Naples, Italy.
13. Biella G, Martinelli Boneschi F, Magnani G, Franceschi M, Galimberti D, Scarpini E, Ghidoni R, Benussi L, Squitti R, Confaloni A, Clerici F, Mariani C, Forloni G, Albani D.
CYP2D6 polymorphism rs1080985 as pharmacogenetic marker in Alzheimer's disease patients treated with donepezil.
Clinical Neuropathology 31(3): 171 (2012).XLVIII Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology (AINP) – XXXVIII Meeting of the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), May 24-26, 2012, Naples, Italy.
14. Bonsi R, Serpente M, Fenoglio C, Villa C, Cantoni C, Ridolfi E, Clerici F, Ghidoni R, Benussi L, Marcone A, Franceschi M, Gallone S, Cappa S, Binetti G, Rainero I, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D.
TMEM106B genetic variability in patients with Alzheimer's disease.
Clinical Neuropathology 31(3): 172 (2012).XLVIII Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology (AINP) – XXXVIII Meeting of the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), May 24-26, 2012, Naples, Italy.
15. Fenoglio C, Serpente M, Bonsi R, Del Bo R, Bruni AC, Maletta R, Nacmias B, Sorbi S, Marcone A, Cappa S, Magnani G, Filippi M, Agosta F, Comi G, Franceschi M, Rainero I, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, Cagnin A, Clerici F, Mariani C, Comi GP, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D.
Frequency of the chromosome 9 hexanucleotide repeats in Italian patients with front temporal lobar degeneration.
Clinical Neuropathology 31(3): 177 (2012).XLVIII Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology (AINP) – XXXVIII Meeting of the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), May 24-26, 2012, Naples, Italy.
16. Ridolfi E, Fenoglio C, Serpente M, Cantoni C, De Riz M, Pietroboni A, Villa C, Bonsi R, Piccio L, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E.
Cell free microRNA and multiple sclerosis: possible promising biomarkers?
Clinical Neuropathology 31(3): 194 (2012).XLVIII Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology (AINP) – XXXVIII Meeting of the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), May 24-26, 2012, Naples, Italy.

17. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, D. Roberto, L. Benussi, R. Ghidoni, G. Binetti, B. Nacmias, S. Sorbi, A. Marcone, S. Cappa, G. Magnani, M. Filippi, F. Agosta, G. Comi, M. Franceschi, I. Rainero, A. Confaloni, P. Piscopo, G. Bruno, A. Cagnin, F. Clerici, C. mariani, G. Comi, N. Bresolin, E. Scarpini.
Frequency of the chromosome 9 hexanucleotide repeats in Italian patients with frontotemporal lobar de generation.
Journal of Neurology 259, Suppl. 1: S61 (2012). XXII Meeting of the European Neurological Society, June 9-12, 2012, Prague, Czech Republic.
18. Galimberti D, Villa C, Fenoglio C, Serpente M, Ghidoni R, Benussi L, Marcone A, Cappa S, Clerici F, Franceschi M, Rainero I, Gallone S, Ridolfi E, Ghezzi L, Bonsi R, cerami C, Binetti G, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E.
Genetics and expression analysis of the transcription factor Sp4 in patients with Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration.
Journal of Neurology 259, Suppl. 1: S134 (2012). XXII Meeting of the European Neurological Society, June 9-12, 2012, Prague, Czech Republic.
19. Govoni A, Del Bo R, Galimberti D, Fenoglio C, Magri F, Riboldi G, Ranieri M, Scarpini E, Bresolin N, Corti S, Comi G.
Genetic screening of C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in 244 Italian patients affected by amyotrophic lateral sclerosis with and without front temporal dementia.
Journal of Neurology 259, Suppl. 1: S135 (2012). XXII Meeting of the European Neurological Society, June 9-12, 2012, Prague, Czech Republic.
20. Galimberti D, fenoglio C, Ridolfi E, Serpente M, Cantoni C, De Riz M, Pietroboni A, Villa C, Piccio L, Bresolin N, Scarpini E.
Cell free microRNA and multiple sclerosis: possible promising biomarkers?
Journal of Neurology 259, Suppl. 1: S155 (2012). XXII Meeting of the European Neurological Society, June 9-12, 2012, Prague, Czech Republic.
21. Ghezzi L, Bassi MT, Pietroboni AM, Fumagalli GG, Arighi A, Rango M, De Riz M, Jacini F, Galimberti D, Bresolin N, Scarpini E.
A case of vanishing white-matter disease due to the c.260C>T (p.Ala87Val) EIF2B3 mutation.
Journal of Neurology 259, Suppl. 1: S660 (2012). XXII Meeting of the European Neurological Society, June 9-12, 2012, Prague, Czech Republic.
22. Fumagalli GG, Arighi A, Galimberti D, Jacini F, Ghezzi L, Pietroboni A, De Riz M, Fenoglio C, Serpente M, Ridolfi E, Bresolin N, Scarpini E.
Frequency of autosomal dominant mutations in an Italian population of patients with frontotemporal lobar degeneration.
Journal of Neurology 259, Suppl. 1: S182 (2012). XXII Meeting of the European Neurological Society, June 9-12, 2012, Prague, Czech Republic.
23. Rainero I, Rubino E, Chiò A, Rogaeva E, Galimberti D, Fenoglio P, Grinberg Y, Calvo A, Bruni A, St George-Hyslop Peter, Scarpini E, Gallone S, Pinessi L.
SQSTM1 Gene Sequencing in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis.
Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 2012;34(Suppl.1):1-289 - 8th International Conferenceon Frontotemporal DementiasManchester, UK, September 5–7, 2012.

24. Rogaeva E, Xi Z, Zinman L, Grinberg Y, Moreno D, Sato C, Bilbao J, Ghani M, Hernández I, Ruiz A, Boada M, Morón F, Lang A, Marras C, Bruni A, Colao R, Maletta R, Pinessi L, Rainero I, Galimberti D, Morrison K, Moorby C, Stockton J, Masellis M, Black S, Hazrati L, Fornazzari L, Villagra R, Rojas-Garcia R, Clarimón J, Mayeux R, Robertson J, St George-Hyslop P.
Investigation of C9orf72 in Four Neurodegenerative Disorders.
Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 2012;34(Suppl.1):1-289 - 8th International Conference on Frontotemporal Dementias Manchester, UK, September 5–7, 2012.
25. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Nacmias B, Sorbi S, Marcone A, Cappa S, Magnani G, Filippi M, Agosta F, Comi G, Franceschi M, Rainero I, Rubino E, Govone F, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, Bruni AC, Maletta R, Cagnin A, Clerici F, Mariani C, Scarpini E.
Frequency of the chromosome 9 C9ORF72 hexanucleotide repeats in Italian patients with Frontotemporal Lobar Degeneration.
Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 2012;34(Suppl.1):1-289 - 8th International Conference on Frontotemporal Dementias Manchester, UK, September 5–7, 2012.
26. Rohrer J, Frisoni GB, Galimberti D, Masellis M, Rowe JB, Borroni B, Bruni AC, Finger EC, Gerhard A, Graff C, Sorbi S, van Swieten JC, Tagliavini F, Benussi L, Binetti G, Black S, Chow T, Colao R, Doppo E, Fenoglio C, Fox NC, Freedman M, Fumagalli G, Ghidoni R, Giaccone G, Jones M, Keren R, Nacmias B, Ourselin S, Padovani A, Pievani M, Scarpini E, Tang-Wai D, Tartaglia MC, Warren JD, Rossor MN.
GENFI - The GENetic Frontotemporal dementia Initiative.
Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 2012;34(Suppl.1):1-289 - 8th International Conference on Frontotemporal Dementias Manchester, UK, September 5–7, 2012.
27. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Bonsi R, Arosio B, Rossi P, Villa C, Cioffi S, Ridolfi E, Pietroboni A, De Riz M, Jacini F, Arighi A, Fumagalli G, Ghezzi L, Bresolin N, Mari D, Scarpini E.
Frequency of the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in Italian non demented elderly subjects.
Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 2012;34(Suppl.1):1-289 - 8th International Conference on Frontotemporal Dementias Manchester, UK, September 5–7, 2012.
28. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Del Bo R, Bruni A, Maletta R, Nacmias B, Sorbi S, Marcone A, Cappa S, Magnani G, Agosta F, Filippi M, Comi G, Franceschi M, Rainero I, Gallone S, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, Cagnin A, Clerici F, Mariani C, Comi G, Bresolin N, Scarpini E.
Frequency of the chromosome 9 hexanucleotide repeat expansion in Italian patients with frontotemporal lobar degeneration.
European Journal of Neurology 2012;19, Supplement 1, p.71. 16^o Congress of the European Federation of Neurological Sciences, Stockholm, Sweden, September 8-11, 2012.
29. Scarpini E, Galimberti D.
Standard pharmacotherapy of AD: do's and don't's.
European Journal of Neurology 2012;19, Supplement 1, p.19. 16^o Congress of the European Federation of Neurological Sciences, Stockholm, Sweden, September 8-11, 2012.
30. Guaschino C, Esposito F, Annovazzi P, D'Ambrosio A, D'Amico E, Amato M, Rodegher M, Moiola L, Rossi P, Colombo B, Sorosina M, Bucello S, Cavalla P, Capello E, Patti E, Galimberti D, D'Alfonso S, Nacmias B, Capra R, Leone M, Tedeschi G, Mancardi G, Coniglio G, Grimaldi L, Ghezzi A, Martinelli V, Comi G, Martinelli Boneschi F.

Familial risk of multiple sclerosis (MS) in relatives of probands affected with primary progressive multiple sclerosis.

Neurological Sciences 33, Suppl.: S35, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.

31. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Bonsi R, Arosio B, Rossi P, Villa C, Cioffi S, Ridolfi E, Pietroboni A, De Riz M, Jacini F, Arighi A, Fumagalli G, Ghezzi L, Bresolin N, Mari D, Scarpini E.

Frequency of the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in Italian non demented elderly subjects.

Neurological Sciences 33, Suppl.: S44, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.

32. Martinelli Boneschi F, Esposito F, Clarelli F, Barrizzone N, Liberatore G, Brambilla P, Rodegher M, Sorosina M, Guaschino C, Cavalla P, Patti E, Galimberti D, Scarpini E, Lupoli S, Capra R, Tedeschi G, Mancardi G, Coniglio G, Grimaldi L, Ghezzi A, Cusi D, Martinelli V, Leone M, D'Alfonso S, Comi G.

Genome-wide association study of progressive and bout-onset multiple sclerosis patients.

Neurological Sciences 33, Suppl.: S44, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.

33. Ridolfi E, Fenoglio C, Cantoni C, De Riz M, Pietroboni A, Villa C, Serpente M, Bonsi R, Duga S, Asselta R, Calvi A, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E.

Expression and genetic analysis of microRNAs involved in multiple sclerosis.

Neurological Sciences 33, Suppl.: S68-9, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.

34. Grande G, Cova I, Maggiore L, Pomati S, Cucumo V, Ghiretti R, Forcella M, Galimberti D, Scarpini E, Vanacore N, Mariani C, Clerici F.

High levels of participation in physical leisure activities protects MCI subjects against the risk of dementia.

Neurological Sciences 33, Suppl.: S73-74, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.

35. Villa C, Ridolfi E, Fenoglio C, Ghezzi L, Vimercati R, Clerici F, Marcone A, Gallone S, Cantoni C, Serpente M, Bonsi R, Cappa S, Franceschi M, Rainero I, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D.

Expression of the transcription factor SP1 and its regulatory hsa-miR-29b in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease.

Neurological Sciences 33, Suppl.: S74, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.

36. Talarico G, Tosto G, Tropaia F, Letteri F, Piscopo P, Confaloni A, Galimberti D, Scarpini E, Lenzi G, Gasparini M, Bruno G.

Hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72: a case with early presentation and fast worsening.

Neurological Sciences 33, Suppl.: S210, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.

37. Arighi A, Fumagalli G, Jacini F, Fenoglio C, Pietroboni A, Ghezzi L, De Riz M, Serpente M, Ridolfi E, Bonsi R, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. Early onset behavioural variant frontotemporal dementia with psychiatric clinical presentations due to the C9ORF72

- hexanucleotide repeat expansion. **Neurological Sciences** 33, Suppl.: S266-7, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.
38. Cerami C, Marcone A, Galimberti D, Villa C, Scarpini E, Cappa S.
Semantic dementia due to the C9ORF72 mutation: novel evidence of phenotypical variability in the hexanucleotide repeat expansion in chromosome 9.
Neurological Sciences 33, Suppl.: S267, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.
39. Ghezzi L, Bassi M, Pietroboni A, Fumagalli G, Arighi A, Rango M, De Riz M, Jacini F, Galimberti D, Bresolin N, Scarpini E.
A case of vanishing white matter disease due to the c.260C>T (p.Ala87Val) EIF2B3 mutation.
Neurological Sciences 33, Suppl.: S268, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.
40. Pietroboni AM, Arighi A, Jacini F, Fumagalli G, Ghezzi L, Fenoglio C, Serpente M, Ridolfi E, Galimberti D, Scarpini E, Bresolin N.
Atypical presentations of Alzheimer's disease: six case reports in comparison.
Neurological Sciences 33, Suppl.: S269, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.
41. Fenoglio C, Ridolfi E, Cantoni C, De Riz M, Pietroboni A, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Calvi A, Piccio L, Cross A, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E.
Decreased circulating miRNAs in patients with multiple sclerosis.
Neurological Sciences 33, Suppl.: S355, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.
42. Barrizzone N, Leone MA, Esposito F, Lucenti A, Harbo HF, Goris A, Kockum I, Oturai A, Celius EG, Mero IL, Dubois B, Olsson T, Søndergaard H, Cusi D, Lupoli S, Guerini F, Galimberti D, Salvetti M, Liberatore G, Martinelli V, Naldi P, Myhr K, Bergamaschi R, Comi G, Martinelli Boneschi F, D'Alfonso S.
Association of genetic markers with the presence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis patients from the Italian population.
Neurological Sciences 33, Suppl.: S366-7, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.
43. Jacini F, Arighi A, Fumagalli G, Pietroboni A, Ghezzi L, Fenoglio C, Serpente M, Ridolfi E, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E.
Atypical late-onset slowly progressive frontotemporal dementia associated with C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion.
Neurological Sciences 33, Suppl.: S268-9, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.
44. Giacalone G, Lupoli S, Brambilla P, Esposito F, Caso F, Coppi E, Ferrari L, Biella G, Clerici F, Benussi L, Ghidoni R, Galimberti D, Squitti R, Confaloni A, Mariani C, Scarpini E, Binetti G, Franceschi M, Forloni G, Albani D, Magnani G, Comi G, Martinelli Boneschi F.
Pharmacogenomics of response to acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease patients: validation of a score of prediction of response to treatment.
Neurological Sciences 33, Suppl.: S402, 2012. XLIII Congress of the Italian Neurological Society, October 6-9, 2012, Rimini, Italy.

45. Barizzone N, Leone MA, Esposito F, Lucenti A, Harbo HF, Goris A, Kockum I, Oturai AB, Celius EG, Mero IL, Dubois B, Olsson T, Søndergaard HB, Cusi D, Lupoli S, Guerini F, Galimberti D, Salvetti M, Liberatore G, Martinelli V, P. Naldi, Myhr K-M, Bergamaschi R, Comi G, Martinelli Boneschi F, D'Alfonso S.
Association of genetic markers with the presence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the Italian population.
Multiple Sclerosis Journal 2012; 18(Suppl. 4): 130-1. 6th Joint Triennial Congress of the European and Americas Committees for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, October 10-13, 2012, Lyon, France.
46. Fenoglio C, Ridolfi E, Cantoni C, De Riz M, Pietroboni A, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Bresolin N, Piccio L, Cross AH, Galimberti D, Scarpini E.
Decreased circulating miRNAs in patients with multiple sclerosis.
Multiple Sclerosis Journal 2012; 18(Suppl. 4): 267. 6th Joint Triennial Congress of the European and Americas Committees for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, October 10-13, 2012, Lyon, France.

7. PARTECIPAZIONE A EDITORIAL BOARD DI RIVISTE INTERNAZIONALI O NAZIONALI CON IF>0

Dott. D. Galimberti - Editorial Board Member della rivista The Open Geriatric Medicine Journal

Dott. D. Galimberti - Senior Editor della rivista Journal of Alzheimer's disease

Prof. E. Scarpini – Editorial Board Member della rivista Journal of Neurology

Prof. E. Scarpini – Associate Editor della rivista Journal of Alzheimer's disease

Prof. E. Scarpini – Associated Editor della rivista Journal of the Neurological Sciences

8. CHAIRMAN A MANIFESTAZIONI INTERNAZIONALI

- Dott.ssa D. Galimberti - XXII Meeting of the European Neurological Society, June 2012, Prague, Czech Republic. Poster session on Dementia/ Higher function disorders.
- Prof. E. Scarpini - XXII Meeting of the European Neurological Society, June 2012, Prague, Czech Republic. Oral session on Dementia

9. MEMBERSHIP SOCIETA' SCIENTIFICHE

Prof. E. Scarpini – member of the Executive Committee of the European Neurological Society (ENS)

Dott.ssa D. Galimberti – Chair of the European Neurological Society Subcommittee on behavioural and cognitive neurology & Dementia

Dott.ssa D. Galimberti – Secretary of the European Federation of Neurological Societies

Prof. E. Scarpini – socio fondatore e segretario dell'Associazione per la ricerca sulle demenze della Società Italiana di Neurologia (SINDEM)

Dott.ssa D. Galimberti – membro dell'Associazione per la ricerca sulle demenze della Società Italiana di Neurologia (SINDEM)

Prof. E Scarpini – coordinatore del Gruppo di Lavoro Patologie Neurologiche Progressive - Sottogruppo Demenze: “Percorso diagnostico, terapeutico ed assistenziale”. Documento presentato all’Assessorato alla Salute - Regione Lombardia

10. PREMI

Dott.ssa D. Galimberti - Investigator Award 2012 dementia and Cognitive Neurology - 16th Congress of the European Federation of Neurological Societies

11. FINANZIAMENTI

- Center of Excellence for Neurodegenerative disorders “Genetic Frontotemporal dementia initiative” 43.000E (Novembre 2011-Ottobre 2013)
- Joint Program for Neurodegenerative Disorders “BIOMARKAPD” 30.000E (Giugno 2012-Maggio 2015)
- Ricerca Finalizzata Ministero della Salute “Italian network for autosomal dominant Alzheimer’s disease and frontotemporal lobar degeneration” 40.980 E (30/11/2012-29/11/2014)
- Giovani Ricercatori, Ministero della Salute “Identification of genetic factors involved in primary progressive multiple sclerosis: a model of neuro-degeneration” 100.000E (2008-2012)
- Giovani Ricercatori, Ministero della Salute “The topological organization of anatomical and functional cortical brain networks in patients with the behavioral variant of frontotemporal dementia and primary progressive aphasia” 30.000E
- Ricerca Corrente, Ministero della Salute “MicroRNA e Sclerosi Multipla: analisi di espressione e correlazione con la risposta al trattamento” 179.000E
- Fondazione Monzino “Malattia di Alzheimer e Degenerazione Lobare Frontotemporale: ricerca di marcatori da associare alla patologia mediante studi genetici e di espressione per migliorare la diagnosi differenziale e l’efficacia della terapia” 450.000E (2010-2012)
- Novartis “Pilot study for the evaluation of the effect of fingolimod administration on the expression of disease-related miRNAs” 50.000E

SEDE DISTACCATA DEL CENTRO “DINO FERRARI”
UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI MILANO

**presso U.O. NEUROLOGIA – STROKE UNIT
LABORATORIO DI NEUROSCIENZE
UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI MILANO
IRCCS ISTITUTO AUXOLOGICO ITALIANO**

Responsabile

Prof. Dott. Vincenzo Silani

U.O. Neurologia:

**Dott.ssa Laura Adobbati
Dott. Luca Maderna
Dott. Stefano Messina
Dott. Andrea Ciammola
Dott. Barbara Corrà
Dott. Nicola Ticozzi
Dott.ssa Claudia Morelli
Dott. Luca Campana
Dott. Riccardo Doronzo
Dott.ssa Carolina Lombardi**

**Dott.ssa Paola Mattaliano
Dott. Habtom Tesfaghebriel
Dott. Niccolò Mencacci**

**Dott. Alberto Lerario
Dott. Alberto Doretti
Dott. Federico Verde
Dott. Davide Sangalli
Dott.ssa Barbara Poletti
Dott.ssa Annalisa Lafronza
Dott. Laura Carelli
Dott.ssa Federica Solca
Dott. Stefano Zago
Dott. Paolo Tarsia
Barbara Riccardi
Francesca Gregorini
Patrizia Nelli**

Dirigente I° Livello – Stroke Unit
Dirigente I° Livello, Neurofisiologo
Dirigente I° Livello
Dirigente I° Livello
Dirigente I° Livello – Stroke Unit
Neurologo, Ricercatore Universitario
Neurologa, Contrattista a Progetto
Neurologo, Contrattista a Progetto
Neurologo, Consulente in Convenzione
Neurofisiologa, Dirigente I° Livello
Centro Medicina del Sonno
Neurofisiologo, Consulente in convenzione
Neurofisiologo, Consulente in convenzione
Neurologo, Dottorato – UCL
Institute of Neurology - Londra
Specializzando in Neurologia
Specializzando in Neurologia
Specializzando in Neurologia
Specializzando in Neurologia
Psicologa, Consulente in Convenzione
Psicologa, Contrattista a Progetto
Psicologa, Contrattista a Progetto
Psicologa, Contrattista a Progetto
Psicologo, Consulente in Convenzione
Pneumologo, Consulente in Convenzione
Tecnico neurofisiologa
Tecnico neurofisiologa
Segreteria Scientifica U.O. Neurologia

Laboratorio di Neuroscienze

Dott.ssa Antonia Ratti

**Dott.ssa Lidia Cova
Dott.ssa Isabella Fogh**

Biologa, Ricercatore Universitario
Confermato
Biologa, Contrattista a Progetto
Biologa, Sovvenzione
Associazione Centro “Dino Ferrari”
King’s College di Londra

Dott.ssa Jenny Sassone
Dott.ssa Claudia Colombrita
Dott.ssa Cinzia Tiloca

Biotechnologa, Contrattista a Progetto
Biologa, Assegni di ricerca Post doc -Tipo A
Biotechnologa, Dottoranda

Dott. ssa Elisa Onesto
Dott.ssa Valentina Diana
Dott. ssa Daniela Calini
Dott.ssa Annamaria Maraschi

Biotechnologa, Contrattista a Progetto
CTF, Contrattista a Progetto
Biologa, Contrattista a Progetto
Biologa, Contrattista a Progetto

Rapporti di collaborazione:
Nazionali:

Centro “Dino Ferrari”
IRCCS Ospedale Maggiore
Milano

Prof. Nereo Bresolin, Prof. Giacomo Comi
Dott.Maurizio Moggio,Dott.Alessandro Pelle
Prof. Elio Scarpini,Dott.ssa Daniela Galimberti

Istituto Mario Negri, Milano

Dott.ssa Caterina Bendotti, Dott. Pietro
Veglianese, Dott.ssa Tiziana Mennini, Dott. Paolo
Bigini

IRCCS Istituto C. Besta, Milano

Dott.ssa Cinzia Gellera, Dott.Tagliavini
Dott. Paolo Battaglia, Dott. Franco Taroni
Prof. Paolo Rebullà, Dott.ssa Lorenza Lazzari
Prof. Giorgio Lambertenghi,
Dott. Paolo Magni

IRCCS Ospedale Maggiore

CEND Università di Milano
Istituto di Endocrinologia
Università di Milano
Fondazione Matarrella
IRCCS Ospedale San Donato, Milano
IRCCS Istituto Mondino, Pavia
Dipartimento di Scienze e
Tecnologie Biomediche,
Università degli Studi di Milano
Centro Clinico Nemo
Dipartimento di Farmacologia
Sperimentale ed Applicata,
Università di Pavia
Dipartimento di Endocrinologia
IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dipartimento di Farmacologia
Università di Milano - CEND
IRCCS Neuromed
Neuroimaging Research Unit and
Department of Neurology,
Institute of Experimental Neurology,
Division of Neuroscience and
Department of Neuroradiology,
Vita-Salute University and
San Raffaele Scientific Institute, Milan

Prof. Elio Polli, Dott.ssa Patrizia Bossolasco
Prof. Giovanni Meola
Dott. Fabio Blandini, Dr.ssa MarieArmentero
Prof.ssa Cecilia Gelfi

Dott. Massimo Corbo, Dott. Christian Lunetta
Dott. A. Pascale

Prof. L. Persani

Dott. Luigi Sironi, Dott. A.E. Rigamonti,

Dott. Ferdinando Squitieri
Prof. Massimo Filippi
Dott. Federica Agosta
Prof. Giacomo Comi
Prof. Andrea Falini

Internazionali:

University of Massachussets Medical

Prof. Robert H. Brown, John Landers

School of Boston
Università di Ulm, Germania
Dipartimento di Neurologia
King's College, London
Dipartimento di Neurologia
Dipartimento di Neurologia
Università di St. Gallen, Svizzera

Prof. Albert Ludolph
Prof. Al-Chalabi, Christian Shaw
John Powell
Prof. Markus Weber

ATTIVITA' SCIENTIFICA – ANNO 2012

La Sede Distaccata del Centro "Dino Ferrari" presso la U.O. di Neurologia e Laboratorio di Neuroscienze dell' Università di Milano - IRCCS Istituto Auxologico Italiano con il 2012 completa il primo decennio di attività dalla fondazione, voluta dal Prof. Guglielmo Scarlato, nel 2002. In dieci anni di attività, la Sede Distaccata presso l' IRCCS Istituto Auxologico Italiano ha prodotto una serie considerevole di lavori scientifici, ha incrementato l' attività clinica diversificandosi a cogliere la patologia neurodegenerativa raggiungendo, in più occasioni, l' eccellenza. In particolare, è proseguita l' operazione di formazione dei più giovani ricercatori e medici che con successo sono stati inviati in Laboratori sia in Nord America che in Europa. La crescita degli investimenti in apparecchiature dedicate alla genetica ed alla biologia molecolare ha dato rilievo alle collezioni di materiale biologico ed ha permesso di fondare un Consorzio (SLAGEN) per lavorare in sinergia in Italia. Spesso il Centro "Dino Ferrari" è stato l' interlocutore a cui ci si è rivolti dall' estero per avere informazioni sulle casistiche Italiane per quanto riguarda le malattie neurodegenerative e la SLA in particolare. L' intuizione che il mondo delle RNA-binding protein è di rilievo data dal 2006 e, grazie a diversi lavori di base, è stato facile aprire il passo a nuove ipotesi reattive alla neurodegenerazione che oggi appare seganta da meccanismi patogenetici simili. In particolare, il mondo delle Demenze Fronto-Temporali (FTD) si è divenuto continuo con quello della SLA. Le equipe multidisciplinari sono state l' obiettivo perseguito e ciò ha permesso di sviluppare tematiche di ricerca ambiziose come Brain-Computer Interface (BCI) ed Eye Tracking (ET) per la comunicazione dei pazienti.

L' aprirsi degli interessi alla patologia cerebrovascolare è stato di dovere dopo l' affidamento della nuova Stroke Unit dal 2007 e ciò ha fornito nuovi spunti di ricerca intersecati alla patologia neurodegenerativa. In particolare è maturato un largo interesse per la patologia amiloidotica dei vasi cerebrali. Negli anni è stata grandemente sviluppata la Neurofisiologia con studio della patologia nel sonno, mediante una proficua interazione con la U.O. di Cardiologia diretta dal Prof. Gianfranco Parati.

Il momento riabilitativo ha molto occupato l' attenzione del Centro "Dino Ferrari" che ha di molto collaborato a disegnare le fasi successive alla diagnosi, proponendo studi clinici ed innovativi approcci alla patologia spesso in sintonia con gli organismi Sanitari Regionali.

La ricercata interazione tra eccellenza clinica e capacità di Laboratorio si è espressa nel 2012 con la scoperta di un nuovo gene per le forme familiari di SLA (Profilina 1) con la produzione di una rilevante pubblicazione su Nature (23 Agosto 2012) e la successiva dimostrazione che anche casi di SLA sporadica presentano rare mutazioni patogenetiche per lo stesso gene.

Un moderno ed umano approccio alle più temibili malattie neurodegenerative quali SLA, Demenze, Malattie di Huntington, Malattia di Parkinson rappresenta l' obiettivo perseguito con successo nei 10 anni dalla costituzione della U.O. di Neurologia di cui il Centro "Dino Ferrari" fa parte operante, sempre vicino alla matrice storica della IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore di Milano dove è originariamente nato.

Più analiticamente, la Sede Distaccata del Centro "Dino Ferrari" ha ulteriormente ottimizzato gli investimenti in ricerca presso il Centro di Ricerche e Tecnologie Biomediche di Cusano Milanino dove ha locazione il Laboratorio di Neuroscienze. L' acquisizione dell' apparecchiatura Illumina, piattaforma per l' analisi più approfondita di polimorfismi a singolo nucleotide (SNIP) in relazione

alle patologie neurodegenerative di cui il Centro "Dino Ferrari" per tradizione si occupa, ha permesso il completamento del progetto di associazione genica tipo "genoma wide" (GWA) per la definizione di geni di suscettibilità nella Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) sporadica con la creazione del Consorzio SLAGEN per la raccolta dei campioni di DNA presso selezionati Centri Italiani. I dati relativi a 2000 campioni e 2000 controlli a cui si associano 500 ulteriori campioni SLA e 1000 controlli per la fase di replica sono giunti, dopo l'analisi di imputazione, alla meta-analisi con riconoscimento di regioni cromosomiche potenzialmente responsabili della SLA nella forma sporadica sul cromosoma 17 e 18. La diagnostica molecolare è stata ulteriormente arricchita potendo fornire oggi un pannello diagnostico completo per le malattie del motoneurone (SLA), per i disturbi extrapiramidali (Malattia di Huntington e di Parkinson) e per alcune miopatie (Distrofia Miotonica, Miopatia Oculo-Faringea, etc.).

L'attività clinica presso l'U.O. di Neurologia – Stroke Unit dell'IRCCS Istituto Auxologico Italiano è stata sviluppata con la creazione di équipe multidisciplinari per le diverse patologie neurodegenerative (Sclerosi Laterale Amiotrofica, Disturbi del Movimento, Malattie Cerebrovascolari, Disturbi Cognitivi). Sono stati ampliati, in particolare, gli ambulatori ed i servizi dedicati all'inquadramento multidisciplinare dei Disturbi Cognitivi e dei Disturbi del Movimento. E' stata avanzata richiesta per il riconoscimento di un Centro Regionale dedicato ai Disturbi Cognitivi di I° e II° livello. E' stata rafforzata la collaborazione con la U.O. di Cardiologia diretta dal Prof. Gianfranco Parati, per lo studio del sonno in diverse patologie neurodegenerative e cerebrovascolari.

E' proseguita sotto la direzione della U.O. di Neurologia l'attività della moderna Stroke Unit con 6 letti di cui 4 con monitoraggio fissa che ha comportato l'acquisizione e la formazione di nuovo personale specializzato, sia medico che infermieristico. E' stata avviata una intensa attività clinica con monitoraggio innovativo di diversi parametri funzionali e studio del sonno in pazienti ricoverati per ictus acuto, in stretta collaborazione con la U.O. di Cardiologia diretta dal Prof. Gianfranco Parati. La collaborazione con il Dipartimento di Neuroscienze della IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore – Università di Milano ha permesso di completare con successo molteplici procedure di trombolisi endovenosa ed endoarteriosa con limitata incidenza di effetti collaterali, contando sulla consulenza neurochirurgica della medesima istituzione. L'acquisizione di una nuova RM 3T rappresenta il presupposto per una nuova ricerca volta, in particolare, allo studio della patologia neurodegenerativa e cerebrovascolare.

Il Servizio di Neurofisiologia coordinato dal Dott. Luca Maderna ha dato impulso sia dell'attività clinica che di ricerca di base con particolare sviluppo di tecniche innovative di registrazione del muscolo diaframma utile a porre indicazione precoce per la ventilazione non invasiva in pazienti affetti da SLA e diverse patologie muscolari (Distrofia Miotonica di Steinert), allo studio del nervo periferico mediante utilizzo di Ecodoppler, etc.

L'attività didattica è stata espletata nel 2012 per Specializzandi in Neurologia affidati alla U.O. di Neurologia, Studenti in Medicina e Chirurgia che hanno selezionato la struttura per elaborare la Tesi di Laurea e Studenti in Biologia o Biotecnologie che, analogamente, hanno scelto di frequentare il Laboratorio di Neuroscienze per il tirocinio pre-laurea elaborando la Tesi. Due Dottorandi di Ricerca che avevano selezionato il Laboratorio di Cusano Milanino per completare la propria formazione scientifica hanno concluso il loro iter con la discussione delle relative Tesi.

I rapporti con diversi ricercatori del Centro "Dino Ferrari" sono stati molto attivi con l'avanzamento di comuni progetti. In particolare, il progetto di studio relativo alla caratterizzazione istochimica ed immunoistochimica di prelievi biotici di nervo e di muscolo di pazienti affetti da diversa patologia neuromuscolare (Prof. Maurizio Moggio) con analisi biochimica o molecolare in casi selettivi (Prof. Giacomo Comi)

La ricerca di base si è articolata in diverse tematiche che hanno rappresentato la fisiologica evoluzione di studi in parte avviati nel 2011, in armonia con le problematiche cliniche istituzionali di cui il Centro "Dino Ferrari" si interessa.

In particolare, la Dott.ssa Antonia Ratti ha dato ulteriore impulso agli studi di ribonmica aprendo nuovi scenari per la comprensione dei meccanismi patogenetici delle malattie neurodegenerative (memoria-ippocampo-demenza e malattie del motoneurone) e ha definito il ruolo patogenetico di angiogenina, TDP43, FUS/TLS, Optineurina nei pazienti affetti da SLA sporadica. Particolare rilievo è stato dato allo studio di pazienti con SLA e Demenza Fronto-Temporale: dal Settembre 2011 è stato formulato un importante impiego di ricerca per la definizione delle espansioni del gene C9orf72 nella popolazione dei pazienti affetti da SLA, Demenza Fronto-Temporale e svariata patologia extrapiramidale.

La Dott.ssa Lidia Cova ha concluso la caratterizzazione del midollo osseo di pazienti affetti da patologia neurodegenerativa (SLA) e definito i parametri utili all' implantologia nel modello animale reso parkinsoniano con 6-OH-DA con una serie di lavori a stampa che hanno meritato l' attenzione della stampa internazionale. Le potenzialità staminali delle cellule amniotiche sono state ulteriormente caratterizzate con impianto nel topo wobler. Analogamente, le cellule staminali neurali endogene sono state caratterizzate in un modello di ratto iperteso che spontaneamente sviluppa ictus accanto alla iniziale definizione dell' uso di traccianti per monitorare le cellule dopo trapianto utilizzando RM 7 Tesla.

La Dott.ssa Jenny Sassone ha continuato la caratterizzazione di tessuti periferici di pazienti affetti da Malattia di Huntington definendo ulteriormente la patologia mitocondriale muscolare e le basi molecolari della neurotossicità glutammatergica in un modello cellulare di PARK-2.

Il Dott. Nicola Ticozzi ha completato una serie di lavori di estremo interesse quali l' identificazione del gene Profilina 1, sviluppato grazie al progetto Exome Sequencing supportato da Arisla (EXOMEFALS).

Nel 2012 il Centro ha mantenuto la funzione direttiva nell' ambito dell' European ALS Consortium (EALSC), organizzazione Europea dedicata allo sviluppo delle problematiche inerenti le malattie del motoneurone (il Prof. V. Silani ne è stato Chairman), con stesura di linee guida relative alla SLA clinica ed alla Neuroradiologia della SLA nell' ambito dell' EFNS (European Federation of Neurological Societies 2012) ed organizzazione di un gruppo dedicato alle malattie del motoneurone nell' ambito dell' ENS (European Neurological Society) ed EFNS. Diversi Teaching Course sono stati organizzati nell' ambito delle due organizzazioni scientifiche.

Il Centro è inoltre rappresentato in diverse Commissioni della Regione Lombardia avendo attivamente partecipato alla elaborazione di diverse linee guida relative alla SLA, Malattia Neuromuscolari ed Extrapiramidali.

Il Prof. Vincenzo Silani è parte all' editorial Board di European Neurology, ALS e American Journal of Neurodegenerative Diseases.

La migliore espressione dell'attività svolta dalla Sede Distaccata del Centro "Dino Ferrari" sta nel consenso internazionale raggiunto nel 2012 anche per un rilevante numero di ricercatori (no. 4) che stanno svolgendo o hanno completato periodi formativi in qualificati Laboratori in Europa o nel Nord-America con cui il Centro "Dino Ferrari" ha scambi collaborativi di elevato livello. In particolare, la Dr. Isabella Fogh ha la responsabilità presso il King's College di Londra del completamento dell' analisi relativa al GWA delle forme sporadiche di SLA, il Dott. Niccolò Mencacci si trova a Londra presso il Laboratorio diretto dal Prof. John Hardy per un PhD in Neurogenetica.

PRINCIPALI ARGOMENTI DI RICERCA:

1.IDENTIFICAZIONE DI GENI CANDIDATI NELLA SLA FAMILIARE MEDIANTE EXOME SEQUENCING: IDENTIFICAZIONE DEL GENE PROFILINA1 QUALE RESPONSABILE DELLE FORME FAMILIARI DI SLA - PROGETTO EXOMEFALS (ARISLA)

1) Selezione e preparazione dei campioni Nel corso degli anni è stata raccolta presso l' IRCCS Istituto Auxologico Italiano, in collaborazione con l' IRCCS Istituto Neurologico Besta, una coorte

composta da 211 individui affetti da SLA familiare (SLAF), di cui 90 portatori di mutazioni in geni noti (SOD1 n=30, C9ORF72 n=30, TARDBP n=17, FUS n=10, ANG n=3). Nel corso del 2011 e 2012 questa coorte è stata ulteriormente indagata al fine di identificare mutazioni in altri geni associati alla SLA quali OPTN (Del Bo et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011), VCP (Tiloca et al., Neurobiol Aging, 2012), ATXN2 (Mariotti et al., Neurobiol Aging, 2012), UBQLN2 (Gellera et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2012) e C9ORF72 (Ratti et al., Neurobiol Aging, 2012; Smith et al., Eur J. Hum Genet, 2012).

Tra i pazienti risultati negativi per mutazioni patogenetiche sono stati selezionati per exome sequencing 111 individui, di cui 80 casi indice e 31 soggetti appartenenti a 10 famiglie affette da SLAF. Tra i campioni selezionati sono risultati di particolare interesse una famiglia di origine caucasica (Famiglia #1) ed una di origine ebraica sefardita (Famiglia #2).

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico usando protocolli standardizzati; la concentrazione è stata determinata utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop; la qualità del DNA è stata infine valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio.

2) Exome sequencing. La cattura delle sequenze esoniche è stata effettuata utilizzando il chip SeqCap EZ Library Exome v2.0 (Nimblegen), in grado di riconoscere circa 300.000 esoni appartenenti a 30.000 geni (complessità totale = 36,5 Mb). Il sequenziamento delle librerie così ottenute è stato condotto sulla piattaforma HiSeq2000 (Illumina). L'allineamento delle sequenze è stato ottenuto con il software SOAP e la determinazione delle varianti con SOAPsnp. Per semplificare il processo di analisi dell'esoma, abbiamo creato un software personalizzato, in grado di effettuare automaticamente un controllo qualità, calcolando il numero di sequenze ottenute, le coppie di basi sequenziate, la percentuale di allineamento al genoma di riferimento e il numero di SNP identificati. Inoltre, il software analizza tutte le varianti utilizzando l'algoritmo SIFT, al fine di determinare se le varianti identificate alterino o meno un residuo aminoacidico e di prevedere l'effetto sulla funzione della proteina mutata. Abbiamo inoltre creato un database informatico personalizzato, chiamato dbEXOME (figure 1 e 2), in grado di raccogliere tutte le varianti identificate nei nostri campioni, nonché gli oltre 40 milioni di SNP annotati nell'ultima versione del 1000 Genomes project con la loro frequenza allelica. Le funzioni implementate in dbEXOME consentono di analizzare rapidamente e facilmente tutte le varianti derivate dall'exome sequencing. Gli SNP identificati sono stati filtrati secondo diversi criteri. In particolare, sono stati eliminati dalla successiva analisi tutti gli SNP già annotati in database pubblici (dbSNP132, 1000 Genomes Project, NHLBI ESP5400) e le varianti sinonime. Per evitare l'inclusione di falsi positivi derivanti da artefatti di sequenziamento, abbiamo inoltre escluso gli SNP individuati in 29 controlli sani sequenziali utilizzando lo stesso protocollo. Nei casi in cui fossero disponibili dati derivanti da un'analisi di linkage, sono state selezionate solo le varianti sottese da un picco di LOD score.

Al termine dell'analisi sono stati identificati in un totale di 111 campioni 2.119.911 SNP, di cui 23,373 nuove varianti e 14,128 varianti non sinonime. Gli SNP sono stati successivamente prioritizzati sulla base della presenza di varianti multiple nello stesso gene o all'interno dei geni noti per essere coinvolti in processi neurodegenerativi. In particolare, due pedigree (Famiglie # 1 e # 2) risultavano portatrici di due mutazioni nel gene PFN1, codificante per la proteina profilina 1. PFN1 è stato quindi selezionato come il gene candidato più promettente.

3) Identificazione di mutazioni patogenetiche del gene PFN1 nella SLA familiare. Con il metodo di filtraggio sopra descritto, abbiamo osservato come le due più grandi famiglie da noi studiate con exome sequencing (Famiglie # 1 e # 2) ospitavano due mutazioni diverse (C71G e M114T) (Figure 1a e 1b) all'interno di un singolo gene comune, profilina 1 (PFN1) localizzato sul cromosoma 17p13.2. PFN1 è una proteina di 140 amminoacidi in grado di legare l'actina monomeric (G-actina) promuovendone la polimerizzazione a formare actina filamentosa (F-actina). Per confermare che le mutazioni in PFN1 fossero davvero responsabili della SLAF, abbiamo sequenziato l'intera regione codificante di PFN1 in una seconda coorte composta da 272

individui con SLAF, negativi per le più comuni mutazioni patogenetiche. Abbiamo così identificato cinque ulteriori casi di SLAF con mutazioni di PFN1 (Tabella 1). È interessante notare come la mutazione C71G, originariamente identificata nella Famiglia # 1, sia stata scoperta in due ulteriori famiglie. In un caso (Family # 3), il sequenziamento degli altri membri affetti della famiglia ha mostrato una cosegregazione della mutazione con la malattia (Figura 1c). Lo screening di questa coorte ha anche reso possibile l'identificazione di due nuove mutazioni (E117G e G118V), interessanti residui aminoacidici evolutivamente conservati (Figura 1d), supportando l'ipotesi che queste mutazioni siano patogeniche. Il sequenziamento di PFN1 in 816 individui affetti da SLA sporadica (SLAS), infine, ha rivelato la presenza della mutazione E117G in due casi.

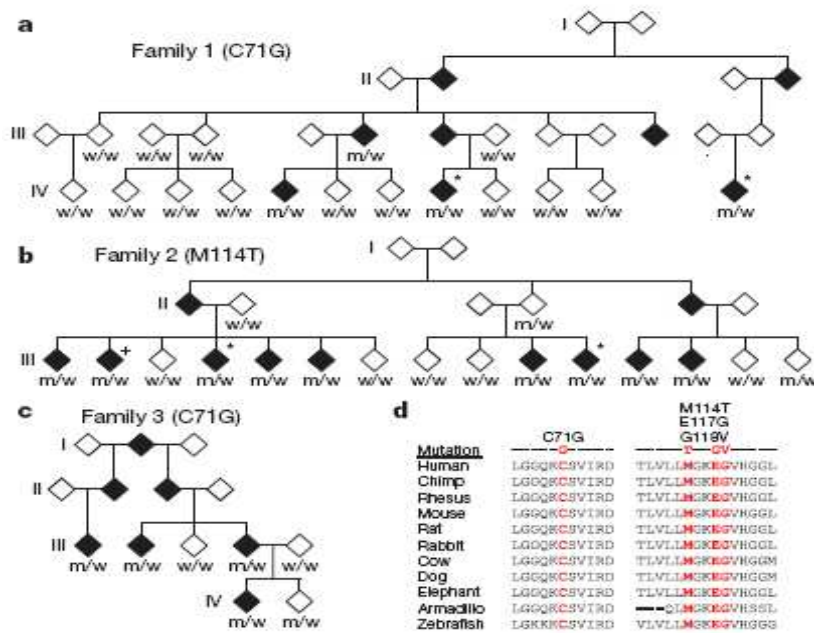


Figure 1

Per confermare la patogenicità delle varianti E117G e G118V, abbiamo interrogato i principali database pubblici. Mentre G118V rappresenta una nuova mutazione, E117G è presente in 2/5.379 casi nel server NHBLI ESP5400; per tale ragione abbiamo deciso di estendere l'analisi mutazionale genotipizzando le varianti identificate in un pannello di 1.089 controlli sani. Tre mutazioni (C71G, M114T, G118V) non sono state osservate nei controlli, mentre E117G è stata individuata in un singolo individuo (Tabella 1). Combinando i nostri dati con quelli del 1000 Genomes Project e di NHBLI ESP5400, si osserva come E117G sia presente in 3/1.090 individui con SLA e 3/7.560 controlli sani (2.75×10^{-3} vs. 3.97×10^{-4} ; $p=0.030$, test di Fisher a due code). Si può quindi ipotizzare che E117G rappresenti un polimorfismo raro o, più facilmente, una mutazione con minor effetto patogenetico.

Mutation	ALS		Controls			
	FALS	SALS	1000 Genomes	ESP Exome Server	Internal Genotyping	Total
C71G	3/274	0/816	0/1092	0/5379	0/1089	0/7560
M114T	2/274	0/816	0/1092	0/5379	0/1089	0/7560
E117G	1/274	2/816	0/1092	2/5379	1/1089	3/7560
G118V	1/274	0/816	0/1092	0/5379	0/1089	0/7560

Tabella 1

La presenza di aggregati insolubili citoplasmatici rappresenta la caratteristica neuropatologica distintiva della maggior parte delle malattie neurodegenerative tra cui la SLA, la malattia di Parkinson e la malattia di Alzheimer. Al fine di indagare se le mutazioni di PFN1 inducessero la formazione di aggregati insolubili, abbiamo transfettato cellule N2A con costrutti wild-type o con i quattro mutanti e successivamente abbiamo effettuato un Western Blot delle frazioni solubili ed insolubili. Mentre la proteina wild-type era presente prevalentemente nella frazione solubile delle cellule transfettate, una frazione considerevole dei costrutti mutati C71G, M114T e G118V sono stati rilevati nella frazione insolubile (Figura 2a). Inoltre, abbiamo anche osservato diverse specie di peso molecolare elevato, indicative della presenza di oligomeri di PFN1 SDS-resistenti. Il costrutto mutante E117G, al contrario, esprime un comportamento più simile al wild-type, con la maggior parte della proteina rilevata nella frazione solubile.

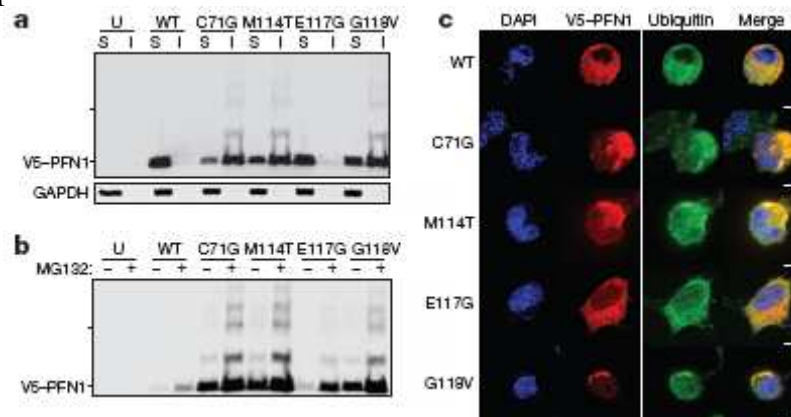


Figure 2

Abbiamo quindi deciso di approfondire le nostre osservazioni mediante immunofluorescenza delle cellule transfettate. Mentre profilina 1 wild-type mostra un pattern di espressione citoplasmatica omogeneo nelle cellule N2A, i costrutti mutanti, compreso E117G, determinano la formazione di aggregati citoplasmatici ubiquitinati nel 15-61% delle cellule transfettate (Figura 2c). E' di particolare interesse la dimostrazione che tali aggregati contengono TDP-43, il maggior componente proteico delle inclusioni citoplasmatiche nella SLA. Risultati simili sono stati ottenuti transfettando colture di motoneuroni primari. In queste ultime cellule, l'espressione di costrutti mutanti di PFN1 determina una diminuzione del legame con actina e la conseguente inibizione della crescita assonale (Fig. 3). Inoltre, i motoneuroni primari che esprimono i costrutti mutanti mostrano coni di crescita di dimensioni ridotte con un rapporto di F-actina/G-actina alterato.

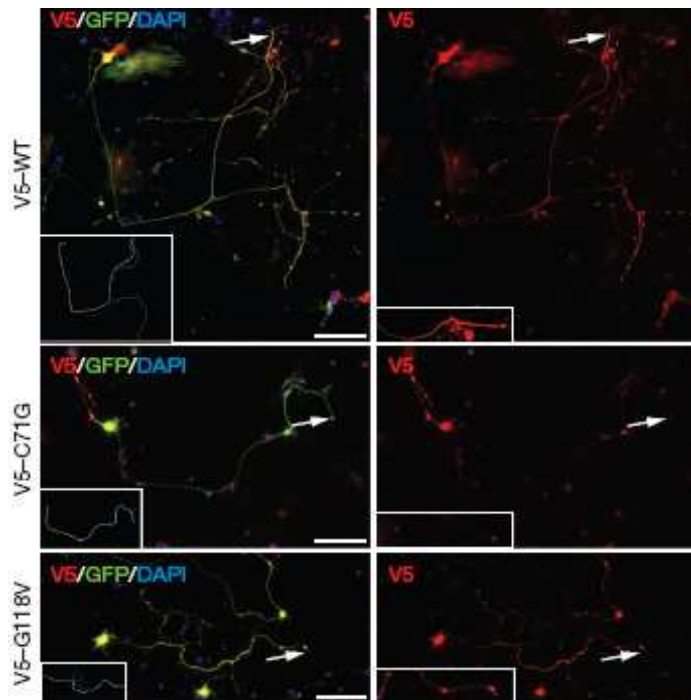


Figura 3

In conclusione, utilizzando una metodica di exome sequencing, abbiamo determinato come mutazioni precedentemente sconosciute nel gene PFN1, codificante per profilina 1, sono responsabili di circa il 2% di tutti i casi di SLAF, e abbiamo proposto un meccanismo patogenetico per spiegare questo fenomeno. I nostri risultati suggeriscono come le alterazioni citoscheletriche possano contribuire in modo determinante alla patogenesi della SLA. Lo screening di un' ampia corte di pazienti affetti da SLA sporadica o familiare in Italia ha dimostrato la scarsa incidenza della mutazione PFN1 con particolare riferimento alle forme sporadiche.

2. ANALISI DEL RUOLO PATOGENETICO DELLA MUTAZIONE DI PARK-2 NELLA MALATTIA DI PARKINSON

Nel corso dell'anno 2012 è stato ulteriormente studiato il legame tra la proteina Parkin e la proteina GluR6. Gli esperimenti di immunoprecipitazione e di pull down hanno permesso di mappare i domini di interazione. Gli esperimenti di FRET hanno evidenziato che l'interazioni tra queste due proteine è modulata dal glutammato. Gli esperimenti di trafficking sono stati eseguiti su cellule eterologhe e su neuroni primari con evidenza della perdita di funzione di parkin che va a disregolare il trafficking di GluR6. Gli esperimenti sulla stabilità del citoscheletro micro tubulare hanno evidenziato che la perdita di funzione di Parkin diminuisce la stabilità del citoscheletro. I risultati sono in via di pubblicazione.

3. STUDIO DEL COINVOLGIMENTO MITOCONDRIALE NELLA PATOGENESI DELLA MALATTIA DI HUNTINGTON: POSSIBILI IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Nel corso dell'anno 2012 è stato ulteriormente investigato il legame tra attivazione della proteina BNip3 e funzionalità mitocondriale in HD. In particolare abbiamo analizzato la funzione protettiva del dominante negativo BNip3deltaTM in modelli cellulari HD (cellule muscolari da pazienti HD e cellule immortalizzate derivate dal topo knock-in). In entrambi i modelli cellulari l'espressione della proteina BNip3deltaTM è stata dimostrata indurre nelle cellule HD una diminuzione della frammentazione mitocondriale, un aumento della produzione di ATP ed un aumento del consumo di ossigeno. Con l'obiettivo di investigare l'effetto dell'espressione della proteina BNip3deltaTM in modelli HD in vivo, è stato preparato e validato il costrutto lentivirale BNip3deltaTM per la veicolazione in vivo.

4. EVENTI STRESSANTI, CARATTERISTICHE DI PERSONALITA' ED ABILITA' DI COPING NELLO SVILUPPO DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

Il ruolo rivestito da fattori psicologici e di personalità, dall'esposizione ad eventi stressanti e dalle abilità di gestione dello stress quali potenziali fattori eziologici di patologia è stato negli ultimi anni oggetto d'interesse in letteratura (Healey et al., 1981; Yoshiuchi et al., 1998; Kivimäki et al., 2002; Coker et al., 2003). Evidenze a favore di fattori nello sviluppo e/o nella recrudescenza di alcune malattie cardiovascolari, neoplastiche, immunitarie e neurologiche sono state recentemente documentate (Theorell et al., 1999; Naliboff et al., 2004, Kubzansky et al., 2005). Sebbene alcuni studi abbiano posto in luce una peculiare tendenza dei pazienti SLA a negare attivamente la malattia (Brown e Mueller, 1970), analisi più approfondite, mediante l'utilizzo di inventari di personalità, non sono state in grado di evidenziare un profilo specifico (Peters et al., 1978). Verranno sottoposti al protocollo di ricerca 50 pazienti affetti da SLA definita, definita con supporto di laboratorio e probabile, diagnosticata secondo i criteri di El Escorial (Brooks et al. 2000). A tali pazienti, afferenti alla U.O. di Neurologia di questo Istituto, verranno somministrati, dopo un colloquio psicologico clinico, alcuni strumenti di assessment psicodiagnostica.

Ad oggi sono stati valutati neurologicamente 34 pazienti mediante registrazione della regione di insorgenza dei segni/sintomi clinici (bulbare, cervicale, toraco-addominale e lombo-sacrale), approfondimento neurofisiologico (EMG, PEM), neuroradiologica (RM), mediante il rilievo del BMI e scale funzionali (ALSFRS). Sono stati infine sottoposti ad una valutazione psicodiagnostica indagando fattori psicologici, emotivi e di personalità nella genesi e nel tipo di decorso ed adattamento alla malattia. 24 di questi pazienti sono stati rivalutati a 6 ed a 12 mesi di distanza per valutare il tipo di adattamento psicologico alla malattia mediante i medesimi strumenti di assessment.

5. OSSERVAZIONE LONGITUDINALE DEI DEFICIT COGNITIVI ASSOCIATI ALLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA)

Sono stati ad oggi esaminati 45 pazienti che hanno soddisfatto i requisiti diagnostici e clinici espressi negli obiettivi. Circa 35 di essi hanno eseguito il follow-up a sei mesi di distanza e 30 un secondo follow-up a 12 mesi. Il sottogruppo di pazienti affetti da Sclerosi Laterale Primaria (SLP) diagnosticati secondo i criteri di Pringle et al., (1992) non è stato ulteriormente ritestato. Si sta attualmente proseguendo la valutazione longitudinale dei deficit disgrafici emersi, alla luce delle iniziali osservazioni che hanno posto in evidenza la progressiva ingravescenza di tali deficit. Non è stato possibile ritestare alcuni dei pazienti precedentemente arruolati in quanto deceduti.

6. DETERMINAZIONE LIQUORALE DEI LIVELLI LIQUORALI DI TDP-43 E FUS IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

Questo studio si inserisce nell'ambito della ricerca tesa a definire marcatori biologici liquorali della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA).

Nel corso del 2012 si è proceduto alla determinazione di angiogenina (ANG) a livello liquorale in 81 pazienti affetti da malattia del motoneurone e 82 soggetti di controllo. In letteratura esistono dati a favore di un ruolo di ANG nella patogenesi della SLA.

In particolare, mutazioni nel gene ANG (cromosoma 14q11.2) sono causa di SLA familiare (ALS9). Poiché in letteratura solo due studi hanno indagato l'espressione di ANG liquorale nella SLA, abbiamo cercato di indagare eventuali differenze tra pazienti con malattia del motoneurone e soggetti di controllo. I dati preliminari di cui disponiamo sembrano non evidenziare differenze significative tra i 2 gruppi ma, dato interessante, sembrano indicare che nei pazienti SLA le concentrazioni liquorali di ANG non correlino con sesso ed età, contrariamente a quanto osservato nei soggetti di controllo. Infatti, in questo gruppo abbiamo rilevato valori liquorali di ANG maggiori nei soggetti di

Sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile ed una correlazione positiva con l'età. Questi risultati potrebbero indicare una alterata espressione di ANG nei pazienti SLA rispetto ai controlli. Pur essendo ancora da valutare definitivamente un'eventuale correlazione tra valori di ANG e parametri clinici (sede d'esordio, status respiratorio, coinvolgimento cognitivo), questo lavoro fornisce dati interessanti nell'ambito della ricerca di biomarcatori liquorali nella SLA e ha permesso di fare esperienza nell'utilizzo della metodica ELISA nel nostro laboratorio, fungendo da "propedeutica" alla determinazione mediante ELISA di TDP-43. Se per ANG è disponibile un kit ELISA commerciale, per quanto riguarda TDP-43, il nostro studio è complicato dal fatto che non è disponibile un kit ELISA per questa proteina ed i suoi frammenti patologici. Pertanto, si sta cercando di approntare la metodica, con notevoli difficoltà metodologiche. Ad oggi si è proceduto al dosaggio di TDP-43 ricombinante mediante colorazione Comassie, al fine di determinare le concentrazioni standard della proteina da utilizzare per l'ELISA. Non è ancora perfezionata la creazione della curva di taratura e si sta cercando di aumentare sensibilità e specificità del test, modificando opportunamente i vari parametri (concentrazione dell'anticorpo di coating e di rilevazione, per esempio). E' previsto che lo studio dell'espressione liquorale di FUS venga avviato al termine del dosaggio di TDP-43.

7. SVILUPPO DI SISTEMI DI MARCATURA STABILI IN CELLULE STAMINALI UMANE: USO DI FLUOROCROMI E/O NANOPARTICELLE MAGNETICHE

Nel corso del terzo anno di ricerca 2012 si sono raccolti ed organizzati in maniera critica diversi risultati dai protocolli di marcatura con nanoparticelle magnetiche/fluorescenti e/o luce nel vicino infrarosso.

In particolare:

Sviluppo, produzione e caratterizzazione di polimeri fluorescenti ad elevata biocompatibilità- Sono stati sintetizzati diversi polimeri chimicamente stabili in cui le molecole fluorescenti (emittenti nel campo del rosso Texas Red) fossero stabilmente inserite nel polimero a base di cianoacrilato. In particolare è stata utilizzata la polimerizzazione anionica del n-Butyl CyanoAcrylate (BCA) e del Methyl Methacrylate (MMA) per ottimizzare la velocità di degradazione dei polimeri nel tempo riducendo il rilascio dei fluorocromi per evitarne l'internalizzazione da parte dei tessuti circostanti post impianto nei futuri protocolli terapeutici. Questa metodica innovativa è stata possibile grazie alla collaborazione col Politecnico di Milano e si basa sulle proprietà specifiche del materiale caratterizzato da biodegradabilità controllabile nel tempo, biocompatibilità e approvazione da parte di FDA per l'utilizzo biomedico come materiale per il trasporto modulabile di farmaci verso organi specifici. Sono state confrontate le principali caratteristiche morfologiche e biologiche delle cellule staminali per verificare che rimanessero inalterate rispetto ai valori ritrovati in cellule non caricate con i polimeri. In particolare abbiamo dimostrato tramite analisi FACs e della funzionalità metabolica che il fenotipo, i parametri riguardanti il ciclo, i fenomeni di apoptosi e la funzionalità biologica fossero preservati post caricamento del polimero.

Nell'ambito di questo progetto si è inoltre verificato e confrontato il potenziale di diverse popolazioni staminali (cellule staminali derivate dal liquido amniotico e dai villi coriali umane, cellule staminali derivate dal bulbo olfattorio murino) sia dal punto di vista biologico che applicando la Nuclear Magnetic Resonance (NMR) per la caratterizzazione dei metaboliti specifici componenti. Queste analisi preliminari permetteranno teoricamente nel prossimo futuro l'identificazione delle cellule staminali (anche caricate con i polimeri fluorescenti) nei tessuti evitando la loro separazione e/o lunghe analisi di immunoistochimica.

Impianto ed imaging di stem nel modello animale- Infine a conclusione del lavoro svolto negli anni precedenti è stato utilizzata la tripla marcatura con *Hoechst 33258* (colorante fluorescente nucleare), le nano particelle fluorescenti da noi sintetizzate (FluoNP) e le nanoparticelle magnetiche Feridex commerciali (SPIOn) per verificare la reale affidabilità delle FluoNP per l'imaging delle cellule stem amniotiche *in vivo*. Le SPIOn sono state selezionate come materiale laboratoristico per la

loro estesa caratterizzazione ed applicazione a scopo diagnostico sia in studi pre-clinici che clinici. Inoltre possono essere esaminate sia *in vivo* in risonanza magnetica (MRI) che *ex vivo* con analisi istologiche. Come prova di principio sono stati iniettati 4 topi bilateralmente nei ventricoli laterali (coi relativi controlli) e la presenza delle nanoparticelle è stata verificata per MRI 3 ore dopo l'impianto vicino al sito d'iniezione e lungo il sistema ventricolare. Due settimane post trapianto il segnale era ancora presente, seppure attenuato, e correlava *ex vivo* con la specifica fluorescenza dei tre marcatori nelle corrispondenti sezioni istologiche dell'area dei ventricoli laterali. Inoltre il segnale rimaneva specificatamente confinato nel citoplasma delle cellule trapiantate sotto forma di piccoli aggregati. Nessun segnale fluorescente non correlabile alla presenza delle stem marcate è stato inoltre ritrovato in tutte le sezioni esaminate.

Il presente progetto ha permesso di raggiungere molteplici risultati grazie alla cooperazione dei vari gruppi partecipanti, sia intra- che inter- Istituto.

I risultati ottenuti sono stati utilizzati per la preparazione di 1 lavoro attualmente in revisione su una rivista internazionale, 4 papers pubblicati oltre a diverse comunicazioni a congressi internazionali.

8. APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE PER LA DIAGNOSI PRECOCE DELLE DISFUNZIONI RESPIRATORIE IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA): VALUTAZIONE NEUROFISIOLOGICA, POLISONNOGRAFIA E PNEUMOLOGICA

Nell'anno 2012 abbiamo studiato elettromiograficamente ed ecograficamente l'attività drammatica in 7 pazienti (M:3 e F:4 maggiori di 18 anni di età (Età media 55,7 Min.: 34, Max.: 63), con diagnosi genetica di "Distrofia Miotonica di Steinert" stati ricoverati presso la U.O. di Neurologia del nostro Istituto. I dati ecografici sono stati confrontati con soggetti controllo che indipendentemente dalle comorbidità, non soffrissero di patologia diaframmatica, broncopolmonare e/o dell'addome superiore, in cui si potesse quindi supporre una cinesi diaframmatica nella norma. Tutti i pazienti in studio sono stati inoltre valutati sia con lo studio polisonnografico che con esami pneumologici (visita pneumologia, EGA, spirometria). Durante l'elettromiografia e l'ecografia abbiamo valutato l'attività elettrica durante la fase inspiratoria, la possibile presenza di scariche miotoniche spontanee evocate dall'inspirazione e l'eventuale evocazione del fenomeno miotonico dopo respiri brevi e rapidi o dopo respiri prolungati e profondi.

Dai nostri risultati, seppur preliminari in quanto eseguiti su un campione ristretto, è risultato che quasi la totalità dei pazienti (6 su 7) presentano scariche miotoniche e/o blocco miotonico del respiro confermato dall'immagine ecografica con conseguente breve apnea. In particolare sono state evidenziate scariche miotoniche spontanee o evocate dall'attività elettrica inspiratoria in quattro dei sei pazienti risultati nel complesso patologici ed in due di questi si è osservata la comparsa del fenomeno miotonico con blocco dell'escursione diaframmatica per una durata di circa 2 sec. In altri due pazienti pur non essendo state registrate scariche miotoniche si è osservata invece la comparsa del blocco miotonico del diaframma. Infine il paziente risultato positivo all'EMG ma non all'ecografia ha presentato un pater elettromiografico atipico in quanto mentre a livello dell'emi-diaframma sinistro non si è osservato nulla di patologico a destra vi era la presenza di una continua attività elettrica solo lievemente incrementata durante la fase inspiratoria ma sempre costante e come detto senza alcun correlato ecografico di blocco del diaframma. In passato l'attività elettrica miotonica è stata dimostrata elettromiograficamente pressoché in tutti i muscoli esplorabili, compresa la muscolatura dello sfintere strato esterno dell'ano. In letteratura non esistono invece ad eccezione di due report del 1972 e del 1985 lavori che abbiano dimostrato la presenza di scariche miotoniche e soprattutto del fenomenico miotonico a livello del muscolo Diaframma. Peraltro è noto che alcuni di questi pazienti nell'arco della loro storia di malattia

presentano disturbi respiratori, principalmente a tipo di apnee notturne, che dal punto di vista polisonnografico sono state fino ad oggi classificate come apnee di tipo “centrale”.

Uno dei più importanti risultati di questo studio è stato quindi, oltre ovviamente a dimostrare in sei pazienti la presenza di scariche miotoniche e del fenomeno miotonico dopo respiri profondi ripetuti, la possibilità di confrontare i dati elettromiografici con l'approccio ecografico utilizzato nell'analisi della motilità del diaframma e correlando tali dati con la presenza di apnee centrali evidenziate dalla polisonnografia.

In conclusione, possiamo affermare che anche nella muscolatura diaframmatica come tutti i muscoli scheletrici nei pazienti affetti da Distrofia Miotonica di Steinert possono essere presenti scariche elettriche di tipo miotonico e queste potrebbero essere la causa, scatenando la comparsa di un fenomeno miotonico diaframmatico, delle apnee ritenute fino ad oggi “centrali” ma che in realtà potrebbero essere quindi di origine periferica.

Inoltre queste due metodiche, elettromiografia ed ecografia M-mode del diaframma, soprattutto se associate sembrerebbero in grado di porre diagnosi precoce di possibile insorgenza di apnee ancor prima che queste si manifestino in modo significativo alla polisonnografia. In conclusione è nostra opinione che l'elettromiografia ad ago del diaframma, essendo risultata priva di rischi e di facile esecuzione, come già peraltro descritto in letteratura e come da noi rilevato negli anni precedenti durante lo studio di pazienti affetti da S.L.A., in associazione con l'ecografia M-mode e comunque sempre anche con la polisonnografia sia da consigliarsi in tutti i pazienti affetti da forme di DM per una diagnosi precoce dei disturbi respiratori, specie notturni, così da poter intervenire con i presidi ventilatori tempestivamente ma soprattutto in una fase pre-sintomatica.

9. L'EFFICIENZA FRONTALE NELLE MALATTIE NEURO-DEGENERATIVE: COUNTERFACTUAL THINKING

L'obiettivo di questo studio è quello di verificare se il deterioramento dell'efficienza frontale, riscontrabile in alcuni profili patologici neurodegenerativi, quali quelli tipici della Malattia di Huntington, sia accompagnato dalla difficoltà nella generazione di CTF, abilità cognitiva di primaria importanza sia a livello individuale che a livello sociale. Ad oggi sono stati arruolati 24 pazienti (12 maschi, 12 femmine) con diagnosi genetica di Malattia di Huntington, afferenti al Centro per i Disturbi del Movimento dell'U.O. di Neurologia di questo Istituto e 24 soggetti di controllo secondo la procedura dello studio. Tutti i soggetti reclutati hanno eseguito la batteria testale appositamente messa a punto.

L'analisi statistica ad oggi effettuata ha posto in evidenza una performance significativamente inferiore dei pazienti rispetto ai controlli in tutti i test cognitivi somministrati ed, in particolare, ai test indaganti la generazione spontanea di CFT e l'uso di questo particolare tipo di pensiero. Sono emerse, inoltre, correlazioni significative tra i risultati al protocollo controfattuale e la prestazione ai test delle funzioni esecutive. Tali dati rappresentano dunque un'iniziale conferma dell'ipotesi secondo la quale una disfunzione a carico dei lobi frontali comporti un deficit nelle capacità di pensiero controfattuale.

10. CHARACTERIZATION OF DISEASE MECHANISM MEDIATED BY TDP-43 AND FUS RNA-BINDING PROTEINS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (Progetto ARISLA)

L'obiettivo del progetto è quello di chiarire il ruolo biologico delle *RNA-binding protein* TDP-43 e FUS nel metabolismo cellulare neuronale per comprendere come la loro disfunzione sia associata a neurodegenerazione nei pazienti affetti da SLA e FTD.

Il nostro interesse è stato rivolto alla definizione degli interattori molecolari delle proteine TDP-43 e FUS in cellule neuronali e in modelli di malattia utilizzando sia tecnologie avanzate (RIP-chip) sia tecniche classiche di biologia cellulare e molecolare. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla identificazione, nel citoplasma di cellule motoneuronali, degli mRNA bersaglio che sono

legati direttamente e regolati post-trascrizionalmente da TDP-43 e FUS. L'identificazione di questi *target* citoplasmatici e dei pathways cellulari di cui fanno parte e' importante per definire il ruolo di TDP-43 e FUS nei processi di stabilizzazione, di trasporto e traduzione del mRNA. Per definire gli mRNA *target* di TDP-43 e FUS abbiamo immunoprecipitato selettivamente i complessi ribonucleoproteici citoplasmatici presenti fisiologicamente nelle cellule motoneuronali NSC-34 e contenenti TDP-43 e FUS. Abbiamo quindi condotto analisi di microarray (Illumina) sugli RNA estratti dai complessi immunoprecipitati (RIP-chip), dimostrando che TDP-43 e FUS legano differenti set di mRNA sebbene convergano su *pathways* regolatori comuni. L'analisi bioinformatica dei dati ha identificato il motivo consenso (UG)_n presente nel 3'UTR dell'80% dei *target* di TDP-43, mentre per FUS non e' stata identificata una sequenza di legame significativamente rappresentata nei geni bersaglio. Mediante tecniche *in vitro* abbiamo inoltre validato il legame con alcuni mRNA *target* selezionati per TDP-43 e FUS, dimostrando che, mentre FUS non influenza la stabilita' e/o la traduzione di tali messengeri, TDP-43 ha invece un'attivita' destabilizzante e puo' alterarne i livelli proteici.

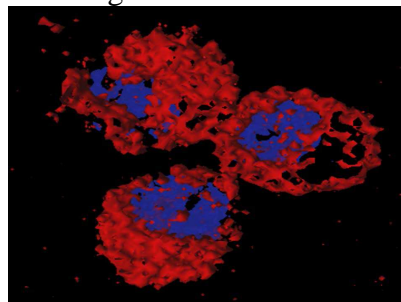
Dai nostri risultati si evince che TDP-43 e FUS regolano in modo diverso il destino dei loro RNA *target* nel citoplasma di cellule motoneuronali e cio' suggerisce che abbiano ruoli complementari nel metabolismo dell' RNA e nella neurodegenerazione.

11. STUDIO DELLA MOTILITA' E DEL RILASCIO DI FATTORI TROFICI IN CELLULE STAMINALI UMANE MARCATE CON NANOPARTICELLE PARAMAGNETICHE

Il trapianto di celle staminali come trattamento delle malattie neurodegenerative rappresenta una promettente alternativa alle classiche, e purtroppo inefficaci, terapie farmacologiche.

Negli ultimi anni la marcatura con nanoparticelle magnetiche SPION, combinata con l'imaging mediante risonanza magnetica, ha permesso di osservare nel tempo cellule staminali impiantate in diversi organi, almeno nella ricerca pre-clinica. Attualmente però non sono disponibili dati sufficienti riguardanti la bio-sicurezza delle nano particelle magnetiche. Inoltre risultati terapeutici inconsistenti post impianto di cellule caricate con nano particelle in modelli animali enfatizzano l'importanza di studi sistematici che caratterizzino tutti i possibili effetti del caricamento di cellule con SPION. Pertanto nel corso di questo secondo anno di studio ci siamo prefissati di caratterizzare il comportamento di hAFCs e hCVCs marcate con SPION in presenza di danno acuto. In particolare abbiamo verificato se la motilità cellulare potesse essere influenzata da una degenerazione nell'ambiente circostante intossicando la linea cellulare di neuroblastoma SH-SY5Y con la neurotossina 6- idrossidopamina (6-OHDA), ricreando *in vitro* un modello di malattia di Parkinson's. La presenza di cellule intossicate con 6-OHDA ha agito come stimolo incrementando in maniera statisticamente significativa la migrazione di entrambe gli stipiti staminali (hAFCs e hCVCs). Questi dati dimostrano come l'ambiente neurodegenerativo influenzi direttamente la velocità di migrazione delle cellule marcate con SPION.

La ricostruzione in 3 D dell'integrazione delle SPION nelle cellule ha dimostrato come le nanoparticelle (in rosso) si dispongano attorno al nucleo cellulare (marcate con Hoechst 33258 in blu) poiché nessuna sovrapposizione di segnale è stata ritrovata nei nostri campioni.



L'analisi di integrazione in time lapse e le analisi in immuno citochimica hanno confermato queste osservazioni. Restano ancora da verificare la presenza di stress ossidativi in hAFCs e hCVCs marcate con diverse concentrazioni di SPION, la quantificazione della componente ferrosa intracellulare e la comparazione delle capacità neuro protettive dei due stipiti cellulari: tali obiettivi saranno oggetto di studio per il prossimo anno.

12. TERAPIA GENICA IN VITRO MEDIANTE LA TECNICA DELL'RNAi PER LA MALATTIA DI HUNTINGTON

La Malattia di Huntington (MdH) è una patologia neurodegenerativa a trasmissione autosomica dominante caratterizzata dalla comparsa di alterazioni comportamentali, disturbi cognitivi e disordini del movimento che progrediscono fino al decesso che avviene generalmente dopo 15-20 anni di malattia. La MdH è causata dall'espansione della tripletta CAG presente nell'esone I del gene *IT-15* (HDCRG, 1993). L'huntingtina (htt), il prodotto proteico del gene *IT-15*, reca, nella forma mutata, un tratto poliglutaminico (polyQ) espanso nella regione ammino-terminale.

Ad oggi la funzione della proteina htt non è nota, ma si ritiene che la presenza del tratto poliQ espanso possa, da un lato conferire all'htt nuove funzioni tossiche per la cellula (*acquisto di funzione*), dall'altro abolirne le funzioni fisiologiche (*perdita di funzione*) anche interagendo o sequestrando componenti chiave di numerose vie intracellulari (*effetto dominante negativo*).

Numerosi studi hanno dimostrato che la htt mutata altera il normale funzionamento di diverse vie intracellulari (quali la trascrizione, l'apoptosi, la funzione mitocondriale, il rilascio di neurotrasmettitori ed il trasporto assonale); sono stati così sviluppati numerosi farmaci in grado di interferire con questi processi cellulari (inibitori delle caspasi, inibitori dei recettori glutamatergici, etc.), che hanno dimostrato un effetto parziale negli animali da esperimento ma sono risultati inefficaci quando testati sui pazienti. Infatti ad oggi non esiste una terapia efficace in grado di alterare il decorso della malattia o di ritardare l'insorgenza dei sintomi

Negli ultimi anni è emersa la grande potenzialità terapeutica della strategia dell'RNA *interfering* (RNAi) nel trattamento delle patologie genetiche dominanti attraverso l'inibizione dell'espressione del gene causativo. La potenzialità dell'RNAi per il trattamento della MdH è stata analizzata a partire dal 2005 in numerosi studi preclinici che hanno evidenziato miglioramenti nel fenotipo associato alla malattia ed aumento della sopravvivenza in diversi modelli animali (Harper et al., 2005; Wang et al., 2005).

L'inibizione dell'espressione dell'htt è una strategia promettente per il trattamento della MdH, tale strategia può essere applicata mediante due approcci diversi:

- Inibizione dell'espressione di entrambi gli alleli,
- Inibizione dell'espressione specifica dell'allele mutato (silenziamento allele-specifico).

Infatti sebbene il silenziamento ideale comporterebbe l'inibizione specifica dell'htt mutata lasciando inalterata l'espressione della htt wild-type, a livello pratico lo sviluppo di sistemi selettivi per ridurre l'espressione della proteina mutata non ha portato ai risultati attesi (Boudreau et al., 2009). Negli ultimi anni si stanno valutando strategie che permettano la discriminazione dell'allele wild-type e di quello mutato mediante polimorfismi (Schwarz et al., 2006) o differenze nella lunghezza del tratto CAG (Hu et al., 2009).

Rimane ancora da chiarire se l'approccio non allele-specifico alla terapia sia utilizzabile per i pazienti, in quanto dati sperimentali confermano la sua tollerabilità ed il suo effetto terapeutico nel modello animale (Boudreau et al., 2009).

Nel corso dell'anno 2011 sono stati condotti esperimenti di silencing di htt in colture primarie muscolari umane HD e control. Gli esperimenti di silencing su entrambi gli alleli hanno evidenziato una importante tossicità cellulare. Questi esperimenti indicano che l'approccio di gene therapy non allele specifico non è possibile colture muscolari umane HD. Per questo motivo nel corso del prossimo anno ci si propone un approccio di gene-therapy basato sul targeting di due funzioni cellulari diverse: l'attività mitocondriale e la via delle map kinasi.

13. STUDIO LONGITUDINALE SU UNA POPOLAZIONE DI PZ AFFETTI DA SLA. VALUTAZIONE DELL'EVOLUZIONE TEMPORALE DEL QUADRO CLINICO, COGNITIVO E NEURADIOLOGICO. CORRELAZIONE TRA MARKER NEURORADIOLOGICI ED ASPETTI CLINICI E GENETICI DELLA MALATTIA MOTONEURONALE

La SLA è una malattia neurodegenerativa che determina la disfunzione del I e II motoneurone e di conseguenza la sofferenza del fascio cortico-spinale e delle fibre nervose periferiche unitamente all'apparato muscolare. Ha carattere progressivo, ingravescente e differente velocità di evoluzione. Causa un deficit motorio della muscolatura bulbare e spinale che si manifesta con disartria, disfagia, disfonia ed ipostenia ai 4 arti. La maggior parte dei casi sono sporadici, una ridotta percentuale (%) è ascrivibile a forme familiari conseguenti a specifica mutazione genetica. E' una malattia a prognosi infausta, con tempo medio di sopravvivenza dall'esordio dei sintomi pari a 3-4 anni e per la quale non esiste terapia curativa. E' necessario un approccio multidisciplinare, che permetta di individuare ed analizzare elementi clinici, biologici, funzionali, morfologico-strutturali, valutare la loro evoluzione nel tempo ed operare un lavoro di sintesi e di correlazione dei dati ottenuti. Tutto ciò potrà contribuire alla definizione eziopatogenetica della malattia.

Caratterizzare specifici marker neuroradiologici e biologici, datare la loro comparsa e monitorarne la presenza ed eventuali modificazioni nel corso evolutivo della malattia, correlarli a determinati quadri clinici e profili genetici, valutare il loro ruolo nell'eziopatogenesi e il loro valore predittivo dell'evoluzione della malattia.

: Il Centro SLA dell'Istituto Auxologico ed il Centro SLA dell'Ospedale San Raffaele recluteranno progressivamente pz affetti da SLA diagnosticata secondo i criteri rivisti di El Escorial, con durata di malattia non superiore a 12 mesi.

Al momento dell'ingresso nello studio ed alle valutazioni di follow-up (a 3 mesi, 6 mesi, 12 mesi) saranno eseguite una visita neurologica (anamnesi, esame obiettivo, ALS-FRS, MRC), ed una valutazione dei parametri respiratori (spirometria, emogasanalisi, polisonnografia). Al baseline, a 6 mesi ed a 12 mesi sarà inoltre eseguita una valutazione neuropsicologica.

Le indagini genetiche (gene SOD1, TARDBP, FUS) saranno effettuate su campioni di sangue di pz che presentano un'anamnesi familiare positiva per SLA.

Lo studio neurofisiologico è costituito dall'esame elettromiografico (EMG secondo i parametri Awaji) e dalla stimolazione magnetica transcraniale (TMS-MEP-CMCT, SP).

Lo studio neuroradiologico viene effettuato tramite esecuzione di RMN encefalo utilizzando uno scanner a 3.0 Tesla ed effettuando sequenze specifiche (DE, FLAIR, high resolution 3D T1-weighted, DTI, SWI, DIR, resting-state f-MRI) volte ad individuare alterazioni strutturali e funzionali della sostanza grigia e bianca.

Ad oggi esiste un marcatore genetico di SLA; utile in un numero limitato di casi, mentre non sono disponibili né un marcatore biologico né un marcatore neuroradiologico per la SLA. La diagnosi è pertanto clinica, supportata dai dati neurofisiologici e formulata dopo avere escluso altre malattie che possono mimare il quadro clinico dato dalla SLA. Il ritardo con cui spesso la diagnosi di SLA viene formulata, comporta degli elevati costi sia in termini economici sia in termini terapeutici ed emotivi. Infatti, spesso la diagnosi di SLA rappresenta la fine di numerose e complesse indagini diagnostiche, determinanti un considerevole impatto economico sul SSN. Inoltre, tanto più la diagnosi è formulata tardi rispetto all'esordio dei sintomi, tanto più sono ridotte le possibilità per i pazienti di partecipare a trial terapeutici. L'individuazione di eventuali marcatori neuroradiologici potrebbe aiutare a distinguere i diversi sottotipi di malattia, caratterizzati da decorso più o meno lento, da precoce interessamento bulbare o associazione con demenza. Questo studio, contribuendo alla caratterizzazione di un marcatore neuroradiologico potrebbe rendere possibile una diagnosi precoce di SLA, riducendo i costi sostenuti dal SSN per il complesso iter diagnostico a cui spesso vanno incontro i pazienti.

Nell'anno 2012 sono stati reclutati per lo studio 3T-SLA 15 pazienti, di cui 4 affetti da Sclerosi Laterale Primaria, 11 da Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) sporadica. Tra quest'ultimi 1 pz è portatore della mutazione nel gene SOD1. Tutti i pz sono stati valutati sotto il profilo neurologico, respiratorio, neurofisiologico, neuropsicologico, sono stati sottoposti a prelievo ematico per eventuali indagini genetiche ed inviati all'esame di RMN encefalo a 3 tesla. Successivamente 4 pazienti sono usciti dal trial (1 pz con SLA per presenza di importante lesione cerebrale post-traumatica, 1 pz con SLA per sopraggiunta importante insufficienza respiratoria con necessità di ventilazione meccanica non invasiva, 1 pz con PLS per motivi personali, 1 pz con PLS per claustrofobia). Gli 11 pazienti rimasti hanno proseguito le indagini clinico-strumentali secondo lo schema temporale definito dal protocollo. In particolare, nei primi mesi del 2012 tutti i pz hanno eseguito la RMN prevista a 3 mesi dall'arruolamento, unitamente alla valutazione clinica neurologica (esame obiettivo, ALS-FRS, MRC, UMN scale, ALSSS), pneumologica (spirometria ed emogasanalisi) e neurofisiologica (elettromiografia, potenziali evocati motori), 6 pz hanno già iniziato ad essere sottoposti alle valutazioni previste a 6 mesi dal baseline.

CENTRO SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA)

Nell'anno 2012, circa 320 pazienti affetti da patologia motoneuronale (prevalentemente SLA) sono stati esaminati nel Centro SLA. Alla valutazione clinica sono state accostate diverse indagini ed iniziative terapeutiche:

- ricerca di mutazioni per i geni SOD1, angiogenina, SETX, VAPB, TDP43, FUS/TLS, OPT, VCP, C9orf72, Malattia di Kennedy, SMN in parte presso il Laboratorio di Neuroscienze ed in parte in collaborazione con l'Istituto C. Besta di Milano (Dott.ssa Cinzia Gellera). Tali indagini hanno permesso di identificare mutazioni in pazienti apparentemente affetti da SLA sporadica (*TARDP* per TDP-43, FUS/TLS in particolare), di riportare un eterozigote per la mutazione D90A. Oggi il Centro offre diagnostica molecolare delle principali patologie motoneuronali;
- sviluppo di nuovi parametri neurofisiologici per definizione del numero residuo di Unità Motorie (MUNE) ed analisi neurofisiologica della funzionalità diaframmatici per porre indicazione alla NIV;
- analisi delle caratteristiche nutrizionali con studio della PEG, BMI, etc, in collaborazione con l'Unità di Endocrinologia dell'IRCCS Istituto Auxologico Italiano;
- valutazione neuropsicologica longitudinale del paziente affetto da SLA mediante valutazione seriata per evidenziare specifici deficit neuropsicologici; particolare attenzione al coinvolgimento fronto-temporale anche con tecniche di eye-tracking e sviluppo di BCI;
- partecipazione a due nuovi trial terapeutici (Pirimetamina nella SLA Familiare SOD1 mutata, Acetilcarnitina).

Il Centro "Dino Ferrari" ha partecipato a diverse iniziative nazionali ed internazionali per l'ottimizzazione delle cure palliative, la definizione dei costi della malattia, l'educazione dei medici e paramedici in stretto rapporto con l' AISLA (Associazione Italiana Sclerosi Laterale Amiotrofica), la definizione dei criteri di invalidità in collaborazione con la Regione Lombardia. Il Centro "Dino Ferrari" è implicato nel Gruppo di Studio Malattie del Motoneurone della Società Italiana di Neurologia - SIN) e nell' European ALS Consortium. Il Prof. Silani è divenuto membro del Website Management Committee della World Federation of Neurology in rapporto alla ALS/MND. Nell'ambito della Task Force dell' ALS European Consortium il Prof. Silani ha proceduto a formulare le linee guida di diagnosi e trattamento della SLA con una EFNS (European Federation Neurological Societies) - Task Force on Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis ("Guidelines for diagnosing and clinical care of patients and relatives. An evidence-based review with Good Practice Points" - Proceeding EFNS 2012), presentato l'attività del Gruppo Motoneurone della EFNS per il 2012 e tenuto vari Teaching Courses nell'ambito dell'ENS ed

EFNS . Nell' ambito dell' ENS il Prof. V. Silani è stato nominato referente per il gruppo Malattie del Motoneurone.

CENTRO MALATTIE EXTRAPIRAMIDALI

Nel corso dell'anno 2012, oltre 300 nuovi pazienti circa affetti da diversi disordini extrapiramidali del movimento (Morbo di Parkinson, Paralisi Sopranucleare Progressiva, Atrofia Multisistemica e Degenerazione Cortico-Basale, Corea di Huntington, ect.) sono stati esaminati e trattati presso il “Centro Disturbi del Movimento” che ha eseguito circa 900 visite ambulatoriali. E' stata creata una stretta collaborazione con l'Associazione Parkinson Milano di cui il Prof. Silani fa parte del Comitato Scientifico creando un interscambio scientifico e di pazienti. E' stata creata una èquipe multispecialistica per la presa in carico del paziente. Il Centro è riconosciuto nell'ambito del NECTAR (Network for European CNS Transplantation and Regeneration) dedicato alle malattie extrapiramidali. Maggior impeto è stato dato inoltre alla creazione di un Centro dedicato alla Malattia di Huntington con creazione di una equipe plurispecialistica formata da neurologi, psichiatri, neuropsicologi e fisiatri nell'intento di fornire un approccio interdisciplinare al paziente, garantendo così un supporto ed un riferimento costante nel tempo che è stato esteso anche ai familiari. Nell'ambito della Malattia di Huntington l'assenza di una cura risolutiva della malattia comporta un particolare impatto emotivo nel soggetto che ancora asintomatico decide di testarsi per la mutazione. Ciò impone un continuo supporto psicologico al paziente durante tutto il lungo processo che porta alla diagnosi pre-clinica. Per questo è stato sviluppato ed applicato un protocollo di test predittivo nella Malattia di Huntington secondo le linee guida dell'International Huntington Association e della Federazione Mondiale di Neurologia. Sono state seguite dodici famiglie affette da Malattia di Huntington e seguiti sei pazienti nell'iter del test predittivo. Dal 2005 il Centro è in grado di formulare diagnosi molecolare di Malattia di Huntington. Alla valutazione clinica sono state accostate diverse indagini ed iniziative terapeutiche:

- ricerca di biomarkers periferici in Malattia di Huntington in collaborazione con l'IRCCS Neuromed (Dott. F. Squitieri) Unità di Neurogenetica;
- analisi del coinvolgimento del sistema nervoso autonomo nei pazienti affetti da M. di Huntington in collaborazione con l'Unità di Cardiologia dell'Istituto Auxologico Italiano (Prof. Parati);
- Studio del sonno nei pazienti affetti da M. di Huntington in collaborazione con il Centro del Sonno (Dott.ssa Carolina Lombardi).

CENTRO DISTURBI COGNITIVI

Nell'anno 2012 vi è stato un ulteriore incremento di pazienti rivoltisi al nostro centro per una valutazione diagnostica di tipo neuropsicologico; infatti sono state effettuate oltre 6.000 prestazioni neuropsicologiche e psicodiagnostiche per pazienti degenti in regime di ricovero ordinario o in Day Hospital, nonché 800 colloqui psicologici clinici in pazienti affetti da molteplici forme di coinvolgimento cognitivo a partire dal Mild Cognitive Impairment (MCI), Malattia di Alzheimer, Demenza Fronto-Temporale, Demenza a Corpi di Lewy, Parkinson's Demenza, Demenza di Huntington, Paralisi Sopranucleare Progressiva, Degenerazione Cortico-Basale ecc. Al già presente ambulatorio neuropsicologico convenzionato S.S.N. è stato aggiunto un nuovo ambulatorio di Valutazione Multidimensionale dei Disturbi Cognitivi (VMD) condotto congiuntamente da neurologo/neuropsicologo nell'ottica di fornire al paziente affetto da patologia cognitiva un'approccio multidisciplinare che tenga conto delle molteplici problematiche che spesso ne caratterizzano il decorso clinico. Particolare attenzione è stata posta alla valutazione neuropsicologica longitudinale dei pazienti affetti da patologia motoneuronale (SLA, PLS) esaminati nel Centro SLA. Sono stati effettuati, in collaborazione con altri presidi ospedalieri quali l'Ospedale S. Anna di Como ed il Centro UVA di Bussolengo a Verona, studi sugli aspetti cognitivi, psico-emotivi e di personalità nella Sclerosi Multipla, nella SLA, nelle cefalee e nella

Malattia di Parkinson. Si sono inoltre organizzati diversi eventi formativi ECM in merito all'inquadramento dei disturbi cognitivi, agli aspetti di diagnosi differenziale e gestione dei disturbi psico-emotivi delle malattie neurodegenerative. Particolare attenzione ha richiesto la messa a punto, con il Centro dedicato alla Malattia di Huntington, di un protocollo di test predittivo per la malattia che ha visto nel supporto psicologico fornito ai pazienti, ai loro familiari ed ai soggetti asintomatici che si sottopongono al test, un ruolo fondamentale. Sempre più spazio è stato dato al caregiver nell'ascolto delle problematiche di gestione quotidiana della patologia cognitiva dei loro congiunti allo scopo di migliorare la qualità diagnostica, clinica ed assistenziale fornita a questa tipologia di pazienti.

La consulenza del Centro Disturbi Cognitivi è stata offerta anche al CIERRECI, nuova struttura dell' IRCCS Istituto Auxologico Italiano per lo studio dell' invecchiamento.

E' in fase di considerazione l' apertura di un Centro Disturbi Cognitivi con l' approvazione della Regione Lombardia.

CENTRO DI MEDICINA DEL SONNO

E' continuata nel corso del 2012 l'attività del Centro di Medicina del Sonno presso l' IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Ospedale San Luca, diretto dal Prof. G.F. Parati e dal Prof. V. Silani e coordinato dalla dott.ssa Lombardi.

Nello 2010 sono state eseguite circa oltre 500 visite ambulatoriali e polisonnografie portatili, 100 video polisonnografie in laboratorio di medicina del sonno, 50 monitoraggi polisunnografici prolungati (24 ore) e 10 actigrafie.

Le patologie osservate nel centro, vista anche l'ispirazione volutamente multidisciplinare, riguardano ad ampio spettro le malattie cardiovascolari associate a disturbi respiratori durante il sonno (ipertensione arteriosa, scompenso cardiaco, stroke) e tutte le patologie neurologiche coinvolgenti il sonno, comprendendo quindi i disturbi del respiro in corso di sonno (Sindrome delle Apnee Ostruttive nel Sonno – OSAS -, Sindrome delle Apnee Centrali, Ipoventilazione Centrale, alterazioni del pattern ventilatorio nelle patologie neuromuscolari), le ipersonnie (narcolessia, ipersonnie secondarie a malattie neurodegenerative), le parasonnie REM e NREM (disturbo comportamentale della fase REM, sonnambulismo, bruxismo ecc), le epilessie ad estrinsecazione prevalentemente notturna (Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy) i disturbi del movimento in corso di sonno (Sindrome delle Gambe senza Risposo) e tutte le forme di insonnia.

Oltre alle attività assistenziali, il Centro cura un'ampia sfera di ricerca.

Attualmente sono all'attivo collaborazioni nazionali ed internazionali con Centri ed Organi di eccellenza per la ricerca in ambito di Medicina del Sonno. Il Prof. Parati e la Dott.ssa Lombardi, come suo collaboratore, sono membri della COST Action B26, un organo europeo che si occupa dello studio delle ripercussioni cardiovascolari delle apnee ostruttive nel sonno. Nell'ambito di tale organismo è in attivo la creazione di un database informatizzato per la raccolta dei dati (caratteristiche generali, fattori di rischio, storia di malattia, comorbidità, genetica, prognosi, terapia) dei pazienti con disturbi del respiro in corso di sonno e la stesura di Linee Guida per l'esecuzione di indagini polisunnografiche nel paziente iperteso.

Il Centro condivide inoltre progetti di Ricerca per lo studio della sonnolenza diurna con il Centro di Medicina del Sonno dell'Istituto di Clinica Neurologica, Università di Bologna (Direttore Prof. Pasquale Montagna) e con il Centro per lo Studio del Sistema Nervoso Vegetativo della stessa struttura (Direttore Prof. Pietro Cortelli) ed un progetto (coordinato dal Prof. CL. Bassetti, Department of Neurology, University Hospital Zurich, in collaborazione con il Centro di Medicina del Sonno dell'Ospedale Niguarda, Dott. Lino Nobili) per lo studio del pattern ventilatorio in sonno nel paziente con stroke. Per l'acquisizione e l'analisi dei segnali cardiovascolari è attiva una stretta collaborazione con il Centro di Bioingegneria, IRCCS "S. Maria Nascente", Fondazione Don Gnocchi ONLUS, Milano, nelle persone dell'Ing. Di Rienzo Marco e dell'Ing. Paolo Castiglioni con i quali stiamo elaborando nuovi sistemi di monitoraggio notturno.

Altri progetti riguardano inoltre:

- lo studio dei determinanti polisonnografici notturni del rialzo pressorio mattutino (morning surge) e valutazione delle diverse modalità di controllo da parte di vari farmaci antiipertensivi nei pazienti con ipertensione arteriosa;
- OSAS e pervietà del forame ovale;
- scompenso cardiaco e pattern ventilatorio nel sonno;
- studio del sonno/OSAS in pazienti ipertesi dippers e nondippers;
- analisi del pattern ventilatorio nel sonno in pazienti con Malattia del Motoneurone (studio trasversale e prospettico);
- Sonno e Corea di Huntington (analisi elettroencefalografica, macro e microstruttura ipnica, studio del pattern motorio e respiratorio, analisi dei movimenti oculari);
- Cushing, iperprolattinemie ed acromegalia e sonno;
- Studio del sonno in pazienti affetti da ictus acuto.

STROKE UNIT

Nel 2012 l'attività della Stroke Unit a direzione neurologica si è ulteriormente consolidata con ottimizzazione della moderna struttura che offre 6 letti di cui 4 completamente monitorizzati con possibilità di inquadramento del paziente affetto da evento cerebrovascolare acuto. L'attività direttiva della Dott.ssa Laura Adobbati è stata particolarmente efficace, avendo portato gli standards dell'attività della Stroke Unit a livello competitivo sia dal punto di vista medico che organizzativo. Il paziente che accede al Pronto Soccorso in tempo utile viene rapidamente inquadrato e può essere sottoposto nei casi indicati a trombolisi intravenosa, intrarteriosa o posizionamento di stent in rapida sequenza anche per la attiva collaborazione con la U.O. di Neuroradiologia e Neurochirurgia dell'IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore di Milano. L'angiografia diagnostica classica viene eseguita nella sala angiografica dell'Istituto Auxologico Italiano come il posizionamento di stents extracranici ed una serie di procedure è stata conclusa con successo: 10 trombolisi intravenose sono state eseguite nel 2010 con successo e senza complicanze. Un numero rilevante di trombolisi intrarteriose sono state completate con successo e senza rilevanti effetti collaterali.

La stretta collaborazione con la UO di Cardiologia diretta dal prof. Gianfranco Parati garantisce un attento monitoraggio cardiologico con una ottimizzazione del monitoraggio clinico per la migliore impostazione terapeutica e lo studio del sonno è stato completato con la collaborazione del Centro del Sonno (dott.ssa Carolina Lombardi) e della consulenza pneumologica (Prof. Francesco Blasi ed équipe).

Una stretta collaborazione è in corso con l'U.O. di Neurochirurgia della Fondazione Ospedale Maggiore di Milano (Consulente Dott. Mario Locatelli) e con la U.O. di Neuroradiologia del medesimo Istituto anche per lo sviluppo della RM 3 Tesla acquisita dell'Istituzione.

Il percorso del paziente post-ictus è assicurato da due U.O. di Riabilitazione nella Istituzione. Oltre all'allestimento del database, diversi studi sono stati impostati tra i quali quello del sonno e delle apnee ostruttive in stretta relazione con l'evento ischemico e la ricerca genetica nelle forme familiari. In stretta collaborazione con le altre Stroke Unit di Milano e con la Regione Lombardia, la Stroke Unit collabora a diversi studi programmatici regionali offrendo la propria disponibilità e competenza. Particolare attenzione è rivolta alla patologia cerebrovascolare rare per mitocondriopatie, per esempio, che vengono attivamente studiate con esecuzione di biopsie muscolari e ricerca di mutazioni in collaborazione con il Centro "Dino Ferrari" dell'IRCCS Ospedale Maggiore di Milano.

Le potenzialità diagnostiche e d'intervento della Stroke Unit in acuto sono ad ora ottimizzate dalla pronta disponibilità di una RM 1.5 Tesla ed, ora, di una RM 3 Tesla per cui è stata programmata un'attività di ricerca volta ulteriormente ad ottimizzare la diagnosi precoce dell'evento ischemico nella prospettiva della più adeguata terapia.

PRODUZIONE SCIENTIFICA 2012

Pubblicazioni su Riviste Internazionali Indicizzate

Lunetta C., Prella A., Serafini M., Magni P., Dozio E., Ruscica M., Sassone J., Colciago C., Moggio M., Corbo M., Silani V.

Impaired expression of IGF-1 system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients.

Muscle and Nerve, 2012, 45, 200-208

I.F. 2,367;

Andersen P.M., Abrahams S., Borasio G.D., de Carvalho M., Chio A., Van Damme P., Hardiman O., Kollewe K., Morrison K.E., Petri S., Pradat P.F., Silani V., Tomik B., Wasner M., Weber M. The EFNS Task Force for the clinical management of Amyotrophic Lateral Sclerosis (MALS).

EFNS guidelines on the Clinical Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis (MALS) - revised report of an EFNS task force.

Eur J Neurol, 2012, 19 (3), 360-375. doi.: 10.1111/j.1468-1331;03501.x. [Epub ahead of print] 2011

I.F. 3,692;

Tiloca C., Ratti A., Pensato V., Castucci A., Sorarù G., Del Bo R., Corrado L., Cereda C., D'Ascenzo C., Comi G.P., Mazzini L., Castellotti B., Ticozzi N., Gellera C., Silani V., and The SLAGEN Consortium.

Mutational analysis of *VCP* gene in familial amyotrophic lateral sclerosis.

Neurobiol Aging, 2012, 33 (3), 630.e1-630.e2

I.F. 6,189;

Cova L., Bossolasco P., Armentero M.T., Diana V., Zennaro E., Mellone M., Calzarossa C., Cerri S., Lambertenghi Delilieri G., Polli E., Blandini F., Silani V.

Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on neural cultures exposed to 6-hydroxydopamine: implications for reparative therapy in Parkinson's disease

Apoptosis, 2012, 17 (3), 289-304. DOI 10.1007/s10495-011-0679-9, 2011

I.F. 4.788;

Bossolasco P., Cova L., Levandis G., Diana V., Cerri S., Lambertenghi Delilieri G., Polli E., Silani V., Blandini F., Armentero M.T.

Noninvasive near-infrared live imaging of human adult mesenchymal stem transplanted in a rodent model of Parkinson's disease

Inter J Nanomed, 2012, 7, 435-447

I.F. 3.130;

Bigini P., Diana V., Barbera S., Fumagalli E., Micotti E., Sitia L., Paladini A., Bisighini C., De Grada L., Coloca L., Colombo L., Manca P., Bossolasco P., Malvestiti F., Fiordaliso F., Forloni G., Morbidelli M., Salmona M., Giardino D., Mennini T., Moscatelli D., Silani V., Cova L.

Longitudinal tracking of human fetal cells labeled with super paramagnetic iron oxide nanoparticles in the brain of mice with motor neuron disease..

PloS One, 2012, 7 (2), e32326

I.F. 4,092;

[Colombrita C](#), [Onesto E](#), [Megiorni F](#), [Pizzuti A](#), [Baralle FE](#), [Buratti E](#), [Silani V](#), [Ratti A](#).

TDP-43 and FUS RNA-binding Proteins Bind Distinct Sets of Cytoplasmic Messenger RNAs and Differently Regulate Their Post-transcriptional Fate in Motoneuron-like Cells.

J Biol Chem. 2012, 287 (19),15635-47. Epub 2012 Mar 16

I.F. 4,773;

Capitanio D., Vasso M., Ratti A., Grignaschi G., Volta M., Moriggi M., Daleno C., Bendotti C., Silani V., Gelfi C.

Molecular signatures of ALS disease progression in hind and forelimb muscles of a SOD1G93A mouse model.

Antioxidants & Redox Signaling, 2012, ahead of print. doi:10.1089/ars.2012.4524

I.F. 8,456;

[Gellera C.](#), [Ticozzi N.](#), [Pensato V.](#), [Nanetti L.](#), [Castucci A.](#), [Castellotti B.](#), [Lauria G.](#), [Taroni F.](#), [Silani V.](#), [Mariotti C.](#)

ATAXIN2 CAG-repeat length in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis: risk factor or variant phenotype? Implication for genetic testing and counseling.

Neurobiol Aging, 2012, [33 \(8\)](#), 1847.e15–1847.e21

I.F. 6,189;

Ramos EM, Keagle P, Gillis T, Lowe P, Mysore JS, Leclerc AL, Ratti A, Ticozzi N, Gellera C, Gusella JF, Silani V, Alonso I, Brown RH, MacDonald ME, Landers JE.

[Prevalence of Huntington's disease gene CAG repeat alleles in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients.](#)

Amyotroph Lateral Scler, 2012, 13(3), 265-9

I.F. 3,091;

Smith BN, Newhouse S, Shatunov A, Vance C, Topp S, Johnson L, Miller J, Lee Y, Troakes C, Scott KM, Jones A, Gray I, Wright J, Hortobágyi T, Al-Sarraj S, Rogelj B, Powell J, Lupton M, Lovestone S, Sapp PC, Weber M, Nestor PJ, Schelhaas HJ, Asbroek AA, Silani V, Gellera C, Taroni F, Ticozzi N, Van den Berg L, Veldink J, Van Damme P, Robberecht W, Shaw PJ, Kirby J, Pall H, Morrison KE, Morris A, de Belleruche J, Vianney de Jong JM, Baas F, Andersen PM, Landers J, Brown RH Jr, Weale ME, Al-Chalabi A, Shaw CE .

The C9ORF72 expansion mutation is a common cause of ALS+/-FTD in Europe and has a single founder.

Eur J Hum Genet, 2012 Jun 13. doi: 10.1038/ejhg.2012.98. [Epub ahead of print]

I.F. 4,400;

Ticozzi N., Tiloca C., Mencacci N.E., Morelli C., Doretto A., Rusconi D., Colombrita C., Sangalli D., Verde F., Finelli P., Messina M., Ratti A., Silani V.

CSF Oligoclonal bands in ALS patients with disease associated mutations.

J Neurol, Jul 1. [Epub ahead of print], 2012;

I.F. 3,473;

Ratti A., Corrado L., Castellotti B., Del Bo R., Fogh I., Cereda C., Tiloca C., D'Ascenzo C., Bagarotti A., Pensato V.4, Ranieri M., Gagliardi S., Calini D.1, Mazzini L.9, Taroni F.4, Corti S., Ceroni M., Oggioni G. D., Lim K., Powell J.F., Sorarù G., Ticozzi N., Comi G.P., D'Alfonso S., Gellea C., Silani V. and the SLAGEN Consortium.

C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in a large Italian cohort with amyotrophic lateral sclerosis and the evidence of a founder effect.

Neurobiol Aging, 2012 Oct;33(10):2528.e7-2528.e14. Epub 2012 Jul 4;

I.F. 6,189;

Gellera C., Tiloca C., Del Bo R., Corrado L., Pensato V., Agostini J., Cereda C., Ratti A., Castellotti B., Corti S., Bagarotti A., Cagnin A., Milani P., Gabelli C., Riboldi G., Mazzini L., Sorarù G., D'Alfonso S., Taroni F., Comi G.P., Ticozzi N., Silani V. and The SLAGEN Consortium.

Ubiquilin 2 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia.

J Neurol Neurosurg Psychiatr, doi: 10.1136/jnnp-2012-303433. Epub 2012 Nov 8;
I.F. 4,764;

Ciccone A, Proserpio P, Roccatagliata DV, Nichelatti M, Gigli GL, Parati G, Lombardi C, Pizza F, Cirignotta F, Santilli IM, Silani V, Sterzi R, Nobili L; the D.A.R.I.A (Detection of Sleep Apnea as Risk Factor in Acute Stroke) Investigators.

Wake-up stroke and TIA due to paradoxical embolism during long obstructive sleep apnea: a cross-sectional study.

Thorax. Doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-201643. Epub 2012 Oct 16;
I.F. 6,840;

[Ticozzi N](#), [Tiloca C](#), [Mencacci NE](#), [Morelli C](#), [Doretti A](#), [Rusconi D](#), [Colombrita C](#), [Sangalli D](#), [Verde F](#), [Finelli P](#), [Messina S](#), [Ratti A](#), Silani V.

Oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with disease-associated mutations.

J Neurol. doi: 10.1007/s00415-012-6589-0. Epub 2012 Jul ;
I.F. 3,473;

Tiloca C., Ticozzi N., Pensato V., Corrado L., Del Bo R., Bertolin C., Fenoglio C., Gagliardi S., Calini D., Lautia G., Castellotti B., Bagarotti A., Corti A., Galimberti D., Cagnin A., Gabelli C., Ranieri M., Ceroni M., Siciilano G., Mazzini L., Cereda C., Scarpini E., Sorarù G., D'Alfonso S., Gellera C., Ratti A. Landers J.E., Silani V. and the SLAGEN Consortium.

Screening of the *PFN1* gene in sporadic ALS and FTD.

Neurobiol Aging 2012 Oct 11. pii: S0197-4580(12)00473-3. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.016. [Epub ahead of print];
I.F. 6,189;

Wu C.-H., Fallini C., Ticozzi N., Keagle P., Sapp P.C., Piotrowska K., Lowe P., Koppers M., McKenna-Yasek D., Baron D. M., Kost J. E., Gonzalez-Perez P., Fox A. D., Adams J., Taroni F., Tiloca C., Leclerc A.L., Chafe S.C., Mangroo D., Moore M.J., Zitzewitz J.A., Xu Z-S., van den Berg L.H., Glass J.D., Sicilino G., Cirulli E.T., Goldstein D.B., Salachas F., Meininger V., Rossoll W., Ratti A., Gellera C., Bosco D.A., Bassell G.J., Silani V., Drory V.E., Brown R.H., Jr., Landers J.E. Mutations in the Profilin 1 Gene Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Nature, 488, 499-503, 2012; 2012 Jul 15. doi: 10.1038/nature11280. [Epub ahead of print];
I.F. 36,280;

Scalabrino G, Veber D, Briani C, Milani S, Terralavoro A, Brenna S, Valenti L, Silani V, Morelli C, Peracchi M.

Cobalamin as a regulator of serum and cerebrospinal fluid levels of normal prions.

J Clin Neurosci, doi: 10.1016/j.jocn.2012.08.004. Epub 2012 Nov 10;
I.F. 1,247;

Calzarossa C., Bossolasco P., Besana A., Manca M.P., Grada L.D., Coppi P.D., Giardino D., Silani V.

Neurorescue Effects and Stem Properties of Chorionic Villi and Amniotic Progenitor Cells.

Neuroscience, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12038;
I.F. 3,380.

Capitolo di Libro

M. Filippi, F. Agosta, S. Abrahams, F. Fazekas, J. Grosskreutz, S. Kalra, J. Kassubek, V. Silani, MR. Turner and J.C. Masdeu

Neuroimaging in the management of Motor Neuron Disease. In:
European Handbook of Neurological Management. Volume 2

2nd edition. Edited by N.E. Gilhus, Barnes M.P. and M. Brainin, pp. 199-211, 2012

Registri

- Registro Nazionale delle Malattie Rare - Istituito dall'Istituto Superiore di Sanità.
- Studio Epidemiologico sull'incidenza delle malattie rare: 50 nuovi casi
- Registro Lombardo della Sclerosi Laterale Amiotrofica.
- Studio epidemiologico su pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica: 40

Corsi ECM

- I Parkinsonismi Atipici
Sala Convegni CIERRECI – Milano, 22/3/2012
- Le mitocondriopatie in Endocrinologia e Neurologia
Sala Convegni Ospedale San Luca – Milano, 24/05/2012
- Angiopatia Amiloidotica e Malattia di Alzheimer
Sala Convegni Ospedale San Luca – Milano, 11/10/2012

Charcotiadi : i giovedì dell'aggiornamento clinico

- Clinico
- Laboratorio di Neuroscienze
- Clinico/laboratorio
- Lezioni magistrali

I mercoledì dell'aggiornamento di laboratorio

- Discussione dei dati di laboratorio relativi ai differenti gruppi

I mercoledì del gruppo di lavoro SLA

- Aggiornamenti sulle Linee Guida
- Novità cliniche e terapeutiche
- Sperimentazioni nazionali ed internazionali

ATTIVITA' PROMOZIONE E DIDATTICA

Partecipazione Editorial Board Internazionali

- Amyotrophic Lateral Sclerosis and other Neuron Disorders
- European Neurology
- American Journal of Neurodegenerative Diseases

Stage all'estero di ricercatori:

- Dott. Cinzia Calzarossa – Karolinska, Stoccolma, Svezia
- Dott. Claudia Fallini – Emory University, Atlanta, USA
- Dott.ssa Isabella Fogh - King's College – London, UK
- Dott. Niccolò Mencacci – UCL Institute of Neurology – London , UK

**SEDE DISTACCATA DEL CENTRO “DINO FERRARI” PRESSO IL
LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE, CITOGENETICA,
ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE, BIOINFORMATICA- IRCCS E.
MEDEA**

Responsabile

Prof. Nereo Bresolin

Personale strutturato:

Dott Maria Teresa Bassi	Biologo
Dott. Maria Clara Bonaglia	Biologo
Dott. Rachele Cagliani	Biologo
Dott Roberto Giorda	Biologo
Ing Uberto Pozzoli	Bioingegnere
Dott. ME Raggi	Biologo
Dott. Manuela Sironi	Biologo

Personale Borsista laureato:

Dott. Chiara Vantaggiato	Biologo Borsista
Dott. Alessia Arnoldi	Biologo Borsista
Dott. Giovanni Airoidi	Biotechnologo Borsista
Dott. Claudia Crimella	Biotechnologo Borsista
Dott. Silvana Beri	Biologo Borsista
Dott. Francesca Ciceri	Biologo Borsista
Dott. Giorgia Menozzi	Matematica Borsista
Ing. Claudia Tresoldi	Ingegnere Biomedico, Borsista

Dottorandi:

Dott. Diego Forni	Biotechnologo - Universita' di Milano
-------------------	---------------------------------------

Personale tecnico strutturato:

Cinzia Baschiroto	Tecnico di laboratorio
Giulietta Gottardi	Tecnico di laboratorio
Paola Pozzi	Tecnico di laboratorio
Chiara Mapelli	Tecnico di laboratorio

Personale tecnico borsista:

Stefania Riva	Tecnico di laboratorio borsista
Erika Tenderini	Tecnico di laboratorio borsista

Attività scientifica – Anno 2012

L'attività del laboratorio dell'IRCCS E. Medea - Ass.ne La Nostra Famiglia, sede distaccata del Centro

“Dino Ferrari”, nel corso del 2012 si è focalizzata su diverse linee di ricerca distribuite nelle sezioni di

biologia molecolare, citogenetica e bioinformatica. Nelle sezioni di biologia molecolare e citogenetica

sono attualmente in corso progetti incentrati sulla caratterizzazione genetico-molecolare di forme di

1) ritardo mentale e autismo 2) patologie e neurodegenerative dell'età pediatrica o giovane-adulta. La sezione di bioinformatica si sta concentrando da alcuni anni sull'applicazione di approcci innovativi

per analizzare i dati di variabilità genetica nell'uomo.

Nell'ambito della ricerca su patologie con ritardo mentale sindromico e autismo si è continuata l'attività iniziata nell'anno precedente sulla caratterizzazione di casi di sindrome di Phelan McDermid (PMS, MIM 606232) che mostrano un ritardo dello sviluppo, assenza o grave compromissione del linguaggio, lievi dismorfismi facciali e spesso problemi comportamentali (Bonaglia et al, 2011). Tale sindrome causata dalla perdita della porzione terminale di un cromosoma 22 alla regione q13. L'aploinsufficienza del gene *SHANK3*, un gene fondamentale per il corretto sviluppo e organizzazione delle sinapsi cerebrali, è verosimilmente responsabile dei principali sintomi neurologici della sindrome, poiché deleta o interrotta in tutti i pazienti affetti dalla PMS. Inoltre, mutazioni puntiformi nel gene *SHANK3* risultano in disturbi del linguaggio e/o comportamentali. Nel 2012 si è creata l'associazione di genitori di pazienti affetti da questa patologia (AISPHEM) e si è dato avvio alla costituzione di una biobanca di campioni biologici per la stessa. Dal punto di vista più strettamente scientifico nell'ambito di questa patologia gli studi sono proseguiti con la caratterizzazione clinica dei pochi casi adulti riconosciuti in modo tale da iniziare a delineare la storia clinica della patologia al momento completamente sconosciuta. Infatti i soggetti adulti, con età oltre i 40 anni, mostrano un progressivo deterioramento clinico, a supporto del fatto che l'aploinsufficienza di *SHANK3* contribuisce al deterioramento neurologico oltre che al suo coinvolgimento nel fenotipo comportamentale della sindrome. Anomalie importanti come difetti cardiaci (6%), epilessia (30%), anomalie cerebrali (69%) si possono riscontrare in pazienti indipendentemente dalla taglia della delezione 22q13. Questi dati oltre a confermare l'estrema variabilità del fenotipo clinico (Bonaglia et al, 2011; Sarasua et al. 2011) sebbene l'aploinsufficienza del gene *SHANK3* sia stata dimostrata in tutti i soggetti analizzati, suggeriscono che, oltre al gene *SHANK3*, possibili mutazioni recessive in un gene(i) che mappa(no) nella porzione 22q deleta o mutazioni di un gene(i) localizzato(i) in un altro punto del genoma possono contribuire alla complessità e/o severità del fenotipo. È stato quindi iniziato uno studio che prevede il sequenziamento dell'esoma di questi pazienti per identificare eventuali determinanti genetici che contribuiscono all'enorme variabilità clinica della patologia stessa. I dati sono in corso di analisi.

Una seconda linea di ricerca si occupa di malattie del motoneurone ad insorgenza precoce ed in particolare di paraparesi spastiche ereditarie. Si è proseguita l'attività di genotipizzazione della casistica dei pazienti a disposizione per i geni nuovi identificati nel 2012 con l'identificazione di nuove mutazioni in *SPG35* (Tonelli et al., 2012) e in *SPG15* e contemporaneamente abbiamo iniziato uno studio sul ruolo di una delle proteine coinvolte nelle forme complicate recessive con assottigliamento del corpo calloso e ad esordio precoce, la spastizina. Per questa proteina sono state identificate nei nostri pazienti 3 nuove mutazioni e le forme mutanti sono state caratterizzate dapprima in neuroni primari di topo e poi in cellule P19 per studiare l'effetto delle stesse sul differenziamento neuronale. Nei neuroni primari abbiamo dimostrato che la spastizina colocalizza parzialmente con il PI3P, gli endosomi precoci ed il reticolo endoplasmatico, confermando i dati

dei localizzazione della forma transfettata nelle *cos7* e suggerendo che la proteina potrebbe effettivamente avere un ruolo nella regolazione del traffico endosomale. Abbiamo poi testato l'effetto del silenziamento della spastizina nelle prime fasi del differenziamento neuronale utilizzando colture embrionali di ippocampo ottenute da embrioni al 18° giorno di vita embrionale. Il silenziamento della spastizina ha determinato una diminuzione nella lunghezza del neurite nei neuroni derivanti dalle P19, in modo analogo a quanto osservato nell'ippocampo. Gli studi proseguiranno nel 2013 con la definizione dei meccanismi molecolari coinvolti in questo processo. Nell'ambito degli studi incorso da anni sull'emiplegia alternante, patologia per la quale il laboratorio ospita la biobanca di materiale biologico dal 2005, il laboratorio ha partecipato ad uno studio internazionale per l'identificazione del gene (Heinzen EL et al., 2012).

L'attività della sezione di bioinformatica si sta concentrando da alcuni anni sull'applicazione di approcci innovativi per analizzare i dati di variabilità genetica nell'uomo. Tali approcci prevedono l'utilizzo di strumenti di genetica di popolazione per identificare geni o regioni geniche che sono stati sottoposti a selezione naturale, partendo dal presupposto che le forze selettive agiscono su un locus specifico appunto perché tale locus contiene una variante polimorfica funzionale e che tali forze lasciano un "segno" che può essere utilizzato per identificare le varianti selezionate. È noto che, durante la storia evolutiva dell'uomo, pathways specifici fondamentali per la sopravvivenza sono stati soggetti a pressione selettiva, ed è per questo che abbiamo applicato le metodiche di genetica di popolazione a geni di interesse biomedico quali, ad esempio, geni coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa, nel pathway della coagulazione e fibrinolisi, nella regolazione metabolica. Abbiamo inoltre studiato i geni coinvolti nella risposta immune e nell'autoimmunità. Ricerche svolte presso il nostro laboratorio e presso altri Istituti hanno dimostrato che le malattie infettive hanno agito come una potente forza selettiva sul genoma umano. Conseguentemente, il pattern di variabilità genetica nell'uomo è determinato anche dalla esposizione agli agenti patogeni subita dalle popolazioni umane in diverse aree geografiche. Ci occupiamo, quindi, di identificare le varianti sottoposte a pressione selettiva mediata da patogeni e valutare se siano coinvolte nel determinare maggiore suscettibilità alle infezioni o a malattie autoimmuni. Abbiamo infatti notato come esista sovrapposizione tra i geni che hanno subito una pressione selettiva esercitata da virus e quelli che portano varianti di suscettibilità a sclerosi multipla. Usando approcci di genetica di popolazione abbiamo identificato nuovi geni di suscettibilità a tale malattia (*OAS1* e *ZC3HAV1*) che codificano per proteine con azione antivirale. Un approccio simile è stato applicato allo studio delle varianti di suscettibilità per il morbo di Crohn. In particolare, abbiamo dimostrato che numerose varianti di rischio per tale malattia sono aumentate in frequenza nelle popolazioni umane a causa di una pressione selettiva esercitata da protozoi; abbiamo inoltre sfruttato tale informazione per identificare tre nuovi geni-malattia (*NSF*, *ARGHEF2* e *HEBP1*). Abbiamo inoltre evidenziato come geni che codificano per regolatori dell'attivazione dei linfociti T siano stati target di selezione naturale a livello sia inter-specifico (durante la storia evolutiva dei mammiferi) sia intra-specifico (nel corso dell'evoluzione delle popolazioni umane). Molte varianti di suscettibilità a malattie autoimmuni localizzate in tali geni sono andate incontro a selezione naturale esercitata da patogeni.

Similmente, è probabile che la variabilità genetica in loci coinvolti nello sviluppo delle facoltà cognitive sia stata modellata da forze selettive. Usando approcci di genetica di popolazione abbiamo

identificato una regione del gene *SNAP25* che è stata target di selezione naturale e che porta polimorfismi in grado di modulare le capacità verbali nella nostra specie. Abbiamo inoltre studiato il gene *THBS4*, che codifica per una glicoproteina coinvolta in diversi processi tra cui infiammazione e sinaptogenesi. Il gene *THBS4* è espresso a livelli molto più alti nel cervello umano rispetto ai cervelli di scimpanze e macachi e la proteina si accumula nelle placche di beta-amiloide. Abbiamo identificato una regione del gene *THBS4* che è stata sottoposta a selezione bilanciante durante la storia evolutiva dell'uomo. Tale regione porta varianti che modulano l'espressione cerebrale del gene in maniera dipendente dal sesso. Queste medesime varianti hanno

un effetto sulla modulazione del volume di sostanza grigia (misurati tramite risonanza magnetica) in pazienti femmine affette da malattia di Alzheimer.

Nel corso del 2012 il laboratorio di Bioinformatica ha iniziato a mettere a punto una serie di strumenti per l'analisi dei dati prodotti da due sequenziatori NGS recentemente acquisiti.

Sfruttando le competenze e gli strumenti messi a punto nel corso degli scorsi anni, è stato possibile implementare software di analisi particolarmente avanzati. La pipeline di analisi dei dati NGS consiste in tre fasi principali. La prima (analisi primaria) consiste nel cosiddetto base calling: la trasformazione del segnale prodotto dalla macchina in sequenze. Questa fase è in genere gestita da software specifici per ogni apparecchio dato che l'operazione dipende fortemente dalla tecnologia usata e che, in ogni caso le procedure vanno tarate sulle caratteristiche della macchina e delle chimiche impiegate. L'output di questa analisi è una lista di corte sequenze (reads) che rappresentano il sequenziamento del campione. La seconda fase (analisi secondaria) consiste nell'allineamento delle reads alla sequenza di riferimento e al cosiddetto variant calling, ovvero l'identificazione di quelle posizioni che differiscono rispetto alla sequenza di riferimento. Anche in questo caso i diversi software per questo tipo di analisi sono disponibili open source. L'analisi terziaria, ultima fase della pipeline, prevede invece l'interpretazione funzionale di questi varianti. È la fase che dipende maggiormente dal tipo di esperimento, ed è anche la più complessa, richiede l'integrazione di molteplici fonti di dati e algoritmi di elaborazione. Sfruttando le competenze e i software di analisi (in particolare la libreria GeCo++) messi a punto in questi anni dal nostro laboratorio è stato possibile realizzare strumenti che realizzano questa fase e che sono altamente configurabili per soddisfare le esigenze di analisi poste dai diversi gruppi. Particolare cura è stata posta nella configurazione di una infrastruttura hardware/software in grado di garantire, oltre alla suddetta flessibilità nelle analisi, la possibilità di mettere a disposizione dei diversi gruppi strumenti accessibili attraverso interfacce web relativamente semplici nell'utilizzo e che non richiedano conoscenze informatiche troppo avanzate. L'idea è quella di costruire un sistema che possa integrare informazioni di diversa natura (database di annotazioni, dati clinici, software per l'analisi funzionale) per rispondere in modo il più possibile intuitivo ai quesiti posti da ogni esperimento. I software a disposizione consentono di analizzare i dati da diversi punti di vista: l'analisi dell'effetto di una variante su di un trascritto viene effettuata valutandone la sua posizione, l'effetto sul prodotto

proteico, sullo splicing e sull'espressione. Ciascuna di queste tipologie di analisi richiede l'accesso a

database di annotazioni, motivi regolatori, fattori di trascrizione, nonché l'impiego di software specifici. Per un impiego efficace è necessario dunque avere a disposizione un sistema informatico in grado di correre diversi software contemporaneamente, garantendo l'accesso alle fonti di dati e integrando poi i risultati in tabelle di semplice lettura e consultazione. I progetti di ricerca del nostro

laboratorio, quasi sempre di natura genome-wide, ci hanno consentito non solo di mettere a punto algoritmi specifici per i diversi aspetti di queste analisi ma anche di sviluppare il software proprio tenendo conto delle esigenze di flessibilità e integrazione citate sopra. In particolare la libreria GeCo++, che è stata sviluppata nel nostro laboratorio come supporto a progetti di ricerca genome wide. Ha trovato una efficace applicazione nei problemi posti dal sequenziamento NGS e, in particolare dall'analisi terziaria dei risultati. In altre parole l'aver pensato in termini genome wide fin

dal momento della prima versione del genoma umano, ci consente ora di affrontare le problematiche NGS in modo efficiente sia in termini di tempi di realizzazione degli strumenti di analisi che di risorse necessarie. Sia le interfacce che e i software sono ancora in fase di test e richiederanno nei prossimi anni parecchio lavoro per essere ampliati (a coprire un maggior numero di tipologie sperimentali).

Elenco delle Ricerche sviluppate nel corso del 2012 presso il laboratorio di biologia molecolare citogenetica e bioinformatica:

- 1) I processi di fissione e fusione mitocondriale e ruolo delle alterazioni bioenergetiche a loro susseguenti nelle patologie degenerative del sistema muscolare e nervoso.
- 2) Caratterizzazione del processo di autofagocitosi nella degenerazione moto neuronale in forme complicate di paraparesi spastica ad esordio in età pediatrica.
- 3) Variabilità fenotipica e aploinsufficienza nella sindrome di Phelan/McDermin: identificazione di nuovi geni mediante sequenziamento dell'esoma.
- 4) Malattia del motoneurone: studio funzionale in *Drosophila* del gene *Senataxina*, responsabile di forme precoci di MND.
- 5) Sviluppo di un modello di malattia di Charcot-Marie-Tooth in *Drosophila* Sviluppo di un modello di malattia di Charcot-Marie-Tooth in *Drosophila*.
- 6) Ruolo del gene BRIP1 (FANCD1) nella destabilizzazione delle sequenze con conformazione Quadruplex associate a riarrangiamenti costituzionali del genoma umano.
- 7) Approccio integrato (genetica di popolazione e next generation sequencing) per l'identificazione di varianti funzionali con effetto patologico.
- 8) RNA e struttura secondaria: nuovi target mutazionali per le malattie genetiche.
- 9) Studio del pattern selettivo di geni di risposta antivirale finalizzato all'identificazione di varianti di suscettibilità alla sclerosi multipla

Publicazioni Laboratorio Biologia Molecolare, Citogenetica e Bioinformatica IRCCS E. Medea Anno 2012

Agosta Federica, Scarlato Marina, Longoni G., Valsasina P., Sessa Maria, Bassi Maria Teresa, Ferrari Maurizio, Falini Andrea, Comi Giacomo Pietro, Filippi Massimo (2012);
Cervical Cord Atrophy in Hereditary Spastic Paraparesis; Abstract P381 Twenty-Second Meeting of the European Neurological Society, Prague, Czech Republic, 9-12.06.2012;

Journal of Neurology, 259(Suppl.1):S80-S81

Doi: 10.1007/s00415-012-6524-4

I.F. 2011: 3,473

Al-Daghri Nasser M., Cagliani Rachele, Forni Diego, Alokail Majed S., Pozzoli Uberto, Alkharfy Khalid M., Sabico Shaun, Clerici Mario*, Sironi Manuela* (2012);
Mammalian NPC1 Genes may undergo positive selection and human polymorphisms associate with type 2 diabetes;

BMC Medicine, 10(1):140

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1186/1741-7015-10-140 PMID: 23153210

I.F. 2011: 6,035

Arnoldi Alessia, Crimella Claudia, Tenderini Erika, Martinuzzi Andrea, D'Angelo Maria Grazia, Musumeci Olimpia, Toscano Antonio, Scarlato Marina, Fantin Marianna, Bresolin Nereo, Bassi Maria Teresa (2012);

Clinical Phenotype Variability in patients with hereditary spastic paraplegia type 5 associated with CYP7B1 mutations;

Clinical Genetics, 81(2):150-157

Doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01624.x PMID: 21214876
I.F. 2011: 3,128

Beri Silvana, Bonaglia Maria Clara, Giorda Roberto (2012);
Low-copy repeats at the human VIPR2 gene predispose to recurrent and nonrecurrent rearrangements;

European Journal of Human Genetics, in press

Doi: 10.1038/ejhg.2012.235 PMID: 23073313

I.F. 2011: 4,400

Bertoletti Eleonora, Zanoni Annalisa, Giorda Roberto, Battaglia Marco (2012);
Influence of the OPRM1 gene polymorphisms upon children's degree of withdrawal and brain activation in response to facial expressions;

Developmental Cognitive Neuroscience,

2(1):103-109

Doi: 10.1016/j.dcn.2011.05.001 PMID: 22682732

I.F. 2011: 0,000

Buono Roberta, Vantaggiato Chiara, Pisa Viviana, Azzoni Emanuele, Bassi Maria Teresa, Brunelli Silvia, Sciorati Clara, Clementi Emilio (2012);

Nitric oxide sustains long term skeletal muscle regeneration by regulating satellite cells fate via signaling pathways requiring vangl 12 and cyclic GMP

Stem Cells (Alphamed Press), 30(2):197-209

Doi: 10.1002/stem.783 PMID: 22084027

I.F. 2011: 7,781

Cagliani Rachele, Fumagalli Matteo, Guerini Franca Rosa, Riva Stefania, Galimberti Daniela, Comi

Giacomo Pietro, Agliardi Cristina, Scarpini Elio, Pozzoli Uberto, Forni Diego, Caputo Domenico, Asselta Rosanna, Biasin Mara, Paraboschi Elvezia M., Bresolin Nereo, Clerici Mario, Sironi Manuela (2012);

Identification of a new susceptibility variant for multiple sclerosis in OAS1 by population genetics analysis;

Human Genetics, 131(1):87-97

Doi: 10.1007/s00439-011-1053-2 PMID: 21735172

I.F. 2011: 5,069

Cagliani Rachele, Riva Stefania, Marino Cecilia, Fumagalli Matteo, D'Angelo Maria Grazia, Riva Valentina, Comi Giacomo Pietro, Pozzoli Uberto, Forni Diego, Cáceres Mario, Bresolin Nereo, Clerici Mario, Sironi Manuela (2012);

Variants in SNAP25 are targets of natural selection and influence verbal performance in women ;

Cellular and Molecular Life Sciences, 69(10):1705-

1715

Doi: 10.1007/s00018-011-0896-y PMID: 22193912

I.F. 2011: 6,570

Cagliani Rachele, Guerini Franca Rosa, Fumagalli Matteo, Riva Stefania, Agliardi Cristina, Galimberti Daniela, Pozzoli Uberto, Goris A., Dubois B., Fenoglio Chiara, Forni Diego, Sanna S., Zara I., Pitzalis M., Zoledziewska M., Cucca F., Marini Federico, Comi Giacomo Pietro, Scarpini Elio, Bresolin Nereo, Clerici Mario, Sironi Manuela (2012);

A trans-specific polymorphism in ZC3HAV1 is maintained by long-standing balancing selection and may confer susceptibility to multiple sclerosis;

Molecular Biology and Evolution, 29(6):1599-1613

Doi: 10.1093/molbev/mss002 PMID: 22319148
I.F. 2011: 5,550

Corti Stefania, Nizzardo Monica, Simone Chiara, Falcone Marianna, Donadoni Chiara, Salani Sabrina, Rizzo Federica, Nardini Martina, Riboldi Giulietta, Magri Francesca, Zanetta Chiara, Faravelli Francesca, Bresolin Nereo, Comi Giacomo Pietro (2012);
Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons;
Experimental Cell Research, 318(13):1528-1541

Doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.40 PMID: 22426197
I.F. 2011: 3,580

Corti Stefania, Nizzardo Monica, Simone Chiara, Falcone Marianna, Nardini Martina, Ronchi Dario, Donadoni Chiara, Salani Sabrina, Riboldi Giulietta, Menozzi Giorgia, Bonaglia Maria Clara, Magri Francesca, Bresolin Nereo, Comi Giacomo Pietro (2012);
Gene corrected spinal muscular atrophy-induced pluripotent stem cells and motoneuron as a model and cell source for transplantation;

Abstract IN8-2.002 64th AAN Annual Meeting - New Orleans, 21-28.04.2012;

Neurology, 78(Suppl. 1)

I.F. 2011: 8,312

Corti Stefania, Nizzardo Monica, Simone Chiara, Falcone Marianna, Nardini Martina, Ronchi Dario, Donadoni Chiara, Salani Sabrina, Riboldi Giulietta, Magri Francesca, Menozzi Giorgia, Bonaglia Maria Clara, Rizzo Federica, Bresolin Nereo, Comi Giacomo Pietro (2012);
Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy;

Science Translational Medicine, 4(165):165ra162

Doi: 10.1126/scitranslmed.3004108 PMID: 23253609

I.F. 2011: 7,804

Crimella Claudia, Baschiroto Cinzia, Arnoldi Alessia, Tonelli Alessandra, Tenderini Erika, Airoidi Giovanni, Martinuzzi Andrea, Trabacca Antonio, Losito Luciana, Scarlato Marina, Benedetti Sara, Scarpini Elio, Spinicci Gabriella, Bresolin Nereo, Bassi Maria Teresa (2012);
Mutations in the motor and stalk domains of KIF5A in spastic paraplegia type 10 and in Axonal charcot Marie tooth type 2;

Clinical Genetics, 82(2):157-164

Doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01717.x PMID: 21623771

I.F. 2011: 3,128

D'Angelo Maria Grazia, Gandossini Sandra, Martinelli Boneschi Filippo, Sciorati Clara, Bonato Sara, Brighina Erika, Comi Giacomo Pietro, Turconi Anna Carla, Magri Francesca, Stefanoni Giuseppe, Brunelli Silvia, Bresolin Nereo, Cattaneo Dario, Clementi Emilio (2012);

Nitric oxide donor and non steroidal anti inflammatory drugs as a therapy for muscular dystrophies: evidence from a safety study with pilot efficacy measures in adult dystrophic patients;

Pharmacological Research, 65(4):472-479

Doi: 10.1016/j.phrs.2012.01.006 PMID: 22306844

I.F. 2011: 4,436

De Cunto Angela, Bensa Marco, Tonelli Alessandra (2012);

A case of familial hemiplegic migraine associated with a novel ATP1A2 gene mutation;

Pediatric Neurology, 47(2):133-

136

Doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2012.04.012 PMID: 22759692

I.F. 2011: 1,522

De Palma Clara, Morisi Federica*, Cheli Stefania*, Pambianco S., Cappello V., Vezzoli Michela, Rovere-Querini Patrizia, Moggio Maurizio, Ripolone Michela, Francolini Maura, Sandri M., Clementi Emilio (2012);

Autophagy as a new therapeutic target in duchenne muscular dystrophy;

Cell Death and Disease, 3:e418

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1038/cddis.2012.159 PMID: 23152054

I.F. 2011: 5,333

Filippi Massimo, Scarlato Marina, Agosta Federica, Scarale Antonio, Canu Elisa, Bassi Maria Teresa, Benedetti Sara, Pagani Elisabetta, Ferrari Maurizio, Falini Andrea, Sessa Maria, Comi Giacomo Pietro(2012);

White-matter damage in pure and complicated hereditary spastic paraparesis;

Abstract P553 Twenty-Second Meeting of the European Neurological Society, Prague, Czech Republic,9-12.06.2012;

Journal of Neurology, 259(Suppl. 1):S138-S139

Doi: 10.1007/s00415-012-6524-4

I.F. 2011: 3,473

Fons Carmen, Campistol Jaume, Panagiotakaki Eleni, Giannotta Melania, Arzimanoglou Alexis, Gobbi Giuseppe, Neville Brian, Ebinger Friedrich, Nevsimalova Sona, Laan Laura, Casaer Paul, Spiel Georg, Ninan Miriam, Sange Guenter, Artuch Rafael, Schyns Tsveta, Vavassori Rosaria, Poncelin Dominique, The ENRAH Consortium (Bassi Maria Teresa, Zucca Claudio) (2012);
ALTERNATING HEMIPLEGIA OF CHILDHOOD: METABOLIC STUDIES IN THE LARGEST EUROPEAN SERIES OF PATIENTS;

European Journal of Paediatric Neurology, 16(1):10-14

Doi: 10.1016/j.ejpn.2011.08.006 PMID: 21945173

I.F. 2011: 2,123

Ghezzi Laura, Scarpini Elio, Rango Mario, Arighi Andrea, Bassi Maria Teresa, Tenderini Erika, De Riz Milena, Jacini Francesca, Fumagalli Giorgio G., Pietroboni Anna M., Galimberti Daniela, Bresolin Nereo (2012);

A 66-year – old patient with vanishing white matter disease due to the p.Ala87Val EIF2B3 mutation;

Neurology, 79(20):2077-2078

Doi: 10.1212/WNL.0b013e3182749edc PMID: 23115207

I.F. 2011: 8,312

Ghezzi Laura, Bassi Maria Teresa, Pietroboni Anna M., Fumagalli Giorgio G., Arighi Andrea, Rango Mario, De Riz Milena, Jacini Francesca, Galimberti Daniela, Bresolin Nereo, Scarpini Elio (2012);

A case of vanishing white-matter disease due to the C.260C>T (P.ALA87VAL) EIF2B3 mutation; Abstrat P660 Twenty-Second Meeting of the European Neurological Society, Prague, Czech Republic, 9-12.06.2012;

Journal of Neurology, 259(Suppl. 1):S174

Doi: 10.1007/s00415-012-6524-4

I.F. 2011: 3,473

Heinzen Erin L., Swoboda Kathryn J., Hitomi Yuki, Gurrieri Fiorella, Nicole Sophie, De Vries Bourkje, Tiziano F. Danilo, Fontaine Bertrand, Walley Nicole M., Heavin Sinead, Panagiotakaki Eleni, the European Alternating Hemiplegia of Childhood (AHC) Genetics Consortium, the

Biobanca e Registro Clinico Emiplegia Alternante (IBAHC) Consortium (Bassi Maria Teresa, Zucca Claudio), the European Network Research on Alternating Hemiplegia (ENRAH) for Small and Medium-sized Enterprise (SMEs) Consortium (Bassi Maria Teresa, Zucca Claudio), Fiori Stefania, Abiusi Emanuela, Di Pietro Lorena, Sweney Matthew T., Newcomb Tara M., Viollet Louis, Huff Chad, Jorde Lynn B., Reyna Sandra P., Murphy Kelley J., Shianna Kevin V., Gumbs Curtis E., Little Latasha, Silver Kenneth, Ptacek Louis J., Haan Joost, Ferrari Michel D., Bye Ann M., Herkes Geoffrey K., Whitelaw Charlotte M., Webb David, Lynch Bryan J., Uldall Peter, King Mary D., Scheffer Ingrid E., Neri Giovanni, Arzimanoglou Alexis, Van Den Maagdenberg Arn M.J.M., Sisodiya Sanjay M., Mikati Mohamad A., Goldstein David B. (2012);

De novo mutations in ATP1A3 cause alternating hemiplegia of childhood;

Nature Genetics, 44(9):1030-1034

Doi: 10.1038/ng.2358 PMID: 22842232

I.F. 2011: 35,532

Magri Francesca, Del Bo Roberto, D'Angelo Maria Grazia, Sciacco Monica, Gandossini Sandra, Govoni Alessandra, Napoli Laura, Ciscato Patrizia, Fortunato Francesco, Brighina Erika, Bonato Sara, Bordoni Andreina, Lucchini Valeria, Corti Stefania, Moggio Maurizio, Bresolin Nereo, Comi Giacomo Pietro (2012);

Frequency and characterization of anoctamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients;

Neuromuscular Disorders, 22(11):934-943

Doi: 10.1016/J.NMD.2012.05.001 PMID: 22742934

I.F. 2011: 2,797

Mannini Linda, Menga Stefania, Tonelli Alessandra, Zanotti Silvia, Bassi Maria Teresa, Magnani Cinzia, Musio Antonio (2012);

SMC1A codon 496 mutations affect the cellular response to genotoxic treatments;

American Journal of Medical Genetics Part A, 158A(1):224-228

Doi: 10.1002/ajmg.a.34384 PMID: 22140011

I.F. 2011: 2,391

Linea: 5 – Neurobiologia

Marino Cecilia, Haiying Meng, Mascheretti Sara, Rusconi Marianna, Cope Natalie, Giorda Roberto, Molteni Massimo, Gruen Jeffrey R. (2012);

DCDC2 genetic variants and susceptibility to developmental dyslexia;

Psychiatric Genetics, 22(1):25-30

Doi: 10.1097/YPG.Ob013e32834acdb2 PMID: 21881542

I.F. 2011: 2,581

Ranieri Michela, Del Bo Roberto, Bordoni Andreina, Ronchi Dario, Colombo Irene, Riboldi Giulietta, Cosi Alessandra, Servida Maura, Magri Francesca, Moggio Maurizio, Bresolin Nereo, Comi Giacomo Pietro, Corti Stefania (2012);

Optic atrophy plus phenotype due to mutations in the OPA1 gene: two more Italian families;

Journal of the Neurological Sciences, 315(1-2):146-149

Doi: 10.1016/j.jns.2011.12.002 PMID: 22197506

I.F. 2011: 2,353

Romaniello Romina*, Tonelli Alessandra*, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Baschiroto Cinzia, Triulzi Fabio, Bresolin Nereo, Bassi Maria Teresa, Borgatti Renato (2012);

A novel mutation in the betatubulin gene TUBB2B associated with complex malformation of cortical development and deficits in axonal guidance;

Developmental Medicine and Child Neurology, 54(8):765-769

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro
Doi: 10.1111/j.1469-8749.2012.04316.x PMID: 22591407
I.F. 2011: 2,918

Romaniello Romina, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Citterio Andrea, Tonelli Alessandra, Sforzini Cinzia, Rizzari Carmelo, Pessina Marco, Triulzi Fabio, Bassi Maria Teresa, Borgatti Renato (2012);

Cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts (CRMCC) associated with CTCl and NDP mutations;

Journal of Child Neurology, in press

Doi: 10.1177/0883073812467849 PMID: 23220793

I.F. 2011: 1,748

Ronchi Dario, Sciacco Monica, Bordoni Andreina, Raimondi Monica, Ripolone Michela, Fassone Elisa, Di Fonzo Alessio, Rizzuti Mafalda, Ciscato Patrizia, Cosi Alessandra, Servida Maura, Moggio Maurizio, Corti Stefania, Bresolin Nereo, Comi Giacomo Pietro (2012);

The novel mitochondrial TRNAasn gene mutation M.5709T>C produces ophthalmoparesis and respiratory impairment;

European Journal of Human Genetics, 20(3):357-360

Doi: 10.1038/ejhg.2011.238 PMID: 22189266

I.F. 2011: 4,400

Ronchi Dario, Garone Caterina, Bordoni Andreina, Gutierrez Rios Purificacion, Calvo Sarah E., Ripolone Michela, Ranieri Michela, Rizzuti Mafalda, Villa Luisa, Magri Francesca, Corti Stefania, Bresolin Nereo, Mootha Vamsi K., Moggio Maurizio, Dimauro Salvatore, Comi Giacomo Pietro, Sciacco Monica (2012);

Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions;

Brain, 135(11):3404-3415

Doi: 10.1093/brain/aws258 PMID: 23043144

I.F. 2011: 9,457

Rossi Elena*, Giorda Roberto*, Bonaglia Maria Clara*, Di Candia Stefania, Grechi Elena, Franzese

Adriana, Soli Fiorenza, Rivieri Francesca, Patricelli Maria Grazia, Saccilotto Donatella, Bonfante Aldo, Giglio Sabrina, Beri Silvana, Rocchi Mariano, Zuffardi Orsetta (2012);

De novo unbalanced translocation in prader-willi and angelman syndrome may be the reciprocal product of inv DUP(15)S;

Plos One, 7(6):e39180

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1371/journal.pone.0039180 PMID: 22720067

I.F. 2011: 4,092

Salvaterra Mariaelena, Giorda Roberto, Bassi Maria Teresa, Borgatti Renato, Knudsen Lisbeth E., Martinuzzi Andrea, Nobile Maria, Pozzoli Uberto, Ramelli Gian P., Reni Gianluigi, Rivolta Damiano, Stazi Maria Antonietta, Strazzer Sandra, Thijs Carel, Toccaceli Virgilia, Trabacca Antonio, Turconi Anna Carla, Zanini Sergio, Zucca Claudio, Bresolin Nereo, Lenzi Leonardo, Pediatric Biobanking ELSI Working Group (Rossetto Maria Giovanna) (2012);

Pediatric Biobanking: a pilot qualitative survey of practices, rules, and researcher opinions in ten european countries;

Biopreservation and Biobanking, 10(1):29-36

Doi: 10.1089/bio.2011.0037

I.F. 2011: 1,294

Scarale Antonio, Scarlato Marina, Agosta Federica, Canu Elisa, Bassi Maria Teresa, Benedetti Sara,

Pagani Elisabetta, Ferrari Maurizio, Comi Giacomo Pietro, Falini Andrea, Sessa Maria, Filippi Massimo(2012);

White matter damage in pure and complicated hereditary spastic paraparesis;

Abstract P03.164 64th AAN Annual Meeting - New Orleans, 21-28.04.2012;

Neurology, 78(Suppl.1)

I.F. 2011: 8,312

Sironi Manuela*, Biasin Mara*, Cagliani Rachele, Forni Diego, De Luca Mariacristina, Saulle Irma, Lo Caputo Sergio, Mazzotta Francesco, Macias Juan, Pineda Juan A., Caruz Antonio, Clerici Mario (2012);

A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection;

The Journal of Immunology, 188(2):818-823

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.4049/jimmunol.1102179 PMID: 22174453

I.F. 2011: 5,788

Sironi Manuela*, Biasin Mara, Forni Diego, Cagliani Rachele, De Luca Mariacristina, Saulle Irma, Lo Caputo Sergio, Mazzotta Francesco, Macias Juan, Pineda Juan A., Caruz Antonio, Clerici Mario* (2012);

Genetic variability at the TREX1 locus is not associated with natural resistance with natural resistance to HIV-1 infection; AIDS, 26(11):1443-1445

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1097/QAD.0b013e328354b3c2 PMID: 22526516

I.F. 2011: 6,245

Tonelli Alessandra, D'Angelo Maria Grazia, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Brighina Erika, Arnoldi Alessia, Citterio Andrea, Bresolin Nereo, Bassi Maria Teresa (2012);

ATYPICAL ADULT ONSET COMPLICATED SPASTIC PARAPARESIS WITH THIN CORPUS CALLOSUM IN TWO PATIENTS CARRYING A NOVEL FA2H MUTATION;

European Journal of Neurology, Letter to the Editor, 19(11):e127-e129

Doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03838.x PMID: 22925154

I.F. 2011: 3,692

Ulzi Gianna*, Lecchi Marzia*, Sansone Valeria, Redaelli Elisa, Corti Eleonora, Saccomanno Domenica, Pagliarani Serena, Corti Stefania, Magri Francesca, Raimondi Monica, D'Angelo Maria Grazia, Modoni Anna, Bresolin Nereo, Meola Giovanni, Wanke Enzo (2012);

Myotonia congenita: Novel mutations in CLCN1 gene and functional characterization in italian patients;

Journal of the Neurological Sciences, 318(1-2):65-71

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1016/j.jns.2012.03.024 PMID: 22521272

I.F. 2011: 2,353

“Centro Dino Ferrari”
Il Direttore
Prof. Nereo Bresolin

