



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

2015

SEZIONI DEL “CENTRO DINO FERRARI”

- LABORATORIO RADIOISOTOPI DI BIOCHIMICA E GENETICA Pag. 3
- LABORATORIO DI NEUROIMMUNOLOGIA CLINICA Pag. 19
- LABORATORIO CELLULE STAMINALI NEURALI Pag. 21
- LABORATORIO PARKINSON E ALTRI DISTURBI DEL MOVIMENTO Pag. 35
- U.O.S.D. MALATTIE NEURODEGENERATIVE Pag. 39
- LABORATORIO DI CELLULE STAMINALI Pag. 51
- U.O.S.D. MALATTIE NEUROMUSCOLARI E RARE Pag. 61
- SEDE DISTACCATA DEL “CENTRO DINO FERRARI” PRESSO
U.O.NEUROLOGIA – STROKE UNIT E LAVORATORIO DI NEUROSCIENZE UNVERSITA’ DEGLI STUDI DI MILANO
I.R.C.C.S. ITITUTO AUXOLOGICO ITALIANO Pag. 71
- SEDE DISTACCATA DEL “CENTRO DINO FERRARI” PRESSO IL LA
BORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE, CITOGENETICA,
ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE, BIOINFORMATICA – I.R.C.C.S. E.
MEDEA Pag. 93

LABORATORIO DI BIOCHIMICA E GENETICA

Responsabile:

Prof. Giacomo P. Comi, Professore Associato

Medici:

Prof. Stefania Corti

Dott. Francesca Magri

Dott. Alessandra Govoni

Dott. Giulietta Riboldi

Dott. Simona Brajkovic

Dott. Irene Faravelli

Dott. Roberta Brusa

Dott. Eleonora Mauri

Biologi:

Dott. Roberto Del Bo

Dott. Sabrina Lucchiari

Dott. Gianna Ulzi

Dott. Domenica Saccomanno

Dott. Daniela Piga

Biotechnologi:

Dott. Dario Ronchi

Dott. Serena Pagliarani

Dott. Mafalda Rizzuti

Dott. Valentina Melzi

Tecnici:

Sig.ra Andreina Bordoni

Sig. Francesco Fortunato

STUDIO DELLE MALATTIE MITOCONDRIALI

Due temi attinenti la funzione mitocondriale sono stati oggetto di studio nel corso del 2015 da parte del Laboratorio di Biochimica e Genetica del Centro Dino Ferrari: 1) ulteriori dati sull'eziologia e la patogenesi dei quadri clinici compatibili con un difetto nel metabolismo ossidativo in pazienti pediatrici ed adulti; in tale contesto, la rivalutazione dei pazienti affetti da miopatia con accumulo di DNA mitocondriale parzialmente difettivo (delezioni del DNA mitocondriale), condotta lo scorso anno, si è rivelata utile per la definizione delle caratteristiche dei pazienti italiani con queste condizioni e decisiva nella identificazione di un nuovo difetto molecolare in una sindrome da delezioni multiple del DNA mitocondriale (mutazioni recessive nel gene *RNASEH1*).; 2) studio di come la disfunzione mitocondriale contribuisca alla patogenesi di malattie neurodegenerative del bambino (Amiotrofia spinale) e la caratterizzazione del difetto ossidativo indotto dalla somministrazione prolungata di Linezolid in pazienti critici ospedalizzati nel reparto di terapia intensiva.

1) Identificazione di mutazioni recessive nel gene *RNASEH1* come causa di una forma di encefalomiopatia mitocondriale a esordio adulto.

Le malattie mitocondriali presentano una grande eterogeneità nelle manifestazioni fenotipiche e nei meccanismi eziopatogenetici a essi sottesi. La variabilità della clinica e la non specificità della maggior parte dei marcatori disponibili rendono difficoltoso per il clinico la definizione della diagnosi e della prognosi sia nell'adulto che nel bambino.

Negli ultimi 20 anni numerosi difetti in geni nucleari codificanti per proteine coinvolte nell'omeostasi del DNA mitocondriale (mtDNA) sono stati associati a reperti peculiari, come l'accumulo muscolare di delezioni multiple del mtDNA, osservabile mediante specifici saggi di Southern blot e di PCR. In questo lavoro collaborativo, abbiamo chiarito un nuovo difetto molecolare alla base di queste condizioni. L'analisi mediante exome sequencing ha identificato mutazioni eterozigoti composte nei soggetti affetti di una famiglia nella regione codificante del gene *RNASEH1*. Varianti nello stesso gene segregano con il fenotipo in un pedigree indipendente e sono state individuate anche in un caso sporadico indipendente. Il gene *RNASEH1* codifica per una RNAsi mitocondriale e nucleare fondamentale per la risoluzione degli ibridi DNA-RNA. Mentre nel nucleo è presente un enzima vicario, il mitocondrio può contare esclusivamente su *RNASEH1* per assolvere a questo compito. Abbiamo partecipato alla caratterizzazione del difetto molecolare risultante dalla ridotta attività di questo enzima in tessuti umani e colture primarie derivate da pazienti, studiando il DNA mitocondriale con un'ampia serie di saggi molecolari. Questi risultati, uniti agli studi biochimici, istologici e agli studi di attività in vitro hanno permesso di supportare la patogenicità delle varianti identificate nei pazienti. Allo stesso tempo questo studio ha gettato nuova luce sul processo di replicazione del DNA mitocondriale e sulle conseguenze di una sua de-regolazione nell'uomo. La ricerca è stata pubblicata in:

Reyes A, Melchionda L, Nasca A, Carrara F, Lamantea E, Zanolini A, Lamperti C, Fang M, Zhang J, Ronchi D, Bonato S, Fagiolari G, Moggio M, Ghezzi D, Zeviani M.

RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy.

Am J Hum Genet. 2015 Jul 2;97(1):186-93. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.05.013. Epub 2015 Jun 18. PubMed PMID: 26094573; PubMed Central PMCID: PMC4572567.

2) Analisi dei fenotipi associati a macrodelezione nel DNA mitocondriale

L'oftalmoplegia esterna progressiva (PEO), la sindrome di Kearns Sayre (KSS) e la sindrome di Pearson (PS) sono tre sindromi cliniche sporadiche associate a macrodelezione del DNA mitocondriale. Ci si riferisce al termine PEO-plus per indicare una forma di PEO con interessamento multi sistemico ma una precisa definizione clinica per questa condizione non è

disponibile. In questo studio retrospettivo collaborativo abbiamo rivalutato 288 pazienti con macredelezione del DNA mitocondriale nell'ambito del network italiano per lo studio delle malattie mitocondriali. Questo sforzo ha consentito l'elaborazione di nuovi criteri di definizione per la PEO e uno spettro fenotipico di KSS. In quest'ultima categoria sono compresi gli elementi clinici multisistemici della KSS che aiutano a descriverne la progressione. L'applicazione di questi criteri ci ha consentito una ri-stratificazione del campione: 64.5% PEO, 31.6% "spettro" KSS (KSS classica: 6.6%) e 2.6% PS. La grandezza della delezione è maggiore nei pazienti con KSS rispetto ai PEO mentre l'eteroplasmia muscolare è inversamente correlata con l'età di esordio. Questa ricerca ha quindi fornito nuovi elementi per la categorizzazione dei pazienti di nuove corti e per la valutazione della storia naturale di queste patologie. Ricerca pubblicata in:

Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Donati MA, Federico A, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Santorelli FM, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Bruno C, Bello L, Caldarazzo Ienco E, Cardaioli E, Catteruccia M, Da Pozzo P, Filosto M, Lamperti C, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Ronchi D, Sauchelli D, Scarpelli M, Sciacco M, Valentino ML, Vercelli L, Zeviani M, Siciliano G. Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion. *J Neurol.* 2015 May;262(5):1301-9. doi: 10.1007/s00415-015-7710-y. Epub 2015 Mar 26. Erratum in: *J Neurol.* 2015 Dec;262(12):2800. PubMed PMID: 25808502.

3) Disfunzione mitocondriale nel muscolo di pazienti con Amiotrofia Spinale 5q

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 in precedenza 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 poco 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 24 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. Studi di espressione genica hanno messo in luce una riduzione dei fattori associati alla biogenesi dei mitocondri. Nella parte conclusiva di questa ricerca abbiamo valutato mediante western blot e saggi di PCR quantitativa l'espressione di alcuni marcatori di differenziamento muscolare. Queste analisi hanno dimostrato che nei muscoli SMA si osserva un rallentamento del programma miogenico, che è la verosimile causa della ridotta biogenesi mitocondriale. Risultati simili sono stati ottenuti nei modelli animali di SMA e in cellule in vitro ottenute dai pazienti (differenziamento di mioblasti in miociti), ma mai nei muscoli umani. Resta ora da capire la relazione molecolare esistente tra il deficit di SMN e questi fenomeni. La comprensione di questo meccanismo potrebbe avere conseguenze importanti per lo sviluppo di terapie volte a contrastare l'atrofia muscolare che caratterizza questa patologia.

Ricerca pubblicata in:

Ripolone M, Ronchi D, Violano R, Vallejo D, Fagiolari G, Barca E, Lucchini V, Colombo I, Villa L, Berardinelli A, Balottin U, Morandi L, Mora M, Bordoni A, Fortunato F, Corti S, Parisi D, Toscano A, Sciacco M, DiMauro S, Comi GP, Moggio M.
Impaired Muscle Mitochondrial Biogenesis and Myogenesis in Spinal Muscular Atrophy.
JAMA Neurol. 2015 Jun;72(6):666-75. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0178. Erratum in:
JAMA Neurol. 2015 Oct;72(10):1210. PubMed PMID: 25844556.

4) Alterazioni nel muscolo scheletrico in un paziente critico settico trattato con Linezolid.

In questo case report abbiamo indagato gli aspetti biochimici e molecolari sottesi all'acidosi lattica sviluppata in seguito a trattamento prolungato con Linezolid in un pazienti con sepsi, ricoverato in un reparto di terapia intensiva. Sono noti in letteratura le complicanze possibili associate ad un uso prolungato di questo potente antibiotico che sembra inibire, insieme a quella batterica, anche la traduzione proteica mitocondriale. Gli studi biochimici e di espressione genica condotti su muscolo ci hanno permesso di approfondire questo fenomeno, inquadrandolo nel più ampio tema dello sbilanciamento tra traduzione mitocondriale e nucleare. In condizioni fisiologiche, questo evento scatena una risposta compensatoria che invece risulta compromessa nel paziente studiato. Quindi l'acidosi lattica è la conseguenza di un difetto sull'omeostasi mitocondriale che è più ampio della sola riduzione della capacità di traduzione intra-mitocondriale. L'estensione di questi studi a nuovi pazienti e nuovi tessuti ci consentirà di esplorare la differenza dei vari organi a questo stress farmacologico e, indirettamente, a quanto si verifica nei tessuti con difetti primari congeniti nei meccanismi di traduzione mitocondriale. La ricerca è stata pubblicata in:

1: Reyes A, Melchionda L, Nasca A, Carrara F, Lamantea E, Zanolini A, Lamperti C, Fang M, Zhang J, Ronchi D, Bonato S, Fagiolari G, Moggio M, Ghezzi D, Zeviani M. *RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy.* **Am J Hum Genet.** 2015 Jul 2;97(1):186-93. doi:10.1016/j.ajhg.2015.05.013. Epub 2015 Jun 18. PubMed PMID: 26094573; PubMed Central PMCID: PMC4572567.

2: Ahmed N, Ronchi D, Comi GP.
Genes and Pathways Involved in Adult Onset Disorders Featuring Muscle Mitochondrial DNA Instability.
Int J Mol Sci. 2015 Aug 5;16(8):18054-76. doi: 10.3390/ijms160818054. Review. PubMed PMID: 26251896; PubMed Central PMCID: PMC4581235.

3: Protti A, Ronchi D, Bassi G, Fortunato F, Bordoni A, Rizzuti T, Fumagalli R.
Changes in Whole-Body Oxygen Consumption and Skeletal Muscle Mitochondria During Linezolid-Induced Lactic Acidosis.
Crit Care Med. 2015 Dec 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26657404.

4: Ripolone M, Ronchi D, Violano R, Vallejo D, Fagiolari G, Barca E, Lucchini V, Colombo I, Villa L, Berardinelli A, Balottin U, Morandi L, Mora M, Bordoni A, Fortunato F, Corti S, Parisi D, Toscano A, Sciacco M, DiMauro S, Comi GP, Moggio M.
Impaired Muscle Mitochondrial Biogenesis and Myogenesis in Spinal Muscular Atrophy.
JAMA Neurol. 2015 Jun;72(6):666-75. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0178. Erratum in:
JAMA Neurol. 2015 Oct;72(10):1210. PubMed PMID: 25844556.

5: Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Donati MA, Federico A, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Santorelli FM, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Bruno C, Bello L, Caldarazzo Ienco E, Cardaioli E, Catteruccia M, Da Pozzo P, Filosto M, Lamperti

C, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Ronchi D, Sauchelli D, Scarpelli M, Sciacco M, Valentino ML, Vercelli L, Zeviani M, Siciliano G.

Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion. J Neurol. 2015 May;262(5):1301-9. doi: 10.1007/s00415-015-7710-y. Epub 2015 Mar 26. Erratum in: J Neurol. 2015 Dec;262(12):2800. PubMed PMID: 25808502.

6: Ronchi D, Riboldi G, Del Bo R, Ticozzi N, Scarlato M, Galimberti D, Corti S, Silani V, Bresolin N, Comi GP.

CHCHD10 mutations in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.

Brain. 2015 Aug;138(Pt 8):e372. doi: 10.1093/brain/awu384. Epub 2015 Jan 8. PubMed PMID: 25576308.

7: Ronchi D, Previtali SC, Sora MG, Barera G, Del Menico B, Corti S, Bresolin N, Comi GP. *Novel splice-site mutation in SMN1 associated with a very severe SMA-I phenotype.*

J Mol Neurosci. 2015 May;56(1):212-5. doi: 10.1007/s12031-014-0483-4. Epub 2015 Jan 9. PubMed PMID: 25572663.

GENETICA DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

L'attività di ricerca è stata volta a caratterizzare a livello clinico, strumentale e genetico un'ampia coorte di pazienti affetti da SLA e SLA/FTD reclutati presso l'ambulatorio delle malattie del motoneurone afferente all'Unità di Neurologia dell'IRCCS Fondazione Ca' Granda. L'UO rappresenta un centro di riferimento per la diagnosi e il trattamento delle malattie del motoneurone (attualmente sono circa 400 i pazienti seguiti). La diagnosi è stata posta secondo i criteri di El Escorial – Revised e secondo i recenti criteri neurofisiologici di Awaji; un consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti arruolati. Nel corso della ricerca, abbiamo analizzato mediante sequenza Sanger nella coorte di pazienti i geni causativi della SLA avanti maggiore frequenza tra cui SOD1, ANG, TARDBP (esone 6) e FUS (esoni 14 e 15), oltre che i geni di nuova identificazione come UBQLN2, PFN1 e più recentemente TUBA4A e TBK1. I pazienti sono stati inoltre sottoposti ad analisi genetica per l'identificazione dell'espansione patogenetica nel gene C9ORF72. 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 "Centri SLA" afferenti al "Consorzio SLAGEN italiano" e pubblicati in riviste internazionali peer-reviewed come documentato nell'elenco pubblicazioni della ricerca.

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.

Analisi del gene TUBA4A

Lo studio esomico effettuato su casi di SLA familiare (FALS) ha permesso di identificare un eccesso di varianti rare (7/635) sul gene TUBA4A che codifica per un membro della famiglia delle alfa-tubuline. Gli studi funzionali dimostrano che le mutazioni sul gene TUBA4A hanno un effetto negativo sulla dinamica dei microtubuli dei motoneuroni primari.

Mediante l'analisi genetica di TUBA4A su 1355 casi sporadici di differenti origini, abbiamo individuato, in un paziente italiano, la variante p.Gly43Val causativa di una lieve affezione ai microtubuli del citoscheletro. Questi risultati preliminari suggeriscono un coinvolgimento del

gene TUBA4A nell'eziologia della forma sporadica di SLA (SALS). Per questo motivo abbiamo esteso lo studio ad una coorte di 1106 casi di SLA sporadiche di origine italiane, includendo 43 pazienti manifestanti in concomitanza demenza fronto-temporale (SLA-FTD). Lo screening mutazionale ha evidenziato quattro nuove varianti in eterozigosi in quattro pazienti. Tre sono mutazioni missenso (p.Val7Ile; p.Thr349Ser e p.Asp438Asn) che determinano una sostituzione amminoacidica su residui conservati nella scala evolutiva ("Online Resource"), mentre la quarta variante (c.226+4A>G) è localizzata sul sito donatore di splicing nel secondo introne.

In conclusione, lo studio identifica nuove mutazioni sul gene TUBA4A in pazienti SALS italiani. Tale mutazioni potrebbero avere effetti deleteri sulle funzioni della proteina, pertanto si rendono necessari ulteriori studi funzionali atti a determinare il loro ruolo all'interno del network dei microtubuli. I difetti dell'architettura del citoscheletro neuronale rappresentano uno dei meccanismi patogenetici alla base della neuro degenerazione, come già osservato nel caso di mutazioni sul gene PFN1.

Pensato V, Tiloca C, Corrado L, Bertolin C, Sardone V, Del Bo R, Calini D, Mandrioli J, Lauria G, Mazzini L, Querin G, Ceroni M, Cantello R, Corti S, Castellotti B, Soldà G, Duga S, Comi GP, Cereda C, Sorarù G, D'Alfonso S, Taroni F, Shaw CE, Landers JE, Ticozzi N, Ratti A, Gellera C, Silani V;

SLAGEN Consortium.

TUBA4A gene analysis in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: identification of novel mutations **J Neurol.** 2015 May;262(5):1376-8. doi: 10.1007/s00415-015-7739-y. Epub 2015 Apr 18. No abstract available. PMID: 25893256

Analisi morfofunzionale di biopsie muscolari di pazienti affetti da SLA

Abbiamo valutato in modo sistematico le biopsie muscolari di pazienti affetti da SLA ponendo particolare attenzione allo studio del metabolismo ossidativo mitocondriale. Abbiamo analizzato le biopsie muscolari mediante metodiche istochimiche, biochimiche e molecolari. L'analisi immunoistochimica ha dimostrato che nei pazienti affetti da SLA il reperto di fibre muscolari COX negative è frequente (50%). In un sottogruppo di pazienti il difetto ossidativo evidenziato era di una gravità tale da supportare l'ipotesi mitocondriale come patogenetica. In uno di questi pazienti è stata identificata una mutazione patogenetica nel gene CHCHD10.

Identificazioni di mutazioni patogenetiche nel gene CHCHD10 in pazienti affetti da SLA

In letteratura è stata descritta l'associazione della mutazione c.176C > T, p.Ser59Leu sul gene CHCHD10 con una forma familiare di SLA/FTD (Bannwarth et al., 2014). I pazienti che possiedono questa mutazione presentavano anche reperti patologici muscolari che denotavano una disfunzione mitocondriale consistente in fibre (COX)-negative per la citocromo c ossidasi, anomalie mitocondriali ultrastrutturali, una ridotta attività della catena respiratoria ed infine la presenza di delezioni multiple sul DNA mitocondriale (mtDNA).

Müller e colleghi hanno identificato la variante p.Arg15Leu (c.44C > A) in due casi di pazienti tedeschi affetti da SLA familiare e la variante p.Gly66Val (c.197C > A) in un paziente finlandese con una malattia familiare del motoneurone con un predominante coinvolgimento dei motoneuroni inferiori (Müller et al., 2014). Sempre in letteratura è riportato uno studio di screening per il gene CHCHD10 in una coorte di 80 pazienti francesi con forma sporadica di SLA-FTD, che individua in due soggetti indipendenti la mutazione p.Pro34Ser (Chausseot et al. 2014). Tali pazienti presentano anche ipoacusia sensorineurale che è tipicamente associata alla malattia mitocondriale benché non sia stata identificata nessuna disfunzione mitocondriale. In ultimo Johnson e colleghi hanno analizzato 85 pazienti indipendenti affetti da SLA familiare del nord America individuando in tre casi la presenza della mutazione p.Arg15Leu (Johnson et al., 2014).

Nel nostro studio abbiamo analizzato i dati clinici, biochimici e molecolari di un paziente italiano affetto da SLA sporadica associata ad una patologia muscolare mitocondriale causata da una nuova mutazione sul gene CHCHD10. L'analisi è stata condotta su una coorte di pazienti italiani con SLA sporadica al fine di supportare il modesto ma non trascurabile ruolo causativo delle mutazioni nel gene CHCHD10 nella patogenesi della malattia.

La premessa è rappresentata dal fatto che abbiamo riscontrati gravi deficienze COX in sette biopsie muscolari (7/50) di pazienti affetti da SLA sporadica (Crugnola et al., 2010). L'analisi di sequenza dei geni causativi della malattia è risultata negativa per tutti i pazienti ad eccezione di due. Un paziente risulta essere positivo per la mutazione p.Gln22Arg del gene SOD1 mentre l'altro possiede la variante p.Ala382Thr sul gene TDP43. Successivamente abbiamo analizzato la regione codificante CHCHD10 nei restanti 5 pazienti negativi ed uno di questi riporta una nuova transizione c.239C > T sull'esone 2 che comporta il cambiamento amminoacidico p.Pro80Leu (Fig. 1A). Questa variante è risultata essere assente in 286 cromosomi italiani utilizzati come controllo e nei database 1000 Genome and Exome Variant Server da noi consultati. La sostituzione amminoacidica cade in una regione altamente conservata tra le differenti specie (Fig. 1B) e la sostituzione con una leucina è predetta patogena dagli algoritmi dei siti di analisi utilizzati (MutationTaster, PMut and SIFT).

Il paziente, all'età di 25 anni, ha iniziato a manifestare una diffusa fascicolazione e una progressiva debolezza con atrofia ai muscoli della mano sinistra che nei successivi 8 mesi si è estesa ad entrambi i lati dei muscoli prossimali degli arti superiori. Due anni dopo l'esordio della malattia, l'esame neurologico dimostrava una grave diplegia brachiale simmetrica compatibile con la sindrome flail-arm, riflessi rotulei Achillei vivaci bilateralmente. Le analisi biochimiche ematiche presentavano un lieve aumento di concentrazione della creatina chinasi (255 U/l, valori di riferimento: 20–195 U/l). Anche la reattività agli anticorpi anti-gangliosidi e le analisi liquorali sono risultate normali. Le indagini elettrofisiologiche evidenziavano segni acuti e cronici di denervazione in tutti i muscoli degli arti superiori e potenziali evocati motori di ampiezza ridotta ai quattro gli arti. L'esame RMN dell'encefalo e del midollo cervicale non ha evidenziato anomalie. Il paziente, ancora in vita 8 anni dopo l'insorgenza della sintomatologia, ha manifestato una grave tetraparesi flaccida che ha richiesto una ventilazione notturna, ma non invasiva. L'esame su tessuto biopsico muscolare scheletrico ha evidenziato un deficit a carico della catena respiratoria (Fig. 1C). Inoltre abbiamo cercato eventuali riarrangiamenti sul DNA estratto da muscolo mediante PCR quantitativa, ma non sono emerse né delezioni né duplicazioni. I campioni di DNA dei parenti non erano accessibili ad eventuali indagini molecolari.

Abbiamo analizzato il gene CHCHD10 in 217 pazienti affetti da SLA sporadica, 11 dei quali (5.1%) sintomatici per demenza e disturbi comportamentali compatibili con la forma SLA-FTD. L'analisi di sequenza per CHCHD10 in 16 casi familiari di SLA e uno della forma familiare di SLA-FTD è risultata negativa. Abbiamo identificato la mutazione p.Pro80Leu anche in un paziente di 59 anni che presenta una diffusa fascicolazione ai quattro arti. Sei mesi dopo l'uomo manifestava un coinvolgimento bulbare, incoordinazione nei movimenti degli arti superiori distali, ipotrofia degli arti distali superiori e inferiori ed infine segni di degenerazione dei motoneuroni superiori. Le analisi MRI dell'encefalo e del midollo spinale risultavano negative, invece l'EEG effettuata nella fase precoce della malattia riportava grafoelementi puntuti nelle regioni posteriori. L'esame elettromiografico segnalava anomalie neurogene croniche ed acute senza cambiamenti miopatici. Le indagini sieriche biochimiche rilevavano un aumento nei livelli della creatina chinasi (320 U/l) e del colesterolo (238 mg/dl) (valori di riferimento: 125–200 mg/dl). La storia familiare del paziente risulta essere negativa per disordini neurologici ad eccezione della madre diagnosticata come affetta da malattia di Parkinson.

Una seconda paziente della nostra coorte è risultata positiva per la mutazione p.Pro34Ser, precedentemente descritta da Chausseot (Chausseot et al., 2014). Clinicamente all'età di 75 anni ha manifestato una forma bulbare di SLA e, un anno dopo, ha presentato una progressiva ipostenia agli arti superiori, necessitando anche di una ventilazione non-invasiva. Nei due anni successivi, la paziente ha richiesto l'ausilio di una sedia a rotelle ed una gastrostomia percutanea endoscopica (PEG). Non possediamo informazioni cliniche dei familiari della paziente.

Nel nostro studio abbiamo quindi individuato mutazioni a carico del gene CHCHD10 in tre pazienti italiani affetti dalla forma sporadica di SLA/FTD. Dai nostri risultati emerge un coinvolgimento di questo gene nel 1.4% dei pazienti italiani diagnosticati per una probabile o certa malattia del motoneurone. Nella nostra casistica CHCHD10 ha un'incidenza numericamente inferiore rispetto ad altri studi (2.3–3.5% della forma familiare di SLA e il 2.6% della forma sporadica).

E' particolarmente complesso definire in modo univoco le caratteristiche fenotipiche dei pazienti portatori del gene CHCHD10 mutato. Il principale segno clinico è un puro disordine del motoneurone accompagnato o da un deficit cerebellare o da una degenerazione fronto-temporale. La malattia può esordire dai 27 ai 78 anni d'età. I sintomi bulbari generalmente sono osservabili negli stadi precoci della patologia. Le caratteristiche cliniche possono differire anche in presenza della stessa mutazione. Infatti in due nostri pazienti, entrambi portatori della stessa sostituzione amminoacidica (p.Pro80Leu), la patologia è insorta a età differenti (28 nel primo paziente e 59 nel secondo); inoltre anche le caratteristiche fenotipiche sono diverse: un paziente manifestava la sindrome di flail-arm, mentre l'altro presentava una forma bulbare di SLA. Analogamente la mutazione p.Pro34Ser è stata descritta in due pazienti francesi affetti da SLA/FTD causativa di una forma quasi pura di malattia del motoneurone con un ritardo di 10 anni rispetto ai nostri pazienti (Chausseot et al., 2014).

Recentemente in letteratura è stata riportata la scoperta di due mutazioni in cis a carico del gene CHCHD10 (p.Arg15Ser e p.Gly58Arg) in due membri di una famiglia portoricana con all'esordio una pura miopatia mitocondriale già precedentemente descritta da Heiman-Patterson et al. (1997) (Ajroud-Driss et al. 2014). La biopsia muscolare presentava ragged red fibers, alterazioni delle creste mitocondriali ed un grave deficit della catena respiratoria tutte classiche caratteristiche di un coinvolgimento mitocondriale. In questi pazienti non è stata individuata né una patologia da motoneurone né demenza benché del paziente più anziano (63 anni) non vi fossero informazioni cliniche aggiornate.

Abbiamo precedentemente descritto il caso di un paziente affetto da un deficit della catena respiratoria muscolare associata a delezioni multiple sul mtDNA in una famiglia affetta da miopatia mitocondriale. La patologia è insorta in età infantile ed è causata da mutazioni a carico del gene GFER codificante per una proteina cardine del sistema di trasporto della catena respiratoria (Di Fonzo et al., 2009). Questo meccanismo ha la funzione di importare altri membri della famiglia delle proteine cisteina-x9-cisteina (al quale appartiene anche CHCHD10) all'interno dello spazio intermembrana del mitocondrio, contribuendo all'assemblaggio del complesso della catena respiratoria (Longen et al., 2009).

Tutte le mutazioni ad oggi descritte cadono sull'esone due del gene CHCHD10 in residui altamente conservati di differenti domini proteici (Fig. 1A). Il sequenziamento dell'esone 2 potrebbe essere un rapido e poco costoso saggio di screening preliminare, sebbene non possiamo escludere un coinvolgimento di altri esoni. Le mutazioni sembrerebbero agire mediante un meccanismo di "toxic gain of function", ma ad oggi gli studi effettuati sulla maggior parte delle mutazioni non garantiscono la certezza di questa ipotesi. Infatti anche un parziale knockdown (40–50%) del trascritto del gene CHCHD10 in cellule HeLa mediante l'utilizzo di siRNA comporta un ridotto contenuto di ATP e una diminuzione dell'attività di COX (Martherus et al., 2010).

La proteina CHCHD10 è espressa ubiquitariamente ed in particolare è abbondante in quei tessuti ad alto dispendio energetico come il cuore, il tessuto muscolare scheletrico e il fegato. La proteina è stata individuata anche nell'encefalo in toto ma non in specifiche subregioni del sistema nervoso centrale nè nel midollo spinale.

La malattia del motoneurone raramente è stata descritta in pazienti portatori di mutazioni su geni codificanti per proteine mitocondriali (Hirano et al., 2008; Ronchi et al., 2012). Viceversa una disfunzione mitocondriale è correlata alla patogenesi sia della forma sporadica sia di quella familiare di SLA (Cozzolino et al., 2013; Tafuri et al., 2015).

La scoperta delle mutazioni sul gene CHCHD10 in casi sporadici e familiari di SLA/SLA-FTD rinforza l'ipotesi che la funzionalità mitocondriale è critica per la sopravvivenza dei motoneuroni spinali e corticali. Lo screening genetico per le mutazioni di CHCHD10 nella nostra coorte di pazienti affetti da malattia del motoneurone pura o complessa ha contribuito alla migliore comprensione di questi meccanismi.

Ronchi D, Riboldi G, Del Bo R, Ticozzi N, Scarlato M, Galimberti D, Corti S, Silani V, Bresolin N, Comi GP.

CHCHD10 mutations in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.

Brain. 2015 Aug;138(Pt 8):e372. doi: 10.1093/brain/awu384. Epub 2015 Jan 8. PubMed PMID: 25576308.

Analisi del gene TBK1

Abbiamo partecipato ad uno studio multicentrico su scala mondiale di sequenziamento dell'intero esoma su un'ampia coorte di pazienti affetti da SLA (nello studio sono state confrontate le varianti mutazionali osservate in 2874 pazienti SLA con le varianti osservate in 6405 controlli sani). Tale analisi ha permesso di identificare il gene TBK1 (codificante la chinasi 1-TANK) come causativo della SLA. TBK1 lega e fosforila un numero di proteine coinvolte nell'immunità innata e nell'autofagia, incluse l'optineurina (OPTN) e p62 (SQSTM1/sequestosoma), entrambe implicate nella SLA. Da questi dati emerge che il pathway autofagico concorre alla patogenesi della SLA e risulta essere un possibile bersaglio terapeutico. Successivamente abbiamo analizzato il gene TBK1 in una coorte di casi sporadici di diverse origini, ma nessuna mutazione patogenetica è stata fino ad ora individuata.

Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, Couthouis J, Lu YF, Wang Q, Krueger BJ, Ren Z, Keebler J, Han Y, Levy SE, Boone BE, Wimbish JR, Waite LL, Jones AL, Carulli JP, Day-Williams AG, Staropoli JF, Xin WW, Chesi A, Raphael AR, McKenna-Yasek D, Cady J, Vianney de Jong JM, Kenna KP, Smith BN, Topp S, Miller J, Gkazi A; FALS Sequencing Consortium, Al-Chalabi A, van den Berg LH, Veldink J, Silani V, Ticozzi N, Shaw CE, Baloh RH, Appel S, Simpson E, Lagier-Tourenne C, Pulst SM, Gibson S, Trojanowski JQ, Elman L, McCluskey L, Grossman M, Shneider NA, Chung WK, Ravits JM, Glass JD, Sims KB, Van Deerlin VM, Maniatis T, Hayes SD, Ordureau A, Swarup S, Landers J, Baas F, Allen AS, Bedlack RS, Harper JW, Gitler AD, Rouleau GA, Brown R, Harms MB, Cooper GM, Harris T, Myers RM, Goldstein DB.

Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways.

Science. 2015 Mar 27;347(6229):1436-41. doi: 10.1126/science.aaa3650

MALATTIE DA ACCUMULO DI GLICOGENO

1) Glicogenosi di tipo 2

La glicogenosi di tipo II (Glycogen Storage Disease type 2, GSDII o malattia di Pompe, OMIM *606800) è una patologia progressiva, spesso fatale, causata da una riduzione dell'attività dell'alfa-1,4-glucosidasi acida (maltasi acida), un enzima lisosomiale che

idrolizza il glicogeno in glucosio. Questo deficit determina una miopatia prossimale con accumulo di glicogeno nel fegato, nel cuore e nel muscolo scheletrico. Alla base della GSDII vi sono mutazioni recessive nel gene *GAA*.

Nuovi aspetti che sono stati affrontati in due studi collaborativi hanno riguardant la specificità dei dati precoci di Risonanza magnetica muscolare e la problematica del delay diagnostico.

Pichiecchio A, Berardinelli A, Moggio M, Rossi M, Balottin U, Comi GP, Bastianello S.

Asymptomatic Pompe disease: Can muscle MRI facilitate diagnosis?

Muscle Nerve. 2015 Oct 16. doi: 10.1002/mus.24936. [Epub ahead of print] No abstract available. PMID: 26474166

Musumeci O, la Marca G, Spada M, Mondello S, Danesino C, Comi GP, Pegoraro E, Antonini G, Marrosu G, Liguori R, Morandi L, Moggio M, Massa R, Ravaglia S, Di Muzio A, Filosto M, Tonin P, Di Iorio G, Servidei S, Siciliano G, Angelini C, Mongini T, Toscano A;

Italian GSD II group.

LOPED study: looking for an early diagnosis in a late-onset Pompe disease high-risk population.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015 Mar 17. pii: jnnp-2014-310164. doi: 10.1136/jnnp-2014-310164. [Epub ahead of print] PMID: 25783438

2) Enzima Deramificante

La glicogenosi di tipo III (GSDIII) è una rara malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva del metabolismo del glicogeno caratterizzata da accumulo di glicogeno nei tessuti, principalmente in fegato e muscolo scheletrico. E' causata da mutazioni nel gene *AGL* che codifica per l'enzima deramificante (GDE). La malattia in genere si manifesta nell'infanzia con epatomegalia, ritardo di crescita e crisi ipoglicemiche, mentre durante l'età adulta si presenta come miopatia. Il nostro laboratorio studia da anni questa patologia attraverso il dosaggio del contenuto di glicogeno dei tessuti, il dosaggio dell'attività dell'enzima deramificante e la diagnosi genetica. Abbiamo anche sviluppato un modello murino per la glicogenosi di tipo III che e' stato ampiamente caratterizzato e che presenta le caratteristiche essenziali della malattia: epatomegalia, accumulo di glicogeno in tutti i tessuti, principalmente fegato e muscolo scheletrico, e intolleranza all'esercizio fisico. La caratterizzazione del modello animale e' stata pubblicata su *BBA-Molecular basis of disease*.

Il lavoro su questo modello sta proseguendo con la somministrazione di due tipi diversi di dieta iperproteica. Infatti alcuni pazienti hanno riportato miglioramento della sintomatologia muscolare in seguito all'assunzione di dieta iperproteica. Stiamo somministrando una dieta ad elevato contenuto proteico e una ad altissimo contenuto proteico. Entrambi i trattamenti hanno mostrato un miglioramento della funzionalità muscolare, anche se con grado diverso, valutata come capacità di correre sul treadmill.

Stiamo lavorando anche sul fronte della terapia genica in collaborazione con il Dott. Federico Mingozzi del Genethon di Parigi. Abbiamo testato i primi costrutti e due dei costrutti testati sono in grado di esprimere la proteina veicolata in vivo.

La collaborazione con il Prof. Dan Theodorescu dell'Università del Colorado ha portato alla pubblicazione di uno studio sull'attività di oncosoppressore del gene *AGL* nel tumore della vescica nel quale e' stata considerata l'associazione tra variabili cliniche con prognosi avversa e livelli di espressione del gene *AGL*. Da questo studio e' emerso che la sintesi di acido ialuronico mediata da dal gene *HAS2* (hyaluronic acid synthase 2) e' un fattore importante per la crescita del cancro della vescica quando associato a bassa espressione del gene *AGL*. I

dati raccolti costituiscono un importante passo avanti per la diagnosi e cura personalizzata in campo oncologico.

Guin S, Ru Y, Agarwal N, Ritterson Lew C, Owens C, Comi GP, Theodorescu D.
Loss of glycogen debranching enzyme AGL drives bladder tumor growth via induction of hyaluronic acid synthesis.
Clin Cancer Res. 2015 Oct 21. pii: clincanres.1706.2015. [Epub ahead of print] PMID: 26490312 **I.F. 8.722**

Presentazioni orali a congressi nazionali e internazionali:

Serena Pagliarani. 211th ENMC International Workshop “Development of diagnostic criteria and management strategies for McArdle Disease and related rare glyco(genolytic) disorders to improve standards of care”, 17-19 Aprile 2015, Naarden, The Netherland..

Serena Pagliarani. 19° Convegno dell’Associazione Italiana Glicogenosi, 20-22 Novembre 2015, Rimini, Italia.

3) Malattie da corpi poliglucosanici

Recentemente, mutazioni a carico del gene Glicogenin1 (GYG1) sono state descritte causare una miopatia progressiva il cui hallmark istologico e’ l’accumulo di corpi poliglucosanici. La revisione delle biopsie che presentano corpi poliglucosanici e ancora senza diagnosi ha portato all’identificazione di una famiglia affetta da deficit di glicogenina. La famiglia e’ seguita dal nostro centro da piu’ di 30 anni.

I dati raccolti hanno permesso di delineare meglio il decorso di questa patologia che presenta una notevole eterogeneita’ dei sintomi. I due affetti della famiglia descritta hanno avuto un decorso molto diverso: una sorella e’ ancora autosufficiente, mentre l’altra non lo e’ piu’ da molti anni. In particolare, la risonanza muscolare ha evidenziato quali muscoli vengono risparmiati anche in un caso cosi’ compromesso come quello descritto.

La malattia da accumulo di corpi poliglucosanici (APBD) è una rara malattia recessiva ad esordio adulto dovuta al deficit dell’enzima ramificante il glicogeno (GBE1). E’ caratterizzata da disfunzione urinaria, neuropatia periferica, paraplegia spastica con perdita della sensibilità pressoria e di vibrazione e disordini cognitivi. Il nostro laboratorio si occupa sia della diagnosi biochimica, con il dosaggio dell’attività enzimatica, sia della diagnosi genetica.

Abbiamo studiato una famiglia italiana con tre fratelli affetti da APBD con manifestazioni eterogenee nei tre soggetti. L’analisi dei dati clinici, istologici e di neuroimaging ha condotto all’ipotesi di APBD che e’ stata confermata da studi biochimici e genetici. Abbiamo individuato una nuova mutazione nel gene GBE1 mentre l’altra mutazione era gia’ stata precedentemente descritta. Nonostante la presentazione clinica all’esordio della malattia fosse eterogenea, tutti i fratelli presentavano lo stesso pattern di danno neurologico se studiati con neuroimaging. Questi dati hanno permesso di delineare meglio la sintomatologia che puo’ essere presente nei soggetti con APBD agli esordi della patologia.

Colombo I, Pagliarani S, Testolin S, Cinnante CM, Fagiolari G, Ciscato P, Bordoni A, Fortunato F, Magri F, Previtali SC, Velardo D, Sciacco M, Comi GP, Moggio M.
Longitudinal follow-up and muscle MRI pattern of two siblings with polyglucosan body myopathy due to glycogenin-1 mutation.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015 Jul 22. pii: jnnp-2015-310553. doi: 10.1136/jnnp-2015-310553. [Epub ahead of print] No abstract available. PMID: 26203156 **I.F. 6.807**

Colombo I, Pagliarani S, Testolin S, Salsano E, Napoli LM, Bordoni A, Salani S, D'Adda E, Morandi L, Farina L, Magri F, Riva M, Prella A, Sciacco M, Comi GP, Moggio M.
Adult polyglucosan body disease: clinical and histological heterogeneity of a large Italian family. **Neuromuscul Disord.** 2015 May;25(5):423-8. doi: 10.1016/j.nmd.2015.01.015. Epub 2015 Feb 7. PMID: 25728520. **I.F. 2.638**

DISTROFIE MUSCOLARI DI DUCHENNE E BECKER, DISTROFIE MUSCOLARI E MIOPATIE CONGENITE

1) Patogenesi delle distrofinopatie e sperimentazioni cliniche nelle patologie neuromuscolari

Il nostro centro è un importante riferimento per la diagnosi e il follow up di pazienti affetti da distrofinopatie e dispone di numerosi dati genetici, clinici e morfologici raccolti nel corso degli anni. Abbiamo preso parte alla realizzazione di studi finalizzati alla definizione patogenetica della Distrofia Muscolare di Duchenne.

Le biopsie muscolari di 40 pazienti affetti da DMD di età compresa fra 1 e 10 anni, raccolte presso il nostro Istituto, sono state analizzate e confrontate. Questo studio, oltre che fornire una descrizione morfologica muscolare dell'evoluzione durante la storia naturale della malattia, rappresenta anche un riferimento per l'utilizzo della biopsia muscolare come strumento di valutazione di efficacia delle terapie sperimentali. In particolare è stato evidenziato che la sostituzione fibrotica del muscolo si acuisce all'età di 6 e 7 anni.

Uno studio multicentrico condotto su una corte di 178 pazienti affetti da DMD ha permesso di riscontrare la presenza di modificatori genetici di malattia, esiste infatti una correlazione fra l'età di esordio di cardiomiopatia dilatativa e diversi polimorfismi dei geni SPP1 e LTBP4, nel dettaglio presentano un effetto protettivo l'allele dominante G del polimorfismo rs28357094 nella regione promotore del gene SPP1 e l'allele recessivo T di rs10880 del gene LTBP4.

E' proseguita la partecipazione attiva a sperimentazioni cliniche Nazionali ed Internazionali in pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD). Sono attualmente in corso le seguenti sperimentazioni che vedono coinvolti un totale di 17 pazienti: Fase di estensione (PTC019) e fase in aperto (PTC020) per la somministrazione di Ataluren, molecola in grado di promuovere il reading through di mutazioni di stop codon del gene della distrofina; fase di estensione dello studio per sicurezza, tollerabilità ed efficacia del farmaco Givinostat, molecola che agisce come inibitore dell'istone deacetilasi e prosecuzione della sperimentazione con Tadalafil, farmaco donatore di ossido nitrico.

Abbiamo collaborato inoltre nello studio clinico promosso dal Prof. Jerry Mendell presso il Nationwide Children's Hospital di Columbus in Ohio condotto in pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Becker trattati con somministrazioni intramuscolari di virus adenoassociati, vettori del gene della follistatina, molecola che agisce inibendo l'attività della miostatina. La metà dei soggetti trattati (3/6) ha presentato un miglioramento delle performances motorie e gli studi bioptici su campioni muscolari hanno evidenziato riduzione della fibrosi e incremento delle dimensioni delle fibre. Tali risultati sono promettenti per il potenziale impiego di tale terapia in modo trasversale nelle distrofie muscolari.

Per quanto riguarda le sperimentazioni terapeutiche finalizzate alla cura delle patologie neuromuscolari, abbiamo partecipato alla realizzazione degli studi preclinici su modelli murini e primati per l'utilizzo della terapia genica nell'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) progettati e realizzati nei laboratori del Prof Brian Kaspar al Nationwide Children's Hospital di Columbus (Ohio). Tali studi hanno dimostrato l'efficacia di utilizzare i virus adenoassociati (AAV) come vettori per il trasporto del gene SMN nei motoneuroni. La somministrazione di AAV

per via sistemica si era rivelata sicura ed efficace nel garantire l'espressione del transgene e il miglioramento clinico del modello murino. E' attualmente in corso la sperimentazione su uomo di tale metodica. Ulteriori indagini precliniche hanno testato la somministrazione di AAV direttamente nel liquido cefalorachidiano. Anche in questo caso il trattamento ha determinato l'espressione del transgene a livello del midollo spinale sia dei modelli murini che dei primati. Nel modello murino è stata dimostrato inoltre un importante miglioramento del fenotipo.

Infine abbiamo collaborato alla raccolta e revisione dei dati derivanti dall'esperienza nella gestione e nel trattamento dei pazienti, condotta dal comitato TREAT-NMD allo scopo di elucidare i criteri per la programmazione e la realizzazione delle sperimentazioni cliniche per le patologie neuromuscolari.

Peverelli L, Testolin S, Villa L, D'Amico A, Petrini S, Favero C, Magri F, Morandi L, Mora M, Mongini T, Bertini E, Sciacco M, Comi GP, Moggio M.

Histologic muscular history in steroid-treated and untreated patients with Duchenne dystrophy.

Neurology. 2015 Nov 24;85(21):1886-93. doi: 10.1212/WNL.0000000000002147. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26497992

Linea 6

Barp A, Bello L, Politano L, Melacini P, Calore C, Polo A, Vianello S, Sorarù G, Semplicini C, Pantic B, Taglia A, Picillo E, Magri F, Gorni K, Messina S, Vita GL, Vita G, Comi GP, Ermani M, Calvo V, Angelini C, Hoffman EP, Pegoraro E.

Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy.

PLoS One. 2015 Oct 29;10(10):e0141240. doi: 10.1371/journal.pone.0141240. eCollection 2015. PMID: 26513582

Linea 6

Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP, Alfano LN, Berry K, Meadows E, Lewis S, Braun L, Shontz K, Rouhana M, Clark KR, Rosales XQ, Al-Zaidy S, Govoni A, Rodino-Klapac LR, Hogan MJ, Kaspar BK.

A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy.

Mol Ther. 2015 Jan;23(1):192-201. doi: 10.1038/mt.2014.200. Epub 2014 Oct 17.

Meyer K, Ferraiuolo L, Schmelzer L, Braun L, McGovern V, Likhite S, Michels O, Govoni A, Fitzgerald J, Morales P, Foust KD, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK.

Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and nonhuman primates.

Mol Ther. 2015 Mar;23(3):477-87

Heslop E, Csimma C, Straub V, McCall J, Nagaraju K, Wagner KR, Caizergues D, Korinthenberg R, Flanigan KM, Kaufmann P, McNeil E, Mendell J, Hesterlee S, Wells DJ, Bushby K;

TACT. The TREAT-NMD advisory committee for therapeutics (TACT): an innovative de-risking model to foster orphan drug development.

Orphanet J Rare Dis. 2015 Apr 23;10:49. doi: 10.1186/s13023-015-0258-1. PubMed PMID: 25902795; PubMed Central PMCID: PMC4417237.

<https://clinicaltrials.gov>

1) Distrofie Muscolari dei cingoli

Lo studio di caratterizzazione genotipica e fenotipica della corte di pazienti affetti da distrofie muscolari dei cingoli è proseguito sostenuto da Progetto Telethon. In particolare l'approfondimento di una sottopopolazione di 27 pazienti senza diagnosi molecolare tramite analisi immunoistochimica su biopsia muscolare ha permesso di individuare un soggetto con assenza della proteina alfa-distroglicano, il successivo sequenziamento del gene ISPD (isoprenoid synthase domain containing) ha portato alla scoperta di due mutazioni in eterozigosi dello stesso. Le mutazioni di ISPD rappresentano l'1% delle cause di distrofie muscolari dei cingoli.

Magri F, Colombo I, Del Bo R, Previtali S, Brusa R, Ciscato P, Scarlato M, Ronchi D, D'Angelo MG, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

ISPD mutations account for a small proportion of Italian Limb Girdle Muscular Dystrophy cases **BMC Neurol.** 2015 Sep 24;15(1):172. doi: 10.1186/s12883-015-0428-8. PMID: 26404900

3) Distrofie muscolari congenite e miopatie congenite

Nel corso dell'anno è stata approfondita la raccolta dei dati clinici della casistica di pazienti affetti da Distrofie Congenite seguiti presso il nostro Istituto. In collaborazione con i centri di riferimento per le patologie neuromuscolari in Italia abbiamo partecipato alla realizzazione dello studio di popolazione di 336 pazienti affetti da Distrofia Muscolare Congenita. Lo studio ha permesso di fornire una completa caratterizzazione epidemiologica, genotipica e fenotipica delle sottocategorie di questa patologia.

Il nostro Ospedale rappresenta inoltre un punto di riferimento anche per la diagnosi e la cura delle Miopatie Congenite, un gruppo di rare patologie muscolari, familiari o sporadiche, estremamente eterogeneo, determinate da mutazioni a carico di varie proteine strutturali della fibra muscolare. Aspetti istologici specifici ne consentono la seguente classificazione: la Miopatia Central-Core, la Miopatia Nemalinica, la Miopatia Centronucleare, la Miopatia Minicore, la Miopatia Miofibrillare e la Miopatia con Disproporzione delle Fibre.

Un gruppo di 54 pazienti con diagnosi istologica di Miopatia Centronucleare è stato studiato a livello nazionale fornendo una caratterizzazione e correlazione genotipo-fenotipo, evidenziando la distribuzione delle frequenze dei diversi geni mutati in Italia ed elaborando un algoritmo diagnostico per indirizzare le indagini genetiche di questo gruppo di patologie.

Graziano A, Bianco F, D'Amico A, Moroni I, Messina S, Bruno C, Pegoraro E, Mora M, Astrea G, Magri F, Comi GP, Berardinelli A, Moggio M, Morandi L, Pini A, Petillo R, Tasca G, Monforte M, Minetti C, Mongini T, Ricci E, Gorni K, Battini R, Villanova M, Politano L, Gualandi F, Ferlini A, Muntoni F, Santorelli FM, Bertini E, Pane M, Mercuri E.

Prevalence of congenital muscular dystrophy in Italy: a population study.

Neurology. 2015 Mar 3;84(9):904-11. doi: 10.1212/WNL.0000000000001303. Epub 2015 Feb 4.

PMID: 25653289

Fattori F, Maggi L, Bruno C, Cassandrini D, Codemo V, Catteruccia M, Tasca G, Berardinelli A, Magri F, Pane M, Rubegni A, Santoro L, Ruggiero L, Fiorini P, Pini A, Mongini T, Messina S, Brisca G, Colombo I, Astrea G, Fiorillo C, Bragato C, Moroni I, Pegoraro E, D'Apice MR, Alfei E, Mora M, Morandi L, Donati A, Evilä A, Vihola A, Udd B, Bernasconi P, Mercuri E, Santorelli FM, Bertini E, D'Amico A.

Centronuclear myopathies: genotype-phenotype correlation and frequency of defined genetic forms in an Italian cohort.

J Neurol. 2015 Jul;262(7):1728-40. doi: 10.1007/s00415-015-7757-9. Epub 2015 May 10. PMID: 25957634.

CANALOPATIE MUSCOLARI

Le canalopatie muscolari sono caratterizzate da un'alterata eccitabilità della membrana muscolare e si dividono in miotonie non-distrofiche e paralisi periodiche. Sono causate da mutazioni nei geni *CLCN1*, *SCN4A*, *CACNA1S* e *KCNJ2* che codificano rispettivamente per i canali del cloro, del sodio, del calcio e del potassio muscolari. Esordiscono principalmente nelle prime due decadi di vita e sono caratterizzate da rigidità muscolare, dolore, debolezza e fatica. Negli ultimi anni abbiamo caratterizzato un'ampia coorte di pazienti affetti sia da miotonie non-distrofiche che da paralisi periodica. Nel nostro laboratorio le indagini genetiche sono eseguite sia come completamento dell'iter diagnostico sia come aspetto di pura ricerca sulle cause genetiche delle canalopatie muscolari nella popolazione italiana. Relativamente al canale del cloro muscolo specifico (*CLCN1*), l'attività di diagnostica, corredata da studi funzionali e di espressione in sistemi in vitro per casi selezionati, ha permesso di collezionare in pochi anni una coorte di oltre 80 soggetti Thomsen/Becker.

La nostra coorte consta, inoltre, di 25 soggetti affetti da paralisi periodica (paralisi periodica ipokaliemica, paralisi periodica iperkaliemica e sindrome di Andersen-Tawil) e di 33 pazienti affetti da miotonia del canale del sodio.

Questi studi sono spesso condotti in collaborazione con altri gruppi che si occupano dello studio delle canalopatie muscolari.

Manoscritto sottomesso a Neurology:

- Translational approach to address therapy in myotonia permanens due to a new *SCN4A* mutation. Jean-François Desaphy, Roberta Carbonara, Adele D'Amico, Anna Modoni, Julien Roussel, Paola Imbrici, Serena Pagliarani, Sabrina Lucchiari, Mauro Lo Monaco, Diana Conte Camerino

Abstract presentati a congressi internazionali:

- Prevalence study of muscle channelopathies in Italy. Maggi L, Lo Monaco M, Portaro S, G. Meola, JF Desaphy, Lucchiari S, Pagliarani S, Ulzi G, Bernasconi P, R Brugnoli, P Imbrici, G Comi, R Mantegazza, F Gerardi, M Trojano, D'Amico A, Pegoraro E, Politano L, Mongini T, Vercelli L, Siciliano G, Ricci G, Conte-Camerino D, A Toscano and VA Sansone on behalf of the Italian Network for Muscle Channelopathies

LABORATORIO DI NEUROIMMUNOLOGIA CLINICA

Prof. Giacomo P. Comi
Dr. Domenica Saccomanno

Neurologo
Biologa Nutrizionista

Laboratorio di Neuroimmunologia: Certificazione di qualità INSTAND (europeo) anno 2015 inerente la diagnostica delle neuropatie disimmuni e sindromi paraneoplastiche.

Diagnostica:

Il Laboratorio di Neuroimmunologia si occupa del dosaggio dei principali anticorpi associati a neuropatie periferiche (NP) disimmuni quali: polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante (CIDP), neuropatia motoria multifocale (MMN), neuropatia sensitivo-motoria demielinizzante associata a gammopatia monoclonale IgM, sindrome di Guillain Barré (GBS), sue varianti e la sindrome di Miller Fisher (MFS). Si occupa altresì del dosaggio di anticorpi anti-neurone/cervelletto associati alle sindromi neurologiche paraneoplastiche quali: Sindrome di Stiff-person, Atassia cerebellare, Encefalite limbica, Encefalomielite e la Lambert-Eaton Myasthene- Syndrom (LEMS).

Ricerca:

Studio di collaborazione tra il Dip. Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Sezione di Neuroscienze, Centro Dino Ferrari, Università degli Studi di Milano: Dott.ssa Domenica Saccomanno, Dott.ssa Francesca Magri, Prof. Giacomo Pietro Comi e il Centro per la Prevenzione e Diagnosi della Malattia Celiaca della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano: Dott.ssa Carolina Tomba, Dott.ssa Leda Roncoroni, Dott. Luca Elli, Prof.ssa Maria Teresa Bardella.

STUDIO CLINICO SULLA PRESENZA DI ANTICORPI ANTI-GANGLIOSIDI NEI PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA CELIACA ED EFFETTI DELLA DIETA SENZA GLUTINE

La malattia celiaca (MC) è un'enteropatia autoimmune (Th1) scatenata dall'ingestione di glutine, in particolare da alcune sue componenti proteiche, chiamate gliadine. La diagnosi si basa sulla presenza di autoanticorpi circolanti (anti transglutaminasi tipo 2), conferma biotica (danno atrofico della mucosa intestinale) e risposta alla dieta senza glutine (DSG).

Al momento l'unica terapia consiste nel seguire per tutto l'arco della vita una DSG al fine di proteggere il paziente dall'insorgenza di complicanze, associate appunto alla MC non trattata. Le complicanze neurologiche sono state riportate in letteratura in circa il 10% dei pazienti affetti da MC e possono interessare il sistema nervoso centrale e quello periferico, con neuropatie periferiche (NP) disimmuni associate alla presenza nel siero dei pazienti di anticorpi anti-gangliosidi.

Anticorpi anti-gangliosidi sono stati trovati in pazienti celiaci con neuropatia ed altre manifestazioni neurologiche associate, ma nessuno degli studi finora riportati in letteratura ha indagato la presenza degli anticorpi anti-GM3, GD3, GT1a e Sulfatide.

L'indagine degli anticorpi anti-gangliosidi ed anti-sulfatide di classe IgG, IgA, IgM, durante una dieta contenente glutine ha permesso di evidenziare nel siero dei pazienti adulti celiaci con e senza disturbi neurologici del nostro studio, la presenza di anticorpi anti-sulfatide IgG (36%) ed anticorpi anti-sulfatide IgA (19%) in pazienti senza disturbi neurologici.

Gli anticorpi anti-sulfatide IgG si sono negativizzati in tutti i pazienti trattati mentre la reattività IgA (14%) è risultata presente durante la DSG in alcuni pazienti celiaci con e senza disturbi neurologici. Sono stati osservati anche anticorpi anti-sulfatide, anti-GM1 ed anti-GM2 IgM in 2 pazienti trattati senza disturbi neurologici ed altre malattie autoimmuni (MA). Nessuno dei due pazienti riferiva la comparsa di disturbi neurologici associati agli

autoanticorpi rilevati di classe IgM, come la neuropatia demielinizzante sensitivo motoria e la neuropatia motoria multifocale (NMM).

La presenza di anticorpi anti-sulfatide IgA ed autoanticorpi IgM in pazienti celiaci trattati potrebbe indicare una maggiore suscettibilità a sviluppare una risposta autoimmune indipendente dal glutine mentre la scomparsa della reattività anti-sulfatide IgG in tutti i pazienti suggerisce un possibile legame tra il glutine e gli autoanticorpi IgG.

LABORATORIO CELLULE STAMINALI NEURALI

Responsabile:

Prof.ssa Stefania Corti

Medici:

Dott. Giulietta Riboldi

Dott. Irene Favarelli

Biologi:

Dott. Sabrina Salani

Dott. Chiara Simone

Dott. Federica Rizzo

Dott. Monica Bucchia

Dott. Valeria Parente

Biotechnologi

Dott. Monica Nizzardo

Dott. Agnese Ramirez

Dott. Mafalda Rizzuti

Dott. Paola Rinchetti

Dott. Sara Dametti

L'attività di ricerca del Laboratorio di Cellule Staminali Neurali è concentrata sullo sviluppo di strategie terapeutiche cellulari e molecolari per patologie neurodegenerative tra cui malattie del motoneurone ad esordio infantile – Atrofia Muscolare Spinale (SMA) e Atrofia Muscolare Spinale con Distress Respiratorio (SMARD1) – o adulto come la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e neuropatie ereditarie come la Malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A).

La riprogrammazione di cellule somatiche adulte in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) offre la possibilità di ottenere cellule paziente specifiche, utili come modello *in vitro* per lo studio dei meccanismi patogenetici e come sorgente cellulare per strategie di tipo cellulo-mediato. Il trapianto di cellule staminali può rappresentare un possibile approccio terapeutico per le malattie neurodegenerative ed in particolare per le malattie del motoneurone.

Nel nostro laboratorio sono inoltre oggetto di studio strategie di terapia genica con vettori adeno-associati (AAV) o di terapia molecolare con oligonucleotidi in particolare con chimica morfolino.

Sono qui presentati in sintesi i risultati ottenuti dalle nostre ricerche nel 2015.

La terapia genica migliora il fenotipo patologico nel modello murino di distrofia muscolare spinale con distress respiratorio di tipo 1 (SMARD1) (Nizzardo et al., 2015)

La distrofia muscolare spinale con distress respiratorio di tipo 1 (SMARD1) è una malattia autosomica recessiva del motoneurone che affligge bambini in età pediatrica. E' causata da mutazioni nel gene IGHMBP2 (11q13) e al momento non vi sono cure disponibili. Recentemente, è stato dimostrato che la terapia genica mediata da virus adeno-associati serotipo 9 (AAV-9) è in grado di migliorare il fenotipo patologico in modelli animali con altre patologie del motoneurone, tra cui l'atrofia muscolare spinale 5q (SMA); ad oggi, trial clinici con tale strategia sono già in corso. In questo lavoro, abbiamo dimostrato la reversione del fenotipo patologico nel modello murino di SMARD1 in seguito ad iniezione sistemica del vettore AAV9 codificante il gene umano *wild-type* IGHMBP2, al fine di sostituire il gene difettivo.

Questo trattamento in particolare ha mostrato un miglioramento della funzionalità motoria, della fisiologia neuromuscolare, della sopravvivenza (450% incremento della vita media) e delle caratteristiche patologiche nel sistema nervoso centrale, nei muscoli e nel cuore nel modello murino della malattia. Per testare questa strategia in un modello umano, abbiamo veicolato il gene umano IGHMBP2 *wild-type* in motoneuroni derivanti da cellule staminali pluripotenti indotte riprogrammate da fibroblasti di pazienti SMARD1. Queste cellule hanno dimostrato in cultura una maggior sopravvivenza e una maggior lunghezza assonale.

I nostri dati supportano il potenziale traslazionale della terapia genica mediata da AAV9 per la SMARD1, ponendo delle valide basi per futuri trial clinici nell'uomo.

- Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Salani S, Dametti S, Rinchetti P, Del Bo R, Foust K, Kaspar BK, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Gene therapy rescues disease phenotype in a spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1) mouse model. *Science Advances*. 2015.

Sviluppo di una terapia per l'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) attraverso nuovi approcci terapeutici mediati da RNA (Nizzardo et al., 2015)

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) 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. È dovuta a mutazioni a livello del gene Survival Motor Neuron 1 (SMN1), che causano la diminuzione dei livelli cellulari della proteina SMN da esso codificata. Questa proteina svolge un ruolo fondamentale nella sopravvivenza dei motoneuroni: una quantità insufficiente di SMN ha come conseguenza la degenerazione dei motoneuroni. Nel genoma umano è presente un gene omologo a SMN1, il gene SMN2, che

differisce da SMN1 per pochi nucleotidi. In particolare, la transizione nucleotidica C-T nell'esone 7 causa un'alterazione di splicing che comporta l'esclusione dell'esone 7 nella maggior parte dei trascritti (SMN Δ 7). Solo il 10% della proteina codificata da SMN2 è full length e funzionante; il rimanente 90% consiste in una forma proteica tronca e funzionalmente difettosa. Non esiste una terapia della SMA, quindi la ricerca di nuove strategie terapeutiche è fondamentale. Ad oggi, non vi sono cure disponibili per tale malattia. Gli oligonucleotidi antisenso (ASO) rappresentano una possibile strategia terapeutica per la SMA, aumentando i livelli di SMN codificato dal gene paralogo SMN2.

In questo studio abbiamo testato tre differenti possibili approcci in cellule umane staminali pluripotenti indotte riprogrammate da fibroblasti di pazienti SMA e motoneuroni: 1) morfolino antisenso indirizzato sull'ISSN-1, 2) l'exon-specific U1 small nuclear RNA (ExSpeU1) ed 3) Transcription Activator-Like Effector-Transcription Factor (TALE-TF).

Tutte queste strategie agiscono modulando l'RNA del gene SMN2: gli ASO agiscono sullo splicing dell'esone 7, TALE-TF aumenta l'RNA di SMN2 agendo sul promotore, mentre ExSpeU1 incrementa il processamento del pre-mRNA. Questi approcci inducono un aumento dell'mRNA SMN full-length e agiscono differenzialmente sull'isoforma Delta-7: ASO riduce tale isoforma, mentre ExSpeU1 e TALE-TF la aumentano. Tutti gli approcci testati in questo studio hanno mostrato un notevole incremento dei livelli della proteina SMN, migliorando significativamente la sopravvivenza dei motoneuroni *in vitro*.

I nostri dati confermano l'utilità delle cellule staminali pluripotenti indotte derivate da pazienti SMA come modello *in vitro* della malattia e dimostrano la potenzialità di nuovi approcci mediati da RNA come strategie terapeutiche per il trattamento della SMA e di altri disordini genetici neurologici.

Nizzardo M, Simone C, Dametti S, Salani S, Ulzi G, Pagliarani S, Rizzo F, Frattini E, Pagani F, Bresolin N, Comi G, Corti S.

Spinal muscular atrophy phenotype is ameliorated in human motor neurons by SMN increase via different novel RNA therapeutic approaches.

Sci Rep. 2015. IF: 5.578.

Motoneuroni con diversa vulnerabilità alla degenerazione nella SLA mostrano un differente profilo proteico (Comley L et al., 2015)

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia fatale caratterizzata dalla perdita dei motoneuroni somatici. Tuttavia, non tutti i motoneuroni sono in ugual modo vulnerabili alla malattia. Alcuni gruppi di motoneuroni, tra cui quelli nei nuclei oculomotori che controllano i movimenti degli occhi, sono resistenti alla degenerazione. Le ragioni di tale diversa vulnerabilità rimane ad oggi ancora sconosciuta. Al fine di comprendere a cosa sia dovuta la resistenza di questi gruppi di motoneuroni, abbiamo valutato il profilo proteico dei motoneuroni oculomotori resistenti e di quelli vulnerabili, come quelli ipoglossali e spinali, sia in modelli *in vitro* che *in vivo* della patologia. Diverse proteine, tra cui il recettore GABAA α 1, la subunità alpha-3 della guanilato ciclasi e la parvalbumina, implicate nella resistenza dei motoneuroni, sono risultate espresse ad alti livelli nei neuroni oculomotori derivati da modelli murini e umani. I motoneuroni vulnerabili alla degenerazione mostrano invece livelli più alti della dineina, periferina e del recettore GABAA α 2, proteine che svolgono un ruolo rispettivamente nel trasporto retrogrado e nell'eccitabilità. Tali proteine sono dinamicamente regolate durante la malattia e questo potrebbe aumentare il rischio di degenerazione di questi motoneuroni. Dai nostri dati emerge come i motoneuroni oculomotori mostrino un diverso profilo proteico rispetto ai motoneuroni vulnerabili del tronco encefalico e del midollo spinale. Questo potrebbe in parte spiegare la loro resistenza alla degenerazione nella SLA. La comparazione tra modello umano e murino mostra una relativa conservazione

dei segnali tra le specie, confermando l'utilità del modello murino SOD1G93A per studiare i meccanismi di vulnerabilità neuronale nell'uomo.

Comley L, Allodi I, Nichterwitz S, Nizzardo M, Simone C, Corti S, Hedlund E.

Motor neurons with differential vulnerability to degeneration show distinct protein signatures in health and ALS. Neuroscience. 2015 IF: 3.357.

Sviluppo di una terapia con oligonucleotidi per la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) (Nizzardo et al., submitted)

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia del motoneurone per la quale attualmente non esiste una terapia efficace. La maggior parte dei casi di SLA non presentano una chiara eziologia genetica e sono definiti come sporadici, mentre il 10% sono definiti familiari. Tuttavia sono stati identificati diversi geni correlati allo sviluppo della patologia e particolarmente frequenti sono risultate le mutazioni a carico del gene che codifica per una proteina, la Cu/Zn superossidodismutasi 1 (SOD1). È stato ipotizzato che alterazioni della proteina SOD1, come l'errato misfolding con successiva aggregazione all'interno del citoplasma, abbiano un effetto tossico sia nei casi familiari sia in quelli sporadici. La riduzione della quantità di proteina mutata potrebbe rallentare la progressione della malattia, rappresentando una valida strategia terapeutica. In questo studio, abbiamo dimostrato che il trattamento con oligonucleotide morfolino (MO), disegnato per ridurre la sintesi di SOD1 umana, causò il rallentamento della progressione della malattia, il miglioramento della funzionalità neuromuscolare e un incremento della sopravvivenza in un modello murino di SLA. Le analisi neuropatologiche hanno dimostrato un incremento del numero dei motoneuroni e degli assoni e una notevole riduzione dell'astrogliosi e microgliosi. Per testare questa strategia in un modello umano, abbiamo trattato con MO i motoneuroni derivati da cellule staminali pluripotenti indotte di pazienti con SLA familiare. Queste cellule hanno mostrato un incremento della sopravvivenza e una riduzione dei marcatori dell'apoptosi. I nostri dati hanno mostrato l'efficacia di questa terapia in modelli animali e umani di SLA, ponendo le basi per futuri trial clinici.

Nizzardo M, Simone C, Rizzo F., Ulzi G, Ramirez A, Rizzuti M, Bordoni A, Bucchia M, Gatti S, N. Bresolin N, Comi G. P and S. Corti.

Morpholino-mediated SOD1 reduction ameliorates an amyotrophic lateral sclerosis disease phenotype.

Submitted to *Scientific Reports*. IF: 5.578.

Identificazione di pathways alterati in motoneuroni derivati da cellule staminali pluripotenti indotte di pazienti con la malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) e sviluppo di un possibile approccio terapeutico (Rizzo et al., manuscript in preparation).

La malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) è una polineuropatia sensitivo-motoria caratterizzata dalla degenerazione dei neuroni motori e sensitivi, che risulta in una progressiva debolezza agli arti, atrofia muscolare e perdita della sensibilità. La patologia è dovuta a mutazioni nel gene Mitofusina 2 (MFN2), che codifica per una proteina localizzata a livello dei mitocondri, essenziale per la sopravvivenza delle cellule e per il loro corretto funzionamento. Ad oggi, purtroppo non esistono terapie risolutive per questa patologia. Obiettivo del nostro studio è approfondire la conoscenza dei meccanismi responsabili della malattia, identificare nuovi bersagli terapeutici e definire biomarcatori del fenotipo patologico.

In questo progetto, i fibroblasti derivati da pazienti affetti da CMT2A che presentavano diverse mutazioni nel gene MFN2 sono stati riprogrammati in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e successivamente differenziati in motoneuroni, offrendo la possibilità di ottenere un modello *in vitro* specifico della malattia. Sfruttando questa metodica, abbiamo ottenuto diverse linee di iPSC da pazienti CMT2A e abbiamo dimostrato il differenziamento

in motoneuroni paziente specifici. Le cellule così ottenute non hanno mostrato alcun difetto in termini di sviluppo e di sopravvivenza in cultura, ma hanno presentato alcune anomalie tipiche della patologia, come alterazioni della localizzazione dei mitocondri, la riduzione della quantità di DNA mitocondriale e dell'attività dei complessi della catena respiratoria. Alterazioni nei processi di mitofagia sembrerebbero responsabili della riduzione del numero di mitocondri, contribuendo quindi al meccanismo della patologia. Questi difetti sono risultati più evidenti nelle cellule neuronali rispetto ai fibroblasti, in accordo con la specificità neuronale della patologia. Le alterazioni trascrizionali in geni coinvolti nella funzionalità mitocondriale e nella struttura citoscheletrica sono state identificate mediante Next Generation Sequencing. Accanto ai modelli *in vitro*, abbiamo condotto le analisi degli stessi aspetti anche nell'unico modello murino attualmente disponibile di CMT2A (MitoCharc1), con lo scopo di caratterizzarlo in modo approfondito e di individuare biomarcatori specifici del fenotipo patologico. Ci siamo dedicati anche allo sviluppo di un approccio terapeutico per questa patologia. Abbiamo silenziato il gene MFN2 endogeno mediante short hairpin RNA (shRNA) nei fibroblasti e nei motoneuroni CMT2A. In parallelo, nelle stesse cellule, per recuperare i normali livelli di espressione del gene MFN2, abbiamo introdotto il c-DNA del gene MFN2 *wild-type* modificato in modo da resistere al processo di silenziamento. I risultati ottenuti sono stati molto promettenti e ci hanno permesso di traslare questa strategia nel modello murino. In modo particolare, abbiamo trasferito questi costrutti per via sistemica utilizzando come vettore l'adenovirus associato del sierotipo 9 (AAV9) e abbiamo riscontrato, in seguito a questo trattamento, il ripristino dei livelli di proteina wild-type. Sono attualmente in corso studi sul recupero delle funzioni motorie, della fisiologia neuromuscolare e della sopravvivenza. Questo studio ha contribuito ad approfondire i meccanismi molecolari patogenetici attraverso la generazione di un modello *in vitro* di CMT2A con iPSC specifiche dei pazienti e di identificare una possibile strategia terapeutica per questa malattia.

Manoscritto in preparazione

Misplacing della proteina SOD1 e disfunzione mitocondriale nella patogenesi della Sclerosi Laterale Amiotrofica (Tafari F. et al., 2015)

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia fatale dei motoneuroni che presenta forme sporadiche (sALS) o familiari (fALS). Anche se il numero di geni coinvolti nella SLA è notevolmente cresciuto nel corso degli anni, i difetti nella superossido dismutasi 1 (SOD1), che codifica per la SOD1 rame / zinco, rimangono ancora una delle principali cause di fSLA e sono probabilmente coinvolti anche nelle forme apparentemente sporadiche. La patogenesi della SLA è ancora ad oggi sconosciuta, ma diversi studi indicano che l'accumulo mitocondriale della proteina SOD1 mutata è un importante meccanismo di disfunzione mitocondriale, responsabile della patologia del motoneurone e della sua morte. La localizzazione intra-mitocondriale di SOD1 mutata è oggetto di discussione. La proteina SOD1 mutata potrebbe infatti accumularsi all'interno dello spazio intermembrana (IMS), controllando il mantenimento fisiologico regolato dallo chaperone del rame per la superossido dismutasi (CCS). D'altra parte, la proteina SOD1 misfolded potrebbe depositarsi sulla membrana mitocondriale esterna (OMM), intervenendo nel trasporto attraverso le membrane mitocondriali e nei processi di apoptosi cellulare mitocondrio-dipendente. I meccanismi che regolano la localizzazione della proteina SOD1 e il suo misplacing potrebbero spiegare alcuni aspetti della patogenesi della SLA, come la selettività cellulare e l'insorgenza tardiva. Questi studi potrebbero permettere di identificare nuovi bersagli per l'intervento terapeutico nella SLA familiare così come nelle forme non genetiche. La manipolazione farmacologica o genetica finalizzata a prevenire o contrastare la migrazione intracellulare della proteina SOD1 mutata potrebbe essere efficace per altre patologie neurodegenerative caratterizzate dall'accumulo tossico di proteine misfolded.

Tafari F, Ronchi D, Magri F, Comi GP, Corti S.

SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. **Front Cell Neurosci.** 2015. IF: 4.3.

Neuropatie relative alla MFN2: caratteristiche cliniche, patogenesi molecolare e prospettive terapeutiche (Stuppia G. et al., 2015)

La Mitofusina 2 (MFN2) è una proteina GTPasica localizzata a livello della membrana mitocondriale esterna, codificata nel genoma nucleare dal gene MFN2 situato sul braccio corto (p) del cromosoma 1. La proteina MFN2 è coinvolta in diverse vie intracellulari, ma svolge principalmente un ruolo essenziale nelle diverse funzioni mitocondriali, compresa la fusione, il trasporto assonale, la comunicazione inter-organelli e la mitofagia. Le mutazioni nel gene che codifica per la MFN2 sono associate alla malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A), un disturbo neurologico caratterizzato da fenotipo clinico con coinvolgimento del sistema nervoso centrale e periferico. In questo lavoro, abbiamo descritto le caratteristiche cliniche, genetiche e neuropatologiche di malattie umane associate alle mutazioni da MFN2. Abbiamo inoltre riportato i meccanismi patogenetici attraverso i quali le mutazioni della MFN2 probabilmente contribuiscono allo sviluppo della neurodegenerazione. Disturbi correlati alla MFN2 possono verificarsi più frequentemente di quanto precedentemente considerato, e possono rappresentare un paradigma per lo studio delle dinamiche mitocondriali, le cui alterazioni sembrano svolgere un ruolo significativo nella patogenesi molecolare e cellulare delle malattie neurodegenerative più comuni; pertanto esse possono anche portare all'identificazione di bersagli terapeutici.

Stuppia G, Rizzo F, Riboldi G, Del Bo R, Nizzardo M, Simone C, Comi GP, Bresolin N, Corti S.

MFN2-related neuropathies: Clinical features, molecular pathogenesis and therapeutic perspectives.

J Neurol Sci. 2015 IF: 2.474.

Caratteristiche cliniche e molecolari e prospettive terapeutiche dell'Atrofia Muscolare Spinale con distress respiratorio di tipo 1 (Vanoli F. et al, 2015)

L'Atrofia muscolare spinale con distress respiratorio (SMARD1) è una malattia neuromuscolare autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene IGHMBP2, che codifica per la proteina 2 che lega l'immunoglobulina μ , portando alla degenerazione dei motoneuroni. È una malattia rara e fatale con un esordio precoce nell'infanzia. Le principali caratteristiche cliniche sono l'atrofia muscolare e la paralisi diaframmatica, che richiede una ventilazione di sostegno rapido e permanente. Le caratteristiche cliniche della malattia umana sono ben rappresentate nel modello murino con degenerazione neuromuscolare (*nmd*). Ad oggi, nessun trattamento efficace è ancora disponibile, ma approcci terapeutici, come l'uso di fattori neurotrofici e la terapia con cellule staminali, hanno dimostrato effetti positivi nel modello murino. La sperimentazione clinica della terapia genica ha mostrato dei risultati soddisfacenti nei pazienti SMA, ponendole basi per un possibile trattamento anche per la SMARD1. Il progresso significativo nella comprensione sia del quadro clinico della SMARD1 che dei meccanismi molecolari pone le basi per una rapida traslazione di strategie terapeutiche pre-cliniche nei pazienti.

Vanoli F, Rinchetti P, Porro F, Parente V, Corti S.

Clinical and molecular features and therapeutic perspectives of spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1.

J Cell Mol Med. 2015 IF: 4.014.

L'Atrofia Muscolare Spinale - recenti progressi terapeutici per una vecchia sfida (Faravelli I., et al., 2015)

Negli ultimi dieci anni, una migliore comprensione dell'eziopatogenesi dell'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) ci ha portato a una svolta storica, ponendo le basi per lo sviluppo di trattamenti terapeutici per la malattia, finora incurabile. La definizione sempre più precisa di bersagli molecolari relativi al locus genico del motoneurone (SMN) ha portato allo sviluppo di promettenti strategie terapeutiche. Queste nuove strategie nel trattamento per la SMA includono la terapia genica, la terapia molecolare con oligonucleotidi antisenso, e la terapia con piccole molecole che hanno lo scopo di aumentare l'espressione della proteina SMN. Studi sulle cellule staminali derivate da pazienti SMA hanno fornito un modello *in vitro* della malattia e il trapianto di cellule staminali potrebbe essere utilizzato come strategia complementare, con un potenziale per trattare le fasi sintomatiche della malattia. In questo studio, abbiamo riassunto i dati consolidati e i nuovi approfondimenti sulla patogenesi della SMA, con un'attenzione particolare alla funzione della proteina SMN. Evidenze precliniche e recenti progressi degli studi clinici in corso sono accuratamente recensiti. Le considerazioni finali sono dedicate a prospettive cliniche future in questo campo in rapida evoluzione, con un ampio dibattito sul confronto tra gli approcci terapeutici delineati e le restanti questioni aperte.

Faravelli I, Nizzardo M, Comi GP, Corti S.

Spinal muscular atrophy-recent therapeutic advances for an old challenge.

Nat Rev Neurol. 2015. IF: 15.358

Le cellule umane staminali pluripotenti come modelli di malattie neurodegenerative e del neuro-sviluppo e scoperta di nuovi farmaci (Corti S. et al., 2015)

Nonostante i notevoli sforzi, non sono ancora stati scoperti trattamenti efficaci per le malattie neurodegenerative e dello sviluppo neurologico. Le possibili ragioni di questo includono la mancanza di adeguati modelli di malattia e di una comprensione limitata dei meccanismi eziologici e neurobiologici. I recenti progressi sulla ricerca delle cellule staminali pluripotenti (PSC) hanno aperto la strada alla generazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) a partire da cellule somatiche, offrendo così una fonte illimitata di cellule neuronali rilevanti per malattie paziente-specifici. In questo studio, ci siamo concentrati sulla discussione dell'uso di cellule umane derivate da PSC come modello di studio di disturbi neurologici e il loro uso nella scoperta di nuovi farmaci e prospettive terapeutiche. La generazione di modelli di malattia basati su iPSC umane ha alimentato un rinnovato entusiasmo ed aspettative nell'identificazione di altri innovativi bersagli molecolari. Le PSC umane offrono uno strumento unico che viene proficuamente sfruttato per le piattaforme di screening high-throughput (HTS). Questo processo può portare all'identificazione di nuove terapie farmacologiche per una vasta gamma di condizioni neurodegenerative e dello sviluppo neurologico. Il miglioramento della derivazione di sottotipi neuronali maturi dalle cellule staminali umane pluripotenti indotte paziente-specifiche e il loro adattamento alla cultura permetterà un maggiore utilizzo di queste cellule nella scoperta di nuovi farmaci.

Corti S, Faravelli I, Cardano M, Conti L.

Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery.

Expert Opin Drug Discov. 2015. IF: 3.539.

Progressi sperimentali riguardo alla rigenerazione neuronale mediata da cellule staminali indotte e alla riprogrammazione diretta *in vivo* (Dametti S. et al., 2015)

La perdita neuronale è una caratteristica comune di molte malattie neurologiche che ancora mancano di trattamenti efficaci. La scoperta di cellule staminali in grado di auto-rinnovarsi all'interno del sistema nervoso centrale (CNS) ha posto l'attenzione sulla plasticità del SNC come potenziale strategia per lo sviluppo di terapie rigenerative dopo lesioni. Il ruolo delle cellule progenitrici neurali sembra essere cruciale, ma non sufficiente a processi riparativi dopo il danno. Inoltre, i meccanismi che regolano questi eventi sono ancora in gran parte sconosciuti. Approcci terapeutici basati sulle cellule staminali sono concentrati principalmente sull'uso sia di cellule staminali pluripotenti indotte e sia su cellule staminali neurali indotte come fonti per il trapianto cellulare. Recentemente, è stata proposta la riprogrammazione diretta *in vivo* di cellule endogene del SNC in cellule staminali/progenitrici neurali multipotenti come una strategia alternativa per superare i limiti legati sia all'invasività del trapianto di cellule esogene e sia agli aspetti tecnici di riprogrammazione *in vitro* (tempo richiesto e limitata quantità disponibile di cellule neuronali direttamente indotte). In questo lavoro, ci proponiamo di descrivere criticamente i recenti studi *in vivo* sulla riprogrammazione diretta, concentrandoci sulla conversione degli astrociti in neuroni o cellule staminali neurali/precursori, con la prospettiva di futuri scopi terapeutici per i disturbi neurologici.

Dametti S, Faravelli I, Ruggieri M, Ramirez A, Nizzardo M, Corti S.

Experimental Advances Towards Neural Regeneration from Induced Stem Cells to Direct In Vivo Reprogramming.

Mol Neurobiol. 2015. IF: 5.137

Sviluppi terapeutici nella Sclerosi Laterale Amiotrofica (Bucchia M. et al., 2015)

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è la più comune malattia del motoneurone negli adulti. È quasi sempre fatale entro pochi anni dall'insorgenza dei sintomi. Nessun trattamento efficace è attualmente disponibile, oltre a terapia di supporto e con riluzolo, un bloccante del rilascio di glutammato, che ha mostrato una modesta sopravvivenza prolungata dei pazienti trattati. Questo lavoro fornisce una panoramica generale dei progressi preclinici e clinici negli ultimi anni e riassume la letteratura per quanto riguarda gli approcci terapeutici emergenti, concentrandosi sui bersagli molecolari. È stata effettuata una revisione sistematica della letteratura, identificando gli studi clinici che coinvolgono importanti terapie molecolari per la SLA. Inoltre, è stato accuratamente analizzato il sito web ALS Therapy Development Institute, ed è stata inclusa una selezione di studi clinici della SLA registrati presso ClinicalTrials.gov.

Negli ultimi anni, sono state sviluppate strategie per comprendere sia i meccanismi genetici che quelli molecolari di SLA. Diversi obiettivi terapeutici sono stati attivamente perseguiti. La maggior parte degli studi clinici in corso si basano sullo studio di profili di sicurezza e tollerabilità di terapie farmacologiche, geniche e cellulari, valutando i loro effetti sulla progressione della malattia.

Attualmente, nessuno sforzo terapeutico sembra essere efficiente, ma recenti scoperte nella SLA potrebbero contribuire ad accelerare la scoperta di un trattamento efficace per questa malattia.

Bucchia M, Ramirez A, Parente V, Simone C, Nizzardo M, Magri F, Dametti S, Corti S.

Therapeutic development in Amyotrophic Lateral Sclerosis,

Clinical Therapeutics, 2015. IF: 2.731.

Modelli di Atrofia Muscolare Spinale basati su cellule staminali pluripotenti (Frattini E et al., 2015)

Le malattie del motoneurone, come la stragrande maggioranza delle patologie neurodegenerative, sono attualmente incurabili e molto difficili da studiare *in vitro*, a causa

della difficoltà nell'ottenere i tipi cellulari maggiormente coinvolti nella patogenesi. I recenti progressi della ricerca nell'ambito delle cellule staminali, in particolare nello sviluppo della tecnologia delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), hanno permesso la generazione di una notevole quantità di cellule neuronali malattia-specifiche, tra cui i motoneuroni e le cellule gliali. Il presente studio riassume criticamente le implicazioni pratiche delle iPSC, generate da fibroblasti di pazienti affetti da Atrofia Muscolare Spinale (SMA), con particolare attenzione alle sfide nello sviluppo e nell'ottimizzazione di modelli *in vitro* di malattia. La ricerca sulle cellule malattia-specifiche derivate paziente può aiutare a comprendere i meccanismi alla base della disfunzione neuronale e della morte nella SMA, fornendo così nuove prospettive per lo sviluppo di terapie efficaci.

Frattini E, Ruggieri M, Salani S, Faravelli I, Zanetta C, Nizzardo M, Simone C, Magri F, Corti S.

Pluripotent stem cell-based models of spinal muscular atrophy.

Mol Cell Neurosci. 2015. IF: 3.840

Applicazioni terapeutiche del peptide HIV-1 Tat (Rizzuti M, et al., 2015)

Nel corso degli ultimi decenni, molti nuovi approcci terapeutici sono stati sviluppati per diverse patologie, tra cui le malattie neurodegenerative. L'efficiente biodistribuzione e il delivery in siti biologici bersaglio sono ostacolati dalla presenza di barriere cellulari e tissutali e una terapia clinica è ostacolata dalla necessità di utilizzare vie di somministrazione invasive. La coniugazione del farmaco candidato con peptidi in grado di penetrare nelle cellule, passando attraverso le membrane cellulari, e di raggiungere bersagli biologici anche quando somministrati per via sistemica, rappresenta uno strumento promettente per superare questo problema. In questo lavoro, abbiamo criticamente riassunto e discusso la biologia, la classificazione e i meccanismi di internalizzazione di peptidi penetranti le cellule. In particolare, abbiamo concentrato la nostra attenzione sul peptide Tat derivato dal virus HIV in grado di penetrare nelle cellule, e ne discutiamo il suo uso efficiente ma controverso nella ricerca di base, preclinica e clinica dalla sua scoperta ad oggi.

Rizzuti M, Nizzardo M, Zanetta C, Ramirez A, Corti S.

Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide.

Drug Discov Today. 2015. IF: 6.691

L'Atrofia Muscolare Spinale è una malattia che colpisce solo i motoneuroni? Patogenesi ed implicazioni terapeutiche (Simone C, et al. 2015)

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una malattia neurologica genetica che causa mortalità infantile; terapie efficaci approvate non sono attualmente disponibili. La SMA è dovuta a mutazioni e/o delezioni omozigoti nel gene SMN1 che regola la sopravvivenza del motoneurone e la conseguente riduzione della proteina SMN, portando alla morte dei motoneuroni. Tuttavia, vi è una crescente evidenza che, oltre a motoneuroni, altri tipi cellulari contribuiscono alla patogenesi della SMA. In questa review, abbiamo discusso il coinvolgimento delle cellule non motoneuronali, localizzate sia all'interno che all'esterno del Sistema Nervoso Centrale, nell'insorgenza della malattia e nella sua progressione. Anche se è necessario il ripristino dei livelli normali della proteina SMN nei motoneuroni, è stato dimostrato che il miglioramento fenotipico ottimale in modelli animali di SMA richiede una correzione di SMN estesa anche ad altri tessuti. Per la traslazione clinica dei nuovi approcci terapeutici, sarà quindi fondamentale considerare anche il ruolo di cellule non moto neuronali.

Simone C, Ramirez A, Bucchia M, Rinchetti P, Rideout H, Papadimitriou D, Re DB, Corti S.

Is spinal muscular atrophy a disease of the motor neurons only: pathogenesis and therapeutic implications?

Cell Mol Life Sci. 2015. IF:5.808

ELENCO LAVORI SCIENTIFICI 2015

Articoli in estenso

Simone C, Ramirez A, Bucchia M, Rinchetti P, Rideout H, Papadimitriou D, Re DB, Corti S.
Is spinal muscular atrophy a disease of the motor neurons only: pathogenesis and therapeutic implications?

Cell Mol Life Sci. 2015 Dec 18.

Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Salani S, Dametti S, Rinchetti P, Del Bo R, Foust K, Kaspar BK, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

Gene therapy rescues disease phenotype in a spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1) mouse model.

Sci Adv. 2015 Mar 13;1(2):e1500078.

Magri F, Colombo I, Del Bo R, Previtali S, Brusa R, Ciscato P, Scarlato M, Ronchi D, D'Angelo MG, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

ISPD mutations account for a small proportion of Italian Limb Girdle Muscular Dystrophy cases. **BMC Neurol.** 2015 Sep 24;15(1):172.

Tafari F, Ronchi D, Magri F, Comi GP, Corti S.

SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. **Front Cell Neurosci.** 2015 Aug 25;9:336. doi: 10.3389/fncel.2015.00336. eCollection 2015. Review.

Stuppia G, Rizzo F, Riboldi G, Del Bo R, Nizzardo M, Simone C, Comi GP, Bresolin N, Corti S. *MFN2-related neuropathies: Clinical features, molecular pathogenesis and therapeutic perspectives.*

J Neurol Sci. 2015 Sep 15;356(1-2):7-18. doi: 10.1016/j.jns.2015.05.033. Epub 2015 May 29. Review.

Nizzardo M, Simone C, Dametti S, Salani S, Ulzi G, Pagliarani S, Rizzo F, Frattini E, Pagani F, Bresolin N, Comi G, Corti S.

Spinal muscular atrophy phenotype is ameliorated in human motor neurons by SMN increase via different novel RNA therapeutic approaches.

Sci Rep. 2015 Jun 30;5:11746.

Vanoli F, Rinchetti P, Porro F, Parente V, Corti S. Clinical and molecular features and therapeutic perspectives of spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1.

J Cell Mol Med. 2015 Jun 20. doi: 10.1111/jcmm.12606. PubMed PMID: 26095024.

Faravelli I, Nizzardo M, Comi GP, Corti S.

Spinal muscular atrophy-recent therapeutic advances for an old challenge.

Nat Rev Neurol. 2015 Jun;11(6):351-359.

Cirulli ET, et al (Corti S in the Study group)

Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways.

Science. 2015 Mar 27;347(6229):1436-41.

Corti S, Faravelli I, Cardano M, Conti L.

Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery.

Expert Opin Drug Discov. 2015 Jun;10(6):615-29. doi: 10.1517/17460441.2015.1037737. Epub 2015 Apr 20. PubMed PMID: 25891144.

Pensato V, Tiloca C, Corrado L, Bertolin C, Sardone V, Del Bo R, Calini D, Mandrioli J, Lauria G, Mazzini L, Querin G, Ceroni M, Cantello R, Corti S, Castellotti B, Soldà G, Duga S, Comi GP, Cereda C, Sorarù G, D'Alfonso S, Taroni F, Shaw CE, Landers JE, Ticozzi N, Ratti A, Gellera C, Silani V;

SLAGEN Consortium. TUBA4A gene analysis in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: identification of novel mutations.

J Neurol. 2015 May;262(5):1376-8.

Dametti S, Faravelli I, Ruggieri M, Ramirez A, Nizzardo M, Corti S.

Experimental Advances Towards Neural Regeneration from Induced Stem Cells to Direct In Vivo Reprogramming.

Mol Neurobiol.

Comley L, Allodi I, Nichterwitz S, Nizzardo M, Simone C, Corti S, Hedlund E.

Motor neurons with differential vulnerability to degeneration show distinct protein signatures in health and ALS.

Neuroscience. 2015 Apr 16;291:216-29.

Ronchi D, Riboldi G, Del Bo R, Ticozzi N, Scarlato M, Galimberti D, Corti S, Silani V, Bresolin N, Comi GP.

CHCHD10 mutations in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.

Brain. 2015 Jan 8. pii: awu384. PubMed PMID: 25576308.

Ronchi D, Previtali SC, Sora MG, Barera G, Del Menico B, Corti S, Bresolin N, Comi GP.

Novel Splice-Site Mutation in SMN1 Associated with a very Severe SMA-I Phenotype.

J Mol Neurosci. 2015 Jan 9.

Bucchia M, Ramirez A, Simone C, Nizzardo M, Magri F, Corti S.

Therapeutic development in Amyotrophic Lateral Sclerosis, Clinical Therapeutics,

2015 Mar 1;37(3):668-80. doi: 10.1016/j.clinthera.2014.12.020.

Epub 2015 Feb 7

Malaguti MC, Melzi V, Di Giacompo R, Monfrini E, Di Biase E, Franco G, Borellini L, Trezzi I, Monzio Compagnoni G, Fortis P, Feraco P, Orrico D, Cucurachi L, Donner D, Rizzuti M, Ronchi D, Bonato S, Bresolin N, Corti S, Comi GP, Di Fonzo A.

A novel homozygous PLA2G6 mutation causes dystonia-parkinsonism.

Parkinsonism Relat Disord. 2015 Mar;21(3):337-9.

Frattini E, Ruggieri M, Salani S, Faravelli I, Zanetta C, Nizzardo M, Simone C, Magri F, Corti S.

Pluripotent stem cell-based models of spinal muscular atrophy.

Mol Cell Neurosci. 2015 Jan;64:44-50.

Ripolone M, Ronchi D, Violano R, Vallejo D, Fagiolari G, Barca E, Lucchini V, Colombo I, Villa L, Berardinelli A, Balottin U, Morandi L, Mora M, Bordoni A, Fortunato F, Corti S, Parisi D, Toscano A, Sciacco M, DiMauro S, Comi GP, Moggio M.

Impaired Muscle Mitochondrial Biogenesis and Myogenesis in Spinal Muscular Atrophy.

JAMA Neurol. 2015 Jun;72(6):666-75. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0178. Erratum in:
JAMA Neurol. 2015 Oct;72(10):1210.

Rizzuti M, Nizzardo M, Zanetta C, Ramirez A, Corti S.
Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide.
Drug Discov Today. 2015 Jan;20(1):76-85. Review.

Abstracts presentati a Congressi Internazionali

Simone C, Nizzardo M, Rizzo F, Bucchia M, Ramirez A, Bresolin N, Comi G, Corti S
Transplantation of an iPSC-derived CD15+CXCR4+VLA4+ neural stem cell subpopulation as a new therapy for ALS.

AAN meeting Washington 2015 (data blitz and poster)

Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Salani S, Ulzi G, Dametti S, Rinchetti P, Del Bo R, Kaspar B, Foust K, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

AAV9-mediated gene therapy in a SMARD1 mouse model.

AAN meeting Washington 2015 (Plenary Session)

Identification of oculomotor-restricted genes with motor neuron protective properties for the development of ALS therapeutics.

TLF meeting 2015

Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Bucchia M, Dametti S, Ramirez A, Corti S

Transplantation of a neural stem cell subpopulation as cell-based therapy for ALS.

ENCALS meeting 2015, Dublin

Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ulzi G, Ramirez A, Bucchia M, Bordoni A, Bresolin N, Comi GP, and Corti S.

SOD1 reduction morpholino-mediated ameliorates Amyotrophic Lateral Sclerosis disease phenotype.

ENCALS meeting 2015

Ramirez A, Bucchia M, Simone C, Nizzardo M, Rizzo F, Dametti S, Trombetta E, Corti S
iPSC derived neural stem cell transplantation as a new therapy for ALS.

VI Meeting on the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Milan, May 28th- 30th, 2015, Milan

Corti S.

The use of synthetic oligonucleotides to improve motor neuron survival in Spinal Muscular Atrophy"

VI Meeting on the "Molecular Mechanisms of Neurodegeneration" Milan, Italy, May 28th- 30th, 2015, Milan

Brajkovic, C. Simone, M. Nizzardo, F. Rizzo, M. Bucchia, A. Ramirez, N. Bresolin, G. P. Comi, S. Corti.

A new therapeutic approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis: iPSC-derived CD15+CXCR4+VLA4+ neural stem cell transplantation,

ENS 2015

Simone C, Nizzardo M., Rizzo F, Ulzi G, Ramirez A, Bucchia M, Bordoni A, Comi G, Corti S
Morpholino antisense oligomer against SOD1 for amyotrophic lateral sclerosis therapy

SFN 2015

-Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Salani S, Rinchetti P, Del Bo R, Dametti S, Foust K, Kaspar BK, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Gene therapy rescues disease phenotype in a spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1) mouse model SFN 2015

Abstracts presentati a Congressi Nazionali

Corti S,

Nuovi approcci terapeutici nelle Atrofie Muscolari Spinali,

AIM Naples 2015

Collaborazioni scientifiche in atto con istituti nazionali ed internazionali:

1. “Studio dei meccanismi molecolari non-cell autonomous nelle malattie del motoneurone” e Progetto NO-MND— “Transferring NOn autonomous cell degeneration models” Motor Neuron Center, Columbia University, Prof. S. Przedborski, director of the Center, and Prof. D. Re, New York, N.Y., USA.
2. Progetto NO-MND— “Transferring NOn autonomous cell degeneration models”, Prof. L. Stefanis Biomedical Foundation, Academy of Athens, Grecia. (“No: 612578, NOMND— Transferring Non autonomous cell degeneration models between EU and USA for development of effective therapies for Motor Neuron Diseases (No-MND) Call FP7- 12 PEOPLE-2013-IRSES”).
3. “Studio di nuovi approcci di terapia genica per l’Atrofia Muscolare Spinale (SMA) e l’atrofia muscolare spinale con Distress Respiratorio (SMARD1)”, Prof. Brian K Kaspar, Ph.D, Professore Associato, The Research Institute at Nationwide Children’s Hospital/ The Ohio State University, Center for Gene Therapy, Columbus, Ohio, USA.
4. “Identificazione di molecole con un ruolo neuroprotettivo nelle malattie del motoneurone”, Prof. Eva Hedlund, PhD, Professore Associato di Neurobiologia, Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm Sweden
5. “Patogenesi molecolare delle SLA familiare associata a FUS”, Dr. Marc Ruepp and Prof. Mühlemann O, University of Bern. Il programma ha previsto lo scambio di ricercatori tra l’University of Bern e UNIMI.
6. “Studio di oligonucleotidi coniugati con peptidi per lo sviluppo di una strategia terapeutica della SMA”, Prof. H. Moulton Oregon University.
7. “ Ruolo dei trasportatori della riboflavin nelle malattie del motoneurone: Analisi genetiche delle Sindromi Brown Vialetto Van Laere e Fazio Londe e sviluppo di nuove strategie terapeutiche per le malattie del motoneurone” Dr. Enrico Bertini, Laboratorio di Medicina Molecolare, Dipartimento di Neuroscienze, IRCCS Ospedale Bambino Gesù, Roma 13
8. “Correzione dello splicing di SMN mediate Exon Specific U1 snRNA come terapia per l’Atrofia Muscolare Spinale (SMA)”, Dr. Franco Pagani, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste
9. “Basi Molecolari della Sclerosi Laterale Amiotrofica” SLAGEN consortium
10. “European ALS population study”, EURALS Consortium
11. “Sviluppo di una strategia terapeutica per mitofusinopatie” in collaborazione con l’Associazione Mitofusina 2 (<http://www.progettomitofusina2.com/it/associazione>).

12. “Studi elettrofisiologici di motoneuroni derivati da cellule staminali in vitro e in vivo”, Prof. Luca Imeri, Dipartimento di Fisiologia Umana, Università degli Studi di Milano, Milano
13. “Basi molecolari della SMA”, Dr. Uberto Pozzoli, IRCCS E. Medea Bosisio, Parini, Italy
14. “Sintesi di oligomeri morfolinici con nuova struttura chimica per lo sviluppo di strategie terapeutiche per le malattie del motoneurone“, Prof. ML Gelmi, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano.

Finanziamenti per progetti di ricerca ottenuti da enti pubblici o privati

1. MIUR, FIRB Futuro in Ricerca 2010-2015 “Development of a stem cell approach for motor neuron diseases”,
2. Ministero della Salute, Ricerca Finalizzata, Progetti di Ricerca Giovani Ricercatori, 2012-2015 “iPS derived neural stem cells for Spinal Muscular Atrophy Therapy (SMAThera)”
3. Fondation Thierry Latran (TLF) 2013-2016 “Identification of oculomotor-restricted genes with motor neuron protective properties for the development of ALS therapeutics”,
4. AFM, co-PI, 2013-2015 “SMN splicing correction mediated by Exon Specific U1 snRNA as therapy for spinal muscular atrophy”
5. Ministry of Health Grant, 2013-2015 “ROLE OF RIBOFLAVIN TRANSPORTERS IN MOTOR NEURON DISEASES: Genetic analysis of the Brown Vialetto Van Laere and Fazio Londe syndromes and development of potential treatment strategies for motor neuron diseases”
6. Cariplo 2013-2016 “Pathogenetic role of differentially expressed/spliced genes in Spinal Muscular Atrophy” PI Dott.ssa Corti.
7. ALS Association Grant (USA) Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) therapy via minimally invasive transplantation of a LeX+CXCR4+VLA4+ neural stem cell subpopulation derived from induced pluripotent stem cells.
8. 7PQ NO-MND 2014-2018— Transferring NO autonomous cell degeneration models between EU and USA for development of effective therapies for Motor Neuron Diseases (MND). FP7-PEOPLE- 2013-IRSES (Finanziamento Comunità Europea).
9. ARISLA grant 2014-2017: ALS molecular therapy exploiting integrated small RNAs analysis
of patient-derived induced pluripotent stem cells Project Acronym: smallRNALS
10. JPND grant 2014-2017: Elucidation of common transcriptional targets in vulnerable Dopamine, MotorNeuron and frontotemporal Dementia disease PATHwayS (Finanziamento Comunità Europea).

LABORATORIO PARKINSON E ALTRI DISTURBI DEL MOVIMENTO

Responsabile:

Dott. Alessio Di Fonzo

Medici:

Dott. Sara Bonato

Dott. Linda Borellini

Dott. Giulia Franco

Dott. Ilaria Trezzi

Dott. Emanuele Frattini

Dott. Edoardo Monfrini

Ricercatori:

Dott. Giacomo Monzio Compagnoni

Biotecnologi:

Dott. Valentina Melzi

CENTRO PARKINSON ED ALTRI DISTURBI DEL MOVIMENTO

Anche nel corso del 2015, nel gruppo di ricerca dedicato alla malattia di Parkinson ed altri disturbi del movimento, sono state condotte indagini molecolari e biochimiche volte ad indagare l'eziologia e la patogenesi dei pazienti che afferiscono all'ambulatorio dedicato.

Grazie a diverse collaborazioni in ambito nazionale ed internazionale sono state trovate nuove mutazioni genetiche in sia in forma giovanili che nelle forme adulte della malattia di Parkinson che hanno portato a pubblicazioni scientifiche e presentazioni a congressi internazionali (Movement Disorder Meeting, International Congress on Parkinsonisms and Related Disorders)

Oltre agli studi genetici sono stati incominciati diversi progetti finalizzati all'identificazione di deficit enzimatici, in particolare dell'enzima lisosomiale Glucocerebrosidasi, sia nei linfociti che nei fibroblasti dei pazienti.

L'attività di ricerca clinica si è dedicata nel 2015 anche alla ricerca di biomarcatori per la malattia di Parkinson e parkinsonismi, e in collaborazione con l'Unità di Neuroradiologia del Policlinico, il Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano e con il Vanderbilt University Medical Center, Nashville US, il centro ha partecipato ad uno studio di Risonanza Magnetica con specifiche sequenze per la Neuromelanina per determinare le differenze di segnale specifiche dei parkinsonismi.

Infine abbiamo proseguito gli ambiziosi progetti di studio della patogenesi della malattia di Parkinson e dell'Atrofia Multisistemica in modelli cellulari di neuroni (e oligodendrociti) generati a partire da cellule staminali pluripotenti indotte di pazienti affetti.

1) Identificazione di mutazioni recessive di PLA2G6 in forme giovanili di distonia parkinsonismo.

Lo studio delle forme di parkinsonismo giovanile ha portato all'identificazione di mutazioni in diversi geni associati talora a fenotipi specifici. Un caso particolare è rappresentato dalle mutazioni del gene PLA2G6, che può portare a diversi fenotipi clinici e neuroradiologici.

Alcune forme legate alle mutazioni di PLA2G6 si manifestano in età infantile con disturbi di tipo distonico ed alterazioni cognitive. In alcuni di questi casi è presente una specifica alterazione di segnale alla RMN encefalo di Neurodegenerazione con accumulo di ferro (tipo II). Una forma di malattia descritta più recentemente è la distonia parkinsonismo ad esordio giovanile. Analizzando il DNA di un paziente con distonia e parkinsonismo, ed anche segni di interessamento del sistema piramidale, abbiamo identificato una nuova mutazione del gene PLA2G6. Questo ha portato a caratterizzare ulteriormente il fenotipo clinico e neuro radiologico, quest'ultimo caratterizzato da immagini suggestive di accumulo di ferro nei nuclei pallidi interni. La ricerca è stata pubblicata in:

Malaguti MC, Melzi V, Di Giacomo R, Monfrini E, Di Biase E, Franco G, Borellini L, Trezzi I, Monzio Compagnoni G, Fortis P, Feraco P, Orrico D, Cucurachi L, Donner D, Rizzuti M, Ronchi D, Bonato S, Bresolin N, Corti S, Comi GP, Di Fonzo A.

A novel homozygous PLA2G6 mutation causes dystonia-parkinsonism.

Parkinsonism Relat Disord. 2015 Mar;21(3):337-9. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.01.001.

2) Identificazione di mutazioni recessive di ATP13A2 in forme giovanili di distonia parkinsonismo.

Sempre nell'ambito dei parkinsonismi giovanili, una collaborazione internazionale con l'istituto Queen Elizabeth Hospital, London, UK ci ha portato a studiare un nuovo caso di distonia parkinsonismo ad esordio giovanile. In questo caso la presenza di alcuni segni clinici molto suggestivi, come il mini-mioclono, hanno indirizzato l'analisi genetica verso il gene ATP13A2 (PARK9). L'analisi ha portato all'identificazione di una nuova mutazione con effetti deleteri sulla proteina. Inoltre il caso clinico è stato approfondito da esami

neuroradiologici volti a determinare la presenza di accumulo di sostanze paramagnetiche nei nuclei della base in questa forma di parkinsonismo. Ricerca pubblicata in:

Martino D, Melzi V, Franco G, Kandasamy N, Monfrini E, Di Fonzo A.

Juvenile dystonia-parkinsonism syndrome caused by a novel p.S941Tfs1X ATP13A2 (PARK9) mutation.

Parkinsonism Relat Disord. 2015 Nov;21(11):1378-80. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.036. Epub 2015 Sep 25.

Altri lavori scientifici collaborativi dell'anno 2015 sono qui riportati:

Ferrucci R, Cortese F, Bianchi M, Pittera D, Turrone R, Bocci T, Borroni B, Vergari M, Cogliamanian F, Ardolino G, Di Fonzo A, Padovani A, Priori A.

Cerebellar and Motor Cortical Transcranial Stimulation Decrease Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease.

Cerebellum. 2016 Feb;15(1):43-7. doi: 10.1007/s12311-015-0737-x.

Rango M, Piatti M, Di Fonzo A, Ardolino G, Airaghi L, Biondetti P, and Bresolin N.

Abnormal Brain Temperature in early-onset PD

Mov Disord. In Press.

Rosa M, Arlotti M, Ardolino G, Cogliamanian F, Marceglia S, Di Fonzo A, Cortese F, Rampini PM, Priori A.

Adaptive deep brain stimulation in a freely moving Parkinsonian patient.

Mov Disord. 2015 Jun;30(7):1003-5. doi: 10.1002/mds.26241. Epub 2015 May 21

UOSD MALATTIE NEURODEGENERATIVE

**Centro per lo studio, la diagnosi e la terapia dei disturbi cognitivi e della memoria
"Unità Valutativa Alzheimer -U.V.A."**

Centro per lo studio, la diagnosi e la terapia della Sclerosi Multipla

<u>Direttore:</u> Prof. Elio Scarpini	Professore Associato di Neurologia
Dott.ssa Daniela Galimberti	Dottore di Ricerca Scienze Neurologiche e del Dolore –Tecnico Laureato Università di Milano
Dott.ssa Chiara Fenoglio	Dottore di Ricerca Scienze Neurologiche e del Dolore – Assegnista Università di Milano
Dott.ssa Emanuela Oldoni	Dottoranda di Ricerca Medicina Molecolare – Università di Milano
Dott.ssa Maria Serpente	Dottore di Ricerca in Medicina Molecolare - Assegnista Università di Milano
Dott.ssa Sara Cioffi	Biologa - Borsista OMP
Dott.ssa Marina Arcaro	Biotechnologa-Borsista OMP
Dott.ssa Milena De Riz	Neurologa Specialista – Dirigente medico OMP
Dott.ssa Anna Pietroboni	Neurologa Specialista – Dirigente medico OMP
Dott. Andrea Arighi	Neurologo Specialista - Dirigente medico OMP
Dott. Giorgio Fumagalli	Medico Specializzando
Dott.ssa Laura Ghezzi	Medico Specializzando
Dott. Alberto Calvi	Medico Specializzando
Dott.ssa Paola Basilico	Medico Specializzando
Dott.ssa Marta Scarioni	Medico Specializzando
Dott. Roberto Vimercati	Psicologo –Borsista OMP
Dr.ssa Emanuela Rotondo	Psicologa- Dottore di Ricerca - Borsista OMP
Dr.ssa Priscilla Corti	Psicologa- Dottore di Ricerca – Borsista OMP
Dott. Matteo Mercurio	Psicologo – Dottore di Ricerca – Borsista OMP
Sig.ra Daniela Da Lisca	Segretaria – Borsista OMP
Sig. Marco Milianti	Segretario – Borsista OMP
Sig.ra Mahin Fardipoor	Tecnico Laboratorio Ospedaliero

1 - ATTIVITÀ 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 2015 sono giunti all'ambulatorio per le Malattie Demielinizzanti circa 100 nuovi pazienti.

Il numero totale di visite nel corso del 2015 è stato di più di 800 in ambulatori dedicati alla Sclerosi Multipla, attivi sia al mattino che al pomeriggio.

È operativo un servizio di “Macro Attività Complessa” (MAC) 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 200 ricoveri in MAC.

Il Servizio è riconosciuto tra i Centri Provinciali autorizzati dalla Regione Lombardia alla dispensazione di: beta-Interferone Ia e Ib, Copaxone (glatiramer acetato), Tysabri (Natalizumab), Gylenia (Fingolimod), Tecfidera (Dimetilfumarato), Aubagio (Teriflunomide), Lemtrada (Alemtuzumab). In particolare, sono al momento registrati in File F per il trattamento circa 250 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 1500 visite, in ambulatori attivi dal lunedì al venerdì, sia mattina che pomeriggio.

Sono stati effettuati 200 ricoveri in regime di MAC 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, 10 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: 180
- dosaggio Amiloide, Tau totale e fosforilata nel liquor per diagnosi Alzheimer: 250
- progranulina plasmatica: 150
- estrazione DNA, mutazioni MAPT, progranulina, PS1 e 2, APP: 100.

2 - SPERIMENTAZIONI CLINICHE (multicentriche, randomizzate)

Open-label, single-arm extension study to the double-blind, randomized, multicenter, placebo-controlled, parallel-group study comparing the efficacy and safety of 0.5 mg FTY720 administered orally once daily versus placebo in patients with primary progressive multiple sclerosis CFTY720D2306E1

Long term, prospective, non-interventional, multinational, parallel-cohort study monitoring safety in patients with MS recently initiated with fingolimod once daily or treated with another approved disease-modifying therapy, Novartis, prot. CFTY720D2406

Transition: A two-year observational study to evaluate the safety profile of fingolimod in patients with MS who switch from natalizumab to fingolimod, Novartis, prot. CFTY720D2405

Studio multicentrico, in aperto, a un solo gruppo di trattamento per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia a lungo termine di 0.5 mg di fingolimod (FTY720) somministrato per via orale una volta al giorno in pazienti con sclerosi multipla, Novartis, prot. CFTY720D2399

A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of Natalizumab on reducing disability progression in subjects with Secondary Progressive Multiple Sclerosis, with optional open-label extension, Biogen, prot. 101MS326

A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled variable treatment duration study evaluating the efficacy and safety of Siponimod (BAF312) in patients with secondary progressive MS, Novartis, prot. CBAF312A2304

Studio osservazionale, della durata di 12 mesi, prospettico, che valuta l'impatto del trattamento con DMT sui disturbi dell'umore nei pazienti che hanno ricevuto una diagnosi recente di SM, TEVA, prot. POSIDONIA

A Phase 2/3, Multi-Center, Randomized, Double-Blind, placebo-controlled (Part A) and double-blind, double-dummy, active-controlled (Part B), parallel group study to evaluate the efficacy and safety of RPC1063 administered orally to relapsing MS patients, Receptos, prot. RPC1063

Observational, single-arm, multicenter one-day trial in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis (RRMS) patients to characterize (in term of demographic, clinical and neurovegetative aspects) the population for whom extended monitoring after the first dose of fingolimod (Gilenya) was necessary CFTY720DIT08

A prospective observational study to depict the role of adherence as a tool of treatment decision making in RMS subject experiencing first clinical relapse whion 1st line DMDs (CHOICE)

Observational study mobility improvements with spasticity in multiple sclerosis with additional treatment using sativex oromucosal spray (MOVE2)

A randomized, multicountry study to evaluate the effectiveness of flobetapir (18F) PET imaging in changing patient management and to evaluate the relationship between florbetapir (18F) PET scan status and cognitive decline (AVID)

Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group, 12-Month trial of leuco-methylthioninium bis (hydromethanesulfotane) in subjects with Mild to moderate AD, TauRx Therapeutics Ltd, prot. Trx-237-015

A Placebo-controlled, double-blind, parallel-group, Bayesian Adaptive randomization design and dose Regimen-finding Study to evaluate safety, tolerability and efficacy of BAN2401 in subjects with Early Alzheimer's Disease, Eisai, prot. BAN2401

Randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, fixed-dose study of Lu AE58054 in patients with mild-moderate AD treated with donepezil, Lundbeck, 14861A

A randomized, Placebo Controlled, Parallel-group, Double Blind efficacy and safety Trial of MK-8931 in Subjects with mild to moderate Alzheimer's Disease, Merck Serono, MK-8931-017

A phase III, Randomized, placebo-controlled, parallel-group, double-blind clinical trial to study the efficacy and safety of MK-8931 in subject with Amnesic Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer's Disease (Prodromal AD), MK-8931-019

Continued Efficacy and Safety monitoring of solanezumab, an anti-amyloid beta antibody in patients with Alzheimer's disease (H8A-MC-LZAO)

Effect of passive Immunization on the progression of mild Alzheimer's disease: Solanezumab (LY2062430) versus Placebo H8A-MC-LZAX

A randomized, double-blind, Placebo-controlled, Parallel-group, 26-week, phase 3 study of two doses of EVP-6124 or placebo in subjects with mild to moderate AD currently or previously receiving an Acetylcholinesterase Inhibitor Medication EVP-6124-025

3. ATTIVITÀ DI RICERCA DI BASE

È 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 sopranucleare 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 2015 l'attività del gruppo si è articolata sulle seguenti tematiche:

1) Ruolo dei microRNA e dei long non coding RNA nella Sclerosi Multipla (SM)

Sono state completate le ricerche iniziate nel corso degli scorsi anno, sui 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 filone di ricerca è stato 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 degli scorsi anni abbiamo identificato alcuni microRNA deregolati nelle cellule circolanti di pazienti con SM (Fenoglio et al., Multiple Sclerosis 2013), e 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., 2013). Nel 2015 abbiamo proseguito questi studi in pazienti sottoposti a diversi tipi di trattamento immunomodulante, e correlato l'andamento dei livelli di miRNA con i dati clinici e radiologici, al fine di identificare un marcatore che predica la risposta al trattamento. Inoltre, abbiamo intrapreso lo studio dei long non coding RNA, che sono molecole composte da >200 nucleotidi, che regolano l'espressione di diversi geni target.

2) Analisi di mutazioni in pazienti con Degenerazione Lobare Frontotemporale e patologie psichiatriche

Sono stati identificate nuove mutazioni in famiglie con forme autosomiche dominanti sia di patologie neurodegenerative che con disturbo bipolare o schizofrenia. Sulla popolazione di pazienti sporadici sono stati effettuati studi di associazione ed identificati fattori di rischio genetici e sono stati analizzati i livelli di molecole infiammatorie nel siero e nel liquido cefalorachidiano.

3) Studi di associazione e di espressione in pazienti con malattia di Alzheimer e studio dei miRNA e lncRNA circolanti a livello del liquido cefalorachidiano e del siero.

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. 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
- Dr. Jonathan Rohrer, UCL, London, UK.

Inoltre, il gruppo ha contribuito a consorzi internazionali per studi su popolazioni di pazienti con:

- Malattia di Alzheimer (International Genomics of Alzheimer's Disease Consortium, dati pubblicati su **Alzheimers & Dementia** 2015; 11(6):658-71.
- Demenza Frontotemporale (Genfi, dati pubblicati su **Lancet Neurology** 2015;14(3):253-62)
- Sclerosi Multipla (dati pubblicati su **Multiple Sclerosis** 2015;21(8):1013-24 e **Brain** 2015; 138(Pt 4): 918-31).

4. PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI CENSITE 2015

1. Serpente M, Fenoglio C, Clerici F, Bonsi R, Arosio B, Cioffi SM, Rotondo E, Franceschi M, Boneschi FM, Mari D, Mariani C, Scarpini E, Galimberti D.
Transmembrane Protein 106B Gene (TMEM106B) Variability and Influence on Progranulin Plasma Levels in Patients with Alzheimer's Disease.
Journal of Alzheimer's Disease 2015;43(3):757-61.
IF=4,151
2. Calvi A, Cioffi SM, Caffarra P, Fenoglio C, Serpente M, Pietroboni AM, Arighi A, Ghezzi L, Gardini S, Scarpini E, Galimberti D.
The Novel GRN g.1159_1160delTG Mutation is Associated with Behavioral Variant Frontotemporal Dementia.
Journal of Alzheimer's Disease 2015;44(1):277-82.
IF=4,151
3. Borroni B, Benussi A, Archetti S, Galimberti D, Parnetti L, Nacmias B, Sorbi S, Scarpini E, Padovani A.
Csf p-tau181/tau ratio as biomarker for TDP pathology in frontotemporal dementia.
Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration 2015;16(1-2):86-91.
IF=2,405
4. Borroni B, Turrone R, Galimberti D, Nacmias B, Alberici A, Benussi A, Caffarra P, Caltagirone C, Cappa SF, Frisoni GB, Ghidoni R, Marra C, Padovani A, Rainero I, Scarpini E, Silani V, Sorbi S, Tagliavini F, Tremolizzo L, Bruni AC;
The FTD Group-SINDEM. Italian Frontotemporal Dementia Network (FTD Group-SINDEM): sharing clinical and diagnostic procedures in Frontotemporal Dementia in Italy.
Neurological Sciences 2015;36(5):751-7.
IF=1,447
5. International Genomics of Alzheimer's Disease Consortium (IGAP, including D. Galimberti); International Genomics of Alzheimer's Disease Consortium IGAP (including Galimberti D). Convergent genetic and expression data implicate immunity in Alzheimer's disease. **Alzheimers & Dementia** 2015;11(6):658-71.
IF=12,407
6. Serpente M, Fenoglio C, Cioffi SM, Bonsi R, Arighi A, Fumagalli GG, Ghezzi L, Scarpini E, Galimberti D.
Profiling of Ubiquitination Pathway Genes in Peripheral Cells from Patients with Frontotemporal Dementia due to C9ORF72 and GRN Mutations.
International Journal of Molecular Science 2015;16(1):1385-1394.
IF=2,862
7. Ronchi D, Riboldi G, Del Bo R, Ticozzi N, Scarlato M, Galimberti D, Corti S, Silani V, Bresolin N, Comi GP.
CHCHD10 mutations in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.
Brain 2015; 138(Pt 8): e372.
IF=9,196
8. Cantoni C, Bollman B, Licastro D, Xie M, Mikesell R, Schmidt R, Yuede CM, Galimberti D, Olivecrona G, Klein RS, Cross AH, Otero K, Piccio L.
TREM2 regulates microglial cell activation in response to demyelination in vivo.

Acta Neuropathologica 2015;129(3):429-47.

IF=10,762

9. Giacalone G, Clarelli F, Osiceanu A, Guaschino C, Brambilla P, Sorosina M, Liberatore G, Zauli A, Esposito F, Rodegher M, Ghezzi A, Galimberti D, Patti F, Barizzone N, Guerini F, Martinelli V, Leone M, Comi G, D'Alfonso S, Martinelli Boneschi F.

Analysis of genes, pathways and networks involved in disease severity and age at onset in primary-progressive multiple sclerosis.

Multiple Sclerosis 2015;21(11):1431-42.

IF=4,822

10. Rohrer JD, Nicholas JM, Cash DM, van Swieten J, Dopper E, Jiskoot L, van Minkelen R, Rombouts SA, Cardoso MJ, Clegg S, Espak M, Mead S, Thomas DL, De Vita E, Masellis M, Black SE, Freedman M, Keren R, MacIntosh BJ, Rogaeva E, Tang-Wai D, Tartaglia MC, Laforce R Jr, Tagliavini F, Tiraboschi P, Redaelli V, Prioni S, Grisoli M, Borroni B, Padovani A, Galimberti D, Scarpini E, Arighi A, Fumagalli G, Rowe JB, Coyle-Gilchrist I, Graff C, Fallström M, Jelic V, Ståhlbom AK, Andersson C, Thonberg H, Lilius L, Frisoni GB, Pievani M, Bocchetta M, Benussi L, Ghidoni R, Finger E, Sorbi S, Nacmias B, Lombardi G, Polito C, Warren JD, Ourselin S, Fox NC, Rossor MN.

Presymptomatic cognitive and neuroanatomical changes in genetic frontotemporal dementia in the Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI) study: a cross-sectional analysis.

Lancet Neurology 2015;14(3):253-62.

IF=21,896

11. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, Adiutori R, Bianchi L, Topping J, Bestwick J, Meier UC, Marta M, Costa GD, Runia T, Evdoshenko E, Lazareva N, Thouvenot E, Iaffaldano P, Drenzo V, Khademi M, Piehl F, Comabella M, Sombekke M, Killestein J, Hegen H, Rauch S, D'Alfonso S, Alvarez-Cermeño J, Kleinová P, Horáková D, Roesler R, Lauda F, Llüfriu S, Avsar T, Uygunoglu U, Altintas A, Saip S, Menge T, Rajda C, Bergamaschi R, Moll N, Khalil M, Marignier R, Dujmovic I, Larsson H, Malmestrom C, Scarpini E, Fenoglio C, Wergeland S, Laroni A, Annibaldi V, Romano S, Martínez A, Carra A, Salvetti M, Uccelli A, Torkildsen Ø, Myhr K, Galimberti D, Rejdak K, Lycke J, Frederiksen J, Drulovic J, Confavreux C, Brassat D, Enzinger C, Fuchs S, Bosca I, Pelletier J, Picard C, Colombo E, Franciotta D, Derfuss T, Lindberg R, Yaldizli Ö, Vécsei L, Kieseier B, Hartung H, Villoslada P, Siva A, Saiz A, Tumani H, Havrdová E, Villar L, Leone M, Barizzone N, Deisenhammer F, Teunissen C, Montalban X, Tintoré M, Olsson T, Trojano M, Lehmann S, Castelnovo G, Lapin S, Hintzen R, Kappos L, Furlan R, Martinelli V, Comi G, Ramagopalan S, Giovannoni G.

Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study.

Multiple Sclerosis 2015;21(8):1013-24.

IF=4,822

12. Cantó E, Tintoré M, Villar LM, Costa C, Nurtdinov R, Álvarez-Cermeño JC, Arrambide G, Reverter F, Deisenhammer F, Hegen H, Khademi M, Olsson T, Tumani H, Rodríguez-Martín E, Piehl F, Bartos A, Zimova D, Kotoucova J, Kuhle J, Kappos L, García-Merino JA, Sánchez AJ, Saiz A, Blanco Y, Hintzen R, Jafari N, Brassat D, Lauda F, Roesler R, Rejdak K, Papuc E, de Andrés C, Rauch S, Khalil M, Enzinger C,

- Galimberti D, Scarpini E, Teunissen C, Sánchez A, Rovira A, Montalban X, Comabella M.
Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes.
Brain 2015; 138(Pt 4): 918-31.
IF=9,196
13. Xi Z, Zhang M, Bruni AC, Maletta RG, Colao R, Fratta P, Polke JM, Sweeney MG, Mudanohwo E, Nacmias B, Sorbi S, Tartaglia MC, Rainero I, Rubino E, Pinessi L, Galimberti D, Surace EI, McGoldrick P, McKeever P, Moreno D, Sato C, Liang Y, Keith J, Zinman L, Robertson J, Rogaeva E.
The C9orf72 repeat expansion itself is methylated in ALS and FTL D patients.
Acta Neuropathologica 2015;129(5):715-27.
IF=10,762
14. Schmidt R, Hofer E, Bouwman FH, Buerger K, Cordonnier C, Fladby T, Galimberti D, Georges J, Heneka MT, Hort J, Laczó J, Molinuevo JL, O'Brien JT, Religa D, Scheltens P, Schott JM, Sorbi S.
EFNS-ENS/EAN Guideline on concomitant use of cholinesterase inhibitors and memantine in moderate to severe Alzheimer's disease.
European Journal of Neurology 2015;22(6):889-98.
IF=4,055
15. Zhang M, Xi Z, Zinman L, Bruni AC, Maletta RG, Curcio SA, Rainero I, Rubino E, Pinessi L, Nacmias B, Sorbi S, Galimberti D, Lang AE, Fox S, Surace EI, Ghani M, Guo J, Sato C, Moreno D, Liang Y, Keith J, Traynor BJ, St George-Hyslop P, Rogaeva E.
Mutation analysis of CHCHD10 in different neurodegenerative diseases.
Brain 2015; 138(Pt 9): e380.
IF=9,196
16. Piscopo P, Tosto G, Belli C, Talarico G, Galimberti D, Gasparini M, Canevelli M, Poleggi A, Crestini A, Albani D, Forloni G, Lucca U, Quadri P, Tettamanti M, Fenoglio C, Scarpini E, Bruno G, Vanacore N, Confaloni A.
SORL1 Gene is Associated with the Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease.
Journal of Alzheimer's Disease 2015;46(3):771-6.
IF=4,151
17. Galimberti D, Dell'Osso B, Altamura AC, Scarpini E.
Psychiatric Symptoms in Frontotemporal Dementia: Epidemiology, Phenotypes, and Differential Diagnosis.
Biological Psychiatry 2015;78(10):684-92.
IF=10,255
18. Galimberti D, Scarpini E.
Idalopirdine as a treatment for Alzheimer's disease.
Expert Opinion on Investigation Drugs 2015;24(7):981-7.
IF=5,528
19. Galimberti D, Bonsi R, Fenoglio C, Serpente M, Cioffi SM, Fumagalli G, Arighi A, Ghezzi L, Arcaro M, Mercurio M, Rotondo E, Scarpini E.
Inflammatory molecules in Frontotemporal Dementia: Cerebrospinal fluid signature of progranulin mutation carriers.

Brain Behaviour & Immunity 2015;49:182-7.
IF=5,889

20. Pietroboni AM, Arighi A, De Riz MA, Ghezzi L, Calvi A, Avignone S, Scola E, Galimberti D, Triulzi F, Scarpini E.
Balò's concentric sclerosis: still to be considered as a variant of multiple sclerosis?
Neurological Sciences 2015;36(12):2277-80.
IF=1,447
21. Ferrari R, Grassi M, Salvi E, Borroni B, Palluzzi F, Pepe D, D'Avila F, Padovani A, Archetti S, Rainero I, Rubino E, Pinessi L, Benussi L, Binetti G, Ghidoni R, Galimberti D, Scarpini E, Serpente M, Rossi G, Giaccone G, Tagliavini F, Nacmias B, Piaceri I, Bagnoli S, Bruni AC, Maletta RG, Bernardi L, Postiglione A, Milan G, Franceschi M, Puca AA, Novelli V, Barlassina C, Glorioso N, Manunta P, Singleton A, Cusi D, Hardy J, Momeni P.
A genome-wide screening and SNPs-to-genes approach to identify novel genetic risk factors associated with frontotemporal dementia.
Neurobiology of Aging 2015;36(10):2904.e13-26.
IF=5,013
22. Arighi A, Rango M, Bozzali M, Pietroboni AM, Fumagalli G, Ghezzi L, Fenoglio C, Biondetti PR, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E.
Usefulness of Multi-Parametric MRI for the Investigation of Posterior Cortical Atrophy.
PLoS One 2015;10(10):e0140639.
IF=3,234
23. Heywood WE, Galimberti D, Bliss E, Sirka E, Paterson RW, Magdalinou NK, Carecchio M, Reid E, Heslegrave A, Fenoglio C, Scarpini E, Schott JM, Fox NC, Hardy J, Bahtia K, Heales S, Sebire NJ, Zetterburg H, Mills K. Identification of novel CSF biomarkers for neurodegeneration and their validation by a high-throughput multiplexed targeted proteomic assay. **Molecular Neurodegeneration** 2015;10(1):64.
IF=6,563
24. Talarico G, Canevelli M, Tosto G, Piscopo P, Confaloni A, Galimberti D, Fenoglio C, Scarpini E, Gasparini M, Bruno G.
Binge eating and fast cognitive worsening in an early-onset bvFTD patient carrying C9ORF72 expansion.
Neurocase 2015;21(5):543-7.
IF=1,124
25. Olde Rikkert MG, Verhey FR, Blesa R, von Arnim CA, Bongers A, Harrison J, Sijben J, Scarpini E, Vandewoude MF, Vellas B, Witkamp R, Kamphuis PJ, Scheltens P.
Tolerability and safety of Souvenaid in patients with mild Alzheimer's disease: results of multi-center, 24-week, open-label extension study.
Journal of Alzheimers Disease 2015;44(2):471-80.
IF=4,151

5. CAPITOLI IN VOLUMI INTERNAZIONALI

Calvi A, De Riz M, Pietroboni A, Galimberti D, Scarpini E. Risk of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) in Natalizumab-Associated PML. In: "Progressive Multifocal

Leukoencephalopathy: Risk Factors, Management Strategies and Prognosis” 2015. Novapublishers, New York, USA (Editor: Denise S. Coleman).

6. COMUNICAZIONI SU RIVISTE CENSITE 2015

1. Pellerino A, Aldieri E, Gulino ER, Ghigo D, Galimberti D, Scarpini E, Rainero I, Giordana MT. 3R/4R t-isoforms ration in the CSF of patients with degenerative dementias. **Clinical Neuropathology** 34(4): 215 (2015). 51°Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology and Clinical Neurobiology (AINPeNC) – 41° Meeting of the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), June 4-6, 2015, Verona, Italy.
2. Galimberti D, Bonsi R, Fenoglio C, Serpente M, Cioffi SMG, Arcaro M, Fumagalli GG, Ghezzi L, Arighi A, Scarpini E. Infallamtion in frontotemporal lobar degeneration: cerebrospinal fluid signature of progranulin mutation carriers. **Clinical Neuropathology** 34(4): 216 (2015). 51°Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology and Clinical Neurobiology (AINPeNC) – 41° Meeting of the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), June 4-6, 2015, Verona, Italy.
3. D. Galimberti, R. Bonsi, C. Fenoglio, M. Serpente, G.G. Fumagalli, L. Ghezzi, A. Arighi, E. Scarpini. Inflammation in frontotemporal lobar degeneration: cerebrospinal fluid signature of progranulin mutation carriers. **European Journal of Neurology** 2015; 22 Suppl.1: 120. – 1st meeting of the European Academy of Neurology, June 2015, Berlin, Germany.
4. Calvi A, Pietroboni AM, Arighi A, De Riz M, Ghezzi L, Galimberti D, Scarpini E. Balò concentric sclerosis: still to be considered an aggressive variant of multiple sclerosis? **European Journal of Neurology** 2015; 22 Suppl.1: 836. – 1st meeting of the European Academy of Neurology, June 2015, Berlin, Germany.
5. Arighi A, Bozzali M, Giulietti G, Pietroboni A, De Riz M, Fumagalli G, Ghezzi L, Basilico P, Calvi A, Scarioni M, Mercurio M, Rotondo E, Corti P, Vimercati R, Fenoglio C, Serpente M, Cioffi S, Galimberti D, Scarpini E. neuroimaging features of autosomal dominant FTLD in symptomatic and asymptomatic mutation carriers. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S11-12, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.
6. Pellerino A, Aldieri E, Gulini G, ghigo D, Galimberti D, Scarpini E, Rainero I, Giordana M. A possible additional diagnostic marker of degenerative dementias: 3R/4R tau isoforms ratio in the CSF. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S24, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.
7. Oldoni E, Serpente M, Fenoglio C, Bursey D, Cioffi S, Arcaro M, Fumagalli G, Scarioni M, Arosio B, Mari D, Pinessi L, Rainero I, Rubino E, Cappa S, Marcone A, Cerami C, Nacmias B, Sorbi S, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, Benussi L, Ghidoni R, Scarpini E, Galimberti D. PRNP P39L variant is a rare cause of frontotemporal lobar degeneration in an Italian FTLD population. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S37, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.
8. Scarioni M, Fumagalli G, Arighi A, Pietroboni A, De Riz M, Basilico P, Calvi A, Leta V, Ferrari M, Fenoglio C, Oldoni E, Serpente M, Galimberti D, Mariani C, Scarpini E.

Neurological Sciences 36, Suppl.: S103, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.

9. Scarioni M, Basilico P, Pietroboni A, Arighi A, Fumagalli G, Calvi A, De Riz M, Galimberti D, Scarpini E. A case report of primary central nervous system lymphoma. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S117, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.
10. Fenoglio C, Serpente M, Ardizzoia R, De Riz M, Comi C, Pietroboni A, Calvi A, Arcaro M, Cioffi S, Oldoni E, Cantello R, Galimberti D, Scarpini E. Long non coding RNA (lncRNAs) expression analysis in patients with multiple sclerosis: potential biomarkers of disease susceptibility and progression. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S147-148, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.
11. Cioffi S, Espay A, Fenoglio C, Serpente M, Arcaro M, Oldoni E, Ardizzoia R, Hagen M, Rodriguez-Porcel M, Scarpini E, Galimberti D. The novel GRN g.1642_1645delTGAG mutation is associated with language and behavioural impairment, and parkinsonism. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S164-165, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.
12. Fumagalli G, Basilico P, Scarioni M, Arighi A, Pietroboni A, Galimberti D, Bresolin N, Scarpini E. A case of genetic Creutzfeldt-jacob disease presenting with insomnia. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S174-175, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.
13. Galimberti D, Bonsi R, Fenoglio C, Serpente M, Cioffi S, Fumagalli G, Arighi A, Ghezzi L, Arcaro M, Mercurio M, Rotondo E, Scarpini E. Inflammatory molecules in frontotemporal dementia: cerebrospinal fluid signature of progranulin mutation carriers. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S218, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.
14. Serpente M, Fenoglio C, Cioffi S, Oldoni E, Arcaro M, Arighi A, Fumagalli G, Scarpini E, Galimberti D. Profiling of specific gene expression pathways in peripheral cells from Alzheimer's disease patients. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S312-313, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.
15. Calvi A, de Riz M, Pietroboni A, Scarioni M, Vergari M, Ariodante A, Nigro M, Galimberti D, Scarpini E, Priori A. Nabiximols and MS spasticity: neuropsychological tests, walking performance and self-reported questionnaires. **Neurological Sciences** 36, Suppl.: S320-321, 2015. XLVI Congress of the Italian Neurological Society, October 10-13, 2015, Genova, Italy.

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. MEMBERSHIP SOCIETÀ SCIENTIFICHE

Dott.ssa D. Galimberti – Secretary of the Dementia Panel della 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)

9. FINANZIAMENTI

- Joint Program for Neurodegenerative Disorders “Searching for therapeutic interventions in frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansions in the presymptomatic stage” 40.000 € (Nov 2015-Ott 2017)
- Ricerca Finalizzata Ministero della Salute “Italian network for autosomal dominant Alzheimer’s disease and frontotemporal lobar degeneration” 40.980 € (30/11/2012-29/11/2015)
- 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” 27.000 € (scad. 30/11/2015)
- Ricerca Corrente, Ministero della Salute “Ruolo delle molecole infiammatorie e degli RNA non codificanti (micro e long RNAs) nella patogenesi della Demenza Frontotemporale (malattia di Pick)” 155.149,40 €
- Progetto di rete Ministero della Salute “New strategies for diagnostic, therapeutics and clinical care in neurological diseases” 70.000 € (Nov 2015-Ott 2018)
- 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” 450.000 € (2013-2015).

LABORATORIO CELLULE STAMINALI

Responsabile:

Dottor Yvan Torrente, Neurologo Universitario in convenzione

Personale:

Dott.ssa Marzia Belicchi laboratorio	Biologa con contratto a tempo indeterminato di tecnico di laureato universitario
Dott.ssa Mirella Meregalli laboratorio	Biologa con contratto a tempo determinato di tecnico di laureato universitario
Dott.ssa Federica Colleoni	Biologa, con borsa annuale ospedaliera
Dott.ssa Paola Razini	Biotechnologa con borsa annuale ospedaliera
Dottor Andrea Farini	Biologo, PostDoc con borsa annuale ospedaliera
Dott.ssa Silvia Erratico	Biotechnologa, contrattista annuale
Dott.ssa Letizia Cassinelli	Biologa con borsa annuale ospedaliera
Dott.ssa Paola Frattini	Biotechnologa con borsa annuale ospedaliera
Dott.ssa Clementina Sitzia	Biotechnologa, medico, con borsa annuale ospedaliera
Dott.ssa Stefania Banfi	Biologa PostDoc con assegno universitario di tipo A annuale
Dott.ssa Francesca De Santis	Biologa con borsa annuale ospedaliera
Dott.ssa Chiara Villa Dottor Mattia Piovani	Bioingegnere, PostDoc contrattista pluriennale universitario Studente della facoltà di Biotechnologie, tirocinante per tesi magistrale dei 5 anni
Dott.ssa Veronica Nervi	Studente della facoltà di Biotechnologie tirocinio per tesi triennale
Dott.ssa Pamela Bella	Studente della facoltà di Biologia tirocinante per tesi magistrale dei 5 anni
Dottor Antonio Scopelliti	Studente della facoltà di Biologia tirocinante per tesi magistrale dei 5 anni
Dott.ssa Naima Guarrata	dottore in economia, project manager contrattista

Nel corso dell'anno 2015 il gruppo di lavoro diretto dal dott. Torrente ha proseguito la sua attività di ricerca nell'ambito delle distrofie muscolari (MDs), un gruppo eterogeneo di patologie ereditarie, in cui la progressiva atrofia e debolezza muscolare sono spesso associate all'esaurimento del potenziale rigenerativo del muscolo. L'obiettivo principale del Laboratorio Cellule Staminali rimane lo studio della distrofia muscolare di Duchenne (DMD), una delle forme di distrofia più frequenti e aggressive, malattia mortale per la quale ancora oggi non sono state trovate terapie efficienti e risolutive. La ricerca di base e applicata condotta dal gruppo del Dott. Torrente mira a capire la patofisiologia della malattia, individuarne i meccanismi di base, identificare prodotti farmacologici e cellulari da utilizzare in ambito terapeutico e trovare biomarkers che possano coadiuvare i medici nella diagnosi, nel fare una valutazione della progressione della malattia e nel poter quindi prevedere il futuro clinico dei pazienti, quasi sempre bambini. Proprio in quest'ambito quest'anno il gruppo del dott. Torrente ha pubblicato sulla rivista scientifica "*Current Gene Therapy*" un lavoro in cui per la prima volta viene descritto il rilascio di AONs da parte di cellule staminali umane CD133+ ingegnerizzate con vettori lentivirali mediato da esosomi e come questo processo permetta il rescue di distrofina murina in vivo. Inoltre, si sottolinea come gli AONs potrebbero essere internalizzati dalle cellule ospite suggerendo un potenziale ruolo degli esosomi, in grado di agire come carriers di vescicole, nello sviluppo di una potenziale terapia per DMD. Anche quest'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. In tal senso il Dott. Torrente, in collaborazione con un'equipe di neurologi, ematologi e fisioterapisti dell'Ospedale San Raffaele di Milano, ha partecipato al primo studio clinico di fase I/II che prevede il trapianto intra-arteria di cellule (mesangioblasti) isolate da un donatore HLA-compatibile in 5 pazienti affetti da Distrofia muscolare di Duchenne. I risultati di tale studio, pubblicati sulla rivista internazionale "*Embo Molecular Medicine*", dimostrano la fattibilità e la sicurezza di una terapia cellulare che utilizza cellule mesangioblasti iniettati con una dose crescente nell'arteria della gamba dei pazienti DMD sottoposti a terapia immunosoppressiva (tacrolimus): quattro infusioni consecutive realizzate a 2 mesi di distanza una dall'altra. I pazienti sono stati valutati da un punto di vista clinico, biochimico e radiologico. Due mesi dopo l'ultima iniezione è stata effettuata una biopsia muscolare per poter valutare la presenza delle cellule iniettate e la loro capacità di partecipare alla rigenerazione muscolare. Non sono stati osservati miglioramenti da un punto di vista funzionale ma nella biopsia muscolare di 4 dei cinque pazienti trattati si sono osservati bassi livelli del DNA del donatore e in un solo paziente è stata rilevata la distrofina. In questo lavoro si conclude che il trapianto intra-arteria di mesangioblasti isolati da un donatore HLA compatibile è un trattamento fattibile e abbastanza sicuro. Sono necessari ulteriori studi clinici che includano un numero maggiore di pazienti, di minore età al fine di realizzare un approccio terapeutico per la DMD veramente efficace. Inoltre il Dott. Torrente, neurologo da numerosi anni impegnato nella clinica della DMD fa parte di un network di medici specialistici che, in collaborazione con Jerry Mendell, direttore del Centro di terapia genica e distrofia muscolare del Nationwide Children's Hospital (Columbus, OH) hanno realizzato uno studio pubblicato sulla prestigiosa rivista scientifica internazionale "*Annals of Neurology*". Questo lavoro valuta l'efficacia e la sicurezza di un trattamento a lungo termine con il farmaco Eteplirsen, che agisce inducendo lo skipping (salto) dell'esone 51 ed è rivolto al trattamento della distrofia muscolare di Duchenne (DMD). I pazienti, trattati per tre anni con tale farmaco, sono stati comparati a controlli mecciati non trattati e mostrano un più lento rate di peggioramento del cammino valutato con il test del cammino dei 6 minuti (6MWT).

Purtroppo ad oggi non sono ancora state evidenziate terapie efficaci per la distrofia muscolare di Duchenne e numerosi ricercatori sono quotidianamente impegnati per cercare di

individuare tutti i meccanismi alla base della patologia e i possibili strumenti da utilizzare per la gestione della distrofia, con l'obiettivo ultimo non di curare ma almeno di migliorare la qualità della vita dei pazienti, tutti bambini e adolescenti.

Negli ultimi anni gli scienziati hanno scoperto molti geni associati a specifiche malattie, mettendo in evidenza che tutti noi abbiamo diversi livelli di predisposizione genetica verso patologie quali ad esempio il cancro, il diabete e le malattie cardiovascolari. Tuttavia è stato stabilito che la presenza e la gravità di queste malattie sono fortemente influenzate da fattori ambientali come la dieta, il fumo e lo stile di vita. Recenti studi confermano sempre più la connessione tra l'alimentazione e i geni perché il cibo può accenderli o spegnerli, modificando la loro espressione: il DNA non si può cambiare, ma è possibile intervenire sui meccanismi con cui la dieta può attivare o disattivare alcuni geni (meccanismi epigenetici). Sono note anche vitamine ed integratori utili a far fronte alle più svariate carenze nutrizionali, in grado, inoltre, di ridurre l'infiammazione associata ai sintomi della distrofia muscolare come ad esempio gli acidi grassi omega 3, che contribuiscono a diminuire l'infiammazione e migliorare l'immunità, la vitamina D utile per il sostegno del muscolo scheletrico e debolezza e la carnitina conosciuta per le sue attività antiossidante e protettiva a livello muscolare.

In tal senso in una pubblicazione sulla rivista internazionale "*BioMed Research International*" il gruppo di ricerca del dott. Torrente ha valutato gli effetti di una dieta a base di una miscela di polifenoli naturali (ProAbe) sull'architettura e la funzionalità muscolare di topi distrofici mdx, modello animale della distrofia muscolare di Duchenne. I muscoli dei topi trattati quotidianamente con il composto hanno mostrato una riduzione della fibrosi e della necrosi muscolare oltre ad una migliore vascolarizzazione. Il recupero delle caratteristiche morfologiche del muscolo distrofico porta ad un incremento della resistenza dei topi distrofici che hanno ricevuto il ProAbe. Questi dati confermano che una dieta a base di una miscela di polifenoli, importanti agenti antiossidanti, potrebbe rappresentare una strategia coadiuvante un trattamento per la distrofia muscolare di Duchenne. Alla luce dei promettenti risultati raggiunti a livello preclinico nel modello animale il Dott. Torrente ha sottomesso al Comitato Etico della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico lo studio dal titolo "STUDIO MONOCENTRICO IN DOPPIO CIECO RANDOMIZZATO DELL'EFFETTO DI UNA MISCELA DI FLAVONOIDI ED ACIDI GRASSI NATURALI IN PAZIENTI AFFETTI DA DISTROFIA MUSCOLARE", che in data 15/7/2015 è stato approvato con parere favorevole 1768 (determina 787/2015). Lo studio mira a valutare la possibilità di integrare la dieta di pazienti affetti da diverse tipologie di distrofia (distrofia muscolare di Duchenne, distrofia Facio-Scapolo-Omerale, e Distrofia dei Cingoli) con la somministrazione di una miscela di composti naturali. L'obiettivo principale di questo studio vuole essere valutare l'effetto a livello muscolare di una miscela di flavonoidi naturali in pazienti distrofici. Si desidera infatti raggiungere il suddetto obiettivo primario attraverso analisi funzionali indagando la capacità di tale composto di agire sulla forza muscolare aumentando la resistenza all'esercizio e migliorare la qualità di vita dei pazienti distrofici: prolungare il tempo di cammino autonomo, ridurre l'affaticabilità, prolungare alcune autonomie come salire/scendere le scale. La valutazione di come e quanto la qualità della vita dei pazienti che hanno assunto l'integratore alimentare, oggetto dello studio, potrebbe essere migliorata verrà realizzata grazie all'analisi dei questionari valutativi della limitazione del movimento (ACTIVLIM/ABILHAND e scale EK) che i pazienti compileranno presso il proprio domicilio e consegneranno mensilmente al clinical monitor. Queste scale valutative delle attività della vita quotidiana, per come essa viene percepita dal paziente stesso, o dai suoi genitori nel caso specifico, di bambini DMD, permettono di poter realizzare un'analisi oggettiva ed omogenea. La performance muscolare dei pazienti distrofici inclusi in questo studio verrà valutata tramite il test del cammino per 6 minuti (6-min walk test; 6MWT). Il 6MWT è stato recentemente scelto come strumento di valutazione della performance

muscolare in trial clinici multicentrici internazionali in pazienti deambulanti affetti da diversi tipi di distrofi muscolari (DMD, FSHD, LGMD) (<https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01957059>; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01540409>). La forza muscolare dei pazienti trattati verrà misurata anche utilizzando il dinamometro isometrico/isocinetico Biodex, strumentazione presente presso l'ambulatorio CDF del padiglione Monteggia della stessa Fondazione, che permette una valutazione quantitativa della forza muscolare distrettuale ai 4 arti. Ulteriore obiettivo dello studio sarà valutare la capacità della miscela di polifenoli naturali di mobilitare alcune popolazioni di cellule staminali/progenitori dal comparto midollare al circolo ematico periferico. Questo obiettivo verrà perseguito realizzando un'analisi immunofenotipica dei campioni di sangue periferico dei pazienti trattati. Come descritto in letteratura è noto che alcuni composti naturali sono in grado di mobilitare popolazioni cellulari (ad esempio cellule CD133+) dal comparto midollare al sangue periferico e tali popolazioni, con potenzialità mio-endoteliali, potrebbero successivamente raggiungere i distretti muscolari compromessi e partecipare alla rigenerazione tessutale. Lo scopo di questo studio vuole essere quello di testare un integratore alimentare costituito da una miscela di composti naturali con caratteristiche anti-infiammatorie ed anti-ossidanti che possa essere indicato quale coadiuvante la terapia cortisonica in uso nel trattamento di pazienti affetti da distrofia muscolare.

Da molti anni il gruppo del dott. Torrente collabora con numerosi gruppi di ricerca che operano all'interno della Fondazione IRCCS Ca' Granda Policlinico di Milano ed in particolare con i colleghi neurochirurghi dell'Università di Milano con cui quest'anno ha pubblicato, sulla rivista scientifica "*Journal of Stem Cell Research & Therapeutics*", uno studio in cui viene dimostrato come cancer stem cells (CSCs) isolate da neurosfere ottenute da un glioblastoma (GBM), il più comune e il più maligno tra le neoplasie della glia, danno origine in vitro a numerosi cloni con un differente rate proliferativo. Inoltre il trapianto di questi cloni in un modello immunodepresso quale il topo nude, dà origine a tumori che mostrano caratteristiche istologiche tipiche del GBM e presentano un rate di crescita con le stesse caratteristiche proliferative del clone iniettato. Questi dati indicano che esistono rilevanti differenze nella capacità tumorigenica delle CSCs isolate da un'unica neurosfera, suggerendo una possibile combinazione dell'ipotesi delle cancer stem cells e del modello di evoluzione clonale alla base dell'eterogeneità del GBM. Nel suddetto lavoro viene inoltre analizzato il ruolo di fattori di trascrizione quali NRSF/REST e Olig2 e si mostra un possibile ruolo predittivo di REST che sembra up regolato nelle cellule più proliferative, invasive e meno differenziate. Ulteriori collaborazioni internazionali hanno permesso l'integrazione di diversi know how e competenze consentendo al gruppo di concretizzare le proprie ricerche in pubblicazioni in importanti riviste scientifiche. In tal senso la proficua collaborazione con professore Gorka Orive del Dipartimento di Farmacologia dell'Università dei Paesi Baschi di Vittoria ha dato origine ad una pubblicazione sulla rivista "*Current Pharmaceutical Biotechnology*", in cui vengono descritte alcune delle tecnologie emergenti negli ultimi anni in relazione allo sviluppo di nuovi biomateriali, all'ottimizzazione di alcune micro- e nano-tecnologie per il delivery di farmaci e cellule o per l'applicazione di cellule staminali come prodotti terapeutici, inoltre ne vengono discussi tutti i potenziali benefici. Anche la collaborazione con il Dr Ricordi, Professore di chirurgia e medicina della Divisione Trapianti cellulari presso l'Università di Miami e Direttore del famoso Diabetes Research Institute, ha permesso di sviluppare la sinergia tra specialisti dei vari settori (medici, biologi, bioingegneri) che ha portato alla realizzazione di due importanti pubblicazioni. Più precisamente sulla rivista "*Biotechnology and Bioengineering*" si è pubblicato un lavoro in cui viene analizzato il trapianto di isole pancreatiche in matrici di fibrina rese pro-angiogeniche dall'incorporazione di minime dosi di un complesso di VEGF-A165 e PDGF-BB. I risultati mostrano che ingegnerizzando il sito di trapianto per promuovere una immediata

rivascolarizzazione, l'engraftment e la funzionalità a lungo termine delle isole trapiantate può essere migliorata a livello di siti extraepatici (sottocute o nel cuscinetto di grasso dell'epidermide). Un secondo lavoro, pubblicato sulla rivista scientifica "*Expert Opin Biol Ther*", è una review che riassume i principi della progettazione di strumenti di immunoisolamento e del differenziamento di cellule staminali in prodotti cellulari maturi in grado di produrre insulina. L'immunoisolamento è un nuovo protocollo in fase di sperimentazione clinica finalizzato ad evitare il rigetto del tessuto trapiantato prevedendone la separazione e racchiudendolo in una specie di membrana che può essere attraversata solo da molecole piccole come le sostanze nutritive o l'ossigeno. Il lettore acquisirà conoscenze dei diversi tipi di strumenti per immunoisolare e dei parametri chiave che influenzano il risultato dell'innesto incapsulato. Vengono anche discussi i progressi nel differenziamento delle cellule staminali in isole endocrine mature, compresi i più recenti studi clinici e le sfide connesse con l'applicazione di dispositivi per immunoisolamento di base progettati per il differenziamento di cellule staminali in isole pancreatiche. Durante quest'anno il Dott. Torrente è stato impegnato anche nell'organizzazione di eventi scientifici divulgativi nazionali ed internazionali, aventi come tema le cellule staminali e rivolti a ricercatori, medici, biologi e studenti universitari; da ricordare in modo particolare le giornate di studio e i convegni organizzati da Unistem all'Università degli Studi di Milano. Durante il 2015 il dott. Torrente ha continuato la sua attività di revisore di lavori scientifici per numerose prestigiose riviste internazionali e di progetti di ricerca ministeriali e internazionali; inoltre fa parte dell'editorial board della rivista scientifica CellR4, un giornale multidisciplinare focalizzato in particolare sulla riprogrammazione, differenziamento e rigenerazione cellulare. Infine nel 2015 il Dott. Torrente, ha proseguito la sua attività didattica presso l'Università degli studi di Milano quale Docente del Corso di Perfezionamento dal titolo "Cellule staminali nelle patologie neuromuscolari e neurodegenerative", Docente responsabile del Corso elettivo "Le staminali in patologie neuromuscolari e neurodegenerative" della Facoltà di Medicina e Chirurgia, docente per il seminario integrativo "Fisiologia e biochimica cellulare di cellule staminali per la terapia di malattie neuromuscolari" del Corso di Fisiologia (Docente Ref. Prof. Roberto Maggi) CdL Magistrale a ciclo unico in Farmacia – Facoltà di Scienze del Farmaco e Docente per il VII° modulo del Corso di Master in Farmacia e Farmacologia Oncologica del Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari.

PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA 2015

ELENCO PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI RECENSITE

1) Clementina Sitzia, Andrea Farini, Federica Colleoni, Francesco Fortunato, Paola Razini, Silvia Erratico, Alessandro Tavelli, Francesco Fabrizi, Marzia Belicchi, Mirella Meregalli, Giacomo Comi, 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, Milan, Italy

Improvement of endurance of DMD animal model using natural polyphenols

BioMed Research International, Issue "Nutrients and Muscle Disease (MDIS) "

I.F.: 2.71

2) G. Cossu, S. C. Previtali, S. Napolitano, M. P. Cicalese, F. S. Tedesco, F. Nicastro, M. Noviello, U. Roostalu, M. G. Natali Sora, M. Scarlato, M. De Pellegrin, C. Godi, S. Giuliani, F. Ciotti, R. Tonlorenzi, I. Lorenzetti, C. Rivellini, S. Benedetti, R. Gatti, S. Markt, B. Mazzi, A. Tettamanti, M. Ragazzi, M. A. Imro, G. Marano, A. Ambrosi, R. Fiori, M. P. Sormani, C. Bonini, M. Venturini, L. S. Politi, Y. Torrente & F. Ciceri.

Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy.

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

EMBO Molecular Medicine. 5 Novembre 2015 I.F.: 8.66

3) F. Colleoni, M. Belicchi, P. Razini, M. Meregalli, R. Galli, S. Mazzoleni, S. Brunelli, M. Di Segni, D. Coviello, M. Baccarin, B. Pollo, N. Bresolin, L. Bello, L. Conti, Y. Torrente.

Cancer Stem Cells Recapitulates the Heterogeneity of Glioblastomas.

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

Journal of Stem Cell Research & Therapeutics. 18 Settembre 2015. I.F.: 2.78

4) M. Meregalli, A. Farini, C. Sitzia, C. Beley, P. Razini, L. Cassinelli, F. Colleoni, P. Frattini, N. Santo, E. Galbiati, D. Prospero, A. Tavelli, M. Belicchi, L. Garcia, Y. Torrente.

Stem cell-mediated exon skipping of the dystrophin gene by the bystander effect.

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

Curr Gene Ther. 2015 Sep 29. . I.F.: 2.54

5) G. Orive, R. Cobos, J. Gorriti, J. L. Pedraz, M. Meregalli and Y. Torrente.

Drug Delivery Technologies and Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration.

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

Special issue of Current Pharmaceutical Biotechnology I.F.: 3.40

6) M. Najjar, V. Manzoli, C. Villa, M. M. Martino, R. D. Molano, Y. Torrente, A. Pileggi, L. Inverardi, C. Ricordi, J. A. Hubbell, Alice A. Tomei.

Fibrin Gels Engineered with Pro-Angiogenic Growth Factors Promote Engraftment of Pancreatic Islets in Extrahepatic Sites in Mice.

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

Biotechnology and Bioengineering. DOI 10.1002/bit.25589. March 9, 2015 I.F.: 4.126

7) Tomei AA, Villa C, Ricordi C.

Development of an encapsulated stem cell-based therapy for diabetes.

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

Expert Opin Biol Ther. 2015;15(9):1321-36. Jul 9. I.F.: 3.74

8) Pane M, Mazzone ES, Sivo S, Sormani MP, Messina S, D Amico A, Carlesi A, Vita G, Fanelli L, Berardinelli A, Torrente Y, Lanzillotta V, Viggiano E, D Ambrosio P, Cavallaro F, Frosini S, Barp A, Bonfiglio S, Scalise R, De Sanctis R, Rolle E, Graziano A, Magri F, Palermo C, Rossi F, Donati MA, Sacchini M, Arnoldi MT, Baranello G, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Previtali S, Bruno C, Politano L, Comi GP, Bertini E, Mercuri E.

Correction: Long Term Natural History Data in Ambulant Boys with Duchenne Muscular Dystrophy: 36-Month Changes.

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

PLoS One. 2015 Dec 4;10(12) I.F.: 3.53

9) Mendell JR, Goemans N, Lowers LP, Alfano LN, Berry K, Shao J, Kaye EM, mercuri E, Eteplirsen Study Group; DMD Italian Network

Longitudinal of effect of eteplirsen vs. historical control on ambulation in DMD

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

Ann Neurol 2015 Nov 17 IF: 9.977

ELENCO CONGRESSI 2015

1. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
"Natural molecules with regenerative potential for salivary gland disorders.

Y. Torrente,

International Workshop "Salivary disorders, Nutrition and Pediatric Age". Milano EXPO Fiera. 9 Ottobre 2015.

2. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
Preclinical experience and perspectives of a clinical trial using CD133 stem cells.

Y. Torrente.

EMBO Conference. Cell therapy today: Achievements, hopes and hype. 9-12 September 2015, Manchester, UK.

3. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
Stem cell therapy in muscular dystrophies: state-of-the-art and future perspectives.

Y. Torrente.

Stem Cell Research Italy, Bari. June 10-12, 2015

4. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Poster presentation)

Beta-sarcoglycanopathy: what's new?

B. Vola, R. Maggi, M. Cerletti, Y. Torrente.

15° Congresso Nazionale AIM. Napoli, 20-23 Maggio 2015

5. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Poster presentation)

Exome sequencing identifies mutations in two genes encoding the LIM-proteins N-RAP and FHL1 in a BAG3 myofibrillar myopathy.

M. Meregalli, F. C. D'Avila, S. Lupoli, M. Barcella, A. Orro, F. De Santis, C. Sitzia, A. Farini, P. D'Ursi, S. Erratico, L. Milanesi, D. Braga, D. Cusi, C. Barlassina, Y. Torrente.

XII Congress of Mediterranean Society of Miology, Napoli. 18-20 Maggio 2015

6. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)

Giornata di Studio "L'evoluzione degli strumenti a disposizione della ricerca genetica e la gestione dei dati clinici"

Y. Torrente.

Premio Sapio per la ricerca italiana XV edizione Centro Congressi San Raffaele, Milano

7. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)

"Le cellule staminali nella sperimentazione clinica"

M Belicchi

UniStem Day 13 marzo 2015 Trento

8. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
“Cellule staminali: dalla ricerca alla clinica”

M Meregalli

UniStem Day 13 marzo 2015 Milano

ELENCO DEI PROGETTI DI RICERCA FINANZIATI ED ANCORA IN CORSO

1) “Gene transfer of human frataxin protein (FXN) using engineered stem cells for the treatment of Friedreich’s ataxia (FRDA)” - Associazione “Ogni Giorno” - per Emma ONLUS, Associazione “Per il sorriso di Ilaria di Montebruno” ONLUS

2) “Studio dell’effetto anti-infiammatorio e immunomodulante di una miscela di flavonoidi ed acidi grassi naturali in modelli murini di distrofia muscolare” - Ricerca Corrente – Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

3) “New international collaborative team on bag3 myofibrillar myopathy” - Fondazione Roby ONLUS

5) Ricerca Finalizzata Ref. n. RF-2009-1547384 (2012-2014) "Design of a clinical trial using CD133-LV(U7)"

6) “Gene therapy for alpha-dystroglycan muscular dystrophy (MDC1C)” _Fondazione Oplis Onlus

7) “Studio genetico e nutrizionale finalizzato alla cura delle Miopatie Miofibrillari” – Fondazione Roby ONLUS

8) “Motor neuron degeneration in Spinal and Bulbar Muscular Atrophy: molecular approaches to counteract mutant androgen receptor neurotoxicity” – Telethon Grant 2014

COLLABORAZIONI NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

- Prof. Tremblay – Université Laval, Québec, Canada
- Prof. T. Patridge – University of Washington, USA
- Prof. Cossu - Università degli Studi di Milano, Milano
- Prof. Garcia – Institut de Myologie, Université Pierre et Marie Curie, UMPC-Inserm UMRS 787, Paris
- Prof. T. Voit – Institut de Myologie, Université Pierre et Marie Curie, UMPC-Inserm UMR S 974, Paris
- Prof. Helge Amthor – Institut de Myologie, Université Pierre et Marie Curie, UMPC-Inserm UMR S 974, Paris
- Prof. V. Mouly - Institut de Myologie, Université Pierre et Marie Curie, UMPC-Inserm UMR S 974, Paris
- Prof. G. S Butler- Browne - Institut de Myologie, Université Pierre et Marie Curie, UMPC-Inserm UMR S 974, Paris
- Prof. Hoffman - Center for Genetic Medicine Research CGMR, George Washington University, USA
- Prof. F. Muntoni - Imperial College of London, UK

- Prof. N. Levy – Génétique Médicale et Développement, Faculté de Médecine de la Timone, Marseille
- Prof. T. Rando - Stanford University, UK
- Prof. P. Munoz – ICREA, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona
- Prof. E. Mercuri - Policlinico Agostino Gemelli, Milano
- Prof. M. Bakingam - Institut Pasteur, Department of Developmental Biology
- Prof. F. Svinartchouk – Généthon, Evry, France
- Prof. A. Lopez del Munain - Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, España

U.O.S.D. MALATTIE NEUROMUSCOLARI e RARE

Responsabile:

Prof. Maurizio Moggio

Collaboratori:

Dott.ssa M. Sciacco: Dirigente Medico Fondazione - Neurologo, Dottore di ricerca in Scienze Neurologiche, co-responsabile "Banca tessuto muscolare scheletrico, nervo periferico, DNA e colture cellulari"

Dott.ssa Gigliola Fagiolari: Biologo - Tecnico ospedaliero Fondazione

Dott.ssa Patrizia Ciscato: Tecnico ospedaliero Fondazione

Dott.ssa Laura Napoli: Biologo - Borsista Telethon

Dott.ssa Michela Ripolone: Biologo - Borsista Fondazione

Dott.ssa Raffaella Violano: Biologo - Borsista Fondazione

Dott.ssa Irene Colombo: Neurologo - Borsista Fondazione

Dottor Lorenzo Peverelli: Neurologo - Borsista Telethon

Dott.ssa Luisa Villa: Specializzanda in Neurologia

Dott.ssa Patrizia Valentini: Architetto - amministrativa - Borsista Telethon

Dott.ssa Silvia Testolin: Laureata in Medicina e Chirurgia, Borsista Fondazione (sino ad agosto 2015)

Roberto Tironi: Tecnico - Borsista Telethon

ATTIVITA' DIAGNOSTICA

- 1) Nell'anno 2015 l'attività assistenziale riguardante le malattie neuromuscolari è sovrapponibile a quella dell'anno precedente.

In particolare:

- effettuate n. 1050 visite nell'ambulatorio per le malattie neuromuscolari in collaborazione con la UO di Neurologia.
- effettuati n. 300 accessi in regime MAC per le suddette patologie.

- 2) Attività del Laboratorio per la diagnosi e lo studio delle Malattie Neuromuscolari:

- studiate e refertate 202 biopsie muscolari e 14 biopsie di nervo.

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

- UOC di Neurologia
- UOD Malattie Neuromuscolari e Rare
- 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 regime di "fatturazione" intercorrono fra il Servizio di Diagnostica e i citati Enti ospedalieri.

- 3) Attività della "Banca di tessuti muscolari, nervo periferico, DNA e colture cellulari" della UOD:

- Sono state effettuate spedizioni di campioni biologici di pazienti affetti da malattie Rare Neuromuscolari a n 16 centri di diagnostica e ricerca sia nazionali sia internazionali.
- Sono state effettuate spedizioni per un totale di n 103 campioni biologici (tessuti muscolari, DNA, colture).

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

- Dall'anno 1999 il Laboratorio ha avuto il riconoscimento di "Biobanca Telethon di tessuto muscolare scheletrico, nervo periferico, DNA 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:

<http://www.centrodinoferrari.com/laboratori/u-o-d-diagnostica-malattie-neuromuscolari-e-rare/>.

- 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.
- Da Luglio 2013 è entrata a far parte dell'Infrastruttura di ricerca europea Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI).

Biopsie Muscolari

Microscopia ottica

Durante l'anno 2015 sono state eseguite N° 202 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 2828 tests.

Microscopia elettronica

Le biopsie muscolari sono state studiate con metodiche ultrastrutturali quando ritenuto necessario e sono stati eseguiti 75 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 2015 sono state eseguite N° 14 biopsie di nervo periferico. Tutti i prelievi biopsici 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 52 tests (istologia e reazioni immunoistochimiche).

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 fibrile. A tal fine sono stati eseguiti circa 42 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.

ATTIVITÀ DI RICERCA

L'attività di ricerca è stata condotta utilizzando gli stessi laboratori e apparecchi impiegati per la diagnostica neuromuscolare. Anche i reagenti utilizzati sono, almeno per l'80%, quelli comunemente impiegati per la diagnostica.

L'attività di ricerca ha prodotto nel 2015 i seguenti risultati:

PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA ANNO 2015

SETTORE URGENZA-EMERGENZA: FISIOPATOLOGIA DELLA RELAZIONE TRA PERSONA E AMBIENTE E MALATTIE RARE

Linea 1: Epidemiologia Clinica

Magri F, Colombo I, Del Bo R, Previtali S, Brusa R, Ciscato P, Scarlato M, Ronchi D, D'Angelo MG, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

ISPD mutations account for a small proportion of Italian Limb Girdle Muscular Dystrophy cases.

BMC Neurol. 2015 Sep 24;15(1):172. doi: 10.1186/s12883-015-0428-8. PMID: 26404900 IF 2,04

La distrofia muscolare dei cingoli da difetto di glicosilazione dell'a-distroglicano è stata recentemente associata a mutazioni nei geni Isoprenoid synthase domain-containing (ISPD) e GDP-mannosio profosforilasi B (GMPPB). Abbiamo studiato una popolazione di 174 pazienti italiani affetti da distrofia dei cingoli ed abbiamo individuato due mutazioni eterozigoti nel gene ISPD in un soggetto con deficit di a-distroglicano

Colombo I, Pagliarani S, Testolin S, Cinnante CM, Fagiolari G, Ciscato P, Bordoni A, Fortunato F, Magri F, Previtali SC, Velardo D, Sciacco M, Comi GP, Moggio M.

Longitudinal follow-up and muscle MRI pattern of two siblings with polyglucosan body myopathy due to glycogenin-1 mutation.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015 Jul 22. pii: jnnp-2015-310553. doi: 10.1136/jnnp-2015-310553. [Epub ahead of print] No abstract available. PMID: 26203156 IF 6,807

Abbiamo seguito per 35 anni 2 sorelle con miopatia da accumulo di poliglucosani dal punto di vista clinico e strumentale. Abbiamo inoltre effettuato uno studio genetico con riscontro di mutazione in omozigosi nel gene glicogenina 1. Il lavoro ci ha permesso di meglio definire lo spettro clinico di questa malattia e di effettuare correlazioni tra genotipo e fenotipo clinico e neuroradiologico.

Fattori F, Maggi L, Bruno C, Cassandrini D, Codemo V, Catteruccia M, Tasca G, Berardinelli A, Magri F, Pane M, Rubegni A, Santoro L, Ruggiero L, Fiorini P, Pini A, Mongini T, Messina S, Brisca G, Colombo I, Astrea G, Fiorillo C, Bragato C, Moroni I, Pegoraro E, D'Apice MR, Alfei E, Mora M, Morandi L, Donati A, Evilä A, Vihola A, Udd B, Bernansconi P, Mercuri E, Santorelli FM, Bertini E, D'Amico A.

Centronuclear myopathies: genotype-phenotype correlation and frequency of defined genetic forms in an Italian cohort.

J Neurol. 2015 Jul;262(7):1728-40. doi: 10.1007/s00415-015-7757-9. Epub 2015 May 10. PMID: 25957634 IF 3.377

Questo studio multicentrico si prefigge di descrivere le correlazioni genotipo-fenotipo in una popolazione di pazienti italiani affetti da miopatia centronucleare soprattutto in quanto questo gruppo di malattie muscolari può conseguire a mutazioni in 7 diversi geni. Rientrano nello studio 13 casi ad esordio infantile-adolescenziale e 11 casi ad esordio adulto.

Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Donati MA, Federico A, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Santorelli FM, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Bruno C, Bello L, Caldarazzo Ienco E, Cardaioli E, Catteruccia M, Da Pozzo P, Filosto M, Lamperti C, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Ronchi D, Sauchelli D, Scarpelli M, Sciacco M, Valentino ML, Vercelli L, Zeviani M, Siciliano G.

Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion.

J Neurol. 2015 May;262(5):1301-9. doi: 10.1007/s00415-015-7710-y. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25808502 IF 3.38

Studio retrospettivo di una popolazione di 228 pazienti afferenti al database del "Network italiano per le malattie Mitochondriali" al fine di ridefinire i fenotipi clinici sottesi dalla presenza di macrodelezioni a carico del DNA mitocondriale. In particolare, sono stati rielaborati i criteri diagnostici della sindrome di Kearns-Sayre (KSS) e dell'oftalmoplegia estrinseca progressiva (PEO)..

Musumeci O, la Marca G, Spada M, Mondello S, Danesino C, Comi GP, Pegoraro E, Antonini G, Marrosu G, Liguori R, Morandi L, Moggio M, Massa R, Ravaglia S, Di Muzio A, Filosto M, Tonin P, Di Iorio G, Servidei S, Siciliano G, Angelini C, Mongini T, Toscano A; Italian GSD II group.

LOPED study: looking for an early diagnosis in a late-onset Pompe disease high-risk population.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015 Mar 17. pii: jnnp-2014-310164. doi: 10.1136/jnnp-2014-310164. [Epub ahead of print] PMID: 25783438 IF 6,807

Studio multicentrico osservazionale mirato a definire la prevalenza della malattia di Pompe ad esordio adulto in una popolazione a rischio utilizzando come sistema di screening il "dried blood spot" (DBS). Lo studio ha coinvolto 17 centri italiani che si occupano di malattie neuromuscolari. In un periodo di 14 mesi sono stati analizzati 1051 casi con positività al test DBS in 30 casi e conferma genetica in 17 casi.

Colombo I, Pagliarani S, Testolin S, Salsano E, Napoli LM, Bordoni A, Salani S, D'Adda E, Morandi L, Farina L, Magri F, Riva M, Prella A, Sciacco M, Comi GP, Moggio M.

Adult polyglucosan body disease: clinical and histological heterogeneity of a large Italian family.

Neuromuscul Disord. 2015 May;25(5):423-8. doi: 10.1016/j.nmd.2015.01.015. Epub 2015 Feb 7. PMID: 25728520 IF 2.64

Descriviamo il caso di tre fratelli italiani affetti da questa rara forma di leucodistrofia ereditaria associata a polineuropatia assonale. Abbiamo effettuato una correlazione clinica, neuroradiologica, biotica muscolare e genetica.

Graziano A, Bianco F, D'Amico A, Moroni I, Messina S, Bruno C, Pegoraro E, Mora M, Astrea G, Magri F, Comi GP, Berardinelli A, Moggio M, Morandi L, Pini A, Petillo R, Tasca G, Monforte M, Minetti C, Mongini T, Ricci E, Gorni K, Battini R, Villanova M, Politano L, Gualandi F, Ferlini A, Muntoni F, Santorelli FM, Bertini E, Pane M, Mercuri E.

Prevalence of congenital muscular dystrophy in Italy: a population study.

Neurology. 2015 Mar 3;84(9):904-11. doi: 10.1212/WNL.0000000000001303. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25653289 IF 8.29

Studio di popolazione su base nazionale di pazienti affetti da distrofia muscolare congenita. Lo studio include 336 pazienti. la forma più comune è quella da deficit di glicosilazione dell'alfa-distrogliocano, a seguire deficit di laminina $\alpha 2$ e collagene VI. meno frequente il riscontro di mutazioni in SEPN1 e LMNA.

Bertoldo F, Zappini F, Brigo M, Moggio M, Lucchini V, Angelini C, Semplicini C, Filosto M, Ravaglia S, Cotelli S, Todeschini A, Scarpelli M, Pancheri S, Tonin P.

Prevalence of asymptomatic vertebral fractures in late-onset Pompe disease.

J Clin Endocrinol Metab. 2015 Feb;100(2):401-6. doi: 10.1210/jc.2014-2763. Epub 2014 Nov 14. PMID: 25396301 IF 6.209

Si tratta di un lavoro multicentrico volto a stabilire la prevalenza delle fratture vertebrali morfometriche e a valutare la massa ossea in soggetti adulti affetti da malattia di Pompe. Lo studio ha permesso di riscontrare fratture vertebrali morfometriche nel 77% dei pazienti studiati (17 su 22). Tutte le fratture erano asintomatiche e atraumatiche e la loro presenza era indipendente dal quadro miopatico e respiratorio. Osteopenia e osteoporosi erano presenti in oltre il 50% dei pazienti. Lo studio sottolinea la necessità di effettuare uno screening per la presenza di fratture vertebrali nei soggetti con malattia di Pompe indipendentemente dalla gravità della patologia.

Linea 3: Nuove Emergenze per la Cura della Salute

Peverelli L, Testolin S, Villa L, D'Amico A, Petrini S, Favero C, Magri F, Morandi L, Mora M, Mongini T, Bertini E, Sciacco M, Comi GP, Moggio M.

Histologic muscular history in steroid-treated and untreated patients with Duchenne dystrophy.

Neurology. 2015 Oct 23. pii: 10.1212/WNL.0000000000002147. [Epub ahead of print] PMID: 26497992 I.F. 8.286

Abbiamo studiato la storia naturale della distrofia muscolare di Duchenne dal punto di vista morfologico con lo scopo di fornire uno strumento riproducibile per la valutazione delle modificazioni istologiche che si verificano nel corso della malattia. Abbiamo analizzato le biopsie di 56 bambini, di età compresa tra 1 e 10 anni, alcuni dei quali in corso di trattamento steroideo. In particolare, abbiamo constatato che tra i 6 e i 7 anni di età vi è un aumento notevole di tessuto connettivo con perdita di capacità rigenerative da parte del muscolo. Questo dato è essenziale al fine di stabilire il momento più idoneo per iniziare eventuali terapie.

Pichiecchio A, Berardinelli A, Moggio M, Rossi M, Balottin U, Comi GP, Bastianello S. *Asymptomatic Pompe disease: Can muscle MRI facilitate diagnosis?*

Muscle Nerve. 2015 Oct 16. doi: 10.1002/mus.24936. [Epub ahead of print] No abstract available. PMID: 26474166 I.F. 2.283

L'articolo mette a fuoco l'importanza degli studi di Risonanza Magnetica Muscolare che possono, in base alla tipologia di muscoli colpiti, fornire un indirizzo diagnostico in soggetti ancora asintomatici dal punto di vista clinico.

Montagnese F, Portaro S, Musumeci O, Migliorato A, Moggio M, Fagiolari G, Rodolico C. *Sporadic late-onset nemaline myopathy in a woman with multiple myeloma successfully treated with lenalidomide/dexamethasone.*

Muscle Nerve. 2015 Jun;51(6):934-5. doi: 10.1002/mus.24545. Epub 2015 Jan 5. No abstract available. PMID: 25524603 IF 2.283

Riportiamo il caso di una paziente affetta da miopatia nemalinica sporadica ad esordio tardivo preceduta da una diagnosi di mieloma multiplo. La paziente ha tratto beneficio dalla somministrazione di terapia steroidea associata a terapia immunomodulante con lenalidomide.

Mora M, Angelini C, Bignami F, Bodin AM, Crimi M, Di Donato JH, Felice A, Jaeger C, Karcagi V, LeCam Y, Lynn S, Mezmaric M, Moggio M, Monaco L, Politano L, de la Paz MP, Saker S, Schneiderat P, Ensini M, Garavaglia B, Gurwitz D, Johnson D, Muntoni F, Puymirat J, Reza M, Voit T, Baldo C, Bricarelli FD, Goldwurm S, Merla G, Pegoraro E, Renieri A, Zatloukal K, Filocamo M, Lochmüller H.

The EuroBioBank Network: 10 years of hands-on experience of collaborative, transnational biobanking for rare diseases.

Eur J Hum Genet. 2015 Sep;23(9):1116-23. doi: 10.1038/ejhg.2014.272. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25537360 IF 4.349

The EuroBioBank (EBB) network (www.eurobiobank.org), di cui la nostra Biobanca fa parte, rappresenta il primo network europeo di Biobanche ed ha lo scopo di fornire campioni biologici di DNA e tessuti alla comunità scientifica che conduce studi sulle malattie rare. Fu fondata nel 2001 ed è da oltre 10 anni coinvolta in n numerosi programmi di ricerca europei. Il lavoro sottolinea in particolare quest'ultimo aspetto.

SETTORE RIPARAZIONE E SOSTITUZIONE DI CELLULE, ORGANI E TESSUTI

Linea 6: Neuroscienze Cliniche e di Base

Reyes A, Melchionda L, Nasca A, Carrara F, Lamantea E, Zanolini A, Lamperti C, Fang M, Zhang J, Ronchi D, Bonato S, Fagiolari G, Moggio M, Ghezzi D, Zeviani M.

RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy.

Am J Hum Genet. 2015 Jun 17. pii: S0002-9297(15)00199-8. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.05.013. [Epub ahead of print] PMID: 26094573 IF 10.931

Studio di sei soggetti provenienti da tre diverse famiglie e affetti da encefalomiopatia mitocondriale in cui la tecnica del next-generation Sequencing ha reso possibile l'identificazione di un nuovo gene responsabile della patologia.

Ripolone M, Ronchi D, Violano R, Vallejo D, Fagiolari G, Barca E, Lucchini V, Colombo I, Villa L, Berardinelli A, Balottin U, Morandi L, Mora M, Bordoni A, Fortunato F, Corti S, Parisi D, Toscano A, Sciacco M, DiMauro S, Comi GP, Moggio M.

Impaired Muscle Mitochondrial Biogenesis and Myogenesis in Spinal Muscular Atrophy.

JAMA Neurol. 2015 Jun 1;72(6):666-75. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0178. PMID: 25844556 IF 7.271

Abbiamo studiato dal punto di vista istochimico, biochimico e biomolecolare le biopsie muscolari di 24 pazienti affetti da atrofia muscolare spinale (SMA) giungendo alla conclusione che un'alterata regolazione della miogenesi e una down-regolazione della biogenesi mitocondriale contribuiscono alle alterazioni patologiche nei muscoli di pazienti affetti da SMA.

Gang Q, Bettencourt C, Machado PM, Fox Z, Brady S, Healy E, Parton M, Holton JL, Hilton-Jones D, Shieh PB, Zanuteli E, De Paepe B, De Bleecker J, Shaibani A, Ripolone M, Violano R, Moggio M, Barohn RJ, Dimachkie MM, Mora M, Mantegazza R, Zanotti S, Hanna MG, Houlden H; Muscle Study Group and the International IBM Genetics Consortium.

The effects of an intronic polymorphism in TOMM40 and APOE genotypes in sporadic inclusion body myositis.

Neurobiol Aging. 2015 Apr;36(4):1766.e1-3. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.039. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25670332 IF 5.01

Il lavoro ha visto il contributo della nostra UO come fornitore di campioni biologici di pazienti affetti da miopatia da corpi inclusi e custoditi nella banca della UO. Sono stati individuati dei polimorfismi a carico del gene TOMM40 e del del gene APOE che sono stati correlati a differenti quadri clinici.

Colombo I, Scoto M, Manzur AY, Robb SA, Maggi L, Gowda V, Cullup T, Yau M, Phadke R, Sewry C, Jungbluth H, Muntoni F.

Congenital myopathies: Natural history of a large pediatric cohort.

Neurology. 2015 Jan 6;84(1):28-35. doi: 10.1212/WNL.0000000000001110. Epub 2014 Nov 26.

PMID: 25428687 IF 8.286

Si tratta di uno studio retrospettivo su 125 pazienti affetti da Miopatia Congenita in età pediatrica, volto a valutare la storia naturale di tale malattia rara. Una caratterizzazione genetica è stata possibile nel 79.2% dei casi, con mutazioni del gene *RYR1* come più frequenti. Si è riscontrata una mortalità del 12% nel primo anno di vita, la perdita della deambulazione nel 9%, il ricorso a ventilazione notturna e gastrostomia in un terzo dei pazienti, e a chirurgia per scoliosi nel 13%. Specifiche correlazioni genotipo-fenotipo sono state altresì descritte.

PROGETTI IN CORSO

- Prosegue il progetto “Correlazioni genotipo fenotipo nella distrofia Facio Scapolo Omerale (FSHD)” nell’ambito del Consorzio Italiano per la FSHD con particolare attenzione per i casi con “aplotipi permissivi” A166. Lo studio è condotto su 23 famiglie che appartengono ai circa 700 casi indice studiati in corso del precedente progetto. Si tratta di un progetto in collaborazione con tutti i centri presenti in Italia che seguono pazienti affetti da tale malattia e che sono riuniti nel Telethon network of FSHD.
- È in fase di validazione la messa a punto di una nuova e aggiornata scheda di valutazione clinica di pazienti affetti da FSHD che, rispetto a quella in uso, permette un maggior dettaglio clinico e quindi migliori correlazioni genotipiche.
- È iniziato il percorso per un consenso attinente i requisiti diagnostici dei pazienti affetti da FSHD2, ovvero tutti quei pazienti che, pur presentando un quadro clinico compatibile con la distrofia FSHD, non sono portatori di una contrazione dell’allele D4Z4.

- Continua lo studio di 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. Nel corso dell'ultimo anno, i risultati di uno studio di Next Generation Sequencing (NGS) hanno evidenziato nei probandi una serie di alterazioni in eterozigosi di geni responsabili di altre malattie neuromuscolari
- Proseguono le indagini bioptiche morfologiche e biochimiche in pazienti affetti da Glicogenosi di tipo II 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 bioptica 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, iniziato due anni fa, è proseguito nel 2013 con l'acquisizione di 19 seconde biopsie provenienti, oltre che dal nostro Istituto, dai centri nazionali parte del network. Sono in corso le valutazioni sopraindicate e confermiamo i risultati preliminari che sembrano attestare l'efficacia della terapia. Nel corso dell'ultimo anno il numero di pazienti è aumentato a 18. In tutti è stato dimostrato un incremento dell'attività enzimatica GAA nelle seconde biopsie e in nove di questi, tramite metodica di WB, è stato dimostrato un incremento della proteina GAA nelle seconde biopsie.
- Continua la rivalutazione retrospettiva di biopsie muscolari della nostra Banca per evidenziare miopatie indotte da mutazioni nei geni che causano miopatie miofibrillari e miopatie congenite”.
- E' stato completato il progetto “Analisi biochimica, istologica e test comportamentali per lo studio della glicogenosi di tipo III nel modello murino knockout AgI” in collaborazione con il Prof. Comi Giacomo Pietro, Laboratorio di Genetica e Biochimica - Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università di Milano – Fondazione IRCCS Ca' Granda – Ospedale Maggiore Policlinico di Milano. Abbiamo iniziato lo studio dei modelli knockout, trattati con terapia retro virale (adenovirus), per verificare se tale terapia porti ad una diminuzione delle vaste raccolte di glicogeno libero intramuscolare. In particolare, nel corso dell'ultimo anno, abbiamo esaminato gli effetti della dieta ad alto contenuto proteico e del ripristino dell'attività enzimatica con adenovirus.
- Prosegue lo 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.

FINANZIAMENTI IN CORSO

- Ministero della Salute Ricerca Corrente 2015
"Storia naturale delle alterazioni istopatologiche muscolari in una larga coorte di pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne sia in terapia steroidea, sia senza tale terapia"
- Telethon Network
"Progetto Telethon Network of Genetic Biobank" anni 2014-2018
- Telethon Network
"Development of the Italian National Registry for FSHD" anni 2014-2016
- Telethon Network
"Building a Nation-wide Italian collaborative network for muscle glycogenoses: registry and natural history" anni 2014-2015
- Collaborazione con IRCCS Auxologico Italiano al progetto di ricerca finalizzata dal titolo "Understanding the biological continuum between Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Fronto-temporal dementia (FTD): a step towards a more efficient assistance model for the affected patients" - Resp. Scientifico UO4 Dr. Maurizio Moggio

SEDE DISTACCATA DEL“CENTRO DINO FERRARI” - UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI MILANO presso U.O. NEUROLOGIA – STROKE UNIT

LABORATORIO DI NEUROSCIENZE UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MILANO IRCCS ISTITUTO AUXOLOGICO ITALIANO

Responsabile

Prof. Dott. Vincenzo Silani

U.O. Neurologia:

Dott.ssa Laura Adobbati

Dirigente I° Livello – Stroke Unit
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott. Luca Maderna

Dirigente I° Livello, Neurofisiologo
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott. Stefano Messina

Dirigente I° Livello
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott. Andrea Ciammola

Dirigente I° Livello
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott. Barbara Corrà

Dirigente I° Livello – Stroke Unit
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott. Nicola Ticozzi

Neurologo, Ricercatore Universitario
Università degli Studi di Milano
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott.ssa Claudia Morelli

Neurologa, Contrattista a Progetto
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott. Luca Campana

Neurologo, Contrattista a Progetto
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott. Riccardo Doronzo

Neurologo, Consulente in Convenzione
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott.ssa Carolina Lombardi

Neurofisiologa, Dirigente I° Livello
Centro Medicina del Sonno
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott.ssa Paola Mattaliano
convenzione

Neurofisiologo, Consulente in
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott. Niccolò Mencacci

Neurologo, Dottorato – UCL
Institute of Neurology- Londra

Dott. Alberto Lerario

Specializzando in Neurologia
Università degli Studi di Milano
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott. Alberto Doretti

Specializzando in Neurologia
Università degli Studi di Milano

Dott. Federico Verde	IRCCS Istituto Auxologico Italiano Specializzando in Neurologia Università degli Studi di Milano IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Davide Sangalli	Specializzando in Neurologia Università degli Studi di Milano IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Barbara Poletti	Psicologa, Consulente in Convenzione IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Annalisa Lafronza	Psicologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Laura Carelli	Psicologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Federica Solca	Psicologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Paolo Banfi	Pneumologo, Consulente in Convenzione IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Barbara Riccardi	Tecnico neurofisiologa IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Francesca Gregorini	Tecnico neurofisiologa IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Patrizia Nelli	Segreteria Scientifica U.O. Neurologia IRCCS Istituto Auxologico Italiano
<u>Laboratorio di Neuroscienze</u>	
Dott.ssa Antonia Ratti	Biologa, Ricercatore Universitario Confermato Università degli Studi di Milano IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Lidia Cova	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Isabella Fogh	Biologa, Sovvenzione Associazione Centro "Dino Ferrari" King's College di Londra
Dott.ssa Patrizia Bossolasco	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Claudia Colombrita	Biologa, Assegni di ricerca Post doc -Tipo A Università degli Studi di Milano IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Cinzia Tiloca	Biotechnologa, Dottoranda

	Università degli Studi di Milano IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. ssa Elisa Onesto	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Valentina Diana	CTF, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. ssa Daniela Calini	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Annamaria Maraschi	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Francesca Sassone	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
<u>Rapporti di collaborazione:</u>	
<u>Nazionali:</u>	
Prof. Nereo Bresolin, Prof. Giacomo Comi	Centro “Dino Ferrari” IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico
Dott.Maurizio Moggio, Prof. Elio Scarpini, Dott.ssa Daniela Galimberti, Dott.ssa Stefania Corti, Dott. Roberto Del Bo	
Dott.ssa Cinzia Gellera, Dott.Tagliavini Dott. Franco Taroni	IRCCS Istituto C. Besta, Milano
Prof. Paolo Rebullà	IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico
Dott.ssa Lorenza Lazzari Prof. Giorgio Lambertenghi,	
Dott. Fabio Blandini, Dr.ssa Marie Armentero	IRCCS Istituto Mondino, Pavia
Dott. Christian Lunetta	Centro Clinico Nemo
Prof. L. Persani	Dipartimento di Endocrinologia IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Luigi Sironi, Dott. A.E. Rigamonti	Dipartimento di Farmacologia Università di Milano - CEND
Prof. Massimo Filippi Dott. ssa Federica Agosta	Neuroimaging Research Unit and Department of Neurology,

Prof. Giacomo Comi	Institute of Experimental Neurology, Division of Neuroscience and
Prof. Andrea Falini	Department of Neuroradiology, Vita-Salute University and San Raffaele Scientific Institute, Milan
Dott. Fabio Blandini, Dott.ssa Cristina Cereda <u>Internazionali:</u>	IRCCS Istituto Mondino, Pavia
Prof. Robert H. Brown, John Landers	University of Massachusetts Medical School of Boston
Prof. Albert Ludolph	Università di Ulm, Germania Dipartimento di Neurologia
Prof. Al-Chalabi, Christian Shaw Prof. John Powell	King's College, London Dipartimento di Neurologia
Prof. Markus Weber	Dipartimento di Neurologia Università di St. Gallen, Svizzera

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 ha prodotto nel 2015 diversi contributi scientifici volti a definire i meccanismi della patologia neurodegenerativa e cerebrovascolare sia acuta che cronica. La vastità della patologia affrontata con ambulatori dedicati e ricerca di biomarcatori permette l' elaborazione di una visione unitaria della neurodegenerazione pur nella prospettiva dei diversi fenotipi clinici. In particolare, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), la Demenza Frontotemporale (FTD), la malattia di Parkinson (PD) e di Huntington (HD) costituiscono le patologie selettivamente studiate con allestimento di banche e database relativi.

È inoltre proseguita la formazione di giovani ricercatori medici e biologi/biotecnologi che 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 continuare l' operato del Consorzio SLAGEN con un lavoro sinergico tra 6 diverse Istituzioni Italiane tra cui 4 IRCCS. Il Centro "Dino Ferrari" è stato l' interlocutore internazionale per ampie casistiche di pazienti per quanto riguarda le malattie neurodegenerative e la SLA in particolare. L' FTD è oggi considerata in un continuum biologico-clinico con la SLA sulla scorta delle crescenti evidenze sperimentali e il Centro ha aderito all' Italian Frontotemporal Dementia Network (FTD Group – SINDEM). La formazione di équipes multidisciplinari è stata perseguita per le diverse patologie e ciò ha permesso di sviluppare innovative tematiche di ricerca come la Brain-Computer Interface (BCI) ed l' Eye Tracking (ET) per l' analisi dei pazienti nonché di sviluppare studi con RM 3 Tesla. Un moderno ed umano approccio alle più temibili malattie neurodegenerative rappresenta l' obiettivo perseguito della U.O. di Neurologia di cui il Centro "Dino Ferrari" fa parte operante, vicino alla matrice storica della IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore di Milano dove è originariamente nato. L' aprirsi degli interessi alla patologia cerebrovascolare è stato alimentato dalla moderna 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 primitiva dei vasi cerebrali ed all' approccio intravascolare arterioso dell' ictus acuto (trombolisi intrarteriosa).

Nel 2015 è stata ulteriormente sviluppato il Servizio di Neurofisiologia con sviluppo dello studio Doppler del nervo periferico integrato all' EMG/ENG classico e con lo studio della patologia nel sonno, mediante 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 collaborato a disegnare le fasi successive alla diagnosi nelle diverse patologie, proponendo studi clinici ed innovativi approcci riabilitativi, in sintonia con gli organismi Sanitari Regionali anche per l' analisi dei costi.

La ricercata interazione tra eccellenza clinica e ricerca di base si era espressa nel 2014 con il completamento della più vasta metanalisi di GWA in oltre 13.000 campioni di DNA con identificazione di un locus sul cromosoma 17 associato alla SLA sporadica (Fogh et al., Hum Mol Gen 2014) e ciò ha fornito la base per ulteriori studi: nell' ambito di un vasto progetto collaborativo è stato identificato infatti il gene *TBKI* con lo studio di 3.000 esomi di pazienti affetti da SLA sporadica (Cirulli et al., Science 2015) e, più recentemente, è stato un gene implicato nella sopravvivenza dei pazienti SLA derivato, appunto, dall' originario GWA (Fogh et al., 2015, in press).

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 appunto del progetto di associazione genica tipo "genoma wide" (GWA) per la definizione di geni di suscettibilità nella SLA sporadica dopo creazione del Consorzio SLAGEN per la raccolta dei campioni di DNA e una sincronia di ricerca presso Centri Italiani di prestigio. 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 ulteriormente sviluppata in particolare con gli ambulatori ed i servizi dedicati all'inquadramento multidisciplinare dei Disturbi Cognitivi e dei Disturbi del Movimento. È stata completata la richiesta per il riconoscimento di un Centro Regionale dedicato ai Disturbi Cognitivi (I° e II° livello). È proseguita sotto la direzione della U.O. di Neurologia l'attività della moderna Stroke Unit con 6 letti di cui 4 con monitoraggio fisso che ha comportato l'acquisizione e la formazione di nuovo personale specializzato, medico e infermieristico. È 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 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 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 ed all'apprendimento di una moderna tecnica per la determinazione del numero di motoneuroni fisiologicamente attivi (MUNE).

L'attività didattica è stata espletata nel 2015 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 hanno scelto di frequentare il Laboratorio di Neuroscienze per il tirocinio pre-laurea elaborando la Tesi. Dottorandi di Ricerca 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 biopsici 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 2014, 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 ulteriormente 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 di cellule staminali neurali endogene 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 definito 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 lo sviluppo ulteriore del progetto di Exome Sequencing supportato da Arisla EXOMEFALS che è esitato nella scoperta di *TBKI* e la conclusione dello studio nei trios (ricerca di mutazioni de novo acquisendo, oltre il DNA del probando, anche il DNA dei genitori quando vivoventi).

Nel 2015 il Centro "Dino Ferrari" 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). Diversi Teaching Course sono stati organizzati nell' ambito della European Academy of Neurology (EAN): il Prof. Silani è stato rieletto co-chairman del l' EAN Subspeciality Scientific panel ALS and Frontotemporal Dementia (Dicembre 2015).

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, Extrapiramidali e Demenza.

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 nell' ulteriore consenso internazionale raggiunto nel 2015 anche per un rilevante numero di ricercatori (no. 3) 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 dell' ulteriore 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.

La Dott.ssa Claudia Morelli ed il Dott. Nicola Ticozzi sono anche i primi due neurologi Italiani divenuti Fellows dell' European Board of Neurology dopo avere sostenuto il relativo esame internazionale all' ENS di Barcellona (2013): ambedue continuano a svolgere la propria attività presso il Centro "Dino Ferrari".

PRINCIPALI ARGOMENTI DI RICERCA:

1. CARATTERIZZAZIONE DEI LIVELLI CIRCOLANTI DI ADIPONECTINA IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Nel corso del 2015 è stata ampliata la casistica dello studio in corso arrivando ad analizzare mediante enzyme-linked immunosorbent assay kits (ELISA), un numero equiparabile di campioni sierici di controlli sani e pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), oltre a diversi sottogruppi di pazienti con altre malattie neurologiche. Inoltre si sono aggiunte le analisi sulla concentrazione di adiponectina nel liquido cerebrospinale (CSF) sugli stessi campioni disponibili. Le nuove analisi confermano una specifica alterazione dei livelli di adiponectina sierica in relazione alla patologia analizzata. In particolare nei pazienti SLA si osservano differenze statisticamente significative rispetto ai controlli solo se i pazienti vengono suddivisi per sesso e i pazienti maschi presentano livelli ridotti rispetto alle pazienti femmine e ai controlli maschi. L'andamento opposto si verifica nelle pazienti SLA. Queste

differenze non vengono mantenute nel CSF dove pazienti SLA, anche dopo suddivisione per sesso, mostrano uguali concentrazioni dell'adipochina rispetto ai controlli. All'opposto i pazienti affetti da Demenza Fronto Temporale risultano inoltre essere quelli con più elevata concentrazione di adiponectina sia nel siero che nel CSF, benché il ridotto numero di campioni analizzati richieda ampliamento prima di conclusioni definitive. E' attualmente in corso la stesura di un lavoro scientifico su una rivista peer review allo scopo di pubblicare i risultati ottenuti.

2. STUDIO DEI FATTORI GENETICI ASSOCIATI ALL'ANGIOPATIA AMILOIDE CEREBRALE.

Sono stati collezionati complessivamente 20 casi di pazienti affetti da angiopatia amiloide cerebrale (CAA) secondo i criteri di Boston oltre a 13 controlli. Sono stati sottoposti a screening ematologico, MAP 24 ore, TAC e RMN encefalo con sequenze in GE, ad alcuni di essi hanno completato anche la valutazione NP. Tutti sono stati prelevati per eseguire il sequenziamento degli esoni dei geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi della malattia.

3. CARATTERIZZAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI RNA NEGLI ESOSOMI DERIVATI DAL SANGUE PERIFERICO DEI PAZIENTI SLA

Nel corso di quest'anno è stata effettuato l'isolamento degli esosomi da siero e l'analisi del carico di geni espressi (microRNA) in essi contenuti tramite analisi specifica microRNA profiling per ottenere possibili biomarkers eventualmente modificabili con terapie specifiche. A tale scopo si è proceduto con un ordine per un preliminare profiling commerciale di microRNA su n°3 controlli (CTR), n°4 pazienti affetti da Sclerosi laterale Amiotrofica (SLA) sporadici e n°3 pazienti SLA con mutazione nota (mtTARDP43). Tutti i campioni sono stati retrotrascritti con successo in cDNA e corsi su uno specifico pannello per l'analisi dei microRNA espressi in siero. Sebbene sia stata riscontrata una variabilità intrinseca tra i vari campioni pur osservando una qualità accettabile del segnale arrivando ad identificare una media di 29 microRNA presenti in ogni campione. In particolare si osservata preliminarmente l'espressione differenziale tra casi mtTARDP43 e CTR di hsa-miR-15a-5p. E' attualmente in corso l'analisi specifica e dettagliata di tutti i dati ottenuti per poterli correlare al loro significato biologico e inserirli nel corretto quadro patologico SLA e successivamente testare la potenziale traslabilità terapeutica dei microRNA in questo ambito. Sono stati anche analizzati i risultati dell'analisi in Risonanza Nucleare Magnetica (NMR) su esosomi derivati da 1 CTR, 1 paziente obeso e 2 pazienti SLA per il contenuto metabolico osservando una chiara sovrapposizione dei profili tra i campioni SLA che differivano chiaramente dagli altri campioni soprattutto nella regione dei composti aromatici.

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

Tale studio si inserisce nell'ambito della ricerca tesa a definire possibili marcatori biologici liquorali della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). A causa di difficoltà tecniche, metodologiche e organizzative non è stato possibile procedere ad ora al dosaggio liquorale né di TDP43 né di FUS. Al contrario, la definizione del neuro filamento quale biomarcatore associato alla SLA è stato ulteriormente comprovato.

5. CELLULE STAMINALI UMANE: USO DI FLUOROCROMI E/O NANOPARTICELLE MAGNETICHE

L'ulteriore caratterizzazione "in vitro" delle cellule geneticamente marcate post infezione con luciferasi non ha evidenziato modifiche sostanziali del comportamento cellulare sia in termini di proliferazione, espressione di citochine/fattori trofici che di migrazione confermando i dati preliminari ottenuti nell'anno precedente. Purtroppo la mancata attivazione a pieno regime dello stabulario universitario di Lodi ha impedito la realizzazione della progettualità prevista sui modelli animali di malattia di Parkinson e Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) per l'ottimizzazione dei protocolli di identificazione diretta delle cellule staminali tramite marcatura genetica nei tessuti evitando la loro separazione e/o lunghe analisi di immunoistochimica.

Ci si è pertanto focalizzati sulla ricerca di marcatori endogeni delle cellule staminali che potessero permetterne l'assoluta identificazione utilizzando la tecnica della Risonanza Magnetica Nucleare (NMR). A tale scopo sono stati analizzati complessivamente 51 campioni di cellule staminali cerebrali divise in: 13 cellule staminali neurali prelevate da embrioni, 11 dal 1° giorno post natale, 12 da adulti e 15 campioni di cellule ensheathing olfattive. L'analisi degli spettri ha permesso di evidenziare che le cellule erano ben distinguibili tra loro per il contenuto statisticamente significativo di ben 4 metaboliti (Taurina, Glutamato, Lattato e Succinato) fornendone uno specifico profilo biologico utilizzabile per lo studio delle specificità molecolari staminali cerebrali. E' attualmente in corso la stesura di un lavoro scientifico su una rivista peer review allo scopo di pubblicare i risultati ottenuti.

6. SICUREZZA ED EFFICACIA DELL'INIBIZIONE DI SOD1 DA PIRIMETAMINA NELLA SLA FAMILIARE

Tra il gennaio 2013 ed il gennaio 2014 sono stati arruolati sette pazienti nel trial clinico internazionale. Di questi, due hanno completato lo studio, uno ha ritirato il proprio consenso per motivi personali dopo avere eseguito le prime due visite (in ottava settimana), uno ha interrotto lo sperimentazione per aggravamento clinico con impossibilità a raggiungere l'Istituto per le valutazioni, tre proseguono regolarmente lo studio. Nessun paziente al momento ha riportato reazioni avverse gravi derivanti dalla terapia sperimentale. Una paziente ha presentato una reazione avversa di lieve entità, che non ha comportato una modificazione dell'iter sperimentale, mentre un'altra paziente ha riportato una reazione avversa di moderata entità, attesa, con necessità di ridurre la posologia della pirimetamina somministrata.

Sono state regolarmente effettuate le valutazioni cliniche, strumentali e laboratoristiche, come previsto dal protocollo. Si è in particolare provveduto al prelievo ed alla conservazione del materiale biologico (plasma, linfociti, globuli rossi e liquor) ed alla definizione dell'attività enzimatica della SOD1 liquorale che è stata dimostrata ridotta del 20-30% come originariamente ipotizzato.

7. ANALISI DI GLUK2 QUALE NUOVO TARGET TERAPEUTICO PER I PARKINSONISMI GIOVANILI AUTOSOMICI RECESSIVI (ARJP) NEI NEURONI PRIMARI, NEI MODELLI ANIMALI DI PARK2 E NELLE CELLULE IPS DA PAZIENTI PARK2

Nei restanti mesi di validità del progetto, nell'anno 2015, valuteremo se Gluk2 può essere target di una terapia genica, mediante l'incrocio di topi parkin-Q311X con i topi Gluk2-/- . Questo ci permetterà di comprendere se la modulazione del recettore può essere un valido approccio come terapia neuroprotettiva in modelli PARK2.

8. VALIDAZIONE ITALIANA DI UNO STRUMENTO DI SCREENING COGNITIVO (EDINBURGH COGNITIVE AND BEHAVIOURAL ALS SCREEN – ECAS) IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

Lo studio è stato volto a validare, su una popolazione italiana, lo strumento di screening cognitivo ECAS, al fine di disporre di una misura sensibile alle alterazioni cognitive presenti nella SLA e somministrabile anche in presenza di limitazioni nelle capacità verbo-motorie. Come ulteriori sotto-obiettivi, in questo ambito, risultano:

- L'indagine delle componenti di validità concorrente e di costrutto dell'ECAS, condotta mediante l'inclusione, nel protocollo di assessment, di prove testali standardizzate e tradizionalmente impiegate nell'indagine del funzionamento cognitivo globale e dell'efficienza frontale sia nella SLA, che in altre patologie.
- La messa a punto e somministrazione di un questionario di valutazione dell'usabilità percepita dai partecipanti rispetto allo strumento ECAS, utile ai fini di eventuali future revisioni dello stesso.
- L'integrazione dello screening cognitivo e comportamentale con ulteriori dati concernenti il profilo clinico-neuropsicologico (anosognosia e anosodiaforia), mediante l'inclusione di domande concernenti il livello di consapevolezza, da parte dei pazienti, delle eventuali alterazioni cognitive e comportamentali presenti.

Ulteriore obiettivo è rappresentato dall'indagine della correlazione presente tra gli indici cognitivi rilevati mediante le prove testali ed i dati di genetica e di laboratorio, che consentirà di identificare peculiari pattern genotipo-fenotipo, utili al fine di meglio caratterizzare i profili clinici presenti nella patologia e, pertanto, fornire ulteriori evidenze di natura diagnostica e prognostica. A conclusione dello studio, la rilevazione delle prestazioni ottenute alle prove neuropsicologiche, in particolar modo concernenti le abilità fronto-esecutive, rende possibile ricavare indici relativi all'integrità cognitiva dei pazienti e quindi di valutare la capacità di assumere decisioni relative a questioni finanziarie, ai trattamenti invasivi proposti nel corso della malattia e alle decisioni di fine vita nei pazienti affetti da SLA negli stadi più avanzati di malattia.

9. IL METABOLISMO MITOCONDRIALE NEI FIBROBLASTI DI PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

Nel corso del secondo anno di progetto abbiamo completato la caratterizzazione della funzionalità mitocondriale dei fibroblasti derivanti da pazienti SLA con mutazioni nei geni *TARDBP* (n=4) e *C9ORF72* (n=4) rispetto a fibroblasti di individui sani di controllo (banca Telethon, n=4). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti mantenendo per 48h le cellule in carenza di glucosio e in presenza di galattosio per favorire un metabolismo ossidativo rispetto alla glicolisi e cercare di mimare così un metabolismo simile a quello post-mitotico neuronale. In accordo con i risultati ottenuti nel corso del primo anno di progetto, i nostri dati indicano la presenza di alterazioni nella respirazione mitocondriale e nel profilo bioenergetico in entrambi i gruppi di fibroblasti SLA in modo mutazione-dipendente. Lo studio dell'attività respiratoria cellulare (Seahorse) ha mostrato, nei fibroblasti *TARDBP*, un aumento dell'OCR (oxygen consumption rate), ovvero del grado di consumo di ossigeno, sia in condizioni basali (OCR-B) sia quando il consumo di ossigeno è stato stimolato con FCCP, un disaccoppiante della fosforilazione ossidativa (OCR-F). Nei fibroblasti *C9ORF72* abbiamo rilevato, invece, una riduzione di entrambi i parametri OCR-B e OCR-F rispetto ai controlli. Per studiare se tali disfunzioni bioenergetiche mitocondriali fossero associate a stress ossidativo, abbiamo misurato i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) riscontrando un aumento significativo di ROS, sia mitocondriali che cellulari totali, solo nei fibroblasti *C9ORF72*. Abbiamo studiato, inoltre, i processi di autofagia/mitofagia, associati alla rimozione dei mitocondri danneggiati, e di biogenesi di nuovi organelli. Dalla misurazione dei livelli delle proteine p62 e LC3, due marcatori di formazione delle vescicole autofagiche, e del marcatore di biogenesi mitocondriale PGC1 α e del contenuto di DNA mitocondriale, è emerso che in entrambi i

gruppi di fibroblasti mutati c'è indicazione di un inizio di autofagia, mentre nei fibroblasti *C9ORF72* è molto attiva anche la biogenesi mitocondriale.

Per studiare se le proteine mutanti agiscono direttamente o indirettamente sul mitocondrio, abbiamo studiato la localizzazione della proteina TDP-43 mediante sia un'analisi di fluorescenza che biochimica di frazionamento cellulare in fibroblasti controllo e *TARDBP* mutati e in cellule di neuroblastoma umano transfettate con TDP-43 wild-type o mutato. Da queste analisi è emerso che TDP-43, sia nella sua forma wild-type che nella sua forma mutata, non si localizza direttamente a livello mitocondriale, suggerendo che il suo meccanismo di azione sull'attività mitocondriale sia di tipo indiretto.

10. SCREENING MUTAZIONALE DEI GENI *TARDBP* E *FUS* IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA DI PARKINSON E PARKINSONISMI

La malattia di Parkinson (PD) è la seconda malattia neurodegenerativa più comune dopo la malattia di Alzheimer e colpisce oltre l'1% degli individui di età superiore ai 60 anni. Diverse evidenze hanno mostrato un possibile overlapping clinico, anatomico-patologico e genetico tra PD e Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). Infatti, sintomi extrapiramidali di tipo parkinsoniano sono presenti in circa il 2.7% dei pazienti affetti da SLA e studi epidemiologici indicano per i familiari dei pazienti SLA un maggiore rischio di sviluppare PD (Majoor-Krakauer et al., *Neurology* 1994). Inoltre, aggregati proteici di TDP-43, osservabili nei tessuti affetti dei pazienti SLA, sono stati rilevati anche nella malattia di Alzheimer, nella malattia di Parkinson e in un significativo numero di pazienti affetti da altri Parkinsonismi primari, come la degenerazione cortico-basale (CBD) e la paralisi sopranucleare progressiva (PSP). Per questo motivo, il progetto "TDP43PD" aveva come principale obiettivo l'identificazione di eventuali mutazioni nei geni *TARDBP* e *FUS/TLS*, fattori causativi di circa 8-10% dei casi familiari e del 2% dei casi sporadici di SLA, su un'ampia coorte di pazienti italiani affetti da PD e da altri parkinsonismi primari.

In collaborazione con il "Centro per la Malattia di Parkinson e i disturbi del Movimento" degli Istituti Clinici di Perfezionamento (Milano), è stata terminata l'analisi mutazionale di entrambi i geni.

Gene *TARDBP*

L'analisi molecolare del gene *TARDBP* è stata condotta mediante sequenziamento diretto dell'esone 6, "hot spot" mutazionale con oltre 50 varianti missenso finora identificate nella SLA, su un'ampia coorte costituita da 782 pazienti PD (212 casi familiari e 570 casi sporadici) e da 157 Parkinsonismi primari (CBD e PSP). I risultati di questo studio hanno rilevato la presenza di quattro diverse mutazioni missenso (p.Gly294Val; p.Gly295Ser; p.Asn267Ser, p.Ser393Leu) in 4/782 pazienti PD, di cui tre casi sporadici e un caso familiare. Inoltre, la variante p.Asn267Ser è stata identificata anche in un paziente affetto da degenerazione cortico-basale e in un caso con paralisi sopranucleare progressiva.

Le varianti da noi identificate sono state in precedenza riportate come mutazioni patogenetiche nella SLA (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>) e risultano assenti nei controlli di database pubblici (6503 individui di NHLBI Exome Sequencing Project, 1092 individui di 1000 Genome Project).

Nei casi PD, PSP e CBD analizzati in questo studio non abbiamo invece identificato la presenza della mutazione p.Ala382Thr, precedentemente identificata da altri gruppi in oltre il 30% dei casi SLA e in una significativa porzione (~2.5%) di pazienti PD sporadici nella popolazione sarda (Quadri et al, *Neurogenetics* 2011).

In accordo con altri studi mutazionali, il nostro lavoro sembra quindi confermare un ruolo patogenetico delle mutazioni di *TARDBP* anche in altri disordini neurodegenerativi diversi

dalla SLA, fornendo supporto all'ipotesi emergente che le principali malattie neurodegenerative dell'adulto possano condividere una comune base eziopatogenetica.

Gene FUS/TLS

Recentemente, mutazioni del gene FUS sono state identificate, tramite un approccio di exome sequencing, come causa di circa l'1,5% dei casi di tremore essenziale (TE), uno dei più comuni disturbi del movimento (Merner et al., Am J Hum Genet 2013). La maggior parte delle mutazioni di FUS finora individuate nella SLA clusterizzano nel segnale di localizzazione nucleare della proteina a livello del dominio C-terminale. Invece, le mutazioni osservate nei pazienti con tremore essenziale (la mutazione di stop p.Gln290* e le varianti missenso p.Arg216Cys, p.Pro431Leu) sono localizzate in domini differenti (il segnale di esporto nucleare e il dominio zing finger), suggerendo un differente meccanismo patogenetico nell'insorgenza dei disordini del movimento. Nel nostro studio l'analisi molecolare è stata condotta sull'intera regione codificante del gene FUS in un gruppo di pazienti affetti da PD (n=196) e da Parkinsonismi primari (n=157) e non ha evidenziato la presenza di varianti non-sinonime o di mutazioni di splicing potenzialmente patogenetiche. Due ulteriori studi condotti rispettivamente su 508 pazienti PD di origine cinese (Gao et al., Parkinsonism Relat Disord. 2014) e su 702 pazienti PD di origine caucasica (Labbé et al., Parkinsonism Relat Disord. 2014) hanno confermato l'assenza di mutazioni nella regione codificante del gene nella malattia di Parkinson. Il nostro studio è stato il primo ad analizzare il gene FUS in una coorte di pazienti CBD e PSP ma ulteriori analisi su casistiche più ampie sono necessarie per escludere il ruolo di mutazioni di FUS come fattori di rischio per queste patologie.

11. IDENTIFICATION OF DE NOVO MUTATIONS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS USING A TRIBASED EXOME SEQUENCING APPROACH

Nel corso dell'anno 2015 è stata completata la fase sperimentale del progetto, con l'identificazione e la validazione di 35 mutazioni *de novo* in 23 trio SLA (costituiti da un individuo affetto da SLA e dai suoi genitori non affetti). Sebbene queste specifiche varianti non ricorrano in una seconda coorte di replica costituita da 520 SLA famigliari e 238 SLA sporadiche, abbiamo osservato una sovra-rappresentazione di varianti rare in 6 geni contenenti mutazioni *de novo* nei pazienti SLA rispetto ai controlli sani. Analisi bioinformatiche hanno altresì dimostrato un arricchimento dei geni contenenti mutazioni *de novo* nelle vie metaboliche cellulari coinvolte nella regolazione trascrizionale, modificazione della cromatina, legame con i nucleosidi purinici e nel trasporto del calcio intracellulare. Prevediamo di proseguire tale linea di ricerca effettuando un'analisi combinata dei nostri dati con quelli di collaboratori internazionali (USA, Germania, Paesi Bassi).

12. IDENTIFICATION OF RISK VARIANTS ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY TO SPORADIC AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS USING AN EXOME SEQUENCING APPROACH

Nell'ambito del progetto IrisALS, abbiamo sequenziato l'esoma di una coorte di 277 pazienti affetti da SLA sporadica, al fine di identificare varianti rare associate alla suscettibilità per la malattia, mediante studi caso-controllo. Tale coorte è stata inclusa in un più vasto studio internazionale che ha analizzato 2869 esomi SLA e 6405 controlli, identificando un eccesso di varianti rare nel gene *TBKI* (Cirulli et al., Science 2015). Tale gene appare di particolare interesse in quanto è coinvolto in processi di regolazione dell'autofagia ed interagisce con altri geni mutati nella SLA (*OPTN* e *SQSTM1*). Ci proponiamo di sviluppare tale linea di ricerca ampliando il numero di esomi Italiani sequenziati ed ottimizzando i protocolli di analisi bioinformatica in modo da aumentarne la sensibilità.

13. LA PERMEABILITÀ DELLA BARRIERA EMATOENCEFALICA NELLA SLA (BBB-SLA)

Recenti evidenze della letteratura hanno dimostrato che la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia multifattoriale la cui patogenesi è determinata da diversi processi biologici (1,2). La barriera ematoencefalica (BBB), fondamentale per l'omeostasi del sistema nervoso centrale, ha la funzione di regolare il transito per e dal compartimento sistemico e di prevenire la diffusione di sostanze nocive. I componenti principali della BBB sono rappresentati da cellule endoteliali microvascolari specializzate. Sono state riportate in letteratura, oltre alla perdita dell'integrità della BBB stessa, anche alterazioni a carico della sua permeabilità responsabili della presenza anomala di proteine sieriche nel liquido cerebrospinale di pazienti affetti da SLA (3,4). In modelli animali della SLA, danni strutturali e funzionali della BBB aumentano con la progressione di malattia (5). Inoltre, i danni sembrano precedere la degenerazione motoneuronale e la neuro-infiammazione (6) suggerendo un ruolo "causativo" nell'insorgenza della malattia. Le Olfactory Ensheathing Cells (OECs) sono cellule gliali specializzate del sistema olfattorio. La loro funzione è quella di supportare attivamente la rigenerazione degli assoni olfattori. Le OECs possiedono elevate capacità rigenerative e, di particolare importanza, possiedono sia proprietà angiogenetiche che la capacità di stimolare l'organizzazione di nuovi sistemi vascolari (7). E' stato dimostrato che il trapianto di OECs in modelli animali della SLA determina un aumento della sopravvivenza dell'animale, una neuroprotezione dei motoneuroni e nuova mielinizzazione a livello del midollo spinale (8,9). Tuttavia, l'effetto diretto delle OECs sui danni alla BBB non è mai stato studiato. Queste cellule potrebbero quindi rappresentare un potente strumento di terapia cellulare.

Gli obiettivi di questo studio sono:

- 1) valutazione delle capacità angiogenetiche delle OECs in un modello *in vitro* di BBB in seguito a danno
- 2) effetto esercitato da cellule mesenchimali staminali (MSCs) o dalla somministrazione diretta di Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in un modello *in vitro* di BBB in seguito a danno
- 3) studio delle potenzialità neuro-protettive delle OECs su un modello motoneuronale *in vitro*

Questo studio *in vitro* costituisce un passo preliminare per un successivo studio nell'animale ed un eventuale traslabilità nell'uomo. La terapia cellulare rimane infatti una delle possibili applicazioni nella cura di una malattia a decorso rapido ed eterogenea come la SLA. Mediante l'utilizzo di OECs, è possibile ipotizzare una sua realizzazione in tempi brevi grazie alle peculiarità possedute da queste cellule: grandi potenzialità differenziative e protettive, possibilità di prelievo autologo, alta capacità di espansione in coltura.

14. iPSCs: UN MODELLO PER LO STUDIO DELLE INTERAZIONI TRA CELLULE NEURALI NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) ottenute mediante riprogrammazione di cellule adulte con quattro fattori di trascrizione fondamentali (octamer-binding transcription factor-3/4 (OCT3/4), SRY-related high-mobility-group (HMG)-box protein-2 (SOX2), MYC e Kruppel-like factor-4 (KLF4), presentano caratteristiche del tutto simili alle cellule embrionali ma non sono soggette a limitazioni di ordine etico (1,2). Le iPSCs si sono rivelate essere un potente strumento di studio per la comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari, fisiologici o causativi di diverse patologie potendosi propagare indefinitamente *in vitro* e differenziare in qualsiasi tipo di cellula somatica (3,4). Le iPSCs sono particolarmente utili qualora si intendano studiare meccanismi relativi a cellule difficilmente isolabili direttamente da un organismo. Questo è per esempio il caso di cellule neurali per le quali il

prelievo diretto risulterebbe troppo invasivo e dannoso per l'individuo (5). E' stato dimostrato che le iPSCs possono essere differenziate in vitro sia in cellule staminali neurali che in cellule differenziate quali astrociti e neuroni di vario tipo (6). La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una patologia devastante che colpisce principalmente i motoneuroni e porta tipicamente alla morte del paziente entro 2-5 anni dalla diagnosi. Circa 90% delle forme vengono classificate come sporadiche (sSLA) mentre un 10% sono familiari (fSLA) ed ereditate prevalentemente in modo autosomico dominante. Ad oggi sono stati identificati più di 10 geni coinvolti nella patologia. Numerosi lavori suggeriscono che oltre al motoneurone, altri tipi cellulari del sistema nervoso centrale contribuiscono alla progressione di malattia, inclusi astrociti, microglia ed oligodendrociti (7-9). Lo studio delle interazioni tra diversi tipi cellulari risulta quindi di primaria importanza per la comprensione dei meccanismi alla base dello sviluppo e della progressione di malattia e per la valutazione di nuove strategie terapeutiche non solo nella SLA ma anche in altre patologie neurodegenerative. Gli esosomi sono vescicole extracellulari prodotte in modo costitutivo dalla maggior parte delle cellule e rappresentano uno dei modi mediante il quale avviene la comunicazione cellulare (10). Contengono sia RNA codificante che non codificante, miRNAs e proteine, hanno quindi un impatto sui naturali processi fisiologici. Gli esosomi possono inoltre facilitare la diffusione di una patologia attraverso il trasferimento di informazione genetica o proteine patogenetiche (come dimostrato nei tumori (11) e di recente in alcune patologie neurodegenerative (12)). Studio *in vitro* delle interazioni e degli effetti reciproci, mediati da esosomi, tra cellule neurali derivanti da fibroblasti cutanei di controlli sani e pazienti affetti da SLA ed altre patologie neurodegenerative.

La comprensione delle interazioni tra diversi tipi cellulari neuronali è un aspetto fondamentale per la comprensione patogenetica della SLA. In particolare, l'individuazione di un preciso ruolo svolto dalle cellule accessori al motoneurone consentirebbe di identificare possibili nuovi target terapeutici per la cura della malattia.

CENTRO SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA)

Nell'anno 2015, 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, Profilina1, 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, C9orf72 in particolare). Oggi il Centro offre la 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 (studio ECAS);
- partecipazione a nuovi trial terapeutici (Pirimetamina nella SLA Familiare SOD1 mutata, G-CSF, etc).

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 dell' ALS European Consortium il Prof. Silani ha tenuto vari Teaching Courses: nell' ambito della nascente EAN il Prof. V. Silani è stato rinominato (2016-) referente per il gruppo Malattie del Motoneurone e Demenza Frontotemporale con il Prof. Albert Ludolph.

CENTRO MALATTIE EXTRAPIRAMIDALI

Nel corso dell'anno 2015, 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 950 visite ambulatoriali. È 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. È stata creata una équipe 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 équipe plurispecialistica formata da neurologi, psichiatri, neuropsicologi e fisiatristi 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 quali lo studio del sonno nei pazienti affetti da M. di Huntington in collaborazione con il Centro del Sonno (Dott.ssa Carolina Lombardi). Particolare attenzione è oggi dedicata alla cura della disfagia, principale causa di morte dei pazienti accanto alle complicanze polmonari. Il Dott. Andrea Ciammola ha dato particolare impulso a questa iniziativa unitamente alla équipe multidisciplinare.

CENTRO DISTURBI COGNITIVI

Nell'anno 2015 vi è stato un ulteriore incremento di pazienti rivoltisi al nostro centro per una valutazione diagnostica di tipo neuropsicologico; infatti sono state effettuate oltre 6.200 prestazioni neuropsicologiche e psicodiagnostiche per pazienti degenti in regime di ricovero ordinario o in Day Hospital, nonché 950 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.

È in fase di considerazione l' apertura di un Centro Disturbi Cognitivi con l'approvazione della Regione Lombardia. Particolare interesse è stato focalizzato allo studio dei pazienti affetti da Demenza Frontotemporale (FTD) con l' apertura di un ambulatorio dedicato, collezionamento di biomarcatori ed allestimento di un database. Particolare attenzione è stata volta all'interazione con l' Associazione Italiana FTD, volta alla presa in cura sia dei pazienti che delle famiglie affette.

CENTRO DI MEDICINA DEL SONNO

È continuata nel corso del 2015 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 2015 sono state eseguite circa oltre 800 visite ambulatoriali e polisonnografie portatili, 200 video polisonnografie in laboratorio di medicina del sonno, 60 monitoraggi polisunnografici prolungati (24 ore) e 20 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.

STROKE UNIT

Nel 2015 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, coordinatrice, 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: 15 trombolisi intravenose sono state eseguite nel 2015 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 (Dott. Paolo Banfi ed èquipe).

Una 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.

Pubblicazioni su Riviste Internazionali Indicizzate

1. Pellitteri R, Cova L, Zaccheo D, Silani V, Bossolasco P.
Phenotypic Modulation and Neuroprotective Effects of Olfactory Ensheathing Cells: a Promising Tool for Cell Therapy.
Stem Cell Rev. 2015 Nov 9. [Epub ahead of print]
I.F. 2.768;
2. Colombrita C, Onesto E, Buratti E, de la Grange P, Gumina V, Baralle FE, Silani V, Ratti A.
From transcriptomic to protein level changes in TDP-43 and FUS loss-of-function cell models.
Biochim Biophys Acta. 2015 Dec;1849(12):1398-410. doi:
10.1016/j.bbagr.2015.10.015. Epub 2015 Oct 26
I..F. 6.332;

3. Querin G, Bertolin C, Da Re E, Volpe M, Zara G, Pegoraro E, Caretta N, Foresta C, Silvano M, Corrado D, Iafrate M, Angelini L, Sartori L, Pennuto M, Gaiani A, Bello L, Semplicini C, Pareyson D, Silani V, Ermani M, Ferlin A, Sorarù G; Italian Study Group on Kennedy's disease.
Non-neural phenotype of spinal and bulbar muscular atrophy: results from a large cohort of Italian patients.
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015 Oct 26. pii: jnnp-2015-311305. doi: 10.1136/jnnp-2015-311305. [Epub ahead of print]
I.F. 6.807;
4. Sassone F, Margulets V, Maraschi A, Rodighiero S, Passafaro M, Silani V, Ciammola A, Kirshenbaum LA, Sassone J.
Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein (BNip3) has a key role in the mitochondrial dysfunction induced by mutant huntingtin.
Hum Mol Genet. 2015 Nov 15;24(22):6530-9. doi: 10.1093/hmg/ddv362. Epub 2015 Sep 10
I.F. 6.393;
5. Solca F, Poletti B, Zago S, Crespi C, Sassone F, Lafronza A, Maraschi AM, Sassone J, Silani V, Ciammola A.
Counterfactual Thinking Deficit in Huntington's Disease.
PLoS One. 2015 Jun 12;10(6):e0126773. doi: 10.1371/journal.pone.0126773. eCollection 2015
I.F. 3.234;
6. Simon CM, Rauskolb S, Gunnarsen JM, Holtmann B, Drepper C, Dombert B, Braga M, Wiese S, Jablonka S, Pühringer D, Zielasek J, Hoeflich A, Silani V, Wolf E, Kneitz S, Sommer C, Toyka KV, Sendtner M.
Dysregulated IGFBP5 expression causes axon degeneration and motoneuron loss in diabetic neuropathy.
Acta Neuropathol. 2015 Sep;130(3):373-87. doi: 10.1007/s00401-015-1446-8015-1446-8. Epub 2015 May 30
I.F. 10.762;
7. Lill CM, Rengmark A, Pihlstrøm L, Fogh I, Shatunov A, Sleiman PM, Wang LS, Liu T, Lassen CF, Meissner E, Alexopoulos P, Calvo A, Chio A, Dizdar N, Faltraco F, Forsgren L, Kirchheiner J, Kurz A, Larsen JP, Liebsch M, Linder J, Morrison KE, Nissbrandt H, Otto M, Pahnke J, Partch A, Restagno G, Rujescu D, Schnack C, Shaw CE, Shaw PJ, Tumani H, Tysnes OB, Valladares O, **Silani V**, van den Berg LH, van Rheenen W, Veldink JH, Lindenberger U, Steinhagen-Thiessen E; SLAGEN Consortium, Teipel S, Pernecky R, Hakonarson H, Hampel H, von Arnim CA, Olsen JH, Van Deerlin VM, Al-Chalabi A, Toft M, Ritz B, Bertram L.
The role of TREM2 R47H as a risk factor for Alzheimer's disease, frontotemporal lobar degeneration, amyotrophic lateral sclerosis, and Parkinson's disease.
Alzheimers Dement. 2015 Dec;11(12):1407-16. doi: 10.1016/j.jalz.2014.12.009. Epub 2015 Apr 30
I.F. 12.407;
8. Pensato V, Tiloca C, Corrado L, Bertolin C, Sardone V, Del Bo R, Calini D, Mandrioli J, Lauria G, Mazzini L, Querin G, Ceroni M, Cantello R, Corti S, Castellotti B, Soldà G, Duga S, Comi GP, Cereda C, Sorarù G, D'Alfonso S, Taroni F, Shaw CE, Landers JE, Ticozzi N, Ratti A, Gellera C, Silani V; SLAGEN Consortium.

TUBA4A gene analysis in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: identification of novel mutations.

J Neurol. 2015 May;262(5):1376-8. doi: 10.1007/s00415-015-7739-y. Epub 2015 Apr

I.F. 3.377;

9. Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, Couthouis J, Lu YF, Wang Q, Krueger BJ, Ren Z, Keebler J, Han Y, Levy SE, Boone BE, Wimbish JR, Waite LL, Jones AL, Carulli JP, Day-Williams AG, Staropoli JF, Xin WW, Chesi A, Raphael AR, McKenna-Yasek D, Cady J, Vianney de Jong JM, Kenna KP, Smith BN, Topp S, Miller J, Gkazi A; FALS Sequencing Consortium, Al-Chalabi A, van den Berg LH, Veldink J, Silani V, Ticozzi N, Shaw CE, Baloh RH, Appel S, Simpson E, Lagier-Tourenne C, Pulst SM, Gibson S, Trojanowski JQ, Elman L, McCluskey L, Grossman M, Shneider NA, Chung WK, Ravits JM, Glass JD, Sims KB, Van Deerlin VM, Maniatis T, Hayes SD, Ordureau A, Swarup S, Landers J, Baas F, Allen AS, Bedlack RS, Harper JW, Gitler AD, Rouleau GA, Brown R, Harms MB, Cooper GM, Harris T, Myers RM, Goldstein DB.

Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways.

Science. 2015 Mar 27;347(6229):1436-41. doi: 10.1126/science.aaa3650. Epub 2015 Feb 19

I.F. 33.611;

10. Ronchi D, Riboldi G, Del Bo R, Ticozzi N, Scarlato M, Galimberti D, Corti S, Silani V, Bresolin N, Comi GP.

CHCHD10 mutations in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.

Brain. 2015 Aug;138(Pt 8):e372. doi: 10.1093/brain/awu384. Epub 2015 Jan 8

I.F. 9.196;

11. Borroni B, Turrone R, Galimberti D, Nacmias B, Alberici A, Benussi A, Caffarra P, Caltagirone C, Cappa SF, Frisoni GB, Ghidoni R, Marra C, Padovani A, Rainero I, Scarpini E, Silani V, Sorbi S, Tagliavini F, Tremolizzo L, Bruni AC; FTD Group-SINDEM.

Italian Frontotemporal Dementia Network (FTD Group-SINDEM): sharing clinical and diagnostic procedures in Frontotemporal Dementia in Italy.

Neurol Sci. 2015 May;36(5):751-7. doi: 10.1007/s10072-014-2033-9. Epub 2014 Dec 21

I.F. 1.447;

12. Smith BN, Vance C, Scotter EL, Troakes C, Wong CH, Topp S, Maekawa S, King A, Mitchell JC, Lund K, Al-Chalabi A, Ticozzi N, Silani V, Sapp P, Brown RH Jr, Landers JE, Al-Sarraj S, Shaw CE.

Novel mutations support a role for Profilin 1 in the pathogenesis of ALS.

Neurobiol Aging. 2015 Mar;36(3):1602.e17-27. doi:

10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.032. Epub 2014 Oct 31

I.F. 5.013;

13. Banfi P, Ticozzi N, Lax A, Guidugli GA, Nicolini A, Silani V.

A review of options for treating sialorrhea in amyotrophic lateral sclerosis.

Respir Care. 2015 Mar;60(3):446-54. doi: 10.4187/respcare.02856. Epub 2014 Sep

16. Review I.F. 1.838

14. Mencacci NE, Rubio-Agusti I, Zdebik A, Asmus F, Ludtmann MH, Ryten M, Plagnol V, Hauser AK, Bandres-Ciga S, Bettencourt C, Forabosco P, Hughes D, Soutar MM, Peall K, Morris HR, Trabzuni D, Tekman M, Stanescu HC, Kleta R, Carecchio M, Zorzi G, Nardocci N, Garavaglia B, Lohmann E, Weissbach A, Klein C, Hardy J, Pittman AM, Foltynie T, Abramov AY, Gasser T, Bhatia KP, Wood NW.

A missense mutation in KCTD17 causes autosomal dominant myoclonus-dystonia.

Am J Hum Genet. 2015 Jun 4;96(6):938-47. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.04.008. Epub 2015 May 14
I.F. 10.931.

15. Silani V.

Editorial on the original article entitled "Genetic validation of a therapeutic target in a mouse model of ALS" published in the Science Translational Medicine on August 6, 2014.

Ann Transl Med. 2015 May;3(Suppl 1):S27. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.02.23. no I.F.
TOT. I.F. 114.116

Registri

- Registro Nazionale delle Malattie Rare - Istituito dall'Istituto Superiore di Sanità.
- Studio Epidemiologico sull'incidenza delle malattie rare: 25 nuovi casi
- Registro Lombardo della Sclerosi Laterale Amiotrofica.
- Studio epidemiologico su pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica: 20

Corsi ECM

- SLA/FTD: basi patogenetiche di rilevanza clinica
Sala Convegni Ospedale San Luca – Milano, 23/04/2015

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 di ricerca

I mercoledì del gruppo di lavoro SLA/FTD

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

ATTIVITÀ 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.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 IRCCS E. Medea
Dott. Maria Clara Bonaglia	Biologo IRCCS E. Medea
Dott. Rachele Cagliani	Biologo IRCCS E. Medea
Dott Roberto Giorda	Biologo IRCCS E. Medea
Ing Uberto Pozzoli	Bioingegnere IRCCS E. Medea
Dott. ME Raggi	Biologo IRCCS E. Medea
Dott. Manuela Sironi	Biologo IRCCS E. Medea
Dott. Chiara Vantaggiato	Biologo IRCCS E. Medea
Dott. Alessia Arnoldi	Biologo IRCCS E. Medea
Dott. Silvana Beri	Biologo IRCCS E. Medea

Personale Borsista laureato:

Dott. Francesca Ciceri	Biologo Borsista IRCCS E. Medea
Dott. Marianna Castelli	Biologo Borsista IRCCS E. Medea
Dott. Andrea Citterio	Biotechnologo Contrattista
Dott. Sara Bertuzzo	Biologo Borsista IRCCS E Medea
Dott Alessandra Mozzi	Biotechnologa IRCCS E.Medea
Ing. Erika Molteni IRCCS	Ingegnere Biomedico – Contrattista E.Medea

Dottorandi:

Dott. Diego Forni	Biotecnologo – Contrattista IRCCS E. Medea
Dott. Chiara Pontremoli	Biologa –Università' di Milano
Dott. Shikha Vashisht	Biologa –SEMM

Personale tecnico strutturato

Cinzia Baschiroto	Tecnico di laboratorio IRCCS E. Medea
Giulietta Gottardi	Tecnico di laboratorio IRCCS E. Medea
Paola Pozzi	Tecnico di laboratorio IRCCS E. Medea
Chiara Mapelli	Tecnico di laboratorio IRCCS E. Medea
Stefania Riva	Tecnico di laboratorio IRCCS E. Medea
Giorgia Menozzi	Programmatrice IRCCS E. Medea

L'attività del laboratorio dell'IRCCS E. Medea - Ass.ne La Nostra Famiglia, sede distaccata del Centro "Dino Ferrari", nel corso del 2015 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 1) dei riarrangiamenti genomici associati ai disordini del neuro-sviluppo (NDDs) 2) patologie e neurodegenerative dell'età pediatrica o giovane-adulta. 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.

Nell'ambito della ricerca relativa ai NDDs si continua a focalizzare l'attenzione alla Sindrome da delezione 22q13, nota anche come Sindrome di Phelan McDermid (PMS, MIM 606232). La PMS è una malattia del neurosviluppo causata dalla perdita (delezione) o interruzione della regione terminale del cromosoma 22 contenente il gene SHANK3, che codifica per una proteina sinaptica strutturale. Il quadro clinico, che include la manifestazione o meno di sintomi di tipo autistico e epilessia, è molto variabile anche tra pazienti con delezione della stessa taglia, ma la ragione per questo fenomeno è finora sconosciuta. È perciò probabile che altri fattori genetici, in aggiunta alla aploinsufficienza di SHANK3, abbiano un ruolo in questa variabilità. Il quadro clinico della sindrome inoltre evolve a seconda dell'età dei pazienti e l'approfondimento di questa evoluzione sarà fondamentale per determinare il trattamento appropriato. L'attività di ricerca, in corso presso l'IRCCS E. Medea, riguarda perciò uno studio clinico-genetico su un'ampia coorte di 80 pazienti italiani con PMS di età che spazia dall'infanzia all'età adulta e prevede: a) un follow-up sistematico attraverso un approccio clinico inter-disciplinare, incluso lo studio del funzionamento cerebrale mediante studi elettroencefalografici (EEG) e di risonanza magnetica (MRI 3 Tesla), b) la definizione delle basi genetiche molecolari mediante NGS per individuare varianti genetiche clinicamente rilevanti, sia a livello della copia rimanente del gene SHANK3 che nella porzione codificante degli altri geni della regione 22q13 coinvolta nella delezione ed eventualmente, in presenza di evidenze cliniche peculiari, nel resto dell'esoma; c) uno studio mirato su una popolazione di soggetti adulti di età compresa fra i 18-50 anni attraverso una valutazione comportamentale sistematica e raccolta della storia clinica.

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 2014 con l'identificazione di nuove mutazioni in SPG46, SPG28, SPG11 e SPG30. Contemporaneamente abbiamo completato lo studio degli effetti di mutazioni in spastizina in cellule (fibroblasti e linfoblasti) di pazienti con mutazioni missenso e troncanti nel gene, precedentemente identificate nel laboratorio.

Nel 2015 abbiamo proseguito l'analisi della funzione di spastizina nell'autofagocitosi e la caratterizzazione dei difetti di maturazione degli autofagosomi in presenza di mutazioni missenso e troncanti di spastizina. Dopo aver dimostrato che spastizina interagisce con Beclin1, abbiamo dimostrato anche che questa proteina è un componente dei complessi autofagici di Beclin1, ma è esclusa dal complesso Atg14-Beclin1. Beclin1 regola l'autofagocitosi formando un complesso centrale con Vps15 e Vps34 e regolando l'attività della chinasi Vps34 tramite l'interazione con una varietà di proteine, tra cui Atg14L, UVRAG e Rubicon. Il complesso generato dall'interazione con Atg14 regola la sintesi del PI3P, la formazione delle isolation membranes e la generazione degli autofagosomi. Il complesso generato dall'interazione con Uvrage regola sia la formazione che la maturazione degli

autofagosomi (Liang et al., 2006, 2008). Infine il legame di Rubicon al complesso contenete Uvrag regola negativamente la maturazione degli autofagosomi (Zhong et al., 2009).

Un dato importante ottenuto nell'ultimo anno riguarda il ruolo di spastizina nel traffico endosomiale ed in particolare nella fusione delle vescicole endosomiali a diversi stadi di maturazione. Gli studi sono tutt'ora in corso ma il dato di rilievo che emerge è che spastizina per la sua localizzazione ha una doppia funzione sia a livello di autofagocitosi sia nel pathway endolisosomiale. Da questo ne deriva che difetti in spastizina possono generare alterazioni in due processi diversi ma strettamente interconnessi quali l'autofagocitosi e il traffico degli endosomi. Sono in corso studi per definire se il coinvolgimento dell'uno o dell'altro processo può essere ristretto a una porzione specifica della proteina. Questi studi sono stati confermati anche in neuroni primari di topo.

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.

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. Abbiamo inoltre messo a punto un approccio complementare che prevede l'analisi evolutiva a livello interspecifico (tra mammiferi o tra primati) al fine di identificare siti o regioni di particolare importanza dal punto di vista funzionale.

Ricerche svolte presso il nostro laboratorio hanno dimostrato che le malattie infettive hanno agito come una potente forza selettiva sul genoma umano e sul genoma di altri mammiferi. Conseguentemente, il pattern di variabilità genetica è determinato anche dalla esposizione agli agenti patogeni subito durante milioni di anni di evoluzione (Sironi et al., Nat Rev Genet 2015). In particolare, tale effetto è evidente per i geni che codificano per molecole con attività antivirale (Forni et al., Mol Ecol 2015; Mozzi et al., Genome Biol Evol 2015; Forni et al. RNA Biol 2015). Abbiamo inoltre dimostrato come pressioni selettive diverse da quella esercitata dagli agenti patogeni abbiano influenzato la variabilità genetica nell'uomo e in altri mammiferi. Queste includono le fonti di sussistenza (Pontremoli et al., Genome Biol Evol. 2015; Polley et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015) e i ritmi stagionali di luce/buio (Forni et al. Genome Biol 2014). I cicli giorno/notte rappresentano, infatti, il principale segnale di sincronizzazione circadiana e variano in funzione della latitudine. Abbiamo applicato un modello geografico esplicito per dimostrare che la migrazione dall'Africa, che ha portato le popolazioni umane a occupare vaste aree latitudinali, ha influenzato la storia evolutiva dei geni coinvolti nella regolazione del ritmo circadiano. Gli SNP identificati usando questo modello mostrano segnali coerenti con l'azione della selezione naturale, verificata applicando analisi basate sulla differenziazione genetica tra popolazioni e sull'omozigotità degli aplotipi. Evidenze di selezione naturale causate dalla variazione annuale del fotoperiodo sono state identificate anche in varianti di rischio per schizofrenia, disordine bipolare e sindrome delle

gambe senza riposo, in linea con la componente circadiana di queste condizioni. I nostri risultati suggeriscono che le popolazioni umane, modificando il loro sistema di regolazione del ritmo circadiano, si siano adattate a una vita a differenti latitudini. Questo processo ha coinvolto anche varianti di rischio per condizioni neuropsichiatriche, suggerendo possibili modulatori genetici per crono terapie e candidati per analisi di interazione con variabili ambientali correlate con il fotoperiodo, come la stagione di nascita, il paese di residenza, lo stile di vita o turni lavorativi.

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 anni (in particolare la libreria GeCo++), è stato possibile implementare software di analisi particolarmente avanzati. 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.

Elenco delle Ricerche sviluppate nel corso del 2015 presso il laboratorio di biologia molecolare citogenetica e bioinformatica:

- 1) Caratterizzazione dei meccanismi patogenetici coinvolti in forme recessive di paraparesi spastica ereditaria ad insorgenza precoce
- 2) Associazione tra riarrangiamenti genomici costituzionali e disabilità del neuro sviluppo
- 3) Alterazioni bioenergetiche e delle vie di clearance cellulare: ruolo nella patogenesi delle patologie degenerative del sistema muscolare e nervoso.
- 4) Sviluppo di soluzioni Next Generation (NGS) per la diagnosi delle epilessie idiopatiche e forme isolate e sindromiche di disabilità intellettiva

- 5) Malattie del motoneurone: analisi di modelli di Drosophila per lo studio del ruolo del metabolismo lipidico nei processi neurodegenerativi
- 6) Approccio integrato (genetica di popolazione e next generation sequencing) per l'identificazione di varianti funzionali con effetto patologico.
- 7) Analisi RNA - seq per l'identificazione de - novo di isoforme di trascrizione e di splicing in pazienti neuromuscolari
- 8) Applicazione di un approccio di Next-Generation-Sequencing per l'identificazione di varianti causative/predisponenti a malattie autoimmuni (Sclerosi Multipla e Morbo di Crohn)

Progetti attivi nel 2015

-Lipid metabolism in the hereditary spastic paraplegia: genes, biomarkers, and models for therapy (NEUROLIPID)- (2014-206) ERARE JTC

-Role of DRP1 and mitochondrial dynamics in neuronal and muscular disorders: molecular mechanisms and therapeutics implications (2014-2016) prog GR-2011-02350544 (Ministero della salute)

Collaborazioni

Prof E. I Rugarli- Institute for Genetics CECAD Research

Center University of Cologne Joseph-Stelzmann-Str. 26

50931 Köln Germany

Prof W Griffith- Institute of Mass Spectrometry College of Medicine Grove Building Swansea University Singleton Park Swansea SA2 8PP Wales, UK.

Prof Luca De Gioia - Department of Biotechnology and Biosciences, University of Milan-Bicocca, 20126 Milan, Italy.

Prof. Mario Clerici -Department of Physiopathology and Transplantation, University of Milan, 20090 Milan, Italy. and Don C. Gnocchi Foundation ONLUS, IRCCS, 20148 Milan, Italy.

Edward J Hollox - Department of Genetics, University of Leicester, Leicester LE2 1TE, UK

Prof Giuseppe Bianchi - Nephrology and Dialysis Unit, San Raffaele Scientific Institute, University Vita Salute San Raffaele, Milan, Ita

Nasser M. Al-Daghri - Biomarker research program, Biochemistry Department, College of Science, King Saud University, Riyadh 11451, Kingdom of Saudi Arabia (KSA) and Prince Mutaib Chair for Biomarkers of Osteoporosis, Biochemistry Department, College of science, King Saud University, Riyadh, KSA

Dott. Franca Guerini - Don C. Gnocchi Foundation ONLUS, IRCCS, 20100 Milan, Italy

Dott. Mara Biasin - Department of Biomedical and Clinical Sciences, University of Milan, 20157 Milan, Italy Prof. Roberto de Franchis - IBD Unit, Chair of Gastroenterology, Luigi

Sacco University Hospital, 20157 Milan Dott. Sergio Lo Caputo - S. Maria Annunziata Hospital, 50122 Florence, Italy

Dott. Rosanna Asselta - Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy.

Dott. Juan Antonio Pineda - Infectious Diseases and Microbiology Clinical Unit. Valme Hospital, Seville, Spain

Dott. Antonio Rivero-Juarez - Maimonides Institut for Biomedical Research (IMIBIC)-Reina Sofia University Hospital-University of Cordoba, Spain

Dott. Antonio Caruz - Immunogenetics Unit, Department of Experimental Biology, University of Jaen, Jaen, Spain

Dott. Manuel Comabella - Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH). Barcelona, Spain

Dott. Matteo Fumagalli - UCL Genetics Institute, Department of Genetics, Evolution and Environment, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, United Kingdom

Dott. Matteo Cereda - Department of Experimental Oncology, European Institute of Oncology (IEO), 20139 Milan, Italy

Prof. Jernej Ule - Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London WC1N 3BG, UK

Publicazioni

Agosta Federica, Scarlato Marina, Spinelli Edoardo G., Canu Elisa, Benedetti Sara, Bassi Maria Teresa, Casali Carlo, Sessa Maria, Copetti Massimiliano, Pagani Elisabetta, Comi Giancarlo, Ferrari Maurizio, Falini Andrea, Filippi Massimo (2015);

Hereditary spastic paraplegia: Beyond Clinical Phenotypes Toward a Unified Pattern of central nervous system damage;

Radiology, 276(1):207-218

Doi: 10.1148/radiol.14141715

PMID: 25611737 I.F. 2014: 6,867

Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Romaniello Romina, Peruzzo Denis, Righini Andrea, Parazzini Cecilia, Colombo Paola, Bassi Maria Teresa, Triulzi Fabio, Borgatti Renato (2015);

Aberrant supracallosal longitudinal bundle: mr features, pathogenesis and associated clinical phenotype;

European Radiology, in press

Doi: 10.1007/s00330-015-4084-6

PMID: 26560723 I.F. 2014: 4,014

Bonaglia Maria Clara, Zanotta Nicoletta, Giorda Roberto, D'Angelo Maria Grazia, Zucca Claudio (2015);

Long-term follow-up of a patient with 5q31.3 microdeletion syndrome and the smallest de novo 5q31.2q31.3 deletion involving pura;

Molecular Cytogenetics, 8:89 Doi: 10.1186/s13039-015-0193-

9PMID: 26582469 I.F. 2014: 2,140

Cappellari Alberto M., Cattaneo Dario, Clementi Emilio, Kustermann Alessandra (2015); *increased levetiracetam clearance and breakthrough seizures in a pregnant patient successfully handled by intensive therapeutic drug monitoring*;
Therapeutic Drug Monitoring, 37(3):285-287
Doi: 10.1097/FDT.0000000000000144 PMID: 25384117 I.F. 2014: 2,376

Area: 3 - AREA NEUROBIOLOGIA, BIOLOGIA COMPUTAZIONALE, FARMACOLOGIA

Citterio Andrea, Arnoldi Alessia, Panzeri Elena, Merlini Luciano, D'Angelo Maria Grazia, Musumeci Olimpia, Toscano Antonio, Bondi Alice, Martinuzzi Andrea, Bresolin Nereo, Bassi Maria Teresa (2015);
Variants in kif1a gene in dominant and sporadic forms of hereditary spastic paraparesis;
Journal of Neurology, 262(12):2684-2690
Doi: 10.1007/s00415-015-7899-9
PMID: 26410750 I.F. 2014: 3,377

Conti Elisa, Nacinovich Renata, Bomba Monica, Raggi Maria Elisabetta, Neri Francesca, Ferrarese Carlo, Tremolizzo Lucio (2015);
Beta-amyloid plasma levels in adolescents with anorexia nervosa of the restrictive type;
Neuropsychobiology, 71(3):154-157
Doi: 10.1159/000381399
PMID: 25998413 I.F. 2014: 2,261

Decio Alice, Tonduti Davide, Pichiecchio Anna, Vetro Annalisa, Ciccone Roberto, Limongelli Ivan, Giorda Roberto, Caffi Lorella, Balottin Umberto, Zuffardi Orsetta, Orcesi Simona (2015);
A novel mutation in col4a1 gene: a possible cause of early postnatal cerebrovascular events;
American Journal of Medical Genetics Part A 167(4):810-815
Doi: 10.1002.ajmg.a.36907
PMID: 25706114 I.F. 2014: 2,159

Ermetici Federica, Filopanti Marcello, Verga Uberta, Passeri Elena, Dito Giorgia, Malavazos Alexis Elias, Mapelli Chiara, Raggi Maria Elisabetta, Spada Anna, Corbetta Sabrina (2015);
estimated glomerular filtration rate by serum cystatin c correlates with cardiometabolic parameters in patients with primary Hyperparathyroidism;
European Journal of Endocrinology, 173(4):441-446 Doi: EJE-15-341
PMID: 26194503 I.F. 2014: 4,069

Forni Diego*, Mozzi Alessandra*, Pontremoli Chiara, Vertemara Jacopo, Pozzoli Uberto, Biasin Mara, Bresolin Nereo, Clerici Mario, Cagliani Rachele, Sironi Manuela (2015);
Diversive selective regimes shape genetic diversity at adar genes and at their coding targets;
rna
Biology, 12(2):149-161
* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro
Doi: 10.1080/15476286.2015.1017215
PMID: 25826567 I.F. 2014: 4,974

Forni Diego*, Pontremoli Chiara*, Cagliani Rachele, Pozzoli Uberto, Clerici Mario, Sironi Manuela (2015);
Positive selection underlies the species-specific binding of p. Falciparum rh5 to human basigin;
Molecular Ecology, 24(18):4711-4722

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1111/mec.13354

PMID: 26302433 I.F. 2014: 6,494

Forni Diego, Filippi Giulia, Cagliani Rachele, De Gioia Luca, Pozzoli Uberto, Al-Daghri Nasser M., Clerici Mario, Sironi Manuela (2015);

The heptad repeat region is a major selection target in mers-cov and Related coronaviruses;

Scientific Reports, 5:14480

Doi: 10.1038/srep14480

PMID: 26404138 I.F. 2014: 5,578

Forni Diego, Martin Diana, Abujaber Razan, Sharp Andrew J., Sironi Manuela, Hollox Edward J. (2015);

Determining multiallelic complex copy number and sequence variation from high coverage exome sequencing data;

BMC Genomics, 16(1):891

Doi: 10.1186/s12864-015-2123-y

PMID: 26526070 I.F. 2014: 3,986

Fusco Carlo, Frattini Daniele, Bassi Maria Teresa (2015);

A novel kcnq3 gene mutation in a child with infantile convulsions and partial epilepsy with centrotemporal spikes;

European Journal of Paediatric Neurology, 19(1):102-103 – Letter to the Editor

Doi: 10.1016/j.ejpn.2014.08.006

PMID: 25278462 I.F. 2014: 2,301

Magri Francesca Maria Benedetta*, Colombo Irene*, Del Bo Roberto, Previtali Stefano, Brusa Roberta, Ciscato Patrizia, Scarlato Marina, Ronchi Dario, D'Angelo Maria Grazia, Corti Stefania, Moggio Maurizio, Bresolin Nereo, Comi Giacomo Pietro (2015);

Ispd mutations account for a small proportion of italian limb girdle muscular dystrophy cases;

BMC Neurology, 15(1):172

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1186/S12883-015-0428-8 PMID: 26404900 I.F. 2014: 2,040

Mascheretti Sara, Facoetti Andrea, Giorda Roberto, Beri Silvana, Riva Valentina, Trezzi Vittoria, Cellino Maria Rosaria, Marino Cecilia (2015);

Grin2b mediates susceptibility to intelligence quotient and cognitive impairments in developmental dyslexia;

Psychiatric Genetics, 25(1):9-20

Doi: 10.1097/YPG.0000000000000068

PMID: 25426763 I.F. 2014: 1,941

Mascheretti Sara, Bureau Alexandre, Trezzi Vittoria, Giorda Roberto, Marino Cecilia (2015);

An assessment of gene-by-gene interactions as a tool to unfold missing heritability in dyslexia;

Human Genetics, 134(7):749-760

Doi: 10.1007/s00439-015-1555-4

PMID: 25916574 I.F. 2014: 4,824

Mezzelani Alessandra, Landini Martina, Facchiano Francesco, Raggi Maria Elisabetta, Villa Laura, Molteni Massimo, De Sanctis Barbara, Brera Carlo, Caroli Anna Maria, Milanese Luciano, Marabotti Anna (2015);

Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility: a translational hypothesis for Regressive autism pathogenesis;

Nutritional Neuroscience, 18(4):145-161

Doi: 10.1179/1476830513Y.0000000108

PMID: 24621061 I.F. 2014: 2,274

Mozzi Alessandra*, Pontremoli Chiara*, Forni Diego, Clerici Mario, Pozzoli Uberto, Bresolin Nereo, Cagliani Rachele, Sironi Manuela (2015);

Oases and sting: adaptive evolution in concert;

Genome Biology and Evolution, 7(4):1016-1032

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1093/gbe/evv046

PMID: 25752600 I.F. 2014: 4,229

Musumeci Olimpia, Rizzo V., Bassi Maria Teresa, Marino M., Montagnese F., Quartarone A., Toscano Antonio (2015);

A clinical multimodal approach in a large italian cohort with hereditary spastic paraplegia (hsp) looking for neurophysiological biomarkers;

Abstract P3165 of the 1st Congress of the European Academy of Neurology, Berlin, Germany, June 2015;

European Journal of Neurology, 22(Suppl. 1):357

I.F. 2014: 4,055

Perrotta Cristiana, Cervia Davide, De Palma Clara, Assi Emma, Pellegrino Paolo, Bassi Maria Teresa, Clementi Emilio (2015);

The emerging role of acid sphingomyelinase in autophagy;

Apoptosis, 20(5):635-644

Doi: 10.1007/S10495-015-1101-9

PMID: 25666706 I.F. 2014: 3,685

Polley Shamik, Louzada Sandra, Forni Diego, Sironi Manuela, Balaskas Theodosius, Hains David S., Yang Fengtang, Hollox Edward J. (2015);

Evolution of the rapidly mutating human salivary agglutinin Gene (dmbt1) and population subsistence strategy;

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 112(16):5105-5110

Doi: 10.1073/pnas.1416531112/-/DCSupplemental

PMID: 25848046 I.F. 2014: 9,674

Pontremoli Chiara*, Mozzi Alessandra*, Forni Diego*, Cagliani Rachele, Pozzoli Uberto, Menozzi Giorgia, Vertemara Jacopo, Bresolin Nereo, Clerici Mario, Sironi Manuela (2015);

Natural selection at the brush- border: adaptations to carbohydrate diets in humans and other mammals;

Genome Biology and Evolution, 7(9):2569-2584

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1093/gbe/evv166

PMID: 26319403 I.F. 2014: 4,229

Pozzi Marco*, Pellegrino Paolo*, Galbiati Sara, Granziera Marica, Locatelli Federica, Carnovale Carla, Perrone Valentina, Antoniazzi Stefania, Perrotta Cristiana, Strazzer Sandra§, Clementi Emilio§ (2015);

Prevalence of respiratory colonisations and related antibiotic resistance among paediatric tracheostomised patients of a long-term rehabilitation centre in italy;

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 34(1):169-175

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro § Co-corresponding authors

Doi: 10.1007/s10096-014-2220-x

PMID: 25107624

I.F. 2014: 2,668

Pozzi Marco*, Galbiati Sara*, Locatelli Federica, Granziera Marica, Santi Marika, Colombo Daniele, Pellegrino Paolo, Radice Sonia, Clementi Emilio“, Strazzer Sandra (2015); *prevention of respiratory infections in tracheostomized patients of a pediatric long-term rehabilitation setting*;

American Journal of Infection Control, 43(4):394-396

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro “ Corresponding author in penultima posizione

Doi: 10.1016/j.ajic.2014.12.015

PMID: 25672950 I.F. 2014: 2,206

Pozzi Marco, Conti Valentino, Locatelli Federica, Galbiati Sara, Radice Sonia, Citerio Giuseppe, Clementi Emilio, Strazzer Sandra (2015);

Paroxysmal sympathetic hyperactivity in pediatric rehabilitation: clinical factors and acute pharmacological management;

Journal of Head Trauma Rehabilitation, 30(5):357- 363

Doi: 10.1097/HTR.0000000000000084

PMID: 25310291 I.F. 2014: 2,920

Pozzi Marco, Locatelli Federica, Galbiati Sara, Clementi Emilio, Strazzer Sandra (2015);

Re: "paroxysmal sympathetic hyperactivity: a new era for diagnosis and treatment";

Journal of Head Trauma Rehabilitation, 30(5):366-367 – Letter to the Editor

Doi: 10.1097/HTR.0000000000000115

PMID: 26348165 I.F. 2014: 2,920

Provenzi Livio, Fumagalli Monica, Sirgiovanni Ida, Giorda Roberto, Pozzoli Uberto, Morandi Francesco, Beri Silvana, Menozzi Giorgia, Mosca Fabio, Borgatti Renato, Montiroso Rosario (2015);

Pain-related stress during the neonatal intensive care unit stay and slc6a4 methylation in very preterm infants;

Frontiers in Behavioral Neuroscience, 9:99

Doi: 10.3389/fnbeh.2015.00099

PMID: 25941480 I.F. 2014: 3,270

Rinaldi Fabrizio, Bassi Maria Teresa, Todeschini Alice, Rota Silvia, Arnoldi Alessia, Padovani Alessandro, Filosto Massimiliano (2015);

A novel mutation in motor domain of kif5a associated with an hsp/axonal neuropathy phenotype;

Journal of Clinical Neuromuscular Disease, 16(3):153-158 – Case Review

Doi: 10.1097/CND.0000000000000063

PMID: 25695920 I.F. 2014: 0,000

Riva Valentina, Marino Cecilia, Giorda Roberto, Molteni Massimo, Nobile Maria (2015);

The role of dc2c2 genetic variants and low socioeconomic status in vulnerability to attention problems;

European Child & Adolescent Psychiatry, 24(3):309-318

Doi: 10.1007/s00787-014-0580-5

PMID: 25012462 I.F. 2014: 3,336

Riva Valentina, Battaglia Marco, Nobile Maria, Cattaneo Francesca, Lazazzera Claudio, Mascheretti Sara, Giorda Roberto, Merette Chantal, Emond Claudia, Maziade Michel, Marino Cecilia (2015);

Grin2b predicts attention problems among disadvantaged children;

European Child & Adolescent Psychiatry, 24(7):827-836

Doi: 10.1007/s00787-014-0627-7

PMID: 25316095 I.F. 2014: 3,336

Romaniello Romina, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Bassi Maria Teresa, Borgatti Renato (2015);
mutations in alpha and beta-tubulin encoding genes: implications in brain malformations;

Brain and Development, 37,3:273-280

Doi: 10.1016/j.braindev.2014.06.002

PMID: 25008804 I.F. 2014: 1,880

Romaniello Romina, Saettini Francesco, Panzeri Elena, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Bassi Maria Teresa, Borgatti Renato (2015);

A de-novo stxbp1 gene mutation in a patient showing the rett syndrome phenotype;

Neuroreport, 26(5):254-257

Doi: 10.1097/WNR.0000000000000337

PMID: 25714420 I.F. 2014: 1,520

Scafuri Bernardina, Varriale Antonio, Facchiano Angelo, D'Auria Sabato, Raggi Maria Elisabetta, Marabotti Anna (2015);

Analysis of the binding of mycotoxins to proteins involved in asd with a combined computational/experimental approach;

Abstract PK-005 of the 29th Annual Symposium of the Protein Society, Barcelona, Spain, 22-25.07.2015;

Protein Science, 24(S1):264-265

I.F. 2014: 2,854

Sironi Manuela, Cagliani Rachele, Forni Diego, Clerici Mario (2015);

Evolutionary insights into host- pathogen interactions from mammalian sequence data;

Nature Reviews Genetics, 16(4):224-236

Doi: 10.1038/nrg3905

PMID: 25783448 I.F. 2014: 36,978

Sironi Manuela*, Biasin Mara*, Pontremoli Chiara, Cagliani Rachele, Saulle Irma, Trabattoni Daria, Vichi Francesca, Lo Caputo Sergio, Mazzotta Francesco, Aguilar-Jimenez Wbeimar, Rugeles Maria Teresa, Cedeno Samandhy, Sanchez Jorge, Brander Christian, Clerici Mario (2015);

Variants in the cyp7b1 gene region do not affect natural resistance to hiv-1 infection;

Retrovirology, 12(1):80

* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1186/s12977-015-0206-0

PMID: 26399852 I.F. 2014: 4,185

Theofilopoulos Spyridon, Griffiths William J., Crick Peter J., Yang Shanzheng, Meljon Anna, Ogundare Michael, Lockhart Andrew, Clayton Peter T., Morris Andrew A., Reddy M. Ashwin, Bassi Maria Teresa, Nittono Hiroshi, Criscuolo Chiara, Seckl Jonathan R., Schoels Ludger, Sailer Andreas W., Gustafsson Jan-Ake, Bjoerkhem Ingemar, Sjoevall Jan, Arenas Ernest, Wang Yuqin (2015);

Identification and characterization of endogenous lxr ligands in human cerebrospinal fluid; relation to motor neuron disease;

Abstract YIC04-05 25th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry jointly with the 13th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry in Conjunction with the 35th Meeting of the Australasian Neuroscience Society, Cairns, Australia, 23-27.08.2015; **Journal of Neurochemistry**, 134(Suppl. 1):101

Doi: 0.1111/jnc.13184

I.F. 2014: 4,281

Vetro Annalisa*, Dehghani Mohammad Reza*, Kraoua Lilia, Giorda Roberto, Beri Silvana, Cardarelli Laura, Merico Maurizio, Manolakos Emmanouil, Parada-Bustamante Alexis, Castro Andrea, Radi Orietta, Camerino Giovanna, Brusco Alfredo, Sabaghian Marjan, Sofocleous Crystalena, Forzano Francesca, Palumbo Pietro, Palumbo Orazio, Calvano Savino, Zelante Leopoldo, Grammatico Paola, Giglio Sabrina, Basly Mohamed, Chaabouni Myriam, Carella Massimo, Russo Gianni, Bonaglia Maria Clara, Zuffardi Orsetta (2015);

Testis development in the absence of sry: chromosomal rearrangements at sox9 and sox3;

European Journal of Human Genetics, 23:1025-1032

* Autori che hanno collaborato in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1038/ejhg.2014.237

PMID: 25351776 I.F. 2014: 4,349

“Centro Dino Ferrari”
Il Coordinatore Scientifico
Prof. Nereo Bresolin

