



**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**

**2013**

## **SEZIONI DEL “CENTRO DINO FERRARI”**

- LABORATORIO RADIOISOTOPI DI BIOCHIMICA E GENETICA      Pag. 3
  
- LABORATORIO CELLULE STAMINALI NEURALI      Pag. 21
  
- U.O.S.D. MALATTIE NEURODEGENERATIVE      Pag. 31
  
- LABORATORIO DI CELLULE STAMINALI      Pag. 47
  
- U.O.S.D. MALATTIE NEUROMUSCOLARI E RARE      Pag. 57
  
- SEDE DISTACCATA DEL “CENTRO DINO FERRARI” PRESSO  
U.O.NEUROLOGIA – STROKE UNIT E LABORA-  
TORIO DI NEUROSCIENZE UNVERSITA’ DEGLI STUDI DI MILANO  
I.R.C.C.S. ITITUTO AUXOLOGICO ITALIANO      Pag. 67
  
- 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. 91

# **LABORATORIO RADIOISOTOPI DI BIOCHIMICA E GENETICA**

## **Responsabile:**

**Prof. Giacomo P. Comi, Professore Associato**

## Medici:

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

## Biologi:

Dott. Roberto Del Bo  
Dott.ssa Sabrina Lucchiari  
Dott.ssa Sabrina Salani  
Dott.ssa Gianna Ulzi  
Dott.ssa Domenica Saccomanno  
Dott.ssa Daniela Piga

## Biotecnologi

Dott. Dario Ronchi  
Dott.ssa Serena Pagliarani  
Dott.ssa Mafalda Rizzuti  
Dott.ssa Valentina Melzi

## Tecnici

Sig.ra Andreina Bordoni  
Sig. Francesco Fortunato

## PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA 2013

### GENETICA DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA)

L'attività di ricerca è stata dedicata all'analisi genetica di nuovi geni causativi nella coorte di pazienti FALS e SALS seguiti presso i nostri ambulatori specialistici. Il nostro dipartimento rappresenta un centro di riferimento per la diagnosi e il trattamento delle malattie del motoneurone. Tutti i pazienti inclusi negli studi hanno soddisfatto i criteri di El Escorial per la SLA probabile o definitiva; un consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti arruolati.

In particolar modo la nostra casistica di pazienti SLA sporadici è stata inserita in un ampio studio internazionale caso-controllo di tipo GWA (genome-wide association), atto a individuare nuovi "loci" malattia. Di fatto è stato eseguito il più ampio studio di associazione che sia mai stato compiuto a tutt'oggi in ambito SLA. Sono stati genotipizzati 3959 nuovi soggetti italiani (1982 casi, 1977 controlli). I risultati ottenuti sono poi stati combinati con i dati ricavati da casistiche di altre Nazioni. In totale sono stati analizzati 13225 individui (6100 casi e 7125 controlli) per oltre 7 milioni di SNP. L'analisi dei dati ha ancora una volta evidenziato come il locus 9p21.2 (dove localizza il gene C9orf72) rappresenti la causa genetica principale delle SLA sporadiche; tuttavia è stato inoltre possibile identificare anche un nuovo locus sito sul cromosoma 17, 17q11.2 (rs34517613;  $p=1.11 \times 10^{-8}$ ; OR 0.82). Tale locus è stato poi confermato in uno studio indipendente di replica analizzando ulteriori 4656 individui ( $p=7.69 \times 10^{-9}$ ; OR 1.16).

Fogh I, Ratti A, Gellera C, Lin K, Tiloca C, Moskvina V, Corrado L, Sorarù G, Cereda C, Corti S, Gentilini D, Calini D, Castellotti B, Mazzini L, Querin G, Gagliardi S, Del Bo R, Conforti FL, Siciliano G, Inghilleri M, Saccà F, Bongioanni P, Penco S, Corbo M, Sorbi S, Filosto M, Ferlini A, Di Blasio AM, Signorini S, Shatunov A, Jones A, Shaw PJ, Morrison KE, Farmer AE, Van Damme P, Robberecht W, Chiò A, Traynor BJ, Sendtner M, Melki J, Meininger V, Hardiman O, Andersen PM, Leigh NP, Glass JD, Overste D, Diekstra FP, Veldink JH, van Es MA, Shaw CE, Weale ME, Lewis CM, Williams J, Brown RH, Landers JE, Ticozzi N, Ceroni M, Pegoraro E, Comi GP, D'Alfonso S, van den Berg LH, Taroni F, Al-Chalabi A, Powell J, Silani V; the SLAGEN Consortium Collaborators.

*A genome-wide association meta-analysis identifies a novel locus at 17q11.2 associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.*

**Hum Mol Genet.** 2013 Nov 20. [Epub ahead of print]

Inoltre, recenti evidenze sperimentali riportate in letteratura ci hanno portato a screenare tre differenti geni malattia all'interno della nostra casistica di pazienti, come qui di seguito riportato. I risultati ottenuti dal nostro gruppo di pazienti sono stati inclusi in studi genetici indipendenti su larga scala che includono i dati raccolti da altri 5 "Centri SLA" afferenti al "Consorzio SLAGEN italiano".

#### **hnRNPA1, A2/B1, A3**

Un recente studio condotto da Kim e collaboratori ha riportato due mutazioni missenso nei geni hnRNPA1 (p.D262V) e hnRNPA2/B1 (p.D290V) in altrettante famiglie affette da miopatia a corpi inclusi associata a malattia di Paget, demenza frontotemporale (FTD) e da sclerosi laterale amiotrofica (ALS). Inoltre altre due mutazioni missenso nel gene hnRNPA1 sono state identificate in 1/212 SLA familiari (FALS) e 1/305 SLA sporadiche (SALS). Tutte le mutazioni descritte localizzano nel dominio prione-like delle proteine e rendono le proteine hnRNP mutate maggiormente prionogeniche dis-regolandole e accelerandone i processi di nuclearizzazione e di polimerizzazione, come confermato da studi funzionali. Inoltre è stato dimostrato come sia hnRNPA1 che hnRNPA2/B1 rappresentino dei fattori in grado di interagire con i repeats esanucleotidici di C9orf72 dando luogo ad aggregati patologici osservati in pazienti FTD/ALS.

Tutto questo ci ha dunque portati a valutare la frequenza mutazionale dei geni hnRNPA1, A2/B1 e A3 in una ampia coorte di pazienti fSLA e sSLA. L'analisi genetica è stata condotta mediante PCR da DNA genomico e sequenziamento diretto degli ampliconi mediante metodica di Sanger. In totale i tre geni sono stati screenati in 113 FALS senza alcuna mutazione in geni noti associati a ALS, in 108 FALS con mutazioni in altri geni causativi di ALS e in 622 casi di ALS sporadica.

Non è stata osservata alcuna mutazione patologica nell'intera regione codificante di questi tre geni.

In conclusione, le variazioni patologiche a carico di questi tre geni rappresentano pertanto una causa rarissima di ALS, almeno nella coorte di pazienti italiani analizzati.

Calini D, Corrado L, Del Bo R, Gagliardi S, Pensato V, Verde F, Corti S, Mazzini L, Milani P, Castellotti B, Bertolin C, Sorarù G, Cereda C, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Ticozzi N, Landers JE, Ratti A, Silani V; SLAGEN Consortium.

*Analysis of hnRNPA1, A2/B1, and A3 genes in patients with amyotrophic lateral sclerosis.*

**Neurobiol Aging.** 2013 Nov;34(11):2695.e11-2.

### **UBQLN2**

Ubiquilina-2, codificata dal gene UBQLN2 (localizzato sul cromosoma X), è una proteina di 624 aminoacidi e appartiene alla famiglia delle proteine ubiquitina-simili. Recentemente, alcune mutazioni a carico del gene UBQLN2 sono state osservate in casi di SLA e SLA/demenza. La maggior parte delle mutazioni individuate coinvolgono residui prolinici all'interno della regione ripetuta PXX che è unica per il gene UBQLN2. L'analisi funzionale ha dimostrato che le mutazioni nel gene UBQLN2 portano ad un'alterazione del processo della degradazione delle proteine.

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

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

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

sistema UPS: differenti genotipi potrebbero dunque convergere nello stesso fenotipo clinico attraverso pathways comuni.

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

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

**J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2013 Feb;84(2):183-7.

### **PFN1**

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

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

Lo screening genetico ha evidenziato la presenza della sola variante p.E117G (già riportata in letteratura) in un unico paziente SALS con insorgenza bulbare all'età di 73 anni. La patogenicità di tale mutazione deve essere ancora del tutto chiarita dal momento che la stessa variante è stata osservata anche in soggetti sani (3 su 7560 individui analizzati). Inoltre è stata osservata in un paziente SALS la seguente variante sinonima (c.45G>C p.G15G). Infine il polimorfismo rs13204 (c.334C>T p.L112L) è stato osservato nella stessa frequenza nel gruppo SLA e nel gruppo soggetti sani (n=1512). Nessun soggetto FTD è risultato essere portatore di alcuna mutazione.

Possiamo dunque concludere che, alla luce dei risultati ottenuti dallo screening molecolare, le mutazioni di PFN1 rappresentano una causa molto rara per lo sviluppo della SLA sporadica nella popolazione italiana. Il contributo di PFN1 nella genetica della FTD necessita di ulteriori approfondimenti.

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

*Screening of the PFN1 gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in frontotemporal dementia.*

**Neurobiol Aging.** 2013 May;34(5):1517.e9-10.

### **ELENCO ABSTRACT PRESENTATI A CONGRESSI INTERNAZIONALI**

D Calini, R Del Bo, L Corrado, S Gagliardi, V Pensato, F Verde, S Corti, L Mazzini, P Milani, B Castellotti, C Bertolin, G Sorarù, C Cereda, GP Comi, S D'Alfonso, C Gellera, N Ticozzi, JE Landers, A Ratti, V Silani.

*Analysis of HNRNP A1, A2/B1 and A3 genes in ALS patients (P175). "24th International Symposium on ALS/MND", Milano 5-8 dicembre 2013.*

**Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration, 2013; 14(Suppl. 2), pag 158.**

N Riva, M Scarlato, S Scarlino, R Del Bo, GP Comi, M Corbo, S Penco, M Ferrari, A Foglio, LM Grimaldi, G Comi, E Nobile-Orazio, MG Marrosu, S Gerevini, A Bolino, S Previtali.

*Clinical and molecular characterization of a color of patients with distal motor neuropathy (P133). "24th International Symposium on ALS/MND", Milano 5-8 dicembre 2013.*

**Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration, 2013; 14(Suppl. 2), pag 135.**

C Tiloca, N Ticozzi, V Pensato, A Bagarotti, R Del Bo, S Gagliardi, G Lauria, S Corti, D Galimberti, M Ceroni, G Siciliano, C Cereda, E Scarpini, G Sorarù, GP Comi, L Corrado, C Gellera, A Ratti, JE Landers, V Silani.

*Screening of the PFN1 gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in frontotemporal dementia (P173). "24th International Symposium on ALS/MND", Milano 5-8 dicembre 2013.*

**Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration, 2013; 14(Suppl. 2), pag 157.**

## **STUDIO DELLE MALATTIE MITOCONDRIALI**

Nel corso del 2013 il Laboratorio di Biochimica e Genetica del Centro Dino Ferrari diretto dal professor Giacomo Pietro Comi ha proseguito le indagini molecolari e biochimiche in pazienti pediatriche e adulti affetti da malattie riconducibili a un difetto nel metabolismo ossidativo.

Le cause genetiche di queste patologie sono molto eterogenee a causa del doppio controllo esercitato dal genoma nucleare e da quello mitocondriale. Il nostro gruppo ha fornito importanti contributi in entrambe le direzioni.

### ***1) Difetti genetici nucleari che compromettono il mantenimento del DNA mitocondriale***

#### ***1.1) Mutazioni recessive nel gene MGME1 quali causa di una grave sindrome mitocondriale dell'adulto con alterata omeostasi del DNA mitocondriale.***

Numerosi difetti molecolari si associano ad alterazioni quantitative e qualitative del DNA mitocondriale in tessuti di pazienti pediatriche e adulti. I geni coinvolti codificano prevalentemente per proteine del replisoma mitocondriale o del rifornimento dei deossiribonucleotidi nel mitocondrio. Nonostante la nostra conoscenza delle cause genetiche sia in espansione, molti pazienti non ricevono ancora una diagnosi genetica.

In questo studio collaborativo con i ricercatori delle Università di Monaco e Bonn e con i colleghi della Columbia University di New York abbiamo identificato una nuova causa genetica associata a una sindrome mitocondriale con oftalmoplegia esterna progressiva, ipostenia e insufficienza respiratoria. A livello molecolare il muscolo scheletrico dei pazienti presenta l'accumulo di genomi mitocondriali parzialmente deleti. Le mutazioni, identificate attraverso un approccio combinato di analisi di linkage classica e sequenziamento di nuova generazione, sono state individuate nel gene MGME1 che codifica per una esonucleasi mitocondriale coinvolta nei processi di replicazione e riparazione del DNA mitocondriale. Le conseguenze biochimiche di questi difetti sono state indagate a livello biochimico e molecolare nei fibroblasti dei pazienti affetti. Studi di complementazione funzionale hanno confermato il carattere recessivo di queste varianti. Questo studio, pubblicato sull'importante rivista Nature Genetics, non solo ha consentito l'identificazione di una nuova causa genetica di una grave malattia mitocondriale ma ha espanso la nostra conoscenza dei meccanismi alla base dell'omeostasi del DNA mitocondriale.

Kornblum C, Nicholls TJ, Haack TB, Schöler S, Peeva V, Danhauser K, Hallmann K, Zsurka G, Rorbach J, Iuso A, Wieland T, Sciacco M, Ronchi D, Comi GP, Moggio M, Quinzii CM, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Klopstock T, Strom TM, Meitinger T, Minczuk M, Kunz WS, Prokisch H.

*Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease.*

**Nat Genet.** 2013 Feb;45(2):214-9. doi: 10.1038/ng.2501.

### ***1.2) Mutazioni dominanti nel gene DNA2 si associano a una forma di miopatia mitocondriale progressiva***

In questo studio abbiamo studiato un caso familiare di miopatia mitocondriale con ptosi e accumulo muscolare di molecole di DNA mitocondriale con delezioni multiple. I soggetti sono stati investigati attraverso tecniche di sequenziamento di nuova generazione, in grado di analizzare l'intero set di sequenze codificanti proteine del genoma umano (esoma). Quest'approccio ha consentito di evidenziare una mutazione che segrega con il fenotipo nel gene DNA2 che codifica per un'endo-esonucleasi mitocondriale. L'estensione dello screening di questo gene in altri pazienti affetti da sindromi simili ha consentito di evidenziare due ulteriori mutazioni. Studi biochimici, condotti in collaborazione con il gruppo del professor Shen (City of Hope, Duarte, California, USA) hanno avvalorato il significato patogenetico delle varianti trovate. Questa scoperta implica il ruolo di un nuovo pathway di riparazione del DNA mitocondriale nelle patologie umane. La scoperta si sovrappone e conferma le evidenze prodotte nel lavoro sul gene MGME1.

Ronchi D, Di Fonzo A, Lin W, Bordoni A, Liu C, Fassone E, Pagliarani S, Rizzuti M, Zheng L, Filosto M, Ferrò MT, Ranieri M, Magri F, Peverelli L, Li H, Yuan YC, Corti S, Sciacco M, Moggio M, Bresolin N, Shen B, Comi GP.

*Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability.*

**Am J Hum Genet.** 2013 Feb 7;92(2):293-300.

### ***1.3) Episodi stroke-like in un paziente con mutazioni recessive in POLG1.***

Questo case report descrivono il secondo paziente con mutazioni nel gene POLG1 associate a una forma di miopatia mitocondriale cui si aggiungono tipici elementi riconducibili alla sindrome MELAS. Abbiamo fornito elementi clinici, istologici, molecolari e di imaging utili a definire un nuovo fenotipo che entra a far parte dello spettro di presentazioni cliniche associate a mutazione in POLG1,

Cheldi A, Ronchi D, Bordoni A, Bordo B, Lanfranconi S, Bellotti MG, Corti S, Lucchini V, Sciacco M, Moggio M, Baron P, Comi GP, Colombo A, Bersano A;

*Lombardia GENS collaborators. POLG1 mutations and stroke like episodes: a distinct clinical entity rather than an atypical MELAS syndrome.*

**BMC Neurol.** 2013 Jan 15;13:8.

### ***1.4) Le patologie umane legate a mutazioni in geni che codificano per proteine coinvolte nella fusione mitocondriale***

I mitocondri sono organelli intracellulari che presentano una dinamica complessa e continua volta al rimodellamento della loro forma e del loro numero. Questo processo è il risultato di due pathway che lavorano in opposizione: la fusione e la fissione mitocondriale. Molte delle proteine coinvolte in questi processi, se alterate, portano allo sviluppo di patologie sia nell'adulto che nel bambino. In questa review ci siamo concentrati sull'analisi degli aspetti clinici e molecolari di questa classe di malattie. La revisione di quanto prodotto da noi e da altri ricercatori a riguardo di questo tema non solo migliora la nostra comprensione di queste malattie ma evidenzia aspetti importanti per la patogenesi di altre malattie neurodegenerative maggiori come la malattia di Parkinson e quella di Alzheimer.

Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, Ronchi D, Rizzo F, Bresolin N, Corti S, Comi GP.  
*Mitochondrial fusion proteins and human diseases.*

**Neurol Res Int.** 2013; 2013:293893. doi: 10.1155/2013/293893.



## **2) Studio delle malattie mitocondriali associate a mutazioni puntiformi del DNA mitocondriale**

### **2.1) Revisione dei casi con mutazione 8344 del DNA mitocondriale nell'ambito del network italiano per lo studio delle malattie mitocondriali**

Nell'ambito di un programma Telethon, partecipiamo ad un network italiano che riunisce i principali gruppi che si occupano di malattie mitocondriali. Questo studio è il primo risultato dello sforzo realizzato per la costruzione di un database per i pazienti mitocondriali del nostro paese. Siamo i secondi contributori di questo database, dopo l'istituto neurologico Carlo Besta.

In questo studio in particolare abbiamo revisionato le caratteristiche cliniche, istologiche e molecolari dei pazienti con mutazione del DNA mitocondriale m.8344A>G, prevalentemente associata alla sindrome con mioclono epilessia e fibre ragged-red nel muscolo. Dei 42 pazienti indipendenti selezionati, sono state riviste le note cliniche e anamnestiche confermando l'eterogeneità anche nel nostro campione di pazienti. In particolare alcuni aspetti clinici, come la presenza di atassia, emergono in modo importante in circa metà dei soggetti analizzati. Questa analisi retrospettiva si rivela di grande interesse per il clinico che si confronta la variante m.8344 e con i fenotipi ad essa associati.

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

*Phenotypic heterogeneity of the 8344A>G mtDNA "MERRF" mutation.*

*Neurology. 2013 May 28;80(22):2049-54.*

### **2.2) Revisione dei casi con mutazione 3243 ("MELAS") del DNA mitocondriale nell'ambito del network italiano per lo studio delle malattie mitocondriali**

La mutazione puntiforme del DNA mitocondriale m.3243A>G è canonicamente associata con encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi stroke-like. Abbiamo condotto uno studio retrospettivo in 126 pazienti italiani positivi per questa mutazione. Abbiamo riscontrato molti elementi clinici, biochimici e molecolari simili a quelli trovati in precedenti revisioni di pazienti 3243-positivi ma abbiamo anche delineato alcuni aspetti innovativi. In particolare è emerso che i pazienti maschi hanno una maggiore probabilità di sviluppare episodi stroke-like rispetto a donne di pari età e con simili livelli di eteroplasmia della mutazione m.3243A>G. Questo elemento rappresenta un possibile effetto di genere nell'ambito delle malattie mitocondriali e spinge verso la necessità di avere una migliore comprensione dei rapporti che regolano il metabolismo mitocondriale e il profilo ormonale dei pazienti, incluso l'eventuale ruolo protettivo degli estrogeni.

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

*The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender?*

*J Neurol. 2013 Dec 29.*

## **ELENCO ABSTRACT PRESENTATI COME POSTER O COMUNICAZIONI ORALI**

Mancuso M, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Uziel G, Bruno C, Orsucci D, Caldarazzo Ienco E, Filosto M, Lamperti C, Martinelli D, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Ronchi D, Santorelli FM,

Sauchelli D, Scarpelli M, Sciacco M, Spinazzi M, Valentino ML, Vercelli, Zeviani M, Siciliano G.

*The clinical spectrum of the mtDNA 3243A>G mutation. Evidences from the Italian network of mitochondrial diseases. XIII Congress of the Italian Association of Myology (AIM), May 16-18 2013*

**Acta myologica**, vol. XXXII, May 2013, p48.

Ronchi D, Quinzii CM, Di Mauro S, Calvo SE, Mootha VK, Xhani R, Colombo I, Di Fonzo A, Bordoni A, Grimoldi N, Vetrano IG, Comi GP, Moggio M, Sciacco M.

*A novel, autosomal recessive mitochondrial disorder due to loss of function of MGME1, involved in mitochondrial DNA replication. [COMUNICAZIONE ORALE] XIII Congress of the Italian Association of Myology (AIM), May 16-18 2013*

**Acta myologica**, vol. XXXII, May 2013, p57.

Ronchi D, Garone C, Bordoni A, Rios PG, Calvo SE, Ripolone M, Ranieri M, Rizzuti M, Xhani R, Servida M, Magri F, Corti S, Bresolin N, Mootha VK, Moggio M, Di Mauro S, Comi GP, Sciacco M.

*Next-generation sequencing discloses DGUOK mutations in adult patients with mtDNA multiple deletions. [COMUNICAZIONE ORALE] XIII Congress of the Italian Association of Myology (AIM), May 16-18 2013*

**Acta myologica**, vol. XXXII, May 2013, p57.

Ronchi D, Di Fonzo A, Bordoni A, Pagliarani S, Rizzuti M, Melzi V, Tiri G, Filosto M, Ferrò MT, Peverelli L, Vetrano IG, Spagnoli D, Corti S, Sciacco M, Moggio M, Bresolin N, Shen B, Comi GP.

*Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. XIII Congress of the Italian Association of Myology (AIM), May 16-18 2013*

**Acta myologica**, vol. XXXII, May 2013, p57.

Ranieri M, Ronchi D, Di Fonzo A, Lin W, Bordoni A, Liu C, Fassone E, Pagliarani S, Rizzuti M, Zheng L, Filosto M, Ferro MT, Magri F, Peverelli L, Li H, Yuan YC, Corti S, Sciacco M, Moggio M, Bresolin N, Shen B, Comi GP.

*Mutations in DNA2 cause progressive myopathy with mtDNA instability. 23rd Meeting of The European Neurological Society, Barcelona June 8-11, 2013.*

**Journal of Neurology**, vol 260, suppl. 1, S246, 2012.

Ronchi D, Di Fonzo A, Bordoni A, Rizzuti M, Melzi V, Corti S, Sciacco M, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

*Heterogeneous genetic landscape in Italian patients affected by adult onset mitochondrial disorders featuring muscle mtDNA instability. Mitochondrial Disease: Translating biology into new treatments.*

**Cambridge** (UK), October 2-4, 2013.

## **STUDIO DEI DISORDINI DEL MOVIMENTO**

I disordini del movimento comprendono un gruppo di patologie caratterizzate da alterazioni del movimento volontario e presenza di movimenti involontari. Tali disordini vengono clinicamente classificati in due grandi categorie: disordini di tipo acinetico-rigido, di cui fa parte la malattia di Parkinson, e disordini di tipo ipercinetico, che comprendono le distonie.

### **1) Malattia di Parkinson**

La malattia di Parkinson è fra le più frequenti patologie neurodegenerative: si stima infatti che ne siano affetti circa 4.5 milioni di persone oltre i 50 anni di età. Nel Parkinson idiopatico, i sintomi tipici comprendono tremore, rigidità e bradicinesia, che formano la triade richiesta per la diagnosi. L'età di esordio è nella settima decade e i sintomi sono tipicamente unilaterali. Le caratteristiche neuropatologiche della malattia sono la perdita dei neuroni dopaminergici e la presenza dei corpi di Lewy, ossia aggregati proteici che si accumulano dapprima nel locus coeruleus, nuclei di raphe e nei nuclei motori dorsali del vago, poi nella sostanza nera ed infine interessano molte regioni del cervello. Il background genetico della malattia di Parkinson resta per la maggior parte sconosciuto, sebbene recenti evidenze hanno rivelato la presenza di loci candidati

La malattia di Parkinson può essere, in una piccola parte dei casi, di tipo ereditario. Attualmente sono stati identificati 18 differenti loci PARK associati a vari fenotipi clinici che comprendono sia forme recessive ad esordio precoce (PARK2, DJ-1 e PINK1 i più comuni) sia forme dominanti (SNCA e LRRK2) di malattia di Parkinson.

Al fine di effettuare una diagnosi genetica dei nostri pazienti, abbiamo analizzato una coorte di 130 probandi con malattia di Parkinson. Abbiamo identificato 4 soggetti con mutazioni nel gene LRRK2 (G2019S, A1396S, IVS31 +3A>G) e un paziente portatore della variante L347P nel gene PINK1 mediante sequenziamento delle regioni codificanti di ciascun gene. Inoltre, un paziente della nostra casistica è risultato portatore di una delezione degli esoni 2, 3 e 4 del gene PARK2, codificante per la proteina Parkina, le cui mutazioni rappresentano la causa principale della malattia di Parkinson ad esordio precoce e con ereditarietà autosomica recessiva. Non abbiamo invece individuato varianti patogenetiche nei geni SNCA e DJ-1.

## **2) Distonie**

Le distonie sono caratterizzate da contrazioni muscolari involontarie, che si manifestano come movimenti ripetitivi e anomalie nella postura. Le distonie primarie sono spesso associate a difetti genetici ereditati in modo autosomico dominante, autosomico recessivo o legato all'X.

Attualmente sono stati identificati 10 geni-malattia, di cui sette con eredità autosomica dominante, due ereditati in modo autosomico recessivo e uno X-linked.

In una casistica di 8 pazienti con distonia primaria abbiamo analizzato le sequenze codificanti dei geni GCH1 (DYT5a), THAP1 (DYT6), TUBB4A (DYT4), SLCA1 (DYT18), PRKRA (DYT16). Per nessuno di essi sono state individuate varianti patogenetiche.

## **STUDIO DELLE MALATTIE DA ACCUMULO DI GLICOGENO**

Il nostro laboratorio da molti anni porta avanti lo studio delle malattie dovute all'accumulo muscolare di glicogeno. Nel corso del 2013 i risultati conseguiti negli ultimi anni di studio sulla glicogenosi di tipo 2 (deficit di enzima maltasi acida) sono stati oggetto di varie pubblicazioni.

### ***1) Screening biochimico e molecolare in pazienti paucisintomatici con glicogenosi di tipo 2 ad esordio adulto e riscontrato aumentato di creatin chinasi.***

Questo lavoro collaborativo include lo screening mediante dosaggio biochimico su goccia di sangue dell'enzima maltasi acida in 137 pazienti con inspiegabile iperckemia. Il protocollo dello studio prevedeva un secondo controllo biochimico attraverso dosaggi biochimici tradizionali su linfociti o su muscolo e, in caso di esito positivo, lo studio molecolare del gene GAA codificante la maltasi acida lisosomiale. I risultati di questo studio hanno permesso di confermare la diagnosi di glicogenosi di tipo 2 a livello biochimico e con conferma molecolare nel 2,2% dei soggetti della coorte. Altri 3 soggetti sono stati identificati come carrier asintomatici della mutazione comune IVS1-32-13T>G. In questo modo abbiamo fornito nuovi dati di correlazione e conferma dell'uso del dosaggio su singola goccia di sangue per la identificazione di difetti

biochimici dell'enzima maltasi acida. Una diagnosi precoce è fondamentale per procedere ad un efficace trattamento, anche con terapia enzimatica sostitutiva.

Spada M, Porta F, Vercelli L, Pagliardini V, Chiadò-Piat L, Boffi P, Pagliardini S, Remiche G, Ronchi D, Comi G, Mongini T.

*Screening for later-onset Pompe's disease in patients with paucisymptomatic hyperCKemia.*

**Mol Genet Metab.** 2013 Jun;109(2):171-3. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.03.002.

## **2) Identificazione di aspetti clinici peculiari in pazienti affetti da glicogenosi di tipo 2**

In questi lavori collaborativi, abbiamo condotto delle osservazioni originali circa la presenza di alterazioni anatomiche e funzionali in pazienti con diagnosi biochimica e genetica di glicogenosi di tipo 2.

Remiche G, Lo Mauro A, Tarsia P, Ronchi D, Bordoni A, Magri F, Comi GP, Aliverti A, D'Angelo MG.

*Postural effects on lung and chest wall volumes in late onset type II glycogenosis patients.*

**Respir Physiol Neurobiol.** 2013 May 1;186(3):308-14. doi: 10.1016/j.resp.2013.03.004.

Remiche G, Ronchi D, Lamperti C, Bordoni A, Magri F, Moggio M, Comi GP.

*Spontaneous hydromyelic cavity in two unrelated patients with late-onset pompe disease: is this a fortuitous association?*

**Eur Neurol.** 2013;70(1-2):102-5

## **GLICOGENOSI DI TIPO III E GLICOGENOSI DI TIPO IV**

La glicogenosi di tipo III (GSDIII) è una rara malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva del metabolismo del glicogeno ed è causata da mutazioni nel gene *AGL* che codifica per l'enzima deramificante (GDE), caratterizzata da accumulo di glicogeno nei tessuti, principalmente in fegato e muscolo scheletrico. La malattia in genere si manifesta nell'infanzia con epatomegalia, ritardo di crescita e crisi ipoglicemiche, mentre durante l'età adulta si presenta una miopatia. Attualmente, i meccanismi patogenetici della GSDIII non sono stati ancora completamente chiariti e i pazienti sono trattati con una dieta appropriata, che comprende pasti frequenti, e terapie sintomatiche.

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.

Il lavoro sulla glicogenosi di tipo III si è ulteriormente sviluppato con la generazione del modello murino di questa patologia. Il modello animale ricapitola le principali caratteristiche della patologia umana, quali accumulo di glicogeno nei tessuti, principalmente muscolo scheletrico e fegato, e difficoltà motorie nell'età adulta. I primi studi sono stati presentati in diversi congressi internazionali.

La malattia da accumulo di corpi poliglucosani ad esordio adulto è una malattia rara recessiva dovuta al deficit dell'enzima ramificante il glicogeno (GBE). Sono presenti disfunzione urinaria, paraplegia spastica con perdita della sensibilità pressoria e di vibrazione, neuropatia periferica e disordini cognitivi. Il nostro laboratorio si occupa sia della diagnosi biochimica, con il dosaggio dell'attività enzimatica, sia della diagnosi genetica, con la ricerca delle mutazioni che causano malattia. Lo studio di caso clinico interessante in collaborazione con l'ospedale Besta ha portato alla pubblicazione di un articolo su di una rivista internazionale.

### **Publicazione scientifica:**

Sagnelli A, Savoardo M, Marchesi C, Morandi L, Mora M, Morbin M, Farina L, Mazzeo A, Toscano A, Pagliarini S, Lucchiarini S, Comi GP, Salsano E, Pareyson D.

*Adult polyglucosan body disease in a patient originally diagnosed with Fabry's disease. Neuromuscul Disord. 2013 Nov 19. pii: S0960-8966(13)00997-8. doi: 10.1016/j.nmd.2013.11.006.*

**Abstract presentati a congressi:**

Sabrina Lucchiari, Serena Pagliarani, Gianna Ulzi, Andreina Bordoni, Raffaella Violano, Michela Ripolone, Gigliola Fagiolari, Stefania Corti, Rubiona Xani, Fabrizio Seidita, Maurizio Moggio, Nereo Bresolin. Giacomo P. Comi

*Glycogen Storage Disease type III: Agl Gene Knockout Mouse Model.*

**13° Congresso Associazione Italiana Miologia - Stresa 16-18 Maggio 2013.**

G.P. Comi, G. Ulzi, L. Morandi, A. Bordoni, M. Mora, S. Gerevini, S. Lucchiari

*Clinics and genetics of a woman affected by Glycogen Storage Disease type III: a large genetic rearrangement in AGL gene.*

**13° Congresso Associazione Italiana Miologia - Stresa 16-18 Maggio 2013**

Comi GP, Lucchiari S, Pagliarani S, Ulzi G, Bordoni A, Violano R, Ripolone M, Fagiolari G, Corti S, Xani R, Seidita F, Moggio M, Bresolin N.

*Glycogen Storage Disease type III: Agl gene knockout mouse model.*

**International GSD Conference, 28-30 Novembre 2013, Heidelberg, Germania**

Gianna Ulzi, Sabrina Lucchiari, Serena Pagliarani, Giacomo P. Comi.

*Novità cliniche e sperimentali della Glicogenosi Tipo 3 e caratterizzazione del modello sperimentale.*

**Congresso Associazione Italiana Glicogenosi, Roma, 7-8 Dicembre 2013.**

## **CANALOPATIE MUSCOLARI**

Le canalopatie muscolari sono caratterizzate da un'alterata eccitabilità della membrana muscolare e si dividono in miotonie non-distrofiche e paralisi periodiche. Esordiscono principalmente nelle prime due decadi di vita e sono caratterizzate da rigidità muscolare, dolore, debolezza e fatica. 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. 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 70 soggetti Thomsen/Becker. La nostra coorte consta, inoltre, di 23 soggetti affetti da paralisi periodica (paralisi periodica ipokaliemica, paralisi periodica iperkaliemica e sindrome di Andersen-Tawil) e di circa 30 pazienti affetti da miotonia del canale del sodio. Nuove mutazioni sono state identificate e analizzate con studi funzionali.

Questi studi finora sono stati presentati a congressi internazionali e hanno portato alla pubblicazione su riviste internazionali di articoli, alcuni dei quali in collaborazione con altri gruppi che si occupano dello studio delle canalopatie muscolari.

**Articoli scientifici:**

Lucchiari S, Ulzi G, Magri F, Bucchia M, Corbetta F, Servida M, Moggio M, Comi GP, Lecchi M. *Clinical evaluation and cellular electrophysiology of a recessive CLCN1 patient.*

**J Physiol Pharmacol. 2013 Oct;64(5):669-78.**

**Abstract presentati a congressi:**

Pagliarani S, Sansone V, Scarlato M, Modoni A, Magri F, Previtali S, Corti S, Meola G, Lo Monaco M, Comi GP.

*Genetic distribution and unusual phenotypes in a periodic paralysis cohort.*

**13° Congresso Associazione Italiana Miologia - Stresa 16-18 Maggio 2013**

G. Ulzi, S. Lucchiari, F. Magri, M. Bucchia, F. Corbetta, M. Servida, M. Moggio, G. P. Comi, M. Lecchi.

*Clinical evaluation and cellular electrophysiology of a recessive CLCN1 patient.*

**13° Congresso Associazione Italiana Miologia - Stresa 16-18 Maggio 2013**

## **MIOPATIE CONGENITE**

### **Caratterizzazione clinica e genetica delle Miopatie Congenite in una coorte di pazienti italiani.**

Le Miopatie Congenite sono un gruppo estremamente eterogeneo di patologie muscolari che hanno esordio alla nascita o nei primi anni di vita e presentano un decorso variabile, caratterizzato da ipotonia, atrofia, debolezza muscolare, ritardo nell'acquisizione delle tappe motorie, malformazioni osteoarticolari, dismorfismi facciali, oftalmoplegia e difficoltà nella nutrizione. Sono forme rare, familiari e occasionalmente sporadiche, causate da un'alterazione geneticamente determinata di varie proteine strutturali della fibra muscolare. In genere sono caratterizzate da aspetti istopatologici specifici che consentono una certa suddivisione. Le principali Miopatie Congenite sono la Miopatia Central-Core, la Miopatia Centronucleare, la Miopatia Minicore, la Miopatia Miofibrillare e la Miopatia Nemalinica.

All'interno del network delle Miopatie Congenite il nostro laboratorio si è occupato dello screening di un gruppo di pazienti italiani affetti da Miopatia Nemalinica. Tramite Target Region Capture Sequencing del gene NEB, responsabile del 50% dei casi di miopatie nemaliniche, abbiamo identificato 9 nuove mutazioni in 6 pazienti. Le varianti sono state selezionate prendendo in considerazione solo quelle che determinano un'alterazione sostanziale della sequenza proteica. Per escludere i polimorfismi si sono usati i data base dbSNPs e 1000 Genome data base e si è valutata la patogenicità usando dei programmi di predizione, come Polyphen. Si è poi controllata la segregazione delle mutazioni all'interno della famiglia, la loro assenza nell'Exome variant server e in un gruppo di 240 cromosomi controllo.

Concludendo la Target Region Capture Sequencing ha permesso una più facile determinazione delle mutazioni: missense, frameshift, stop codon e mutazioni nei siti di splicing. In particolare nello screening dei nostri pazienti ha permesso un'alta frequenza di determinazione delle mutazioni. Queste mutazioni sono distribuite lungo tutto il gene, confermando la mancanza di un hotspot mutazionale. Pertanto questo metodo di analisi sembra essere promettente per una più facile determinazione delle mutazioni in quei geni complessi che presentano un gran numero di esoni, ampie regioni codificanti e non presentano hotspots mutazionali.

**Abstract presentati a congressi:**

Piga D; Ronchi D; Magri F; Corti S; Ghezzi S; Mercuri E; Bertini E; Toscano A; Moroni I; Moggio M; D'Angelo MG; Bruno C; Mora M; Bresolin N; Comi GP.

*Next generation sequencing in the analysis of an Italian cohort of patients affected by nemaline myopathy.*

**65th ANNUAL MEETING AAN - American Academy of Neurology**

*(San Diego, 16-23 Mar 2013)*

Piga D; Ronchi D; Magri F; Corti S; Ghezzi S; Mercuri E; Bertini E; Toscano A; Moroni I; Moggio M; D'Angelo MG; Bruno C; Mora M; Bresolin N; Comi GP.

*Next generation sequencing in the analysis of an Italian cohort of patients affected by nemaline myopathy.*

**XIII° CONGRESSO NAZIONALE AIM - Associazione Italiana di Miologia**  
(Stresa, 16-18 Mag 2013) *Comunicazione orale*

## **MIASTENIE CONGENITE**

### **Analisi genetica dei pazienti affetti da Miastenie Congenite.**

Le miastenie congenite sono un gruppo eterogeneo di malattie, con una prevalenza stimata intorno a 1 su 500.000 individui. Sono dovute ad alterazioni di diverse componenti della placca neuromuscolare, che normalmente consente la trasmissione tra nervo e muscolo. Le varie forme di miastenie congenite hanno aspetti clinici comuni: l'esordio è generalmente precoce, i sintomi principali sono l'oftalmoplegia, la ptosi palpebrale, la disfonia, le difficoltà di deglutizione, la paralisi della muscolatura facciale e l'affaticabilità muscolare. La severità di tali malattie è molto variabile e il principale fattore di rischio è costituito dalle crisi respiratorie che possono essere scatenate da infezioni ed episodi febbrili.

La diagnosi si basa sul sospetto clinico, sull'esame elettromiografico e sulla caratterizzazione genetica. Ad oggi sono noti 16 geni implicati nello sviluppo della patologia.

Tramite sequenziamento di questi geni in un gruppo di pazienti affetti da Miastenia Congenita abbiamo identificato alcune mutazioni nuove nei geni COLQ, CHRNE e CHRNA1. In particolare una nuova mutazione in un sito di splicing del gene COLQ è stata identificata in un neonato di 6 mesi con ipotonia del tronco dalla nascita e crisi respiratorie ricorrenti, ptosi bilaterale, oftalmoplegia e riduzione dei movimenti spontanei.

Mutazioni in COLQ causano una forma rara di Miastenia Congenita autosomica recessiva associata alla mancanza di un enzima della placca neuromuscolare, l'acetilcolinesterasi. L'individuazione della mutazione e del gene coinvolto ha permesso di adottare la terapia farmacologica piu' adatta.

### **Abstract presentati a congressi:**

Bonato S; Piga D; Pagliarani S; Del Bo R; Ronchi D; Moggio M; DiLena R; Ciscato P; Agostoni C; Boccazzi A; Vetrano IG; Spagnoli D; Bresolin N; Comi GP.

*A severe pediatric case of Congenital Myastenic Syndrome due to a novel mutation in COLQ gene.*

**XIII° CONGRESSO NAZIONALE AIM - Associazione Italiana di Miologia**  
(Stresa, 16-18 Mag 2013) *Poster*

## **ELENCO LAVORI SCIENTIFICI 2013**

1. Sagnelli A, Savoiaro M, Marchesi C, Morandi L, Mora M, Morbin M, Farina L, Mazzeo A, Toscano A, Pagliarani S, Lucchiari S, Comi GP, Salsano E, Pareyson D.  
*Adult polyglucosan body disease in a patient originally diagnosed with Fabry's disease.*  
Neuromuscul Disord. 2013 Nov 19. pii: S0960-8966(13)00997-8.  
doi:10.1016/j.nmd.2013.11.006. [Epub ahead of print]  
**PubMed PMID:** 24380807.
2. Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Donati A, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Uziel G, Bruno C, Ienco EC, Filosto M, Lamperti C, Catteruccia M, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Ronchi D, Santorelli FM, Sauchelli D, Scarpelli M, Sciacco M, Valentino ML, Vercelli L, Zeviani M, Siciliano G.  
*The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender?*

**J Neurol.** 2013 Dec 29. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00415-013-7225-3 PubMed PMID: 24375076.

3. Zanetta C, Nizzardo M, Simone C, Monguzzi E, Bresolin N, Comi GP, Corti S.  
*Molecular Therapeutic Strategies for Spinal Muscular Atrophies: Current and Future Clinical Trials.*  
**Clin Ther.** 2013 Dec 17. pii: S0149-2918(13)01100-4. doi:10.1016/j.clinthera.2013.11.006. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24360800.
4. Lucchiari S, Ulzi G, Magri F, Bucchia M, Corbetta F, Servida M, Moggio M, Comi GP, Lecchi M.  
*Clinical evaluation and cellular electrophysiology of a recessive CLCN1 patient.*  
**Physiol Pharmacol.** 2013 Oct;64(5):669-78. PubMed PMID: 24304580.
5. Fogh I, Ratti A, Gellera C, Lin K, Tiloca C, Moskvina V, Corrado L, Sorarù G, Cereda C, Corti S, Gentilini D, Calini D, Castellotti B, Mazzini L, Querin G, Gagliardi S, Del Bo R, Conforti FL, Siciliano G, Inghilleri M, Saccà F, Bongioanni P, Penco S, Corbo M, Sorbi S, Filosto M, Ferlini A, Di Blasio AM, Signorini S, Shatunov A, Jones A, Shaw PJ, Morrison KE, Farmer AE, Van Damme P, Robberecht W, Chiò A, Traynor BJ, Sendtner M, Melki J, Meininger V, Hardiman O, Andersen PM, Leigh NP, Glass JD, Overste D, Diekstra FP, Veldink JH, van Es MA, Shaw CE, Weale ME, Lewis CM, Williams J, Brown RH, Landers JE, Ticozzi N, Ceroni M, Pegoraro E, Comi GP, D'Alfonso S, van den Berg LH, Taroni F, Al-Chalabi A, Powell J, Silani V; the SLAGEN Consortium Collaborators.  
*A genome-wide association meta-analysis identifies a novel locus at 17q11.2 associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.*  
**Hum Mol Genet.** 2013 Nov 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24256812.
6. Brajkovic S, Riboldi G, Govoni A, Corti S, Bresolin N, Comi GP.  
*Growing Evidence about the Relationship between Vessel Dissection and Scuba Diving.*  
**Case Rep Neurol.** 2013 Sep 12;5(3):155-61. doi: 10.1159/000354979. PubMed PMID: 24163671; PubMed Central PMCID: PMC3806682.
7. Ruggieri M, Riboldi G, Brajkovic S, Bucchia M, Bresolin N, Comi GP, Corti S.  
*Induced neural stem cells: Methods of reprogramming and potential therapeutic applications.*  
**Prog Neurobiol.** 2013 Nov 15. pii: S0301-0082(13)00118-4. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.11.001. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24246715.
8. Remiche G, Ronchi D, Magri F, Lamperti C, Bordoni A, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.  
*Extended phenotype description and new molecular findings in late onset glycogen storage disease type II: a northern Italy population study and review of the literature.*  
**J Neurol.** 2013 Oct 25. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00415-013-7137-2 PubMed PMID: 24158270.
9. Liguori R, Giannoccaro MP, Pasini E, Riguzzi P, Valentino ML, Comi GP, Carelli V, Bresolin N, Michelucci R.  
*Acute rhabdomyolysis induced by tonic-clonic epileptic seizures in a patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.*  
**J Neurol.** 2013 Oct;260(10):2669-71. doi: 10.1007/s00415-013-7103-z. Epub 2013 Sep 20. PubMed PMID: 24052116.
10. Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ruggieri M, Salani S, Riboldi G, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP, Corti S.



*Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDHhiSSCloVLA4+ neural stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model.*

**Hum Mol Genet.** 2014 Jan 15;23(2):342-54. doi: 10.1093/hmg/ddt425. Epub 2013 Sep 4. PubMed PMID: 24006477; PubMed Central PMCID: PMC3869354.

11. Remiche G, Ronchi D, Lamperti C, Bordoni A, Magri F, Moggio M, Comi GP.  
*Spontaneous hydromyelic cavity in two unrelated patients with late-onset pompe disease: is this a fortuitous association?*  
**Eur Neurol.** 2013;70(1-2):102-5. doi:10.1159/000350851. Epub 2013 Jul 9. PubMed PMID: 23860444.
12. Calini D, Corrado L, Del Bo R, Gagliardi S, Pensato V, Verde F, Corti S, Mazzini L, Milani P, Castellotti B, Bertolin C, Sorarù G, Cereda C, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Ticozzi N, Landers JE, Ratti A, Silani V; SLAGEN Consortium.  
*Analysis of hnRNPA1, A2/B1, and A3 genes in patients with amyotrophic lateral sclerosis.*  
**Neurobiol Aging.** 2013 Nov;34(11):2695.e11-2. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.025. Epub 2013 Jul 2. PubMed PMID: 23827524.
13. Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, Ronchi D, Rizzo F, Bresolin N, Corti S, Comi GP.  
*Mitochondrial fusion proteins and human diseases.*  
**Neurol Res Int.** 2013;2013:293893. doi: 10.1155/2013/293893. Epub 2013 May 27. PubMed PMID: 23781337; PubMed Central PMCID: PMC3678461.
14. Govoni A, Magri F, Brajkovic S, Zanetta C, Faravelli I, Corti S, Bresolin N, Comi GP.  
*Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy.*  
**Cell Mol Life Sci.** 2013 Dec;70(23):4585-602. doi: 10.1007/s00018-013-1396-z. Epub 2013 Jun 18. PubMed PMID: 23775131.
15. Forni D, Cagliani R, Pozzoli U, Colleoni M, Riva S, Biasin M, Filippi G, DeGioia L, Gnudi F, Comi GP, Bresolin N, Clerici M, Sironi M.  
*A 175 million year history of T cell regulatory molecules reveals widespread selection, with adaptive evolution of disease alleles.*  
**Immunity.** 2013 Jun 27;38(6):1129-41. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.008. Epub 2013 May 23. PubMed PMID: 23707475.
16. Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Uziel G, Bruno C, Caldarazzo Ienco E, Filosto M, Lamperti C, Martinelli D, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Ronchi D, Santorelli FM, Sauchelli D, Scarpelli M, Sciacco M, Spinazzi M, Valentino ML, Vercelli L, Zeviani M, Siciliano G.  
*Phenotypic heterogeneity of the 8344A>G mtDNA "MERRF" mutation.*  
**Neurology.** 2013 May 28;80(22):2049-54. doi:10.1212/WNL.0b013e318294b44c. Epub 2013 May 1. PubMed PMID: 23635963.
17. Remiche G, Lo Mauro A, Tarsia P, Ronchi D, Bordoni A, Magri F, Comi GP, Aliverti A, D'Angelo MG.  
*Postural effects on lung and chest wall volumes in late onset type II glycogenosis patients.*  
**Respir Physiol Neurobiol.** 2013 May 1;186(3):308-14. doi: 10.1016/j.resp.2013.03.004. Epub 2013 Mar 15. PubMed PMID: 23501539.
18. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Arighi A, Fumagalli GG, Del Bo R, Bruni AC, Anfossi M, Clodomiro A, Cupidi C, Nacmias B, Sorbi S, Piaceri I, Bagnoli S, Bessi V, Marcone A, Cerami C, Cappa SF, Filippi M, Agosta F, Magnani G, Comi G,

Franceschi M, Rainero I, Giordana MT, Rubino E, Ferrero P, Rogaeva E, Xi Z, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, Talarico G, Cagnin A, Clerici F, Dell'Osso B, Comi GP, Altamura AC, Mariani C, Scarpini E.

*Autosomal dominant frontotemporal lobar degeneration due to the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: late-onset psychotic clinical presentation.*

**Biol Psychiatry.** 2013 Sep 1;74(5):384-91. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.01.031. Epub 2013 Mar 7. PubMed PMID: 23473366.

19. Cagliani R, Guerini FR, Rubio-Acero R, Baglio F, Forni D, Agliardi C, Griffanti L, Fumagalli M, Pozzoli U, Riva S, Calabrese E, Sikora M, Casals F, Comi GP, Bresolin N, Cáceres M, Clerici M, Sironi M.

*Long-standing balancing selection in the THBS4 gene: influence on sex-specific brain expression and gray matter volumes in Alzheimer disease.*

**Hum Mutat.** 2013 May;34(5):743-53. doi: 10.1002/humu.22301. Epub 2013 Apr 2. PubMed PMID: 23420636.

20. Cagliani R, Pozzoli U, Forni D, Cassinotti A, Fumagalli M, Giani M, Fichera M, Lombardini M, Ardizzone S, Asselta R, de Franchis R, Riva S, Biasin M, Comi GP, Bresolin N, Clerici M, Sironi M.

*Crohn's disease loci are common targets of protozoa-driven selection.*

**Mol Biol Evol.** 2013 May;30(5):1077-87. doi: 10.1093/molbev/mst020. Epub 2013 Feb 6. PubMed PMID: 23389767.

21. Ronchi D, Di Fonzo A, Lin W, Bordoni A, Liu C, Fassone E, Pagliarani S, Rizzuti M, Zheng L, Filosto M, Ferrò MT, Ranieri M, Magri F, Peverelli L, Li H, Yuan YC, Corti S, Sciacco M, Moggio M, Bresolin N, Shen B, Comi GP.

*Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability.*

**Am J Hum Genet.** 2013 Feb 7;92(2):293-300. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.12.014. Epub 2013 Jan 24. PubMed PMID: 23352259; PubMed Central PMCID: PMC3567272.

22. Mazzone ES, Pane M, Sormani MP, Scalise R, Berardinelli A, Messina S, Torrente Y, D'Amico A, Doglio L, Viggiano E, D'Ambrosio P, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Bonfiglio S, De Sanctis R, Rolle E, Bianco F, Magri F, Rossi F, Vasco G, Vita G, Motta MC, Donati MA, Sacchini M, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Previtali S, Napolitano S, Bruno C, Politano L, Comi GP, Bertini E, Mercuri E.

*24 month longitudinal data in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy.*

**PLoS One.** 2013;8(1):e52512. doi: 10.1371/journal.pone.0052512. Epub 2013 Jan 11. PubMed PMID: 23326337; PubMed Central PMCID: PMC3543414.

23. Cheldi A, Ronchi D, Bordoni A, Bordo B, Lanfranconi S, Bellotti MG, Corti S, Lucchini V, Sciacco M, Moggio M, Baron P, Comi GP, Colombo A, Bersano A; Lombardia GENS collaborators.

*POLG1 mutations and stroke like episodes: a distinct clinical entity rather than an atypical MELAS syndrome.*

**BMC Neurol.** 2013 Jan 15;13:8. doi: 10.1186/1471-2377-13-8. PubMed PMID: 23324391; PubMed Central PMCID: PMC3570393.

24. Kornblum C, Nicholls TJ, Haack TB, Schöler S, Peeva V, Danhauser K, Hallmann K, Zsurka G, Rorbach J, Iuso A, Wieland T, Sciacco M, Ronchi D, Comi GP, Moggio M, Quinzii CM, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Klopstock T, Strom TM, Meitinger T, Minczuk M, Kunz WS, Prokisch H.

*Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease.*

- Nat Genet.** 2013 Feb;45(2):214-9. doi: 10.1038/ng.2501. Epub 2013 Jan 13. PubMed PMID: 23313956; PubMed Central PMCID: PMC3678843.
25. Dilena R, Abicht A, Sergi P, Comi GP, Fonzo AD, Chidini G, Natacci F, Barbieri S, Lochmüller H.  
*Congenital Myasthenic Syndrome Due to Choline Acetyltransferase Mutations in Infants: Clinical Suspicion and Comprehensive Electrophysiological Assessment Are Important for Early Diagnosis.*  
**J Child Neurol.** 2013 Jan 4. [Epub ahead of print] DOI: 10.1177/0883073812470000 PubMed PMID: 23292760.
26. Ciccolella M, Corti S, Catteruccia M, Petrini S, Tozzi G, Rizza T, Carrozzo R, Nizzardo M, Bordoni A, Ronchi D, D'Amico A, Rizzo C, Comi GP, Bertini E.  
*Riboflavin transporter 3 involvement in infantile Brown-Vialetto-Van Laere disease: two novel mutations.*  
**J Med Genet.** 2013 Feb;50(2):104-7. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101204. Epub 2012 Dec 14. PubMed PMID: 23243084.
27. Gellera C, Tiloca C, Del Bo R, Corrado L, Pensato V, Agostini J, Cereda C, Ratti A, Castellotti B, Corti S, Bagarotti A, Cagnin A, Milani P, Gabelli C, Riboldi G, Mazzini L, Sorarù G, D'Alfonso S, Taroni F, Comi GP, Ticozzi N, Silani V; SLAGEN Consortium.  
*Ubiquilin 2 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia.*  
**J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2013 Feb;84(2):183-7. doi: 10.1136/jnnp-2012-303433. Epub 2012 Nov 8. PubMed PMID: 23138764.
28. Tiloca C, Ticozzi N, Pensato V, Corrado L, Del Bo R, Bertolin C, Fenoglio C, Gagliardi S, Calini D, Lauria G, Castellotti B, Bagarotti A, Corti S, Galimberti D, Cagnin A, Gabelli C, Ranieri M, Ceroni M, Siciliano G, Mazzini L, Cereda C, Scarpini E, Sorarù G, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Ratti A, Landers JE, Silani V; SLAGEN Consortium.  
*Screening of the PFN1 gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in frontotemporal dementia.*  
**Neurobiol Aging.** 2013 May;34(5):1517.e9-10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.016. Epub 2012 Oct 11. PubMed PMID: 23063648; PubMed Central PMCID: PMC3548975.
29. Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Riboldi G, Comi GP, Bresolin N, Corti S.  
*Direct reprogramming of adult somatic cells into other lineages: past evidence and future perspectives.*  
**Cell Transplant.** 2013;22(6):921-44. doi: 10.3727/096368912X657477. Epub 2012 Oct 3. Review. PubMed PMID: 23044010.
30. McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence JM, Eagle M, Gappmaier E, Glanzman AM; PTC124-GD-007-DMD Study Group, Spiegel R, Barth J, Elfring G, Reha A, Peltz S.  
*The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study.*  
**Muscle Nerve.** 2013 Sep;48(3):343-56. doi: 10.1002/mus.23902. Epub 2013 Jun 26. PubMed PMID: 23681930; PubMed Central PMCID: PMC3824082.
31. McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence J, Eagle M, Gappmaier E, Glanzman AM; PTC124-GD-007-DMD Study Group, Spiegel R, Barth J, Elfring G, Reha A, Peltz SW.

*The 6-minute walk test and other clinical endpoints in duchenne muscular dystrophy: reliability, concurrent validity, and minimal clinically important differences from a multicenter study.*

**Muscle Nerve.** 2013 Sep;48(3):357-68. doi: 10.1002/mus.23905. Epub 2013 Jul 17. PubMed PMID: 23674289; PubMed Central PMCID: PMC3826053.

32. Spada M, Porta F, Vercelli L, Pagliardini V, Chiadò-Piat L, Boffi P, Pagliardini S, Remiche G, Ronchi D, Comi G, Mongini T.

*Screening for later-onset Pompe's disease in patients with paucisymptomatic hyperCKemia.*

**Mol Genet Metab.** 2013 Jun;109(2):171-3. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.03.002. Epub 2013 Mar 14. PubMed PMID: 23566438.

33. Compagnucci C, Nizzardo M, Corti S, Zanni G, Bertini E.

*In vitro neurogenesis: development and functional implications of iPSC technology.*

**Cell Mol Life Sci.** 2013 Nov 20. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00018-013-1511-1 PubMed PMID: 24252976.

34. Rizzo F, Riboldi G, Salani S, Nizzardo M, Simone C, Corti S, Hedlund E.

*Cellular therapy to target neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis.*

**Cell Mol Life Sci.** 2013 Oct 8. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00018-013-1480-4 PubMed PMID: 24100629.

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

*PINK1 parkinsonism and Parkinson disease: distinguishable brain mitochondrial function and metabolomics.*

**Mitochondrion.** 2013 Jan;13(1):59-61. doi: 10.1016/j.mito.2012.10.004. Epub 2012 Oct 10.

PMID: 23063710

**LABORATORIO CELLULE STAMINALI NEURALI**  
**PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA 2013**

**Responsabile:**

**Dott.ssa Stefania Corti**

Medici:

Dott.ssa Giulietta Riboldi

Dott.ssa Irene Favarelli

Dott.ssa Chiara Zanetta

Biologi:

Dott.ssa Sabrina Salani

Dott.ssa Chiara Simone

Dott.ssa Federica Rizzo

Biotechnologi

Dott.ssa Monica Nizzardo

Dott.ssa Monica Bucchia

Dott.ssa Margherita Ruggieri

## **SVILUPPO DI UNA TERAPIA CELLULO-MEDIATA PER LA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA)**

La SLA è una malattia degenerativa e progressiva del sistema nervoso centrale, che colpisce selettivamente i motoneuroni, sia il I motoneurone a livello della corteccia cerebrale, che il II motoneurone, a livello del tronco encefalico e del midollo spinale. Tale patologia ad esito fatale insorge in età adulta e colpisce 1-3 individui ogni 100.000 persone/anno con una prevalenza di 4-13 casi per 100.000. La maggior parte dei casi sono sporadici, e solo il 10% sono classificati come familiari. Dei casi familiari, il 20% sono dovuti a mutazioni nel gene della superossido dismutasi 1 (SOD1). Negli ultimi anni altri geni causativi sono stati identificati come C9ORF72 and TARDBP, ma il 50% dei casi familiari presenta ancora una eziologia genetica non nota. Ad oggi non esistono terapie risolutive per questa patologia. Questo studio ha contribuito allo sviluppo di un modello in vitro di questa patologia e di un approccio terapeutico basato sull'utilizzo di cellule staminali neurali (NSC) per il trattamento della SLA. In questo lavoro, abbiamo inizialmente generato linee cellulari iPSC da pazienti SLA e da pazienti controllo con un metodo non virale e le abbiamo caratterizzate verificandone la loro pluripotenza e l'espressione di marker specifici di staminalità. Le cellule così ottenute sono in grado di differenziarsi nei derivati dei tre foglietti embrionali in vitro e di originare teratomi in vivo. Il DNA fingerprinting ha confermato la loro origine dai fibroblasti cutanei. Oltre a generare un modello in vitro della patologia, utile per testare nuovi farmaci e per lo studio della patogenesi, abbiamo contribuito con queste cellule allo sviluppo di un approccio terapeutico per il trattamento della SLA. A questo scopo, abbiamo isolato una sottopopolazione di cellule staminali pluripotenti indotte derivate da un soggetto sano con una elevata attività aldeide deidrogenasica, basso side scatter ed elevata espressione per il marcatore VLA4. Dopo aver differenziato questa sottopopolazione in NSC mediante l'utilizzo di specifici protocolli già validati nel nostro laboratorio, le abbiamo trapiantate a livello sistemico e a livello intratecale nel modello murino di SLA (SOD1G93A). Le cellule NSC trapiantate hanno mostrato una buona capacità di migrazione e di attecchimento a livello del sistema nervoso con entrambi i tipi di iniezione. I topi SLA trattati hanno mostrato un miglioramento delle funzioni neuromuscolari e un aumento della sopravvivenza soprattutto a seguito della somministrazione sistemica. Abbiamo inoltre identificato la produzione di fattori neurotrofici e la riduzione di micro e macroglia, come i meccanismi molecolari responsabili di questi effetti positivi, come dimostrato dagli esperimenti di immunocistochimica e di ELISA. Abbiamo inoltre dimostrato che le NSC inducono un decremento del numero di astrociti attraverso l'attivazione del recettore vanilloide TRPV1. Questo studio ha dimostrato che il trapianto di NSC, mediante iniezioni minimamente invasive, può avere un effetto terapeutico nella SLA, ma anche nell'ambito di altre malattie del motoneurone.

Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ruggieri M, Salani S, Riboldi G, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

*Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDHhiSSCloVLA4+ neural stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model.*

*Hum Mol Genet.* 2014 Jan 15;23(2):342-54.

## **SVILUPPO DI UNA TERAPIA BASATA SUL MORFOLINO PER IL TRATTAMENTO DELL'ATROFIA MUSCOLARE SPINALE (SMA)**

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una malattia autosomica recessiva, che si manifesta con progressiva debolezza muscolare, atrofia e paralisi, ad esito fatale. La SMA rappresenta la più frequente causa genetica di mortalità infantile. Attualmente risulta priva di cure risolutive. Essa è dovuta a mutazioni del gene "Survival Motor Neuron 1" (SMN1), con conseguente riduzione

dei livelli cellulari della proteina SMN. Nel genoma umano è presente un gene paralogo di SMN1, ossia SMN2, che differisce da SMN1 per pochi nucleotidi tra cui un nucleotide specifico nell'esone 7. Questo nucleotide determina un cambiamento nello splicing di SMN2, con perdita dell'esone 7 dal trascritto maturo e conseguente produzione di una proteina SMN tronca e non funzionante. Solo il 10% delle proteine derivanti da SMN2 sono full-length e le nuove strategie terapeutiche sono finalizzate ad un cambiamento dello splicing di SMN2, con inclusione dell'esone 7 e aumento dei livelli di proteina funzionante con conseguente modulazione dei sintomi clinici e protezione dei motoneuroni spinali, profondamente danneggiati nella SMA. Un promettente approccio terapeutico è rappresentato dall'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (ASO) o del morfolino (MO), un ASO con una struttura chimica che garantisce una maggiore resistenza alla degradazione metabolica e quindi una più elevata efficacia se somministrato in vivo. Si tratta di molecole analoghe a specifiche regioni dell'RNA del gene target, in grado di legarsi ad esso e impedirne l'espressione o, come nel nostro interesse, modificarne lo splicing. Il MO ha prodotto incoraggianti risultati nei trial clinici, come quello per il trattamento della Distrofia Muscolare di Duchenne, mostrando bassa tossicità e buona tollerabilità. In questo progetto abbiamo disegnato e prodotto una molecola di MO della lunghezza di 25 nucleotidi, complementare alla regione ISS-N1 del gene SMN2. Dai nostri esperimenti preliminari abbiamo dimostrato che questa sequenza è in grado di modificare lo splicing di SMN2 nel modello murino di SMA, con aumento dei livelli di espressione della proteina SMN funzionale. I topi trattati hanno manifestato una maggiore sopravvivenza rispetto ai topi non trattati e un miglioramento dei tipici sintomi clinici della patologia (ripristino della funzionalità neuromuscolare). Il nostro scopo è quello di delineare un protocollo pre-clinico per il trattamento della SMA, in modo da poterlo traslare facilmente anche nella clinica. Per questo è fondamentale testare l'efficacia e la biodistribuzione del MO dopo iniezioni minimamente invasive (iniezioni sistemiche), valutando con attenzione la eventuale tossicità della molecola, sia a livello locale che sistemico, con uno studio del rapporto dose/effetto. Ci proponiamo di continuare i nostri studi sull'uso di queste nuove molecole, per sviluppare approcci molecolari all'avanguardia per il trattamento della SMA. Il nostro lavoro contribuirà allo sviluppo di una terapia per questa malattia del motoneurone, applicabile successivamente, con le dovute modifiche, ad altre patologie neurodegenerative.

Monica Nizzardo, Chiara Simone, Sabrina Salani, Marc-David Ruepp, Federica Rizzo, Margherita Ruggieri, Simona Brajkovic, Hong Moulton, Oliver Muehlemann, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi and Stefania Corti,

*Combined Systemic and Local Morpholino Treatment Rescues the Phenotype of SMA  $\Delta$ 7 Mouse Model. Clinical Therapeutics, 2014*

***Cellule staminali neurali iPSC-derivate possono migliorare il fenotipo patologico nell'atrofia muscolare spinale con distress respiratorio di tipo 1 (SMARD1)***

L'atrofia muscolare spinale con distress respiratorio di tipo 1 (SMARD1, OMIM 604320) è una malattia del motoneurone autosomica recessiva infantile causata da mutazioni nel gene che codifica per l'immunoglobulina micro-binding protein 2 (IGHMBP2). La proteina IGHMBP2 è una ATPasi/elicasa appartenente alla superfamiglia SF1, la cui funzione ad oggi non è stata ancora del tutto chiarita. I pazienti affetti da questa patologia presentano una progressiva debolezza muscolare, paralisi respiratoria e generalmente decedono durante l'infanzia. Attualmente non vi sono terapie efficaci per la SMARD1. Il trapianto di cellule staminali neurali (NSC) rappresenta una possibile strategia terapeutica per questa patologia e per le altre malattie del motoneurone. Abbiamo recentemente utilizzato la tecnologia di riprogrammazione cellulare per convertire fibroblasti cutanei in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs), le quali sono in grado di fornire cellule staminali neurali (NSC) per uso terapeutico. Il nostro obiettivo è di valutare il potenziale terapeutico delle NSC derivate da iPSCs in un modello murino di

SMARD1. Abbiamo precedentemente riportato che il trapianto di NSC e di precursori neuronali in modelli animali di malattie del motoneurone può migliorarne il fenotipo. I topi SMARD1 che utilizzeremo recano mutazioni in un sito di splicing nel gene codificante per la proteina IGHMBP2 e ciò determina nel topo un disturbo neuromuscolare simile alla malattia umana. Nel presente studio, valuteremo il potenziale terapeutico del trapianto delle NSC nel midollo spinale di topi nmd, associato alla capacità di attecchimento di queste cellule e ad un eventuale miglioramento del fenotipo neuropatologico. In particolare determineremo il tipo cellulare più efficace nel trapianto, il protocollo ottimale di somministrazione, l'attecchimento cellulare e l'efficacia terapeutica. Dimostreremo se le NSC si integrano adeguatamente nel parenchima del midollo spinale di topi SMARD1, in particolare nelle aree di degenerazione attiva, e se in seguito si differenziano nelle tre principali linee neuroectodermiche e se generano motoneuroni. Valuteremo se il trapianto induce un miglioramento del fenotipo neuropatologico e se aumenta la sopravvivenza dei topi. Valuteremo inoltre se combinando il trattamento con cellule NSC con farmaci o con la terapia genica si può avere un aumento ulteriore dell'efficacia terapeutica.

Chiara Simone, Monica Nizzardo, Federica Rizzo, Margherita Ruggieri, Giulietta Riboldi, Sabrina Salani, Monica Bucchia, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi, and Stefania Corti.

*iPSC-derived neural stem cells for Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress Type 1.*

**Manuscript in preparation.**

### ***Cellule staminali neurali indotte: metodi per la riprogrammazione e potenziali applicazioni terapeutiche.***

Dati sperimentali ci hanno permesso di asserire che lo stato differenziativo terminale delle cellule è reversibile e l'alterazione del bilancio tra gli specifici fattori di trascrizione potrebbe essere una promettente strategia per indurre la pluripotenza. In virtù dei rischi correlati all'uso di cellule pluripotenti indotte in applicazioni cliniche, i biologi stanno attualmente investigando nuovi metodi per indurre la formazione di un tipo cellulare differenziato mediante la diretta conversione di un altro tipo cellulare. Vari fattori di riprogrammazione sono stati scoperti e sono stati già ottenuti fenotipi cellulari mediante processi di trans-differenziamento. È stato recentemente dimostrato che cellule staminali neurali indotte (iNSCs) possono essere ottenute da cellule somatiche, come i fibroblasti, sia murini che umani, in seguito all'espressione forzata di definiti fattori di trascrizione. Fino ad ora due differenti approcci sono stati applicati con successo per ottenere le iNSCs: un metodo diretto e uno indiretto che coinvolge uno stato intermedio destabilizzato. La possibilità di indurre iNSCs caratterizzate da cellule umane ha aperto nuovi orizzonti per la ricerca nel campo della modulazione delle patologie umane e delle applicazioni terapeutiche cellulo-basate nel settore neurologico. La nostra review è focalizzata sulle tecniche relative alla riprogrammazione, già descritte in letteratura e sulle tecniche innovative che possono essere meglio esplorate in quest'area di ricerca, così come sui criteri per la caratterizzazione fenotipica delle iNSCs ottenute e i loro usi nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche per le malattie neurologiche.

Ruggieri M, Riboldi G, Brajkovic S, Bucchia M, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

*Induced neural stem cells: Methods of reprogramming and potential therapeutic applications. Prog Neurobiol. 2013 Nov 15.*

### ***Terapia cellulare per la sclerosi laterale che ha come target le cellule infiammatorie***

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una progressiva perdita di specifiche popolazioni neuronali. Cellule non neuronali sembrano contribuire in maniera significativa alla perdita neuronale in diverse di queste malattie, tra cui la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), il Parkinson e il morbo di Alzheimer. Nella SLA, vi è una degenerazione dei motoneuroni a livello della corteccia, del tronco encefalico e del midollo spinale, che proiettano a diversi gruppi muscolari volontari. Questo causa atrofia muscolare, paralisi e conseguentemente morte dei



pazienti. La neuroinfiammazione, caratterizzata dalla comparsa di astrociti reattivi e di microglia, oltre che di infiltrazione di macrofagi e linfociti T, sembra giocare un ruolo molto importante nella patogenesi della malattia, evidenziando il coinvolgimento di cellule non neuronali nella neuro degenerazione. Dai lavori presenti in letteratura, si evidenzia la presenza di un cross-talk tra i motoneuroni, gli astrociti e le cellule del sistema immunitario, tra cui microglia e linfociti T, che vengono successivamente attivati. Attualmente, non esistono terapie efficaci per la SLA, ma il coinvolgimento di queste altre popolazioni ha permesso di identificare altri possibili bersagli terapeutici. In questo lavoro, abbiamo riassunto i meccanismi di azione degli astrociti, della microglia e dei linfociti T nel sistema nervoso durante la patogenesi della SLA. Abbiamo inoltre valutato anche il potenziale terapeutico di queste popolazioni cellulari, dopo il trapianto in pazienti affetti da SLA e in modelli animali della malattia. Abbiamo posto la nostra attenzione sulla capacità di queste popolazioni cellulari di modulare l'ambiente circostante dei motoneuroni, causando un passaggio da uno stato pro-infiammatorio a uno neuroprotettivo. Abbiamo inoltre discusso i recenti progressi compiuti in questo campo e i punti critici che devono essere superati per la traslazione clinica di terapie cellulari volte a modulare l'azione di queste popolazioni e a preservare i motoneuroni nei pazienti.

Rizzo F, Riboldi G, Salani S, Nizzardo M, Simone C, Corti S, Hedlund E.  
*Cellular therapy to target neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis.*  
**Cell Mol Life Sci.** 2013 Oct 8.

### ***Strategie molecolari, genetiche e terapeutiche mediate dalle cellule staminali per l'atrofia muscolare spinale (SMA)***

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia autosomica recessiva dei motoneuroni. È la prima causa genetica di mortalità infantile. È causata da una mutazione nel gene SMN1, che causa una riduzione della proteina SMN. Ad oggi non esistono cure risolutive, sebbene negli ultimi dieci anni c'è stato un evidente progresso nella comprensione sia dei meccanismi genetici che molecolari ad essa sottesi. Notevole è stato l'impegno per colmare il divario tra studi di ricerca preclinica e sperimentazione clinica. In questo articolo, abbiamo riassunto le strategie terapeutiche più interessanti che si stanno attualmente sviluppando, rappresentate da approcci molecolari, genici e riguardanti le cellule staminali per il trattamento della SMA.

Zanetta C, Riboldi G, Nizzardo M, Simone C, Faravelli I, Bresolin N, Comi GP, Corti S.  
*Molecular, genetic and stem cell-mediated therapeutic strategies for spinal muscular atrophy (SMA).*  
**J Cell Mol Med.** 2014

### ***Strategie molecolari per la atrofia muscolare spianle: clinical trials attuali e futuri (review)***

La distrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia autosomica recessiva dei motoneuroni causata da una mutazione nel gene SMN1, la quale causa mortalità infantile. Attualmente non ci sono trattamenti risolutivi. In questo lavoro, abbiamo analizzato i vari aspetti che devono essere considerati per creare trial clinici più efficienti e sintetizzato i trials molecolari più promettenti che si stanno sviluppando ad oggi o che sono in programma in futuro per il trattamento della SMA. Abbiamo riassunto i lavori presenti in letteratura, identificando i clinical trials importanti coinvolti in nuove terapie molecolari nella SMA. Inoltre, i lavori presentati ai meeting 'Families of Spinal Muscular Atrophy' sono stati attentamente analizzati. Negli ultimi dieci anni sono stati osservati dei notevoli progressi nella comprensione dei meccanismi sia genetici che molecolari. Nuove molecole target di SMN sono state identificate come promessa negli studi preclinici, e vari trial clinici sono stati iniziati per testare farmaci che sono stati scoperti attraverso la ricerca di base. Sia nei trial preclinici che in quelli clinici sono coinvolte nuove terapie molecolari, suggerendo che i paradigmi sulle cure cliniche nella SMA cambieranno presto.

Zanetta C, Nizzardo M, Simone C, Monguzzi E, Bresolin N, Comi GP, Corti S.  
*Molecular therapeutic strategies for spinal muscular atrophies: current and future clinical trials. Clin Ther. (review)*

**Neurogenesi in vitro: implicazioni funzionali sulla tecnologia delle iPSC (review)**

La neurogenesi è il processo che regola la proliferazione delle cellule staminali neurali, determinandone il loro differenziamento in cellule della glia e in neuroni, e regolandone la loro organizzazione in networks funzionali. In questo lavoro abbiamo cercato di rispondere a diverse domande. Questo processo può essere ricapitolato in vitro usando la tecnologia delle cellule pluripotenti indotte (iPSCs)? Possono le malattie neurodegenerative essere modellate usando le iPSCs? Qual è il potenziale della tecnologia delle iPSCs nell'ambito della neurobiologia? Quali sono i recenti sviluppi nel campo delle malattie neurologiche? Fino ad ora le applicazioni delle iPSCs in neurobiologia sono focalizzate sulla capacità di regolare in vitro il differenziamento delle iPSCs umane nei differenti sottotipi neurali e nelle cellule della glia. In questo lavoro, abbiamo riassunto le conoscenze attuali sul differenziamento neurale in vitro da una prospettiva sia di sviluppo che di biologia cellulare. Abbiamo in modo particolare sottolineato l'importanza di implementare ulteriormente le conoscenze sui meccanismi di controllo nella neuro genesi in vivo in modo da migliorare le tecnologie in vitro anche per future applicazioni terapeutiche.

Compagnucci C, Nizzardo M, Corti S, Zanni G, Bertini E.  
*In vitro neurogenesis: development and functional implications of iPSC technology. Cell Mol Life Sci. 2013 Nov 20. (review)*

## ELENCO LAVORI SCIENTIFICI 2013

1. Zanetta C, Nizzardo M, Simone C, Monguzzi E, Bresolin N, Comi GP, Corti S.  
*Molecular Therapeutic Strategies for Spinal Muscular Atrophies: Current and Future Clinical Trials. Clin Ther. 2013 Dec 17. pii: S0149-2918(13)01100-4. doi:10.1016/j.clinthera.2013.11.006. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24360800.*
2. Fogh I, Ratti A, Gellera C, Lin K, Tiloca C, Moskvina V, Corrado L, Sorarù G, Cereda C, Corti S, Gentilini D, Calini D, Castellotti B, Mazzini L, Querin G, Gagliardi S, Del Bo R, Conforti FL, Siciliano G, Inghilleri M, Saccà F, Bongioanni P, Penco S, Corbo M, Sorbi S, Filosto M, Ferlini A, Di Blasio AM, Signorini S, Shatunov A, Jones A, Shaw PJ, Morrison KE, Farmer AE, Van Damme P, Robberecht W, Chiò A, Traynor BJ, Sendtner M, Melki J, Meininger V, Hardiman O, Andersen PM, Leigh NP, Glass JD, Overste D, Diekstra FP, Veldink JH, van Es MA, Shaw CE, Weale ME, Lewis CM, Williams J, Brown RH, Landers JE, Ticozzi N, Ceroni M, Pegoraro E, Comi GP, D'Alfonso S, van den Berg LH, Taroni F, Al-Chalabi A, Powell J, Silani V; the SLAGEN Consortium Collaborators.  
*A genome-wide association meta-analysis identifies a novel locus at 17q11.2 associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet. 2013 Nov 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24256812.*
3. Brajkovic S, Riboldi G, Govoni A, Corti S, Bresolin N, Comi GP.  
*Growing Evidence about the Relationship between Vessel Dissection and Scuba Diving. Case Rep Neurol. 2013 Sep 12;5(3):155-61. doi: 10.1159/000354979. PubMed PMID: 24163671; PubMed Central PMCID: PMC3806682.*
4. Ruggieri M, Riboldi G, Brajkovic S, Bucchia M, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

*Induced neural stem cells: Methods of reprogramming and potential therapeutic applications.*

**Prog Neurobiol.** 2013 Nov 15. pii: S0301-0082(13)00118-4.

doi:10.1016/j.pneurobio.2013.11.001. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24246715.

5. Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ruggieri M, Salani S, Riboldi G, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP, Corti S.  
*Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDHhiSSCloVLA4+ neural stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model.*  
**Hum Mol Genet.** 2014 Jan 15;23(2):342-54. doi: 10.1093/hmg/ddt425. Epub 2013 Sep 4. PubMed PMID: 24006477; PubMed Central PMCID: PMC3869354.
6. Calini D, Corrado L, Del Bo R, Gagliardi S, Pensato V, Verde F, Corti S, Mazzini L, Milani P, Castellotti B, Bertolin C, Sorarù G, Cereda C, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Ticozzi N, Landers JE, Ratti A, Silani V; SLAGEN Consortium.  
*Analysis of hnRNPA1, A2/B1, and A3 genes in patients with amyotrophic lateral sclerosis.*  
**Neurobiol Aging.** 2013 Nov;34(11):2695.e11-2. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.025. Epub 2013 Jul 2. PubMed PMID: 23827524.
7. Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, Ronchi D, Rizzo F, Bresolin N, Corti S, Comi GP.  
*Mitochondrial fusion proteins and human diseases.*  
**Neurol Res Int.** 2013;2013:293893. doi: 10.1155/2013/293893. Epub 2013 May 27. PubMed PMID: 23781337; PubMed Central PMCID: PMC3678461.
8. Govoni A, Magri F, Brajkovic S, Zanetta C, Faravelli I, Corti S, Bresolin N, Comi GP.  
*Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy.*  
**Cell Mol Life Sci.** 2013 Dec;70(23):4585-602. doi: 10.1007/s00018-013-1396-z. Epub 2013 Jun 18. PubMed PMID: 23775131.
9. Ronchi D, Di Fonzo A, Lin W, Bordoni A, Liu C, Fassone E, Pagliarani S, Rizzuti M, Zheng L, Filosto M, Ferrò MT, Ranieri M, Magri F, Peverelli L, Li H, Yuan YC, Corti S, Sciacco M, Moggio M, Bresolin N, Shen B, Comi GP.  
*Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability.*  
**Am J Hum Genet.** 2013 Feb 7;92(2):293-300. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.12.014. Epub 2013 Jan 24. PubMed PMID: 23352259; PubMed Central PMCID: PMC3567272.
10. Cheldi A, Ronchi D, Bordoni A, Bordo B, Lanfranconi S, Bellotti MG, Corti S, Lucchini V, Sciacco M, Moggio M, Baron P, Comi GP, Colombo A, Bersano A; Lombardia GENS collaborators.  
*POLG1 mutations and stroke like episodes: a distinct clinical entity rather than an atypical MELAS syndrome.*  
**BMC Neurol.** 2013 Jan 15;13:8. doi: 10.1186/1471-2377-13-8. PubMed PMID: 23324391; PubMed Central PMCID: PMC3570393.
11. Ciccolella M, Corti S, Catteruccia M, Petrini S, Tozzi G, Rizza T, Carrozzo R, Nizzardo M, Bordoni A, Ronchi D, D'Amico A, Rizzo C, Comi GP, Bertini E.  
*Riboflavin transporter 3 involvement in infantile Brown-Vialetto-Van Laere disease: two novel mutations.*  
**J Med Genet.** 2013 Feb;50(2):104-7. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101204. Epub 2012 Dec 14. PubMed PMID: 23243084.

12. Gellera C, Tiloca C, Del Bo R, Corrado L, Pensato V, Agostini J, Cereda C, Ratti A, Castellotti B, Corti S, Bagarotti A, Cagnin A, Milani P, Gabelli C, Riboldi G, Mazzini L, Sorarù G, D'Alfonso S, Taroni F, Comi GP, Ticozzi N, Silani V; SLAGEN Consortium.  
*Ubiquilin 2 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia.*  
**J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2013 Feb;84(2):183-7. doi: 10.1136/jnnp-2012-303433. Epub 2012 Nov 8. PubMed PMID: 23138764.
13. Tiloca C, Ticozzi N, Pensato V, Corrado L, Del Bo R, Bertolin C, Fenoglio C, Gagliardi S, Calini D, Lauria G, Castellotti B, Bagarotti A, Corti S, Galimberti D, Cagnin A, Gabelli C, Ranieri M, Ceroni M, Siciliano G, Mazzini L, Cereda C, Scarpini E, Sorarù G, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Ratti A, Landers JE, Silani V; SLAGEN Consortium.  
*Screening of the PFN1 gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in frontotemporal dementia.*  
**Neurobiol Aging.** 2013 May;34(5):1517.e9-10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.016. Epub 2012 Oct 11. PubMed PMID: 23063648; PubMed Central PMCID: PMC3548975.
14. Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Riboldi G, Comi GP, Bresolin N, Corti S.  
*Direct reprogramming of adult somatic cells into other lineages: past evidence and future perspectives.*  
**Cell Transplant.** 2013;22(6):921-44. doi: 10.3727/096368912X657477. Epub 2012 Oct 3. Review. PubMed PMID: 23044010.
15. Compagnucci C, Nizzardo M, Corti S, Zanni G, Bertini E.  
*In vitro neurogenesis: development and functional implications of iPSC technology.*  
**Cell Mol Life Sci.** 2013 Nov 20. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00018-013-1511-1 PubMed PMID: 24252976.
16. Rizzo F, Riboldi G, Salani S, Nizzardo M, Simone C, Corti S, Hedlund E.  
*Cellular therapy to target neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis.*  
**Cell Mol Life Sci.** 2013 Oct 8. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00018-013-1480-4 PubMed PMID: 24100629.

### ***Abstract presentati a congressi internazionali anno 2013***

Corti S, Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ruggieri M, Salani S, Faravelli I, Zanetta C, Riboldi G, Brajkovic S, Bresolin N, Comi GP.

*Amyotrophic lateral sclerosis: new therapeutic perspectives offered by iPSCs-derived neural stem cells. Alsmnd meeting 2013.*

Ruggieri M, Simone C, Nizzardo M, Rizzo F, Riboldi G, Salani S, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

*Targeted Genome Editing for developing novel therapeutic approaches for SMA. Alsmnd meeting 2013.*

Ruggieri M, Simone C, Nizzardo M, Rizzo F, Riboldi G, Salani S, Zanetta C, Faravelli I, Bresolin N, Comi GP, Corti S

*Genome editing strategies for the development of a treatment for SMA. SFN 2013.*

Rizzo F, Nizzardo M, Simone C, Ruggieri M, Salani S, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

*iPSCs-derived neural stem cells transplantation as therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis. SFN 2013*

Nizzardo M, Simone C, Salani S, Ruepp MD, Rizzo F, Ruggieri M, Brajkovic S, Moulton HM, Muehlemann O, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

*Combined systemic and local morpholino treatment rescues the phenotype of SMA  $\Delta 7$  mouse model 2013 Annual SMA Conference.*

Simone C, Ruggieri M, Nizzardo M, Rizzo F, Riboldi G, Salani S, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

*Genetic engineering of SMA human pluripotent stem cells using multiple genome editing strategies. 2013 Annual SMA Conference.*

Ruepp MD, Nizzardo M, Simone C, Salani S, Rizzo F, Ruggieri M, Brajkovic S, Moulton HM, Muehlemann O, Bresolin N, Comi GP, Corti S.

*Combined systemic and local morpholino treatment rescues the phenotype of the SMA  $\Delta 7$  mouse model. 18th annual meeting of the RNA Society, 2013.*

Brajkovic S., Riboldi G., Govoni A., Ranieri M., Nizzardo M., Simone C., Salani S., Rizzo F., Ruggieri M., Faravelli I., Zanetta C., Bresolin N., Comi GP, Corti S.

*A promising therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis: induced pluripotent stem cell-derived neural stem cell transplantation. XXIII Meeting European Neurological Society, 2013.*

Riboldi G., Brajkovic S., Govoni A., Ranieri M., Nizzardo M., Simone C., Salani S., Rizzo F., Ruggieri M., Faravelli I., Zanetta C., Bresolin N., Comi GP, Corti S

*Unmodified and octa-guanidine-conjugated morpholino oligomers rescue phenotype in mouse models of spinal muscular atrophy. XXIII Meeting European Neurological Society, 2013.*

Corti S and Hedlund E.

*Identification of oculomotor-restricted genes with motor neuron protective properties for the development of ALS therapeutics. TLF 2013 meeting.*

Corti S, Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ruggieri M, Salani S, Brajkovic S, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N and Comi GP.

*iPSCs-derived neural stem cells as a therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis. ENCALS 2013 meeting.*

Corti S, Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ruggieri M, Salani S, Brajkovic S, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP.

*Transplantation of iPSCs-Derived Neural Stem Cells as Therapeutic Approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis. 65th Annual Meeting of American Academy of Neurology, 2013.*

Corti S, Nizzardo M, Simone C, Salani S, Rizzo F, Ruggieri M, Brajkovic S, Faravelli I, Zanetta C, Magri F, Bresolin N, Comi GP.

*Rescue of the Spinal Muscular Atrophy Phenotype in Mouse by Unmodified and Octa-Guanidine-Conjugated Morpholino Oligomers, 65th Annual Meeting of American Academy of Neurology, 2013.*

### **Abstract presentati a congressi nazionali 2013**

Corti S., Nizzardo M., Simone C., Rizzo F., Ruggieri M., Salani S., Faravelli I., Zanetta C., Bresolin N., Comi G.

*Development of a therapeutic approach for Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress (SMARD1) using human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells and motor neurons, XLIV Congresso della Società Italiana di Neurologia, 2013.*

Nizzardo M, Simone C., Rizzo F., Ruggieri M., Salani S., Zanetta C., Faravelli I., Ruepp M., Moulton H., Bresolin N., Comi G., Corti S.

*Improved oligonucleotides strategy towards a treatment for genetic motor neuron diseases. XLIV Congresso della Società Italiana di Neurologia, 2013.*

F. Rizzo, C. Simone, M. Ruggieri, S. Salani, C. Zanetta, G. P. Comi, S. Corti, M. Nizzardo  
*Morpholino antisense oligomer against SOD1 for the development of ALS therapy. 4° Convegno AriSLA, 2013.*

Simone C, Nizzardo M, Rizzo F, Ruggieri M, Salani S, Riboldi G, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Corti S, Comi GP.

*Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDHhiSSClo neural stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model. 4° Convegno AriSLA, 2013*

Rizzo F, Ruggieri M., Nizzardo M, Simone C, Salani S, Bresolin N, Corti S.

*Amelioration of Amyotrophic Lateral Sclerosis phenotype in mouse model by iPS derived neural stem cells transplantation. Congresso Nazionale Associazione Italiana di Miologia, 2013.*

Corti S, Nizzardo M, Simone C, Salani S, Ruepp MD, Rizzo F, Ruggieri M, Brajkovic S, Bresolin N, Comi GP.

*Spinal muscular atrophy phenotype rescue by combined systemic and local morpholino treatment. Congresso Nazionale Associazione Italiana di Miologia, 2013.*

Simone C., Nizzardo M., Ronchi D., Salani S., Riboldi G., Magri F., Faravelli I., Zanetta C., Menozzi G., Bonaglia C., Bresolin N., Comi G., Corti S.

*Neuroprotection in Spinal Muscular Atrophy (SMA) using neural stem cells as therapeutic approach. Convention Telethon 2013.*

Nizzardo M., Simone C., Rizzo F., Ruggieri M., Salani S., BrajkovicS., Bresolin N., Corti S. Comi GP.

*Development of a therapeutic approach for Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress (SMARD1) using human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells and motor neurons, Convention Telethon 2013.*

## UOSD MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Direttore: 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 Elisa Ridolfi

Dottore di Ricerca Medicina Molecolare – Borsista  
OMP

Dott.ssa Rossana Bonsi

Dottoranda di Ricerca Medicina Molecolare –  
Università di Milano

Dott.ssa Chiara Villa

Dottore di Ricerca Medicina Molecolare, Assegnista  
Università di Milano

Dott.ssa Maria Serpente

Dottoranda di Ricerca Medicina Molecolare –  
Università di Milano

Dott.ssa Sara Cioffi

Biologa Borsista OMP

Dott.ssa Milena De Riz

Neurologa Specialista–Dirigente medico OMP

Dott.ssa Anna Pietroboni

Neurologa Specialista–Dirigente medico OMP

Dott. Andrea Arighi

Medico Specializzando

Dott. Giorgio Fumagalli

Medico Specializzando

Dott.ssa Laura Ghezzi

Medico Specializzando

Dott. Alberto Calvi

Medico Specializzando

Dott.ssa Paola Basilico

Medico Specializzando

Dott. Roberto Vimercati

Psicologo –Borsista OMP

Dr.ssa Emanuela Rotondo

Psicologa- Dottore di Ricerca - Borsista OMP

Dr.ssa Priscilla Corti

Psicologa- Dottoranda di Ricerca – Borsista OMP

Dott. Matteo Mercurio

Psicologo – Dottorando di Ricerca - Università di  
Milano

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 2013 sono giunti all'ambulatorio per le Malattie Demielinizzanti circa 100 nuovi pazienti.

Il numero totale di visite nel corso del 2013 è stato di più di 800 in ambulatori dedicati alla Sclerosi Multipla, attivi sia al mattino che al pomeriggio.

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

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

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

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

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

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

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

- esame liquor, IEF per diagnosi di sclerosi multipla: 165
- dosaggio Amiloide, Tau totale e fosforilata nel liquor per diagnosi Alzheimer: 251
- progranulina plasmatica: 127
- estrazione DNA, mutazioni MAPT, progranulina, PS1 e 2, APP: 94.



## **2 - SPERIMENTAZIONI CLINICHE (multicentriche, randomizzate)**

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

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

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

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

Multicenter, Randomized, double-blind, Placebo-controlled, Parallel-group two year study to evaluate the effect of subcutaneous R04909832 on Cognition and function in Prodromal AD, Roche, prot. WN25203C

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

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

A 6-month, Randomized, Active Comparator, Open-label. Multi-Center Study to Evaluate Patient Outcomes, Safety and Tollerability of fingolimod (FTY720) 0.5 mg/day in patients with Relapsing Remitting MS who are candidates for MS therapy change from previous Disease Modifying Therapy, Novartis, prot. CFTY720DIT02

A 18-month, open-label, rater-blinded, randomized, multi-center, active-controlled, parallel-group pilot study to asses efficacy and safety of fingolimod in comparison to interferon beta 1b in treating the cognitive symptoms associated to relapsing-remitting MS and to asses possible relationship of these effects to regional brain atrophy, Novartis, prot. CFTY720DIT01

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

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

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 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

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

An open-label, multicenter, expanded access study with fingolimod in patients with relapsing-remitting MS for whom no suitable therapy exists, Novartis, prot. CFTY720DIT03

Continued efficacy and safety monitoring of Solanezumab, an anti-amyloid  $\beta$  antibody in Patients with AD, Lilly, prot. H8A-MC-LZAO

Efficacy and safety of 3 doses of S 38093 (2.5 and 20 mg/day) versus placebo, in co-administration with donepezil (10 mg/day) in patients with moderate AD, Servier, prot. CL2-38093-012

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

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

Studio osservazionale in pazienti affetti da SM RR trattati con immunomodulanti volontariamente non complianti, Quintiles, prot. OAK BIIT0112

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

### **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 soprannucleare progressiva, degenerazione corticobasale)
- 600 con diagnosi di Sclerosi Multipla

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

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

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

Nel corso del 2013 l'attività del gruppo si è articolata sulle seguenti tematiche:

1) Ruolo dei microRNA nella Sclerosi Multipla (SM)

Sono state portate a termine le ricerche iniziate nel corso dello scorso anno, in particolare lo studio di espressione di una nuova classe di molecole, i microRNA (miRNA) che diverse evidenze

sperimentali suggeriscono come possibili marcatori in patologie di varia natura ed eziogenesi. I miRNA sono dei modulatori trascrizionali di numerosissimi geni tra i quali anche geni propriamente implicati nella patogenesi della SM. Lo scopo di questo nuovo filone di ricerca recentemente intrapreso, è quello di verificare la funzione e il livello di espressione di queste molecole al fine di stabilire la loro possibile utilità come marcatore di patologia. Nel corso dell'anno abbiamo identificato alcuni microRNA deregolati nelle cellule circolanti di pazienti con SM (Fenoglio et al., Multiple Sclerosis 2013). Abbiamo recentemente messo a punto una tecnica per dosare i livelli di miRNA circolanti, che permette di ottenere dati senza bisogno di isolare le cellule (Ridolfi et al., 2013).

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

Sono stati identificate diverse mutazioni a trasmissione autosomica dominante associate non solo a patologie degenerative ma anche al disturbo bipolare ed alla schizofrenia (Galimberti et al., 2013). Sulla popolazione di pazienti sporadici sono stati effettuati studi di associazione ed identificati fattori di rischio genetici.

3) Studi di associazione e di espressione in pazienti con malattia di Alzheimer e studio dei miRNA 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, Franc

#### **4. PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI CENSITE 2013**

1. Lambert JC, Grenier-Boley B, Harold D, Zelenika D, Chouraki V, Kamatani Y, Sleegers K, Ikram MA, Hiltunen M, Reitz C, Mateo I, Feulner T, Bullido M, Galimberti D, Concari L, Alvarez V, Sims R, Gerrish A, Chapman J, Deniz-Naranjo C, Solfrizzi V, Sorbi S, Arosio B, Spalletta G, Siciliano G, Epelbaum J, Hannequin D, Dartigues JF,

- Tzourio C, Berr C, Schrijvers EM, Rogers R, Tosto G, Pasquier F, Bettens K, Van Cauwenberghe C, Fratiglioni L, Graff C, Delepine M, Ferri R, Reynolds CA, Lannfelt L, Ingelsson M, Prince JA, Chillotti C, Pilotto A, Seripa D, Boland A, Mancuso M, Bossù P, Annoni G, Nacmias B, Bosco P, Panza F, Sanchez-Garcia F, Del Zompo M, Coto E, Owen M, O'Donovan M, Valdivieso F, Caffara P, Scarpini E, Combarros O, Buée L, Champion D, Soininen H, Breteler M, Riemenschneider M, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Trégouët DA, Williams J, Amouyel P.  
*Genome-wide haplotype association study identifies the FRMD4A gene as a risk locus for Alzheimer's disease.*  
**Molecular Psychiatry** 2013;18(4):461-70.  
IF=14,897
2. Polito L, Kehoe PG, Davin A, Benussi L, Ghidoni R, Binetti G, Quadri P, Lucca U, Tettamanti M, Clerici F, Bagnoli S, Galimberti D, Nacmias B, Sorbi S, Guaita A, Scarpini E, Mariani C, Forloni G, Albani D.  
*The SIRT2 polymorphism rs10410544 and risk of Alzheimer's disease in two Caucasian case-control cohorts.*  
**Alzheimers & Dementia** 2013;9(4):392-9.  
IF=14,483
3. D'Addario C, Dell'osso B, Galimberti D, Palazzo MC, Benatti B, Di Francesco A, Scarpini E, Altamura AC, Maccarrone M.  
*Epigenetic Modulation of BDNF Gene in Patients with Major Depressive Disorder.*  
**Biological Psychiatry** 2013;73(2):e6-7.  
IF=9,247
4. Galimberti D, D'Addario C, Dell'Osso B, Fenoglio C, Marcone A, Cerami C, Cappa SF, Palazzo MC, Arosio B, Mari D, Maccarrone M, Bresolin N, Altamura AC, Scarpini E.  
*Progranulin gene (GRN) promoter methylation is increased in patients with sporadic frontotemporal lobar degeneration.*  
**Neurological Sciences** 2013;34(6):899-903.  
**IF=1,412**
5. Tiloca C, Ticozzi N, Pensato V, Corrado L, Del Bo R, Bertolin C, Fenoglio C, Gagliardi S, Calini D, Lauria G, Castellotti B, Bagarotti A, Corti S, Galimberti D, Cagnin A, Gabelli C, Ranieri M, Ceroni M, Siciliano G, Mazzini L, Cereda C, Scarpini E, Sorarù G, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Ratti A, Landers JE, Silani V; SLAGEN Consortium.  
*Screening of the PFN1 gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in frontotemporal dementia.*  
**Neurobiology of Aging** 2013;34(5):1517.e9-10  
IF=6,166
6. Galimberti D, Ghezzi L, Scarpini E.  
*Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease.*  
**Journal of the Neurological Sciences** 2013;  
333(1-2):50-4.  
IF=2,243
7. Martinelli-Boneschi F, Giacalone G, Magnani G, Biella G, Coppi E, Santangelo R, Brambilla P, Esposito F, Lupoli S, Clerici F, Benussi L, Ghidoni R, Galimberti D, Squitti R, Confaloni A, Bruno G, Pichler S, Mayhaus M, Riemenschneider M, Mariani C, Comi G, Scarpini E, Binetti G, Forloni G, Franceschi M, Albani D.

*Pharmacogenomics in Alzheimer's disease: a genome-wide association study of response to cholinesterase inhibitors.*

**Neurobiology of Aging** 2013; 34(6):1711.e7-13.

IF=6,166

8. Haldar S, Beveridge AJ, Wong J, Singh A, Galimberti D, Borroni B, Zhu X, Blevins J, Greenlee JJ, Perry G, Mukhopadhyay C, Schmotzer C, Singh N.  
*A low molecular-weight ferroxidase is increased in the CSF of sCJD cases: CSF ferroxidase and transferrin as diagnostic biomarkers for sCJD.*  
**Antioxid Redox Signal** 2013; 19(14):1662-75.  
IF=7,189
9. Ridolfi E, Fenoglio C, Cantoni C, Calvi A, De Riz M, Pietroboni A, Villa C, Serpente M, Bonsi R, Vercellino M, Cavalla P, Galimberti D, Scarpini E.  
*Expression and Genetic Analysis of MicroRNAs Involved in Multiple Sclerosis.*  
**International Journal of Molecular Science** 2013;14(3):4375-84.  
IF=2.464
10. Cerami C, Marcone A, Galimberti D, Zamboni M, Fenoglio C, Serpente M, Scarpini E, Cappa SF.  
*Novel Evidence of Phenotypical Variability in the Hexanucleotide Repeat Expansion in Chromosome 9.*  
**Journal of Alzheimer's Disease** 2013; 35(3): 455-62.  
IF=4,174
11. Villa C, Ridolfi E, Fenoglio C, Ghezzi L, Vimercati R, Clerici F, Marcone A, Gallone S, Serpente M, Cantoni C, Bonsi R, Cioffi S, Cappa S, Franceschi M, Rainero I, Mariani C, Scarpini E, Galimberti D.  
*Expression of the Transcription Factor Sp1 and its Regulatory hsa-miR-29b in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Alzheimer's Disease.*  
**Journal of Alzheimer's Disease** 2013; 35(3): 487-94.  
IF=4,174
12. Piscopo P, Rivabene R, Galimberti D, Crestini A, Talarico G, Vanacore N, Scarpini E, Bruno G, Confaloni A.  
*Gender Effects on Plasma PGRN Levels in Patients with Alzheimer's Disease: A Preliminary Study.*  
**Journal of Alzheimer's Disease** 2013; 35(2): 313-8.  
IF=4,174
13. Arosio B, Abbate C, Galimberti D, Rossi PD, Inglese S, Fenoglio C, Ridolfi E, Gussago C, Casati M, Tedone E, Ferri E, Serpente M, Scarpini E, Mari D.  
*GRN Thr272fs Clinical Heterogeneity: A Case with Atypical Late Onset Presenting with a Dementia with Lewy Bodies Phenotype.*  
**Journal of Alzheimer's Disease** 2013;35(4):669-74.  
IF=4,174
14. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Arighi A, Fumagalli GG, Del Bo R, Bruni AC, Anfossi M, Clodomiro A, Cupidi C, Nacmias B, Sorbi S, Piaceri I, Bagnoli S, Bessi V, Marcone A, Cerami C, Cappa SF, Filippi M, Agosta F, Magnani G, Comi G, Franceschi M, Rainero I, Giordana M, Rubino E, Ferrero P, Rogaeva E, Xi Z, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, Talarico G, Cagnin A, Clerici F, Dell' Osso B, Comi GP, Altamura AC, Mariani C, Scarpini E.

- Autosomal Dominant Frontotemporal Lobar Degeneration Due to the C9ORF72 Hexanucleotide Repeat Expansion: Late-Onset Psychotic Clinical Presentation.*  
**Biological Psychiatry** 2013 74: 384-91.  
 IF=9,247
15. Cerami C, Marcone A, Galimberti D, Villa C, Fenoglio C, Scarpini E, Cappa SF.  
*Novel Missense Progranulin Gene Mutation Associated with the Semantic Variant of Primary Progressive Aphasia.*  
**Journal of Alzheimer's Disease** 2013;36(3):415-20.  
 IF=4,174
16. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Carrillo MC, Collins S, Chalbot S, Cutler N, Dufour-Rainfray D, Fagan AM, Heegaard NH, Robin Hsiung GY, Hyman B, Iqbal K, Lachno DR, Lleó A, Lewczuk P, Molinuevo JL, Parchi P, Regeniter A, Rissman R, Rosenmann H, Sancesario G, Schröder J, Shaw LM, Teunissen CE, Trojanowski JQ, Vanderstichele H, Vandijck M, Verbeek MM, Zetterberg H, Blennow K, Käser SA;  
*Alzheimer's Association QC Program Work Group (including Galimberti D). CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program.*  
**Alzheimer's & Dementia** 2013; 9(3): 251-61.  
 IF=14,483
17. Galimberti D, Scarpini E.  
*Progress in Alzheimer's disease research in the last year.*  
**Journal of Neurology** 2013; 260(7):1936-41.  
 IF=3,578
18. Piccio L, Cantoni C, Henderson JG, Hawiger D, Ramsbottom M, Mikesell R, Ryu J, Hsieh CS, Cremasco V, Haynes W, Dong LQ, Chan L, Galimberti D, Cross AH.  
*Lack of adiponectin leads to increased lymphocyte activation and increased disease severity in a mouse model of multiple sclerosis.*  
**European Journal of Immunology** 2013;43(8):2089-100.  
 IF=4,97
19. Teunissen C, Menge T, Altintas A, Alvarez-Cermeño JC, Bertolotto A, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Degn M, Deisenhammer F, Fazekas F, Franciotta D, Frederiksen JL, Galimberti D, Gnanapavan S, Hegen H, Hemmer B, Hintzen R, Hughes S, Iacobaeus E, Kroksveen AC, Kuhle J, Richert J, Tumani H, Villar LM, Drulovic J, Dujmovic I, Khalil M, Bartos A.  
*Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis.*  
**Multiple Sclerosis** 2013; 19(13): 1802-9.  
 IF=4,472
20. Mechelli R, Umeton R, Policano C, Annibali V, Coarelli G, Ricigliano VA, Vittori D, Fornasiero A, Buscarinu MC; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (including Galimberti D); Wellcome Trust Case Control Consortium,2, Romano S, Salvetti M, Ristori G.  
*A "candidate-interactome" aggregate analysis of genome-wide association data in multiple sclerosis.*  
**PLoS One** 2013;8(5):e63300.  
 IF=3,73
21. Fenoglio C, Ridolfi E, Galimberti D, Scarpini E.

*An Emerging Role for Long Non-Coding RNA Dysregulation in Neurological Disorders.*  
**International Journal of Molecular Science** 2013; 14(10): 20427-42.  
IF=2.464

22. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A, Oturai A, Saarela J, Fontaine B, Hemmer B, Martin C, Zipp F, D'Alfonso S, Martinelli-Boneschi F, Taylor B, Harbo HF, Kockum I, Hillert J, Olsson T, Ban M, Oksenberg JR, Hintzen R, Barcellos LF; Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2); International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Agliardi C, Alfredsson L, Alizadeh M, Anderson C, Andrews R, Søndergaard HB, Baker A, Band G, Baranzini SE, Barizzzone N, Barrett J, Bellenguez C, Bergamaschi L, Bernardinelli L, Berthele A, Biberacher V, Binder TM, Blackburn H, Bomfim IL, Brambilla P, Broadley S, Brochet B, Brundin L, Buck D, Butzkueven H, Caillier SJ, Camu W, Carpentier W, Cavalla P, Celius EG, Coman I, Comi G, Corrado L, Cosemans L, Cournu-Rebeix I, Cree BA, Cusi D, Damotte V, Defer G, Delgado SR, Deloukas P, di Sapio A, Dilthey AT, Donnelly P, Dubois B, Duddy M, Edkins S, Elovaara I, Esposito F, Evangelou N, Fiddes B, Field J, Franke A, Freeman C, Frohlich IY, Galimberti D, Gieger C, Gourraud PA, Graetz C, Graham A, Grummel V, **Guaschino** C, Hadjixenofontos A, Hakonarson H, Halfpenny C, Hall G, Hall P, Hamsten A, Harley J, Harrower T, Hawkins C, Hellenthal G, Hillier C, Hobart J, Hoshi M, Hunt SE, Jagodic M, Jelčić I, Jochim A, Kendall B, Kermodé A, Kilpatrick T, Koivisto K, Konidari I, Korn T, Kronsbein H, Langford C, Larsson M, Lathrop M, Lebrun-Frenay C, Lechner-Scott J, Lee MH, Leone MA, Leppä V, Liberatore G, Lie BA, Lill CM, Lindén M, Link J, Luessi F, Lycke J, Macciardi F, Männistö S, Manrique CP, Martin R, Martinelli V, Mason D, Mazibrada G, McCabe C, Mero IL, Mescheriakova J, Moutsianas L, Myhr KM, Nagels G, Nicholas R, Nilsson P, Piehl F, Pirinen M, Price SE, Quach H, Reunanen M, Robberecht W, Robertson NP, Rodegher M, Rog D, Salvetti M, Schnetz-Boutaud NC, Sellebjerg F, Selter RC, Schaefer C, Shaunak S, Shen L, Shields S, Siffrin V, Slee M, Sorensen PS, Sorosina M, Sospedra M, Spurkland A, Strange A, Sundqvist E, Thijs V, Thorpe J, Ticca A, Tienari P, van Duijn C, Visser EM, Vucic S, Westerlind H, Wiley JS, Wilkins A, Wilson JF, Winkelmann J, Zajicek J, Zindler E, Haines JL, Pericak-Vance MA, Ivinson AJ, Stewart G, Hafler D, Hauser SL, Compston A, McVean G, De Jager P, Sawcer SJ, McCauley JL.  
*Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis.*  
**Nature Genetics** 2013; 45(11): 1353-60.  
IF=35,209
23. Galimberti D, Scarpini E.  
*Dementia: not only Alzheimer's disease, an eye on frontotemporal dementia.*  
**Acta Medica Portuguesa** 2013;26(4):299-300.  
IF=0,151
24. Ridolfi E, Barone C, Scarpini E, Galimberti D.  
*The role of the innate immune system in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: an eye on microglia.*  
**Clinical and Developmental Immunology** 2013;2013:939786.  
IF=3,064

25. Fenoglio C, Ridolfi E, Cantoni C, De Riz M, Bonsi R, Serpente M, Villa C, Pietroboni AM, Naismith RT, Alvarez E, Parks BJ, Bresolin N, Cross AH, Piccio LM, Galimberti D, Scarpini E.  
*Decreased circulating miRNA levels in patients with primary progressive multiple sclerosis.*  
**Multiple Sclerosis** 2013; 19(14): 1938-42.  
IF=4,472
26. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, Jun G, Destefano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thornton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, Zelenika D, Vardarajan BN, Kamatani Y, Lin CF, Gerrish A, Schmidt H, Kunkle B, Dunstan ML, Ruiz A, Bihoreau MT, Choi SH, Reitz C, Pasquier F, Hollingworth P, Ramirez A, Hanon O, Fitzpatrick AL, Buxbaum JD, Champion D, Crane PK, Baldwin C, Becker T, Gudnason V, Cruchaga C, Craig D, Amin N, Berr C, Lopez OL, De Jager PL, Deramecourt V, Johnston JA, Evans D, Lovestone S, Letenneur L, Morón FJ, Rubinsztein DC, Eiriksdottir G, Sleegers K, Goate AM, Fiévet N, Huentelman MJ, Gill M, Brown K, Kamboh MI, Keller L, Barberger-Gateau P, McGuinness B, Larson EB, Green R, Myers AJ, Dufouil C, Todd S, Wallon D, Love S, Rogaeva E, Gallacher J, St George-Hyslop P, Clarimon J, Lleo A, Bayer A, Tsuang DW, Yu L, Tsolaki M, Bossù P, Spalletta G, Proitsi P, Collinge J, Sorbi S, Sanchez-Garcia F, Fox NC, Hardy J, Naranjo MC, Bosco P, Clarke R, Brayne C, Galimberti D, Mancuso M, Matthews F; European Alzheimer's Disease Initiative (EADI); Genetic and Environmental Risk in Alzheimer's Disease (GERAD); Alzheimer's Disease Genetic Consortium (ADGC); Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE), Moebus S, Mecocci P, Del Zompo M, Maier W, Hampel H, Pilotto A, Bullido M, Panza F, Caffarra P, Nacmias B, Gilbert JR, Mayhaus M, Lannfelt L, Hakonarson H, Pichler S, Carrasquillo MM, Ingelsson M, Beekly D, Alvarez V, Zou F, Valladares O, Younkin SG, Coto E, Hamilton-Nelson KL, Gu W, Razquin C, Pastor P, Mateo I, Owen MJ, Faber KM, Jonsson PV, Combarros O, O'Donovan MC, Cantwell LB, Soininen H, Blacker D, Mead S, Mosley TH Jr, Bennett DA, Harris TB, Fratiglioni L, Holmes C, de Bruijn RF, Passmore P, Montine TJ, Bettens K, Rotter JI, Brice A, Morgan K, Foroud TM, Kukull WA, Hannequin D, Powell JF, Nalls MA, Ritchie K, Lunetta KL, Kauwe JS, Boerwinkle E, Riemenschneider M, Boada M, Hiltunen M, Martin ER, Schmidt R, Rujescu D, Wang LS, Dartigues JF, Mayeux R, Tzourio C, Hofman A, Nöthen MM, Graff C, Psaty BM, Jones L, Haines JL, Holmans PA, Lathrop M, Pericak-Vance MA, Launer LJ, Farrer LA, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Moskvina V, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD, Amouyel P.  
*Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease.*  
**Nature Genetics** 2013; 45(12): 1452-8.  
IF=35,209
27. Ghezzi L, Scarpini E, Galimberti D.  
*Disease-modifying drugs in Alzheimer's disease.*  
**Drug Design Development Therapy** 2013; 7: 1471-9.  
IF=3,486
28. Angiari S, Rossi B, Piccio L, Zinselmeier BH, Budui S, Zenaro E, Della Bianca V, Bach SD, Scarpini E, Bolomini-Vittori M, Piacentino G, Dusi S, Laudanna C, Cross AH, Miller MJ, Constantin G. Regulatory T  
*Cells Suppress the Late Phase of the Immune Response in Lymph Nodes through P-Selectin Glycoprotein Ligand-1.*



**Journal of Immunology** 2013; 191(11): 5489-500.  
IF=5,52

29. Patti F, Morra VB, Amato MP, Trojano M, Bastianello S, Tola MR, Cottone S, Plant A, Picconi O; COGIMUS Study Group (Including Scarpini E).  
*Subcutaneous interferon  $\beta$ -1a may protect against cognitive impairment in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: 5-year follow-up of the COGIMUS study.*  
**PLoS One** 2013; 8(8): e74111.  
IF=3,73
30. Ross J, Sharma S, Winston J, Nunez M, Bottini G, Franceschi M, Scarpini E, Frigerio E, Fiorentini F, Fernandez M, Sivilia S, Giardino L, Calza L, Norris D, Cicirello H, Casula D, Imbimbo BP.  
*CHF5074 reduces biomarkers of neuroinflammation in patients with mild cognitive impairment: a 12-week, double-blind, placebo-controlled study.*  
**Current Alzheimer Research** 2013; 10(7): 742-53.  
IF=3,676
31. Villa M, Black S, Groth N, Rothman KJ, Apolone G, Weiss NS, Aquino I, Boldori L, Caramaschi F, Gattinoni A, Malchiodi G, Crucitti A, Della Cioppa G, Scarpini E, Mavilio D, Mannino S.  
*Safety of MF59-adjuvanted influenza vaccination in the elderly: results of a comparative study of MF59-adjuvanted vaccine versus nonadjuvanted influenza vaccine in northern Italy.*  
**American Journal of Epidemiology** 2013; 178(7): 1139-45.  
IF=4,78
32. Giunta M, Rigamonti AE, Bonomo SM, Gagliano MG, Müller EE, Scarpini E, Galimberti D, Cella SG.  
*Estrogens need insulin-like growth factor I cooperation to exert their neuroprotective effects in post-menopausal women.*  
**J Endocrinol Invest.** 2013;36(2):97-103.  
IF=1,654

## 5. COMUNICAZIONI SU RIVISTE CENSITE 2013

1. Bonsi R, Fenoglio C, Serpente M, Cioffi SMG, Villa C, Ridolfi E, Barone C, Arighi A, Fumagalli GG, Ghezzi L, Mercurio M, Scarpini E, Galimberti D.  
*Cytokine gene expression in peripheral cells from C9ORF72 mutation carriers in frontotemporal lobar degeneration.*  
**Clinical Neuropathology** 32(3): 217-8 (2013). 49° Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology and Clinical Neurobiology (AINP-NC) – 39° Meeting of the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), May 30-June 1, 2013, Pisa, Italy.
2. Fenoglio C, Galimberti D, Ridolfi E, De Riz M, Serpente M, Cioffi SMG, Barone C, Calvi A, Pietroboni A, Villa C, Bonsi R, Piccio L, Scarpini E.  
*Decreased circulating miRNA levels in patients with primary progressive multiple sclerosis.*  
**Clinical Neuropathology** 32(3): 223 (2013). 49° Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology and Clinical Neurobiology (AINP-NC) – 39° Meeting of

- the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), May 30-June 1, 2013, Pisa, Italy.
3. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Arighi A, Fumagalli GG, Del Bo R, Bruni AC, Anfossi M, Clodomiro A, Cupidi C, Nacmias B, Sorbi S, Piaceri I, Bagnoli S, Bessi V, Marcone A, Cerami C, Cappa SF, Filippi M, Agosta F, Magnani G, Comi G, Franceschi M, Rainero I, Giordana MT, Rubino E, Ferrero P, Rogaeva E, Xi Z, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, talarico G, Cagnin A, Clerici F, Dell'Osso B, Comi GP, Altamura AC, Mariani C, Scarpini E.  
*Autosomal dominant frontotemporal lobar degeneration due to the C9ORF72 hexanucleotide expansion: late-onset psychotic clinical presentation.*  
**Clinical Neuropathology** 32(3): 225 (2013). 49°Annual Meeting of the Italian Association of Neuropathology and Clinical Neurobiology (AINP-NC) – 39° Meeting of the Italian Association for Research on Brain Aging (AIRIC), May 30-June 1, 2013, Pisa, Italy.
  4. Scarpini E, Ghezzi L, Galimberti D.  
*Recent advances in Alzheimer and other dementias: treatment perspectives.*  
**Journal of Neurology** 260, Suppl. 1: S10 (2013). XXIII Meeting of the European Neurological Society, June 8-11, 2013, Barcelona, Spain.
  5. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Arighi A, Fumagalli GG, Del Bo R, Bruni AC, Anfossi M, Clodomiro A, Cupidi C, Nacmias B, Sorbi S, Piaceri I, Bagnoli S, Bessi V, Marcone A, Cerami C, Cappa SF, Filippi M, Agosta F, Magnani G, Comi G, Franceschi M, Rainero I, Giordana MT, Rubino E, Ferrero P, Rogaeva E, Xi Z, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, talarico G, Cagnin A, Clerici F, Dell'Osso B, Comi GP, Altamura AC, Mariani C, Scarpini E.  
*Frontotemporal lobar degeneration due to the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: psychotic clinical presentation.*  
**Journal of Neurology** 260, Suppl. 1: S52 (2013). XXIII Meeting of the European Neurological Society, June 8-11, 2013, Barcelona, Spain.
  6. Caso F, Agosta F, Galantucci S, Magnani G, Galimberti D, Pagani E, Comi G, Falini A, Filippi M.  
*Neuroanatomical correlates of disease progression in a case of nonfluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia due to progranulin (GRN) Cys157LysfsXD97 mutation.*  
**Journal of Neurology** 260, Suppl. 1: S52-3 (2013). XXIII Meeting of the European Neurological Society, June 8-11, 2013, Barcelona, Spain.
  7. Calvi A, De Riz M, Pietroboni AM, Ghezzi L, Arighi A, Fumagalli GG, Maltese V, Comi G, Galimberti D, Scarpini E.  
*Abnormally severe immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) in a multiple sclerosis (MS) patient with natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy (PML).*  
**Journal of Neurology** 260, Suppl. 1: S70 (2013). XXIII Meeting of the European Neurological Society, June 8-11, 2013, Barcelona, Spain.
  8. Arighi A, Donelli C, Galimberti D, Pietroboni AM, De Riz M, Ghezzi L, Fumagalli G, Jacini F, Calvi A, Zago S, Rotondo E, Corti P, Mercurio M, Vimercati R, Fenoglio C, Ridolfi E, Scarpini E.  
*Cerebrospinal fluid and neuroimaging biomarkers in posterior cortical atrophy.*

- Journal of Neurology** 260, Suppl. 1: S166-7 (2013). XXIII Meeting of the European Neurological Society, June 8-11, 2013, Barcelona, Spain.
9. Ghezzi L, Pietroboni A, Arighi A, Jacini F, Fumagalli G, Donelli C, Calvi A, Fenoglio C, Serpente M, Ridolfi E, Galimberti D, Scarpini E.  
*Rapidly progressive frontotemporal dementia due to the progranulin gene Arg110X mutation.*  
**Journal of Neurology** 216-7, Suppl. 1: S166-7 (2013). XXIII Meeting of the European Neurological Society, June 8-11, 2013, Barcelona, Spain.
10. Kuhle J, Dobson R, Bestwick JP, Topping J, Dalla Costa G, Khademi M, Sombekke M, Killestein J, Evdoshenko E, Lazareva N, Runia T, Zbornikova P, Horakova D, D'Alfonso S, Thouvenot E, Moll N, Hegen H, Rauch S, Khalil M, Fuchs S, Lindberg RLP, Derfuss T, Llufrui S, Franciotta D, Roesler R, Lauda F, Rajda C, Drulovic J, Menge T, Kieseier BC, Avsar T, Marignier R, Malmstrom C, Myhr KM, Wergeland S, Annibali V, Romano S, Carra A, Laroni A, Frederiksen JL, Larsson HB, Uccelli A, Martinez AD, Salvetti M, Torkildsen O, Lycke J, Confavreux C, Rejdak K, Bosca I, Brassat D, Scarpini E, Fenoglio C, Galimberti D, Siva A, Hartung HP, Dujmovic I, Vecsei L, Tumani H, Bergamaschi R, Colombo E, Villoslada P, Saiz A, Enzinger C, Kappos L, Deisenhammer F, Alvarez-Cermeno JC, Villar L, Pelletier J, Lehmann S, Castelnovo G, Barizzzone N, Leone M, Havrdova E, Trojano M, Iaffaldano P, Drenzo V, Comabella M, Tintore M, Montalban X, Hintzen R, Lapin S, Teunissen C, Piehl F, Olsson T, Furlan R, Martinelli V, Comi G, Ramagopalan S, Giovannoni G.  
*Multivariate clinically isolated syndrome (CIS) risk factor study: towards individual prognosis and treatment indication in CIS.*  
**Multiple Sclerosis Journal** 2013; 11(Suppl. 1): 33-4. 29th Congress of the European Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) and the 18th Annual Conference of Rehabilitation in MS (RIMS), October 2-3, 2013, Copenhagen, Denmark.
11. Canto E, Tintore M, Costa C, Arrambide G, Villar LM, Alvarez-Cermeno JC, Deisenhammer F, Hegen H, Khademi M, Olsson T, Piehl F, Bartos A, Simova D, Kotoucová J, Kuhle J, Kappos L, Garcia-Merino JA, Saiz A, Blanco Y, Hintzen R, Jafari N, Brassat D, Tumani H, Lauda F, Roesler R, Rejdak K, Papuc E, de Andres C, Khalil M, Galimberti D, Scarpini E, Montalban X, Comabella M.  
*Validation of cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 as a prognostic biomarker of conversion to multiple sclerosis and disease severity in patients with clinically isolated syndromes.*  
**Multiple Sclerosis Journal** 2013; 11(Suppl. 1): 156-7. 29th Congress of the European Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) and the 18th Annual Conference of Rehabilitation in MS (RIMS), October 2-3, 2013, Copenhagen, Denmark.
12. Fenoglio C, Ridolfi E, De Riz M, Pietroboni A, Calvi A, Maltese V, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Barone C, Cioffi S, Frigerio F, Turrini R, Galimberti D, Scarpini E.  
*Effect of fingolimod treatment on circulating miRNA levels in patients with multiple sclerosis.*  
**Multiple Sclerosis Journal** 2013; 11(Suppl. 1): 544-5. 29th Congress of the European Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) and the 18th Annual Conference of Rehabilitation in MS (RIMS), October 2-3, 2013, Copenhagen, Denmark.

13. Ridolfi E, Fenoglio C, De Riz M, Pietroboni A, Calvi A, Maltese V, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Barone C, Cioffi S, Frigerio F, Turrini R, Galimberti D, Scarpini E.  
*Effect of fingolimod treatment on circulating miRNAs levels in patients with multiple sclerosis.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S35, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.
14. Villa C, Ridolfi E, fenoglio C, Ghezzi L, Serpente M, Bonsi R, Cioffi S, Barone C, Arighi A, Fumagalli G, Scarpini E, Galimberti D.  
*Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease.*  
**Neurological Sciences** 41, Suppl.: S35, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.
15. Bonsi R, Fenoglio C, Serpente M, Cioffi S, Villa C, Ridolfi E, Barone C, Arighi A, Fumagalli G, Ghezzi L, Mercurio M, Scarpini E, Galimberti D.  
*Cytokine gene expression in peripheral cells from patients with Frontotemporal Lobar Degeneration due to GRN and C9ORF72 mutation.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S41, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.
16. Barone C, Fenoglio C, Serpente M, Cioffi S, Bonsi R, Villa C, Ridolfi E, Arighi A, Fumagalli G, Ghezzi L, Scarpini E, Galimberti D.  
*TREM2 genetic variability in an Italian population of FTL D patients.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S41-2, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.
17. Caso F, Agosta F, Magnani G, Galantucci S, Spinelli E, Galimberti D, Falini A, Comi G, Filippi M.  
*Clinical and MRI correlates of disease progression in a case of nonfluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia due to progranulin (GRN) Cys157LysfsX97 mutation.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S42, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.
18. Serpente M, Fenoglio C, Villa C, Ridolfi E, Bonsi R, Cioffi S, Barone C, Arighi A, Fumagalli G, Ghezzi L, Callea A, Scarpini E, Galimberti D.  
*Profiling of ubiquitination pathway genes in peripheral cells from C9ORF72 mutation carriers with Frontotemporal Lobar Degeneration.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S79, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.
19. Galimberti D, Maggiore L, Scarpini E, Barone C, Fenoglio C, Sartorio E, Cioffi S, Ridolfi E, Mariani C, Clerici F.  
*A case of Alzheimer's disease with the nonsense TREM2 p.Q33X mutation.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S94, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.
20. Grande G, Ghiretti R, Maggiore L, Galimberti D, Scarpini E, Mariani C, Clerici F.  
*CSF and neuropsychological profile in a suspected case of dementia pugilistica.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S94-5, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.

21. Ghezzi L, Pietroboni A, Arighi A, Fumagalli G, Donelli C, Calvi A, Fenoglio C, Serpente M, Ridolfi E, Galimberti D, Scarpini E.  
*Rapidly progressive Frontotemporal dementia due to the progranulin gene Arg110X mutation.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S246-7, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.
22. Arighi A, Galimberti D, Pietroboni A, De Riz M, Fumagalli G, Ghezzi L, Donelli C, Calvi A, Callea A, Zago S, Rotondo E, Corti P, Mercurio M, Vimercati R, Fenoglio C, Ridolfi E, Rango M, Scarpini E.  
*Cerebrospinal fluid and neuroimaging biomarkers in posterior cortical atrophy.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S247-8, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.
23. Cioffi SMG, Fenoglio C, Serpente M, Arosio B, Villa C, Bonsi R, Barone C, Ridolfi E, Rossi P, Abbate C, Mari D, Scarpini E, Galimberti D.  
*Incomplete penetrance of the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: frequency in a cohort of geriatric non demented subjects.*  
**Neurological Sciences** 34, Suppl.: S438, 2013. XLIV Congress of the Italian Neurological Society, November 2-5, 2013, Milan, Italy.

## **6. 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

## **7. CHAIRMAN A MANIFESTAZIONI INTERNAZIONALI**

- Dott.ssa D. Galimberti - XXII Meeting of the European Neurological Society, June 2013, Barcellona, Spain. Poster session on Dementia/ Higher function disorders.
- Prof. E. Scarpini - XXII Meeting of the European Neurological Society, June 2013, Barcellona, Spain. Oral session on Dementia

## **8. MEMBERSHIP SOCIETÀ SCIENTIFICHE**

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

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

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

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

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

## 9. FINANZIAMENTI

- Center of Excellence for Neurodegenerative disorders “Genetic Frontotemporal dementia initiative” 43.000 € (Novembre 2011-Ottobre 2013)
- Joint Program for Neurodegenerative Disorders “BIOMARKAPD” 30.000 € (Giugno 2012-Maggio 2015)
- Ricerca Finalizzata Ministero della Salute “Italian network for autosomal dominant Alzheimer’s disease and frontotemporal lobar degeneration” 40.980 € (30/11/2012-29/11/2014)
- 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 €
- Ricerca Corrente, Ministero della Salute “Ruolo dei fattori infiammatori ed epigenetici nella forma autosomica dominante della Degenerazione Lobare Frontotemporale (demenza di Pick): nuovi possibili scenari per la comprensione dei meccanismi patogenetici e l’identificazione di biomarcatori per la diagnosi precoce” 115.500 €
- 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)
- Novartis “Pilot study for the evaluation of the effect of fingolimod administration on the expression of disease-related miRNAs” 50.000 €

## LABORATORIO CELLULE STAMINALI

### *Responsabile:*

- Dottor Yvan Torrente, Neurologo Universitario in convenzione

### *Personale:*

- Marzia Belicchi biologa con contratto a tempo indeterminato di tecnico di laboratorio laureato universitario
- Mirella Meregalli biologa con contratto a tempo determinato di tecnico di laboratorio laureato universitario (fino a settembre 2012 ) e poi assegnista universitaria
- Federica Colleoni biologa, con borsa ospedaliera
- Paola Razini biotecnologa con borsa ospedaliera
- Andrea Farini biologo, PostDoc contrattista pluriannuale universitario
- Silvia Erratico biotecnologa, contrattista annuale
- Letizia Cassinelli, biologa con contratto a termine universitario (UNISTEM)
- Clementina Sitzia, biotecnologa, studentessa della facoltà di Medicina e Chirurgia, con borsa ospedaliera
- Stegania Banfi, biologa con borsa annuale ospedaliera
- Chiara Villa, bioingegnere, Phd/student contrattista pluriennale universitario
- Jacopo Zini, studente della facoltà di Biotecnologie tirocinio per tesi triennale
- Alessandro Genna studente della facoltà di Biotecnologie , tirocinante per tesi magistrale dei 5 anni
- Mattia Piovani studente della facoltà di Biotecnologie tirocinio per tesi triennale
- Lorenzo Da Dalt studente della facoltà di Biotecnologie tirocinio per tesi triennale
- Giorgia Riolo studente della facoltà di Biotecnologie tirocinio per tesi triennale
- Naima Guarrata, dottore in economia, project manager contrattista annuale

Consuntivo dell'attività di ricerca svolta nel corso dell'anno 2013 da parte del Gruppo di lavoro, diretto dal Dr. Yvan Torrente, attivo presso il Laboratorio Cellule Staminali - "Centro Dino Ferrari" dell'Università degli Studi di Milano.

L'attività di ricerca svolta nell'anno 2013 dal gruppo di lavoro diretto dal dott. Torrente si è sostanzialmente divisa tra ricerca di base e ricerca clinica applicata. Infatti, l'interesse primario del gruppo è costituito, da anni, dallo studio delle cellule staminali adulte e della loro applicazione nello sviluppo di nuove terapie cellulari per la lotta alle distrofie muscolari, in particolare alla distrofia muscolare di Duchenne.

Nonostante i numerosi approcci sperimentali e le strategie terapeutiche che negli anni si sono susseguite, ad oggi questa patologia rimane ancora priva di cure efficaci e risolutive. In vero, da alcuni anni la letteratura scientifica ha più volte sottolineato come l'approccio più promettente per questo tipo di patologie sia la combinazione di terapia genica e terapia cellulare. In questa ottica il gruppo quest'anno ha realizzato una review pubblicata sulla rivista scientifica "Febs Journal" in cui ha descritto diverse tipologie di cellule staminali isolate dal tessuto muscolare e da altri tessuti, mostrandone le caratteristiche e sottolineando il loro possibile utilizzo al fine di migliorare la terapia cellulare per il trattamento delle distrofie muscolari. Non a caso quest'anno il gruppo ha scritto anche un capitolo dal titolo "CD133(+) Cells for the Treatment of Degenerative Diseases: Update and Perspectives" pubblicato nel libro "Prominin-1 (CD133): New Insights on Stem Cell Biology": in questo capitolo gli autori descrivono le potenziali fonti tissutali di cellule staminali CD133+ in grado di essere trapiantate con successo, di proliferare e differenziare in cellule specializzate e funzionali. La caratterizzazione di queste cellule staminali potrebbe portare a nuove importanti opportunità nel trattamento di patologie degenerative quali appunto la distrofia muscolare di Duchenne.

Durante quest'ultimo anno il team del dott. Torrente ha continuato a collaborare con diversi gruppi di ricerca nazionali ed internazionali sia per studi clinici sia per sviluppare temi importanti per la ricerca di base nel campo delle malattie neuromuscolari. Ad esempio la collaborazione con l'Ospedale San Raffaele di Milano ha portato alla pubblicazione sulla rivista scientifica "PloS One" di uno studio clinico eseguito su un gruppo di pazienti tra i 5 e i 12 anni affetti da distrofia muscolare di Duchenne ed ancora in grado di camminare, al fine di effettuare una loro valutazione longitudinale, utilizzando un test muscolare quantitativo (QMT), e successivamente correlare i risultati del QMT con misurazioni funzionali quali North Star Ambulatory Assessment (NSAA) o il 6-min walk test (6MWT). Lo scopo di tale lavoro è stato quello di evidenziare i cambiamenti avvenuti nei pazienti distrofici durante il secondo anno di follow-up clinico, sottolineando eventuali differenze tra i risultati ottenuti durante il primo e il secondo anno dello studio ed identificando alcuni possibili marcatori caratteristici della perdita della capacità di camminare. In sintesi nel lavoro viene riportato che con il test 6MWT si osserva un decremento di 222.7 (SD 81.0) nel primo anno e un decremento di 264.7 (SD 123.1) nel secondo anno; con l' NSAA invece il calo medio complessivo è di 21.86 (SD 4.21) nel primo anno e di 22.98 (SD 5.19) nel secondo anno. 14 bambini hanno perso la capacità di camminare, uno solo durante il primo anno dello studio mentre gli altri 13 durante il secondo anno. Da questo studio emerge inoltre che una distanza di 330 metri al test 6MWT, o un punteggio basale di 18 nella scala NSAA riduce significativamente il rischio della perdita della capacità di deambulare entro due anni.

Oltre alla distrofia muscolare di Duchenne il team di ricerca diretto dal dott. Torrente ha studiato le disferlinopatie, patologie dovute ad una mutazione nel gene che codifica per la disferlina, proteina presente nella membrana della cellula muscolare dove sembra svolgere una funzione di riparazione di eventuali danni ad essa arrecati. La suddetta proteina è presente anche in altre cellule, per esempio i monociti: un'alterazione della disferlina a questo livello potrebbe alterare la funzione di queste cellule immunitarie contribuendo alla progressione della malattia ed



all'infiammazione del muscolo che si osserva ad un'analisi istologica. Dalla letteratura è noto che mutazioni a livello dello stesso gene danno quadri clinici diversi (varianti alleliche). Tra queste si conosce la LGMD2B, la miopatia di Miyoshi e la miopatia distale con esordio nel tibiale anteriore (DMAT) (anche chiamata DACM for distal anterior compartment myopathy, cioè miopatia distale del compartimento anteriore). Lo studio di questa patologia neuromuscolare ha portato il gruppo di ricerca del dott. Torrente alla pubblicazione di un lavoro sulla rivista scientifica "Febs Journal" in cui si mostra che cellule staminali circolanti CD133+, isolate dal sangue periferico di pazienti affetti da miopatia di Miyoshi, trattate con oligonucleotidi antisenso (AON) presentano una parziale espressione di disferlina in vitro ma non in vivo dopo trapianto intramuscolare in topi scid/blAJ. Successivamente questi esperimenti sono stati estesi ingegnerizzando le cellule esprimenti l'antigene di membrana CD133 degli stessi pazienti con un vettore lenti-virale in modo da far esprimere alle cellule la proteina disferlina in modo stabile e utilizzare le stesse cellule per trapiantare i topi scid/blAJ: in questo caso i ricercatori hanno osservato un'espressione di disferlina sufficiente a correggere i deficit funzionali durante la riparazione della membrana del muscolo scheletrico. Questi dati suggeriscono che un approccio lentivirus-mediato, permettendo l'espressione di disferlina full-length in cellule staminali isolate pazienti affetti da miopatia di Miyoshi, potrebbe rappresentare un trattamento terapeutico alternativo per le disferlinopatie.

Infatti è noto come, negli ultimi anni, i ricercatori di tutto il mondo si siano impegnati per cercare nuovi sistemi per migliorare la terapia genica in termini di efficacia e di sicurezza in particolare per superare gli ostacoli costituiti dal ridotto trasferimento genico, dal basso livello di espressione della proteina, dal rischio di mutagenesi per integrazione casuale del vettore virale, dall'immunogenicità dei vettori stessi e, qualche volta, dello stesso transgene. Recentemente la comunità scientifica ha mostrato un'attenzione particolare anche verso i microRNA (miRNA), piccole molecole endogene di RNA non codificante, parte di una grande rete di geni regolatori con diverse funzioni; la più nota, attualmente, è l'attività di regolazione post-trascrizionale, in cui vanno a inibire la traduzione di determinati RNA messaggeri (mRNA): dalla letteratura emerge che tali molecole potrebbero essere coinvolte nella patogenesi di patologie neurodegenerative (NDDs). E proprio in linea con questo argomento, il gruppo di ricerca del dott. Torrente ha quest'anno pubblicato una review sulla rivista scientifica "Front Cell Neuroscience" in cui gli autori evidenziano i livelli di espressione dei miRNA rilevati in diversi tessuti di pazienti affetti da NDDs al fine di valutare la loro possibile applicazione come eventuali biomarcatori della malattia.

La ricerca clinica, legata all'attività clinica del Dott. Torrente presso la Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico e alla proficua collaborazione con l'Unità di Neurochirurgia della stessa Fondazione, ha portato il gruppo di ricerca alla pubblicazione sulla rivista scientifica "Cell Transplantation" di un caso clinico (approvato dal Comitato Etico della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico come Ex Caso Compassionevole) relativo ad una paziente di 23 anni che, avendo subito plurime lesioni da taglio agli arti superiori, presentava la resezione in più punti dei nervi mediano, ulnare, radiale, associate a lesioni vascolari e ossee. La suddetta paziente, che altrimenti avrebbe rischiato l'amputazione degli arti superiori, è stata trattata con cellule staminali autologhe isolate dalla cute e posizionate in guide di collagene GMP tra il nervo tagliato e l'innesto di nervo surale, in modo da colmare l'ampio vuoto. Il lavoro pubblicato descrive appunto l'intervento chirurgico ed il follow up clinico di tre anni, evidenziando, tramite filmati ed esami clinici della paziente trattata, la maggiore capacità di effettuare lievi movimenti con le mani e le braccia e di riuscire a tenere fra le dita un pezzo di carta o una penna; così gli autori hanno descritto come la combinazione di cellule staminali e bioscaffold possa rappresentare un possibile trattamento per le lesioni a nervi periferici determinando un lieve miglioramento della qualità di vita dei pazienti.

Durante quest'anno lavorativo il gruppo diretto dal dott. Torrente ha inoltre presentato al Comitato Etico della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico altre due richieste di parere di eticità per due casi compassionevoli dal titolo "Trattamento con gel piastrinico e cellule staminali autologhe isolate dalla cute in paziente affetta da lesione midollare traumatica". La lesione spinale traumatica, infatti, pur non avendo un'alta incidenza, generalmente colpisce una fascia relativamente giovane di popolazione, determinando anche un notevole carico economico sia per il paziente stesso che per la società. Attualmente, non esiste un approccio efficace per il trattamento della lesione spinale, eccetto alte dosi di metilprednisolone, un antinfiammatorio che presenta però molti effetti collaterali (quali l'alterazione del bilancio elettrolitico, ipertensione, insufficienza cardiaca, alterazioni muscolo-scheletriche, complicazioni gastrointestinali, alterazioni neurologiche) e non impedisce comunque la perdita irreversibile dell'attività motoria e sensoriale. (Baptiste and Fehlings, 2006; Hawryluk et al, 2008). Di fatto, la lesione midollare rappresenta una delle più drammatiche patologie che possano colpire l'uomo, a causa della grave disabilità che ne consegue e, soprattutto, la drastica repentinità che quasi sempre caratterizza l'esordio post evento traumatico. Le lesioni spinali sono la prima causa di invalidità in Italia e, dal punto di vista assistenziale, sono una delle sfide più impegnative cui deve far fronte il sistema sanitario. Il Comitato Etico ha accordato parere favorevole per entrambe le richieste e le due pazienti sono state trattate, in collaborazione con l'Unità di Neurochirurgia, rispettivamente ad aprile 2013 e a novembre 2013. Ad oggi è ancora in corso il loro follow-up clinico: le pazienti vengono valutate clinicamente circa ogni tre mesi dal trattamento con visite neurologiche, esami radiologici quali la risonanza magnetica ed esami elettrofisiologici come potenziali evocati motori e sensitivi ed elettromiografia. L'applicazione di questa tecnica di preparazione delle cellule staminali autologhe con un gel piastrinico, particolarmente ricco di fattori di crescita e in grado di comportarsi da sostegno e da supporto trofico per le cellule stesse permetterebbe di incrementarne la vitalità, la proliferazione ed il differenziamento neuronale, come si evince dalla letteratura, e potrebbe rappresentare un nuovo tipo di approccio terapeutico per pazienti affetti da lesione midollare; in realtà con questo tipo di trattamento non è garantito né atteso un recupero funzionale assoluto ma esiste la speranza di raggiungere almeno un parziale recupero sensoriale e dell'attività viscerale, cambiamenti favorevoli che potrebbero certamente migliorare la qualità di vita dei pazienti spesso molto giovani. In vero, è evidente la necessità e la volontà dei ricercatori di trasformare questi due "case report" in un vero e proprio studio clinico includendo un maggior numero di pazienti e utilizzando precise scale di valutazione clinica di eventuali effetti benefici del trattamento stesso.

Nel 2013 il dott. Torrente ha inoltre presentato al Comitato Etico della Fondazione un'altra richiesta di parere di eticità per uno studio biologico prospettico ("Caratterizzazione fenotipica delle cellule staminali presenti in un prelievo di sangue midollare di pazienti affetti da distrofia muscolare (distrofia muscolare di Duchenne, distrofia di Becker e distrofia Fascio-scapolo-omeroale)") il cui obiettivo è quello di indagare se l'assenza di distrofina o altre mutazioni importanti a livello muscolare possano interferire e modificare le percentuali di espressione delle sottopopolazioni di cellule staminali presenti a livello midollare senza trascurare, però, di valutare la presenza a livello midollare di una popolazione di cellule staminali specifica e propria di questa sede. Infatti in letteratura non sono riportati studi circa la componente staminale midollare di pazienti distrofici, non è noto ad oggi se questa popolazione di cellule staminali presenti differenzi rispetto a quella di soggetti sani. Lo sviluppo futuro di uno studio di questo tipo potrebbe portare alla realizzazione di uno studio clinico con infusione in arteria femorale, con controllo angiografico, di cellule staminali midollari autologhe in pazienti affetti da distrofia, al fine di poter migliorare la perfusione della muscolatura attraverso un processo di neoangiogenesi ed incrementare la componente cellulare dei muscoli distrofici. Per la realizzazione della ricerca sono stati coinvolti il Prof. Agostino Cortelezzi, direttore dell'U.O.C. Ematologia I e Centro Trapianti di Midollo della Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale

Maggiore Policlinico e il Dott. Nicola Stefano Fracchiolla afferente alla medesima unità operativa.

Per quanto riguarda le conoscenze tecnologiche legate alle cellule staminali, al muscolo ed alle patologie neuromuscolari, notevoli sono stati i progressi degli ultimi anni. La ricerca, e in particolare la ricerca applicata, diventa ogni anno più tecnologizzata ed è sempre più importante per i ricercatori avere a disposizione nuove metodiche di imaging in grado di visualizzare e quantificare le cellule di interesse in seguito ad un trapianto: in tal senso recenti sviluppi nell'uso delle nanotecnologie hanno contribuito al progresso delle metodiche di imaging in vivo ad alta risoluzione, tra cui si possono citare la tomografia ad emissione di positroni, l'emissione di singoli fotoni, la risonanza magnetica e la tomografia microcomputerizzata.

In particolare la microtomografia computerizzata X-ray è una tecnologia complessa che consente di ottenere risoluzioni elevate fino a centinaia di nanometri (submicron). Grazie alla preziosa collaborazione che prosegue da anni con l'Università Politecnica delle Marche, Di.S.C.O. - Sezione di Biologia, Biochimica e Fisica di Ancona, quest'anno è stato possibile scrivere un capitolo di libro dal titolo "Micro-CT technique for three-dimensional visualization of human stem cells" in cui i ricercatori diretti dal dott. Torrente hanno descritto dettagliatamente la metodologia utilizzata per isolare una popolazione di cellule staminali circolanti CD133+, visualizzare le stesse cellule con la tecnologia Micro-CT dopo averle iniettate nella circolazione di topi distrofici ed analizzare in modo quantitativo la loro distribuzione in vivo utilizzando tecniche di biologia molecolare, al fine di poter valutare la loro cinetica di migrazione. Questa stessa collaborazione ha permesso altresì la pubblicazione sulla rivista scientifica "Tissue Engineering" di un altro lavoro in cui viene mostrato come diverse tipologie cellulari possano essere mantenute in coltura su scaffold di acido poliglicolico (PGA) e di acido polilattico-co-glicolico (PGLLA) e possano poi essere visualizzate al sincrotrone a raggi X valutandone, utilizzando il contrasto di fase, la loro distribuzione e la loro proliferazione.

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 l'*Organizzazione del Congresso CTS – Cell Transplant Society* all'Università degli Studi di Milano, del Convegno "Cellule staminali: un cammino tra speranza di cura, scienza e rispetto delle regole" a Montecitorio a Roma e di una serie di giornate di studio e di convegni Unistem all'Università degli Studi di Milano.

Il Laboratorio Cellule Staminali, inoltre, è stato prescelto dalla Direzione Scientifica della Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico per rappresentare la stessa Fondazione alla manifestazione "Dalle staminali all'uomo: l'avventura delle cellule" - Notte Bianca dei Ricercatori – Meet Me Tonight, tenutasi a Milano a settembre di quest'anno. In quest'occasione il gruppo di ricerca diretto dal dott. Torrente ha svolto attività divulgativa con il fine ultimo di portare la ricerca fuori dal laboratorio, facendo conoscere il proprio lavoro, rispondendo alle domande della gente sulle cellule staminali e facendo chiarezza sull'utilizzo clinico delle cellule staminali, coinvolgendo i cittadini in un'occasione di incontro in un contesto divertente e stimolante. Quest'anno il dott. Torrente è stato invitato a far parte dell'editorial board della rivista scientifica CellR4, un giornale multidisciplinare focalizzato in particolare sulla riprogrammazione, differenziamento e rigenerazione cellulare.

In conclusione, come si evince dalla letteratura scientifica sempre in evoluzione, ogni anno i promettenti risultati della ricerca scientifica nel campo delle cellule staminali e in particolare della terapia cellulare e genica apportano significative informazioni e nuove conoscenze in tema di biologia delle cellule staminali, sulle loro potenzialità differenziative e sulla loro capacità di essere ingegnerizzate per correggerne specifici difetti genetici: tutto questo ci fa sperare di essere sempre più vicini ad un'applicazione clinica delle cellule staminali adulte in trials di fase

I/II nel campo di patologie neurodegenerative e neuromuscolari per cui non esiste ancora una cura, prima tra tutte, appunto, la distrofia muscolare di Duchenne.

## **PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA 2013**

### ELENCO PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI RECENSITE

1. Simona Maciotta, Mirella Meregalli, and Yvan Torrente  
*The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases*  
In press in **Front Cell Neurosci**.  
I.F.: 4.469 Medicina Riparativa e Rigenerativa Terapia genica e cellulare
2. Grimoldi N, Colleoni F, Tiberio F, Vetrano IG, Cappellar A, Costa A, Belicchi M, Razini P, Giordano R, Spagnoli D, Pluderi M, Gatti S, Morbin M, Gaini SM, Rebullà P, Bresolin N, Torrente Y  
*Stem Cell Salvage of injured peripheral nerve.*  
**Cell Transplant. 2013 Nov 21.**  
I.F.: 4.422 Medicina Riparativa e Rigenerativa Terapia genica e cellulare
3. Mazzone ES, Pane M, Sormani MP, Scalise R, Berardinelli A, Messina S, Torrente Y, D'Amico A, Doglio L, Viggiano E, D'Ambrosio P, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Bonfiglio S, De Sanctis R, Rolle E, Bianco F, Magri F, Rossi F, Vasco G, Vita G, Motta MC, Donati MA, Sacchini M, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Previtali S, Napolitano S, Bruno C, Politano L, Comi GP, Bertini E, Mercuri E.  
*Correction: 24 Month Longitudinal Data in Ambulant Boys with Duchenne Muscular Dystrophy.*  
**PLoS ONE.** 2013 Nov 11;8(11).  
I.F.: 3.73 Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia genica e cellulare
4. Meregalli M, Navarro C, Sitzia C, Farini A, Montani E, Wein N, Razini P, Beley C, Cassinelli L, Parolini D, Belicchi M, Parazzoli D, Garcia L, Torrente Y.  
*Full-length dysferlin expression driven by engineered human dystrophic blood derived CD133+ stem cells.*  
**FEBS J.** 2013 Dec;280(23):6045-60.  
I.F.: 4.25 Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia Genica E Cellulare
5. Giuliani A, Moroncini F, Mazzoni S, Belicchi ML, Villa C, Erratico S, Colombo E, Calcaterra F, Brambilla L, Torrente Y, Albertini G, Bella SD.  
*Polyglycolic Acid-Polylactic Acid Scaffold Response to Different Progenitor Cell In Vitro Cultures: A Demonstrative and Comparative X-Ray Synchrotron Radiation Phase-Contrast Microtomography Study.*  
**TISSUE ENGINEERING**  
I.F.:4.065 Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia genica e cellulare
6. Maurilio Sampaolesi, Stephane Blot, Giuseppe D'Antona, Nicolas Granger, Rossana Tonlorenzi, Anna Innocenzi, Paolo Mognol, Jean-Lauren Thibaud, Beatriz G. Galvez, Ines Barthelemy, Laura Perani, Sara Mantero, Maria Guttinger, Orietta Pansarasa, Chiara Rinaldi, M. Gabriella Cusella De Angelis, Yvan Torrente, Claudio Bordignon, Roberto Bottinelli & Giulio Cossu  
*Corrigendum: Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs*  
**NATURE** 444, 574–579 (2006), Doi:10.1038/Nature05282

I.F.: 38.597 Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia Genica E Cellulare

7. Mazzone ES, Pane M, Sormani MP, Scalise R, Berardinelli A, Messina S, Torrente Y, D'Amico A, Doglio L, Viggiano E, D'Ambrosio P, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Bonfiglio S, De Sanctis R, Rolle E, Bianco F, Magri F, Rossi F, Vasco G, Vita G, Motta MC, Donati MA, Sacchini M, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Previtali S, Napolitano S, Bruno C, Politano L, Comi GP, Bertini E, Mercuri E.  
*24 month longitudinal data in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy.*

**PLoS ONE. 2013;8(1):e52512**

I.F.: 3.73 Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia genica e cellulare

8. Meregalli M, Farini A, Belicchi M, Parolini D, Cassinelli L, Razini P, Sitzia C, Torrente Y.  
*Perspectives of stem cell therapy in Duchenne muscular dystrophy.*

**FEBS J. 2013 Sep;280(17):4251-62**

I.F.: 4.25 Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia Genica E Cellulare

### CAPITOLI DI LIBRO

1. Farini A, Villa C, Belicchi M, Meregalli M, Torrente Y.  
*Micro-CT technique for three-dimensional visualization of human stem cells.*

**Methods Mol Biol. 2013;1052:143-52**

Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia genica e cellulare

2. Meregalli M, Farini A, Belicchi M, and Torrente Y.  
*Pr CD133(+) Cells for the Treatment of Degenerative Diseases: Update and Perspectives.*  
In *Prominin-1 (CD133): New Insights on Stem & Cancer Stem Cell Biology. Chapter 15,*  
*pp. 229-243*

**Adv Exp Med Biol. 2013;777:229-43**

I.F.: 1.825 Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia Genica E Cellulare

### ELENCO CONGRESSI 2013

- *Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)*  
Medicina Riparativa e Rigenerativa Terapia Genica e Cellulare

*Invited speaker* Ruolo delle cellule staminali mesenchimali adiposo-derivate nella rigenerazione muscolare. *Y. Torrente*. Corso di Aggiornamento 1st Milan Laryngology Master Class. Auditorio, Centro Ricerche e Studi Amplifon, Via Ripamonti, 133 – Milan. 7-8 Novembre 2013

- *Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)*  
Medicina Riparativa e Rigenerativa Terapia Genica e Cellulare

Curso Tecnología Endoret (PRGF) y su aplicación en Traumatología – BTI. Instituto de Formación Eduardo Anitua, Vitoria-Gasteiz, España. 18 Ottobre 2013

- *Chairman* Ruolo della nutraceutica nelle malattie muscolari. *Y. Torrente*. Convegno Ystem “La nutraceutica nella prevenzione delle malattie dismetaboliche e neurodegenerative”. Aula Magna, Università degli Studi di Milano. 14 Ottobre 2013

- *Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)*  
Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia genica e cellulare

*Invited speaker* Le cellule staminali come approccio terapeutico della paralisi cerebrale infantile. Y. Torrente. Convegno Swiss Stem Cell Bank “Paralisi cerebrale infantile. Quali risposte dalle cellule staminali?” - Circolo della Stampa, Sala Montanelli, Corso Venezia 48 Milano. 2 Ottobre 2013

- *Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)*  
Medicina Riparativa E Rigenerativa Terapia genica e cellulare

*Invited speaker* Role of adipose-derived stem cells in muscle regeneration Y. Torrente. Fat injection and tissue regeneration. 5<sup>th</sup> International Symposium. Centro Congressi Fondazione Cariplo, Milano. 14 Settembre 2013

- *Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation)* Medicina Riparativa e Rigenerativa Terapia genica e cellulare

Stem cells and muscular dystrophies.

*M. Meregalli, A. Farini, M. Belicchi, L. Jardim, D. Parolini, C. Sitzia, P. Razini, L. Cassinelli, M. Baruffi, L. Garcia, Y. Torrente*. 12th Congress of the Cell Transplant Society, Aula Magna, Università degli Studi di Milano, Milan. July 7-11, 2013

-*Co-chairman e coordinatore scientifico* Cellule staminali: Un cammino tra speranza di cura, scienza e rispetto delle regole. Y. Torrente. Sala Capranichetta, Hotel Nazionale, Roma. 11 giugno 2013

-*Chairman* Unistem Day 2013 – L’Italia Unita dalla Scienza, Il lungo ed affascinante viaggio della ricerca sulle cellule staminali. Aula Magna, Università degli Studi di Milano. 15 Marzo 2013

-*Comunicazione scientifica su riviste non censite (Poster)* Medicina Riparativa e Rigenerativa Terapia Genica e Cellulare

Allo-trapianto di mesoangioblasti da donatore hla-identico per la terapia cellulare della distrofia muscolare di Duchenne. *G. Cossu, S. Napolitano, M.P. Cicalese, S. Previtali, M. Venturini, S. Politi, R. Fiori, F.S. Tedesco, M. Noviello, A. Tettamanti, F. Nicastro, C. Godi, S. Markt, M.G. Natali-Sora, M. Scarlato, F. Ciotti, S. Giuliani, R. Tonlorenzi, C. Bonini Chiara, Y. Torrente, F. Ciceri*. XVII Convention Scientifica Fondazione Telethon, Palazzo dei Congressi, Riva del Garda (TN). 11-13 Marzo 2013

-*Comunicazione scientifica su riviste non censite (Poster)* Medicina Riparativa e Rigenerativa Terapia genica e cellulare

Immortalizzazione reversibile e trasduzione di mesoangioblasti dmd con un cromosoma artificiale esprimente la distrofina per la terapia cellulare della distrofia muscolare. *S. Benedetti, F.S. Tedesco, H. Hoshiya, G. D’Antona, M. Gerli, M. Ragazzi, K. Yasushiro, R. Tonlorenzi, S. Chaouch, A. Lombardo, S. Antonini, C. Gargioli Cesare, L. Naldini Luigi, Y. Torrente, R. Bottinelli, G. Messina, M. Oshimura, G. Cossu*. XVII Convention Scientifica Fondazione Telethon, Palazzo dei Congressi, Riva del Garda (TN). 11-13 Marzo 2013

*-Comunicazione scientifica su riviste non censite (Poster) Medicina Riparativa e Rigenerativa  
Terapia genica e cellulare*

Modificazione genica di cellule staminali distrofiche allo scopo di trapianto autologo nella distrofia muscolare di Duchenne. *M. Meregalli, A. Farini, M. Belicchi, D. Parolini, C. Sitzia, P. Razini, L. Cassinelli, J.C. da Silva Bizario, L. Garcia, Y. Torrente.* XVII Convention Scientifica Telethon, Palazzo dei Congressi, Riva del Garda (TN). 11-13 Marzo 2013

#### ELENCO DEI PROGETTI DI RICERCA FINANZIATI ED ANCORA IN CORSO

- 1) Optistem 223098-FP7\_Health-2007-1.4-66 n°223098 (2009–2013) “Optimization of stem cell therapy for degenerative epithelial and muscle diseases” Finanziamento totale 548.4000 Euro, rimanenti 180.000 Euro
- 2) Bando Giovani Ricercatori 2008 del Ministero della Salute (2011-2013)– “New assays for evaluation of Tumorigenic potential of malignant brain tumor Cancer Stem cells clonal derivatives and identification of molecular targets for pharmacological interventions”  
Finanziamento totale 527.330 Euro, rimanenti 60.000 Euro
- 3) Ricerca Corrente 2012 della Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico “Sviluppo di protocolli espansivi cellulari al fine di un trattamento autologo con cellule staminali muscolari in pazienti distrofici”.  
Finanziamento 31.000 Euro
- 4) Ricerca Finalizzata Ref. n. RF-2009-1547384 (2012-2014) "Design of a clinical trial using CD133-LV(U7)"  
Finanziamento totale 600.000 Euro (I tranche 240.000 Euro erogata nel 2013)
- 5) Progetto Trento-Unistem (2010-2012) "Cellule staminali nella terapia delle distrofie muscolari", Finanziamento totale 600.000 Euro, ultima tranche 200.000 erogata a ottobre 2011, rimanenti 55.000 Euro





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

**Responsabile:**

M. Moggio

**Collaboratori:**

- M. Sciacco: Dirigente Medico Fondazione - Neurologo, Dottore di ricerca in Scienze Neurologiche, co-responsabile banca tessuti e DNA
- G. Fagiolari: Biologo - tecnico ospedaliero Fondazione
- M. Ripolone: Biologo borsista Fondazione
- P. Ciscato: Tecnico ospedaliero Fondazione
- R. Violano: Biologo - borsista Fondazione
- L. Napoli: Biologo - borsista Telethon
- V. Lucchini: Neurologa - Dottore di ricerca in medicina molecolare - Borsista Fondazione
- M. Servida: Neurologa - Borsista Fondazione (sino a tutto aprile 2013)
- I. Colombo: Specializzanda senior in Neurologia
- L. Peverelli: Specializzando in Neurologia
- L. Villa: Specializzanda in Neurologia
- P. Valentini: Architetto - amministrativa - Borsista Telethon
- R. Xhani: Laureata in Medicina e Chirurgia, Borsista Fondazione
- S. Testolin: Laureata in Medicina e Chirurgia, Borsista Telethon

## ATTIVITÀ DIAGNOSTICA

---

Nell'anno 2013 l'attività ambulatoriale globale riguardante le malattie neuromuscolari e del motoneurone è sovrapponibile a quella dell'anno precedente.

In particolare, sono state effettuate n. 1.050 visite nell'ambulatorio per le malattie neuromuscolari delle UU.OO. Neurologia e Diagnostica Malattie Neuromuscolari.

Inoltre sono stati effettuati n. 211 accessi di DH per le suddette patologie.

Sono state studiate e refertate 219 biopsie muscolari e 19 biopsie di nervo.

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

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

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

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

- Dall'anno 1999 il Laboratorio ha avuto il riconoscimento di "Banca Telethon di DNA, tessuto muscolare scheletrico, nervo periferico e colture cellulari". I diversi campioni biologici stoccati nella banca sono a disposizione dei ricercatori italiani e stranieri interessati e sono elencati in un dedicato sito web: <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.

### *Biopsie Muscolari*

---

#### Microscopia ottica

Durante l'anno 2013 sono state eseguite N° 219 biopsie muscolari indagate con metodiche istologiche, istoenzimatiche e immunoistochimiche.

Tutte le biopsie di pazienti col sospetto clinico di distrofia sono state studiate anche con metodiche immunologiche con anticorpi contro le varie proteine coinvolte in queste patologie

(distrofina, merosina, sarcoglicani, disferlina, caveolina, emerina, alfadistroglicano, miotilina, desmina, etc.).

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

Biopsie con il sospetto di IBM vengono studiate con la colorazione Rosso Congo. In totale, relativamente a quanto sopra specificato, sono stati eseguiti 3.083 tests.

#### Microscopia elettronica

Le biopsie muscolari sono state studiate con metodiche ultrastrutturali quando ritenuto necessario e sono stati eseguiti 72 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 2013 sono state eseguite N° 19 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 72 tests (istologia e reazioni immunocitochimiche).

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

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

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

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

##### Microscopia elettronica

Le biopsie di nervo sono state incluse in resine epossidiche e tecnicate per le osservazioni in microscopia elettronica, per l'isolamento delle singole fibre nervose e per la valutazione quantitativa della densità fibrile. A tal fine sono stati eseguiti circa 65 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 2013 i seguenti risultati:

## PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA ANNO 2013

### Pubblicazioni originali su riviste censite:

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

### Linea 6 - Genomica, epigenomica e proteonomica

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

*The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender?*  
**J Neurol.** 2013 Dec 29. DOI 10.1007/s00415-013-7225-3. PMID: 24375076. I.F. 3,578

Studio retrospettivo del fenotipo clinico di 126 pazienti italiani (facenti parte del database nazionale) portatori della mutazione puntiforme m.3243A>G del DNA mitocondriale (mutazione “MELAS”, encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi “stroke-like”). Analisi e commenti in merito alla marcata eterogeneità clinica sottolineando come i sintomi più comuni siano costituiti da ipoacusia e diabete, seguiti da episodi “stroke-like”. Questi ultimi, almeno nella popolazione italiana, sembrano essere più frequenti nei soggetti di sesso maschile.

Levy RJ, Ríos PG, Akman HO, Sciacco M, Vivo DC, Di Mauro S.

*Long Survival in Patients With Leigh Syndrome and the m.10191T>C Mutation in MT-ND3: A Case Report and Review of the Literature.*

**J Child Neurol.** 2013 Nov 27. DOI: 10.1177/0883073813506783. PMID: 24284231. I.F. 1,385

Gli autori descrivono il caso atipico di una paziente affetta da sindrome di Leigh (encefalomiopatia necrotizzante subacuta) dovuta a mutazione puntiforme m.10191T>C nella subunità ND3 (codificata dal DNA mitocondriale) del Complesso I della catena respiratoria. Nelle forme ad esordio infantile l'encefalopatia è spesso precocemente letale anche se sono descritti casi sopravvissuti fino all'infanzia e all'adolescenza. Nel caso descritto, nonostante l'esordio infantile e la gravità dei disturbi, la paziente ha raggiunto l'età adulta (attualmente ha 25 anni) grazie alle cure dei familiari e ad un regime dietetico mirato (poco apporto proteico).

Remiche G, Ronchi D, Magri F, Lamperti C, Bordoni A, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

*Extended phenotype description and new molecular findings in late onset glycogen storage disease type II: a northern Italy population study and review of the literature.*

**J Neurol.** 2013 Oct 25. DOI 10.1007/s00415-013-7137-2. PMID: 24158270. I.F. 3,578

Gli autori hanno effettuato una correlazione genotipo-fenotipo in 36 pazienti affetti da glicogenosi di tipo II (Malattia di Pompe) ad esordio tardivo allo scopo di identificare quali siano le mutazioni più deleterie ossia quelle che si associano ad una maggior disabilità dal punto di vista muscolare e respiratorio. L'obiettivo è quello di identificare fattori prognostici il più possibile accurati anche per meglio definire le strategie di follow-up e l'algoritmo per la somministrazione di enzima ricombinante.

Filocamo M, Baldo C, Goldwurm S, Renieri A, Angelini C, Moggio M, Mora M, Merla G, Politano L, Garavaglia B, Casareto L, Bricarelli FD.

*Telethon Network of Genetic Biobanks: a key service for diagnosis and research on rare diseases.* **Orphanet J Rare Dis.** 2013 Aug 30;8(1):129. doi: 10.1186/1750-1172-8-129. PMID: 24004821. I.F. 4,315

Questo lavoro sottolinea l'importanza delle Banche di tessuti biologici quale potente strumento per favorire la ricerca di base, traslazionale e clinica in materia di malattie rare. Ancor più efficace nel favorire questo processo è risultata la creazione di network di Biobanche. Nella fattispecie, il lavoro riporta l'esperienza quinquennale del Telethon Network of Genetic Biobanks (TNGB), di cui la Biobanca di tessuti Neuromuscolari di questo Istituto fa parte. La presenza di un network ha consentito di uniformare le procedure di stoccaggio e preparazione dei campioni nonché di elaborare regolamentazioni condivise per la distribuzione dei campioni stessi.

Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Uziel G, Bruno C, Ienco EC, Filosto M, Lamperti C, Martinelli D, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Ronchi D, Santorelli FM, Sauchelli D, Scarpelli M, Sciacco M, Spinazzi M, Valentino ML, Vercelli L, Zeviani M, Siciliano G.

*Phenotypic heterogeneity of the 8344A>G mtDNA "MERRF" mutation.*

**Neurology.** 2013 May 28. 80(22):2049-54. DOI 10.1212/WNL.0b013e318294b44c Epub 2013 May 1 PMID: 23635963. I.F. 8,249

Studio retrospettivo del fenotipo clinico di 42 pazienti italiani (facenti parte del database nazionale) portatori della mutazione puntiforme m.8344A>G del DNA mitocondriale (mutazione "MERRF", mioclono epilessia con fibre Ragged Red). Analisi e commenti in merito alla marcata eterogeneità clinica con particolare riferimento al fatto che l'epilessia mioclonica è risultata presente solo in un paziente su 5 mentre le caratteristiche cliniche più comuni sono risultate essere la miopatia, le crisi comiziali generalizzate, l'ipoacusia, la ptosi palpebrale e la presenza di lipomi multipli.

Ronchi D, Di Fonzo A, Lin W, Bordoni A, Liu C, Fassone E, Pagliarani S, Rizzuti M, Zheng L, Filosto M, Ferrò MT, Ranieri M, Magri F, Peverelli L, Li H, Yuan YC, Corti S, Sciacco M, Moggio M, Bresolin N, Shen B, Comi GP.

*Mutations in DNA2 Link Progressive Myopathy to Mitochondrial DNA Instability.*

**Am J Hum Genet.** 2013 Feb 7;92(2):293-300. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.12.014. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23352259. I.F. 11,202

Grazie alla tecnica dell'Exome Sequencing gli autori hanno identificato per la prima volta mutazioni nel gene DNA2 in soggetti adulti con miopatia mitocondriale e delezioni multiple del DNA mitocondriale. La proteina codificata da questo gene ha un ruolo nei processi di replicazione del DNA mitocondriale e un suo alterato funzionamento porta ad instabilità del DNA mitocondriale.

Cheldi A, Ronchi D, Bordoni A, Bordo B, Lanfranconi S, Bellotti MG, Corti S, Lucchini V, Sciacco M, Moggio M, Baron P, Comi GP, Colombo A, Bersano A, On Behalf Of Lombardia Gens Collaborators.

*POLG1 mutations and stroke like episodes: a distinct clinical entity rather than an atypical MELAS syndrome.*

**BMC Neurol.** 2013 Jan 15;13(1):8. doi:10.1186/1471-2377-13-8 PMID: 23324391. I.F. 2,564

Gli autori descrivono il caso di un paziente affetto da una malattia mitocondriale caratterizzata da episodi stroke-like, miopatia e presenza di fibre Ragged Red alla biopsia muscolare. La ricerca della mutazione mitocondriale MELAS (encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi "stroke-like") è risultata negativa e il paziente è risultato invece portatore di mutazioni nel gene nucleare POLG1, a sua volta associato a mitocondriopatia clinicamente

eterogenea. Gli autori sottolineano l'importanza di sequenziare il gene POLG1 in caso di pazienti con episodi "stroke-like" e ricerca della mutazione MELAS negativa.

Kornblum C, Nicholls TJ, Haack TB, Schöler S, Peeva V, Danhauser K, Hallmann K, Zsurka G, Rorbach J, Iuso A, Wieland T, Sciacco M, Ronchi D, Comi GP, Moggio M, Quinzii CM, Dimauro S, Calvo SE, Mootha VK, Klopstock T, Strom TM, Meitinger T, Minczuk M, Kunz WS, Prokisch H.

*Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease.*

**Nat Genet.** 2013 Feb;45(2):214-9. doi: 10.1038/ng.2501. Epub 2013 Jan 13. PMID: 23313956. I.F. 35,209

Gli autori hanno evidenziato per la prima volta mutazioni in un gene, C20orf72, responsabile del mantenimento del genoma mitocondriale. Le mutazioni, identificate in tre famiglie di etnia differente, inducono deplezione e delezioni multiple del DNA mitocondriale e determinano una grave malattia mitocondriale caratterizzata da oftalmoplegia estrinseca, cachessia e insufficienza respiratoria che si trasmette in modo autosomico recessivo.

#### Linea 8 - Prevenzione, diagnosi e terapia personalizzata (dalla nascita alla terza età)

Brunetti D, Dusi S, Giordano C, Lamperti C, Morbin M, Fugnanesi V, Marchet S, Fagiolari G, Sibon O, Moggio M, d'Amati G, Tiranti V.

*Pantethine treatment is effective in recovering the disease phenotype induced by ketogenic diet in a pantothenate kinase-associated neurodegeneration mouse model.*

**Brain.** 2013 Dec 6. doi:10.1093/brain/awt325. PMID: 24316510. I.F. 9,915

Analisi di un modello animale (tipo knockout) per il gene PANK2, le cui mutazioni sono responsabili di un disturbo autosomico recessivo caratterizzato da distonia, disartria, rigidità, retinite pigmentosa e accumulo di ferro a livello encefalico. Il lavoro dimostra che la somministrazione di pantetina può impedire lo sviluppo del fenotipo patologico neuromuscolare nei topi, suggerendo la possibilità di un utilizzo della sostanza a livello sperimentale nei soggetti affetti.

### SETTORE MEDICINA RIPARATIVA E RIGENERATIVA

#### Linea 1 - Neuroscienze cliniche e di base

Sancisi V, Germinario E, Esposito A, Morini E, Peron S, Moggio M, Tomelleri G, Danieli-Betto D, Tupler RG.

*Altered Tnnt3 characterizes selective weakness of fast fibers in mice overexpressing FSHD Region Gene 1 (FRG1).*

**Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2013 Dec 4. doi:10.1152/ajpregu.00379.2013. PMID: 24305066. I.F. 3,284

Studio di un modello animale (topo FRG1) per la distrofia Facio-Scapolo-Omerale in cui si evince che la fibre muscolari rapide, le più compromesse dal processo distrofico, mostrano anomalie nell'isoforma "veloce" delle troponina muscolare. Ciò correla col riscontro nei pazienti distrofici di uno splicing aberrante nella troponina T scheletrica (TNNT3). Gli autori concludono che le alterazioni della troponina potrebbero rappresentare un marker biologico della gravità della malattia e della sua progressione.

Ricci G, Scionti I, Sera F, Govi M, D'Amico R, Frambolli I, Mele F, Filosto M, Vercelli L, Ruggiero L, Berardinelli A, Angelini C, Antonini G, Bucci E, Cao M, Daolio J, Di Muzio A, Di Leo R, Galluzzi G, Iannaccone E, Maggi L, Maruotti V, Moggio M, Mongini T, Morandi L, Nikolic A, Pastorello E, Ricci E, Rodolico C, Santoro L, Servida M, Siciliano G, Tomelleri G, Tupler R. *Large scale genotype–phenotype analyses indicate that novel prognostic tools are required for families with facioscapulohumeral muscular dystrophy.*

**Brain.** 2013 Nov;136(Pt 11):3408-17. doi: 10.1093/brain/awt226. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24030947. I.F. 9,915

Gli autori hanno effettuato una correlazione studio genotipo-fenotipo su un'ampia casistica di soggetti (163 probandi e 367 familiari) appartenenti a famiglie con Distrofia Facio-Scapolo-Omerale in quanto, negli ultimi anni, sono stati descritti soggetti sani portatori del difetto molecolare identificativo della malattia e, viceversa, soggetti affetti con indagine genetica nella norma. Sono state fatte correlazioni tra aplotipo, espansione dell'allele D4Z4 e gravità del quadro clinico, ed è stato analizzato il rischio di sviluppare la sintomatologia da parte dei familiari (anche in relazione al grado di parentela col probando). I risultati di questo studio hanno messo in evidenza le difficoltà legate al counselling genetico per questa patologia e, di conseguenza, la necessità di individuare nuovi fattori di suscettibilità allo sviluppo della malattia.

Lucchiari S, Ulzi G, Magri F, Bucchia M, Corbetta F, Servida M, Moggio M, Comi GP, Lecchi M. *Clinical evaluation and cellular electrophysiology of a recessive CLCN1 patient.* **J Physiol Pharmacol.** 2013 Oct;64(5):669-78. PMID: 24304580. I.F. 2,476

Viene discusso il caso di una donna di 32 anni affetta da miotonia congenita e portatrice di due mutazioni nel gene CLCN1 (canale del cloro). È stato condotto uno studio elettrofisiologico cellulare, in particolare per stabilire l'effetto delle mutazioni sul funzionamento del canale. Una delle due mutazioni ha dimostrato di avere effetti più deleteri. La co-espressione e gli effetti delle due mutazioni spiegano il fenotipo miotonico della paziente.

Remiche G, Ronchi D, Lamperti C, Bordoni A, Magri F, Moggio M, Comi GP.

*Spontaneous hydromyelic cavity in two unrelated patients with late-onset pompe disease: is this a fortuitous association?*

**Eur Neurol.** 2013; 70(1-2):102-5. doi: 10.1159/000350851. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23860444. I.F. 1,5

Gli autori descrivono I primi due casi di associazione tra Glicogenosi tipo II (Malattia Di Pompe) ad esordio tardivo e presenza di cavità idromielica spontanea, in un caso a livello toracico, nell'altro caso a livello cervicale e toracico. Vengono presentate le storie cliniche e le immagini neuroradiologiche. I casi vengono discussi dal punto di vista patofisiologico e delle possibili implicazioni cliniche.

## PROGETTI IN CORSO

---

- 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

- Continua lo studio di una famiglia affetta da distrofia facio-scapolo omerale (FSHD) con caratteristiche atipiche dal punto di vista genotipo-fenotipo. Infatti, la famiglia è composta da sette germani, tre con test genetico negativo per FSHD e quattro portatori invece di un frammento patologico (frammento corto D4Z4 sul cromosoma 4q35). Solo uno dei soggetti con test genetico patologico è clinicamente affetto, mentre, dato alquanto interessante, due soggetti con test genetico positivo e uno con test genetico negativo presentano segni miopatici alla biopsia muscolare (microscopia ottica ed elettronica) in assenza di manifestazioni cliniche. È quasi completato lo studio di altri geni coinvolti in patologie muscolari di natura distrofica per evidenziare eventuali fattori co-responsabili delle atipie genotipo-fenotipo.
- 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.
- Proseguono le indagini biottiche morfologiche e biochimiche in pazienti affetti da Glicogenosi di tipo II e che assumono terapia con enzima ricombinante (ERT Therapy). Lo studio è coordinato dal nostro laboratorio assieme ai colleghi dell'Istituto Besta e prevede una analisi biottica 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.
- Prosegue il progetto: studio della deplezione del DNA mitocondriale (mtDNA) in soggetti affetti da atrofia muscolare spinale (SMA). Tale deplezione è ritenuta di tipo secondario, conseguente alla marcata ipotrofia muscolare indotta dalla patologia di base. Abbiamo pertanto iniziato una revisione sistematica di 17 biopsie muscolari provenienti da altrettanti pazienti affetti da SMA (tipo I, II o III). Dati preliminari mostrano come vi sia un deficit di citocromo c ossidasi (COX) nella maggior parte dei campioni biottici, e come il deficit sia più marcato nella forma più grave e ad esordio precoce, la SMA I. Il deficit non interessa soltanto le fibre ipotrofiche, inoltre, lo studio parallelo di frammenti muscolari provenienti da pazienti pari-età affetti da altre patologie neurogene, mostra un'attività COX nella norma. Ciò supporta l'ipotesi che la disfunzione mitocondriale nella SMA non sia di tipo secondario, ma, piuttosto, contribuisca all'eziopatogenesi della malattia. Dati preliminari hanno evidenziato una riduzione di espressione di geni deputati alla replicazione mitocondriale.
- 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”.



- Prosegue 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 Cà Granda – Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.
- 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.
- Progetto “vaccinazioni e malattie neuromuscolari”. IL progetto, in collaborazione con i colleghi pediatri e quelli della UO di Igiene, affronta il delicato aspetto delle vaccinazioni in pazienti affetti dalle più frequenti malattie neuromuscolari.
- Progetto “anestesia e malattie neuromuscolari”, in collaborazione con la Associazione Italiana di Miologia (AIM) e con le Associazioni Parent Project e UILDM.

#### FINANZIAMENTI IN CORSO:

---

- Ministero della Salute Ricerca corrente 2014  
 “Patogenesi dell’Atrofia Muscolare Spinale: caratterizzazione del difetto ossidativo mitocondriale e studio dei meccanismi molecolari che causano tale disfunzione”
- Telethon Network  
 “Progetto Telethon Network of Genetic Biobank” anni 2014-2018
- Telethon Network  
 “Development of the Italian National Registry for FSHD” anni 2014-2016



**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	Neurofisiologo, Consulente in convenzione 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 Doretta	Specializzando in Neurologia Università degli Studi di Milano IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Federico Verde	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

Laboratorio di Neuroscienze

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 Jenny Sassone	Biotechnologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. ssa Elisa Onesto	Biotechnologa, 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

Rapporti di collaborazione:

Nazionali:

Centro “Dino Ferrari”  
IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico

Prof. Nereo Bresolin, Prof. Giacomo Comi  
Dott. Maurizio Moggio, Prof. Elio Scarpini,  
Dott.ssa Daniela Galimberti, Dott.ssa Stefania  
Corti, Dott. Roberto Del Bo

IRCCS Istituto C. Besta, Milano

Dott.ssa Cinzia Gellera, Dott. Tagliavini  
Dott. Franco Taroni

IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico

Prof. Paolo Rebullà  
Dott.ssa Lorenza Lazzari  
Prof. Giorgio Lambertenghi,

IRCCS Istituto Mondino, Pavia

Dott. Fabio Blandini,  
Dr.ssa Marie Armentero

Centro Clinico Nemo

Dott. Christian Lunetta

Dipartimento di Endocrinologia  
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Prof. L. Persani

Dipartimento di Farmacologia  
Università di Milano - CEND

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

Neuroimaging Research Unit and  
Department of Neurology,  
Institute of Experimental Neurology,  
Division of Neuroscience and  
Department of Neuroradiology,  
Vita-Salute University and  
San Raffaele Scientific Institute, Milan

Prof. Massimo Filippi  
Dott. ssa Federica Agosta  
Prof. Giacomo Comi

Prof. Andrea Falini

IRCCS Istituto Mondino, Pavia

Dott. Fabio Blandini, Dott.ssa Cristina Cereda

Internazionali:

University of Massachusetts Medical  
School of Boston

Prof. Robert H. Brown, John Landers

Università di Ulm, Germania  
Dipartimento di Neurologia

Prof. Albert Ludolph

King’s College, London  
Dipartimento di Neurologia

Prof. Al-Chalabi, Christian Shaw  
Prof. John Powell

Dipartimento di Neurologia  
Università di St. Gallen, Svizzera

Prof. Markus Weber

## ATTIVITÀ SCIENTIFICA – ANNO 2013

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 nel 2013 ha prodotto una serie considerevole di lavori scientifici ed ha incrementato l' attività clinica diversificandosi a cogliere la complessità della patologia neurodegenerativa. È proseguita l'operazione di formazione dei più giovani ricercatori e medici che con successo sono stati inviati in Laboratori sia in Nord America che in Europa. La crescita degli investimenti in apparecchiature dedicate alla genetica ed alla biologia molecolare ha dato rilievo alle collezioni di materiale biologico ed ha permesso continuare l' operato del Consorzio SLAGEN con un lavoro sinergico tra 6 diverse Istituzioni Italiane. Il Centro "Dino Ferrari" è stato l' interlocutore per informazioni sulle casistiche Italiane per quanto riguarda le malattie neurodegenerative e la SLA in particolare. Il mondo della Demenza Fronto-Temporale (FTD) è divenuto continuo con quello della SLA dopo le recenti evidenze biologiche. Le équipes multidisciplinari sono state l' obiettivo perseguito per le diverse patologie e ciò ha permesso di sviluppare tematiche di ricerca ambiziose come Brain-Computer Interface (BCI) ed Eye Tracking (ET) per la comunicazione dei pazienti. Un moderno ed umano approccio alle più temibili malattie neurodegenerative quali SLA, Demenze, Malattie di Huntington, Malattia di Parkinson rappresenta l' obiettivo perseguito della U.O. di Neurologia di cui il Centro "Dino Ferrari" fa parte operante, sempre vicino alla matrice storica della IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore di Milano dove è originariamente nato. L' aprirsi degli interessi alla patologia cerebrovascolare è stato di dovere dopo l' affidamento della nuova Stroke Unit dal 2007 e ciò ha fornito nuovi spunti di ricerca intersecati alla patologia neurodegenerativa. In particolare è maturato un largo interesse per la patologia amiloidotica primitiva dei vasi cerebrali.

Nel 2013 è stata largamente sviluppata la Neurofisiologia con studio anche 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 spesso in sintonia con gli organismi Sanitari Regionali anche per l' analisi dei costi.

La ricercata interazione tra eccellenza clinica e ricerca di base si è espressa nel 2013 con il completamento di una vasta metanalisi di GWA in oltre 13.000 campioni di DNA e la scoperta di un locus sul cromosoma 17 associato alla SLA sporadica.

Più analiticamente, la Sede Distaccata del Centro "Dino Ferrari" ha ulteriormente ottimizzato gli investimenti in ricerca presso il Centro di Ricerche e Tecnologie Biomediche di Cusano Milanino dove ha locazione il Laboratorio di Neuroscienze. L' acquisizione dell' apparecchiatura Illumina, piattaforma per l' analisi più approfondita di polimorfismi a singolo nucleotide (SNIP) in relazione alle patologie neurodegenerative di cui il Centro "Dino Ferrari" per tradizione si occupa, ha permesso il completamento 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 grande 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 con la creazione di équipes multidisciplinari per le

diverse patologie neurodegenerative (SLA, Disturbi del Movimento, Malattie Cerebrovascolari, Disturbi Cognitivi). Sono stati ampliati, in particolare, gli ambulatori ed i servizi dedicati all'inquadramento multidisciplinare dei Disturbi Cognitivi e dei Disturbi del Movimento. 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 fissa che ha comportato l'acquisizione e la formazione di nuovo personale specializzato, sia medico che 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 nuova RM 3T rappresenta il presupposto per una nuova ricerca volta, in particolare, allo studio della patologia neurodegenerativa e cerebrovascolare.

Il Servizio di Neurofisiologia coordinato dal Dott. Luca Maderna ha dato impulso sia dell'attività clinica che di ricerca di base con 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 2013 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 biotici di nervo e di muscolo di pazienti affetti da diversa patologia neuromuscolare (Prof. Maurizio Moggio) con analisi biochimica o molecolare in casi selettivi (Prof. Giacomo Comi).

La ricerca di base si è articolata in diverse tematiche che hanno rappresentato la fisiologica evoluzione di studi in parte avviati nel 2012, 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 del midollo osseo di pazienti affetti da patologia neurodegenerativa (SLA) e definito i parametri utili all'implantologia nel modello animale reso parkinsoniano con 6-OH-DA con una serie di lavori a stampa che hanno meritato l'attenzione della stampa internazionale. Le potenzialità staminali delle cellule amniotiche sono state ulteriormente caratterizzate con impianto nel topo wobler. Analogamente, le cellule staminali neurali endogene sono state caratterizzate in un modello di ratto iperteso che spontaneamente sviluppa ictus accanto alla iniziale definizione dell'uso di traccianti per monitorare le cellule dopo trapianto utilizzando RM 7 Tesla.

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

Il Dott. Nicola Ticozzi ha completato una serie di lavori di estremo interesse quali lo sviluppo ulteriore del progetto di Exome Sequencing supportato da Arisla EXOMEFALS) e l' avvio dello studio nei trios (ricerca di mutazioni de novo acquisendo, oltre il DNA del probando, anche il DNA dei genitori quando vivoventi).

Nel 2013 il Centro ha mantenuto la funzione direttiva nell' ambito dell' European ALS Consortium (EALSC), organizzazione Europea dedicata allo sviluppo delle problematiche inerenti le malattie del motoneurone (il Prof. V. Silani ne è stato Chairman). Diversi Teaching Course sono stati organizzati nell' ambito delle due organizzazioni scientifiche ENS ed EFNS.

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 nel consenso internazionale raggiunto nel 2013 anche per un rilevante numero di ricercatori (no. 4) che stanno svolgendo o hanno completato periodi formativi in qualificati Laboratori in Europa o nel Nord-America con cui il Centro "Dino Ferrari" ha scambi collaborativi di elevato livello. In particolare, la Dr. Isabella Fogh ha la responsabilità presso il King's College di Londra 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).

## **PRINCIPALI ARGOMENTI DI RICERCA:**

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

Nel presente progetto ci si proponeva di determinare l' adiponectinemia sierica nei pazienti affetti da Sclerosi laterale Amiotrofica (SLA) in relazione alla fase di malattia, al peso e composizione corporea ed ai livelli di HDL colesterolo (Lo studio è stato condotto in collaborazione con la Dr.ssa Raffaella Canello afferente all'Unità del Laboratorio di Biologia Molecolare presso il nostro istituto.)

Nel corso del 2013 sono stati raccolti i sieri di 8 pazienti affetti da SLA e 9 pazienti affetti da altre patologie neuronali (APN) presso l'U.O. Neurologia dell'Istituto. A questi sono stati aggiunti 21 campioni provenienti da donatori di controllo (CTR) normopeso (NW) o obesi (OB) (rispettivamente 7 + 14 sieri). I pazienti ed i donatori sono stati selezionati in modo da avere un'età paragonabile (CTR: 42,1; SLA: 50,4; APN: 53,5). I valori di Body Mass Index o Indice di massa corporea (BMI) sono stati calcolati secondo la seguente formula: peso corporeo (in kg) diviso per il quadrato della statura (in m). I BMI dei campioni suddivisi per tipologia di paziente sono risultano essere: OB 30.4; NW 23.05; SLA 22.3; APN 21.4

I campioni di siero, congelati a -20°C fino al loro utilizzo, sono stati utilizzati mediante test ELISA a sandwich (DRG® Adiponectin (human) ELISA) per la valutazione dei livelli di adiponectina (proteina secreta esclusivamente dagli adipociti del tessuto adiposo che oltre ad avere un ruolo nella regolazione dell'omeostasi energetica, esercita importanti funzioni a livello vascolare e cardiaco, regolando la funzione endoteliale, la protezione dal danno ischemico con effetti antinfiammatori)



Ogni campione è stato analizzato in doppio. I valori medi di adiponectina ottenuti per i gruppi OB e NW sono risultati in linea con quanto precedentemente riportato in letteratura.

Per quanto riguarda invece i risultati ottenuti da pazienti, si evidenzia una differenza tra pazienti SLA e APN. In particolare, i primi mostrano concentrazioni sieriche paragonabili ai CTR NW, mentre i secondi mostrano valori molto più elevati. Ulteriori indagini su una casistica più ampia sono in programma per il prossimo anno, si richiede quindi una estensione della durata del progetto.

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

Nel corso dell'anno 2013 ci si è prosci di identificare i meccanismi molecolari della ubiquitinazione di GluR6. In particolare, tramite plasmidi codificanti ubiquitine mutanti si è mirati ad identificare il tipo di ubiquitinazione. Successivamente, è stato investigato come il blocco della ubiquitinazione del recettore possa modificare il trafficking del recettore. In parallelo, ci si propone di identificare il dominio su cui GluR6 viene ubiquitinato tramite l'utilizzo di plasmidi codificanti forme di GluR6 progressivamente delete della regione C-terminale e mutanti puntiformi.

## *3. 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.

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

Nel presente progetto ci si proponeva di analizzare il profilo dell'RNA esosomiale nel siero di pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) rispetto a controlli comparabili per età. Nel corso di questo anno sono inoltre stati raccolti i sieri di 8 pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), 9 pazienti affetti da altre patologie neuronali (APN) e 21 campioni provenienti da donatori di controllo. Ogni campione è stato processato per l'isolamento degli esosomi.

In questa prima fase dello studio, è stata messa a punto la metodica di isolamento degli esosomi utilizzando una chimica basata su specifici polimeri capace di precipitare in modo selettivo vescicole con dimensioni comprese tra i 40-550 nm (ExoQuick<sup>TM</sup> Exosome Precipitation Solution SBI). Per ottimizzare l'ottenimento e la caratterizzazione degli esosomi, sono stati utilizzati prelievi di siero da donatori sani. L'effettivo isolamento delle vescicole è stato verificato con diverse metodiche. Le vescicole essendo per loro dimensioni al di sotto del potere di risoluzione del citofluorimetro e del microscopio confocale, sono state miscelate con biglie in latex (aldehyde/sulfate latex beads) del diametro di 4 µm. Si è quindi proceduto alla marcatura con l' anticorpo anti-CD63, marcatore espresso in modo specifico dagli esosomi ed analizzate con citofluorimetro. Le biglie con legati gli esosomi sono state inoltre osservate al microscopio a fluorescenza per verificare la presenza delle vescicole. Un'ulteriore caratterizzazione degli esosomi è stata effettuata mediante real-time PCR. L'RNA è stato estratto con un kit specifico per l'estrazione da esosomi (Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit Invitrogen). L'RNA

estratto è stato retrotrascritto ed il cDNA amplificato mediante miR-Q, una nuova RT-PCR quantitativa per il profilo di espressione di piccole molecole di RNA quali i miRNAs. I primer scelti e disegnati sono stati i seguenti: SNORD44, SNORD47, SNORD48, SNORD52 e RNU6 (per la normalizzazione dei dati del miR-Q) e miR177, miR122 e miR132 microRNA, riconosciuti come essere altamente negli erosomi sierici. Per convalidare i risultati ottenuti dall'amplificazione con miR-Q (la cui interpretazione appare complicata dalla presenza di numerosi primer-dimer che complicano l'analisi), ci si propone di ripetere gli esperimenti con nuovi primers.

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

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

Nel corso del 2011 si è proceduto all'analisi dei dati. L' angiogenina è stata dosata a livello liquorale in 80 pazienti affetti da malattia del motoneurone (inclusi due casi sporadici mutati nel gene TARDBP e un caso familiare portatore di mutazione nel gene SOD1) e 81 soggetti di controllo. Non sono state evidenziate differenze significative tra i pazienti SLA e i soggetti di controllo ma, dato interessante, nei pazienti SLA le concentrazioni liquorali di angiogenina non correlavano con sesso ed età, contrariamente a quanto osservato nei controlli. Infatti, in questo gruppo abbiamo rilevato valori liquorali di angiogenina maggiori nei soggetti di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile ed una correlazione positiva con l'età. Tali risultati potrebbero indicare un' alterata espressione di angiogenina nei pazienti SLA rispetto ai controlli. Non è stata trovata alcuna differenza tra i pazienti con malattia ad esordio bulbare o spinale, né una correlazione tra i valori di angiogenina liquorali e la durata di malattia. I pazienti affetti da SLA e decadimento cognitivo tipo demenza fronto-temporale (SLA-FTD) presentavano invece valori di angiogenina liquorale più elevati rispetto ai pazienti SLA senza decadimento cognitivo. Interessante è anche il riscontro, nel gruppo di controllo, di valori liquorali di angiogenina significativamente più elevati nei soggetti affetti da FTD rispetto ai controlli affetti da altre malattie. Questi dati suggeriscono un possibile ruolo di angiogenina nella FTD.

Nel corso del 2012 si è proceduto all'analisi del gene ANG codificante per angiogenina nei pazienti con SLA-FTD (7 soggetti) e nei pazienti affetti da FTD (5 soggetti). Nessuno di loro è risultato mutato per ANG.

Questo lavoro fornisce dati interessanti nell'ambito della ricerca di biomarcatori liquorali nella SLA e ha permesso di fare esperienza nell'utilizzo della metodica ELISA su liquor nel Laboratorio di Neuroscienze, fungendo da "propedeutica" alla determinazione mediante ELISA di TDP-43. Si è proceduto al dosaggio di TDP-43 ricombinante mediante colorazione Comassie, al fine di determinare le concentrazioni standard della proteina da utilizzare per l'ELISA. Tuttavia, riteniamo che i kit ELISA per la determinazione, rispettivamente, di TDP-43 *full-length* e TDP-43 fosforilata, recentemente messi in commercio, rappresentino un'alternativa che potrebbe facilitare dal punto di vista metodologico lo studio.

Non esistendo alcun dato in proposito in letteratura, auspichiamo di procedere anche alla determinazione liquorale di FUS a livello liquorale, una volta conclusi i dosaggi di TDP-43.

#### *6. CELLULE STAMINALI UMANE: USO DI FLUOROCROMI E/O NANOPARTICELLE MAGNETICHE*

Nel corso del quarto anno di ricerca, nel 2013 ci si è principalmente focalizzati sulla ottimizzazione della marcatura per trasfezione delle cellule staminali con bioluminescenza utilizzando il sistema reporter della luciferasi. In particolare, è stata clonata la regione del gene reporter luciferasi, inserendola in un opportuno vettore lentivirale poi introdotto nelle cellule staminali derivate da liquido amniotico provenienti da eccedenze diagnostiche ottenute dalla

Citogenetica dell' Istituto, previo consenso informato. L' attività di marcatura delle cellule staminali sono state condotte in collaborazione con l'Università degli Studi di Milano (Prof Lucignani-Dr.ssa Ottobrini, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-chirurgica e dei Trapianti). La strategia tramite inserzione del gene luciferasi permette di quantificare la concentrazione della proteina reporter prodotta o della sua attività enzimatica *in vitro* ed *in vivo*. In particolare, il lentivirus codificante il gene Luciferasi è stato utilizzato per la marcatura genetica bioluminescente sfruttandone le proprietà di alta attività specifica e mancanza di attività endogena (basso *background*). La marcatura è avvenuta anche in concomitanza con un intercalante di membrana emittente nella luce del vicino infrarosso già precedentemente validata nel nostro laboratorio e oggetto di una precedente pubblicazione. Questo approccio integrato permetterà di seguire il destino cellulare *in vivo* ed *ex vivo* validando le osservazioni ottenute sulla localizzazione ed homing delle cellule mesenchimali umane ottenute precedentemente utilizzando il vettore m-Cherry. Il Progetto ha quindi permesso di:

1. Confrontare metodologie diverse di trasfezione sulle stesse staminali amniotiche: la comparazione dell'efficienza di trasfezione utilizzando due diversi carriers (Poli-brene e Poli-ornitina) per facilitare l'inserzione del lentivirus ha evidenziato, come precedentemente riportato, che le principali attività metaboliche cellulari (proliferazione, ciclo cellulare, apoptosi) non vengono modificate dall'infezione, ma che l'integrazione del lentivirus (e quindi il risultante segnale di bioluminescenza al luminometro) è maggiore utilizzando il poli-brene rispetto all'utilizzo della poliornitina. Il contemporaneo utilizzo di bioluminescenza e luce nel vicino infrarosso ha inoltre evidenziato come la localizzazione del segnale avvenga correttamente nella membrana (per il vicino infrarosso) e nel citoplasma (per la bioluminescenza) permettendo contemporaneamente la rilevazione dei due diversi segnali senza interferenze di background
2. Perfezionamento di un modello sperimentale animale murino lesionale da neurotossina 6 idrossidopamina (6-OHDA) e imaging delle staminali impiantate: la lesione unilaterale è stata provocata nello striato di un topo normale iniettando 10 ug/2uL di neurotossina o di veicolo (PBS). Cinque giorni dopo sono state iniettate le cellule (100.000 cellule in 4 ul/animale) e il segnale è stato seguito nel tempo *in vivo* fino a una settimana post impianto. Sono allo studio analisi *ex vivo* dei tessuti cerebrali per valutare l'estensione della lesione provocata e dell'impianto cellulare.

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

I risultati ottenuti sono stati utilizzati per la preparazione di un lavoro scientifico attualmente in revisione su una rivista internazionale.

## **7. COMPrensione IL CONTINUUM BIOLOGICO TRA SLA E FTD: VERSO UN PIÙ EFFICACE MODELLO ASSISTENZIALE PER I PAZIENTI**

### *1. Caratterizzazione fenotipica di Pazienti affetti da SLA.*

Nel corso dei precedenti 18 mesi, sono stati arruolati presso l'U.O. Neurologia – IRCCS Istituto Auxologico Italiano 206 Pazienti affetti da SLA. Ciascun Paziente è stato valutato da un neurologo esperto nella clinica delle malattie neuromuscolari ed è stato sottoposto a studi esaustivi di ordine neurofisiologico (ENG/EMG e PEM con studio del periodo silente), neuroradiologico (RMN dell'encefalo su scanner 3 Tesla e RMN del midollo cervicale, ove appropriato), neuropsicologico (batterie convenzionali e test computerizzati con *Eye-tracker*) e pneumologico (emogasanalisi, spirometria in clinostatismo ed ortostatismo, polisonnografia notturna). La diagnosi è stata posta secondo i criteri di El Escorial – Revised e secondo i recenti

criteri neurofisiologici di Awaji. Sulla base della valutazione neuropsicologica i Pazienti sono stati classificati in SLA pura, SLA con alterazioni comportamentali (ALSbi), SLA con disturbi cognitivi (ALSci) e SLA/FTD.

## *2. Creazione di un database informatico.*

Le informazioni cliniche sono state raccolte in un database informatico creato appositamente con il software FileMaker Pro. Il Database MND dell'U.O. Neurologia – IRCCS Istituto Auxologico Italiano attualmente include informazioni su 754 pazienti ed è suddiviso in diverse sezioni (dati anamnestici, clinici, laboratoristici, neurofisiologici, neuropsicologici). Il database è disegnato per facilitare analisi statistiche e la condivisione dei dati con le altre U.O. partecipanti al Progetto.

## *3. Allestimento di una Banca Biologica.*

Per ciascuno dei Pazienti arruolati nel presente Progetto abbiamo ottenuto, previo consenso informato, un campione di sangue periferico, da cui è stato successivamente estratto il DNA genomico, ed un campione di siero. In tutte le circostanze in cui fosse ritenuto utile per la diagnosi, i Pazienti sono anche stati sottoposti a rachicentesi e/o a biopsia muscolare. Attualmente, la Banca Biologica dell'U.O. Neurologia – IRCCS Istituto Auxologico contiene circa 700 campioni di DNA, 300 di siero e 250 di liquor cefalorachidiano. In collaborazione con l'U.O. 4 abbiamo anche raccolto circa 100 campioni bioptici di muscolo di Pazienti affetti da SLA.

## *4. Studio di marcatori liquorali nei Pazienti affetti da SLA*

Nei campioni di liquor prelevati dai Pazienti arruolati abbiamo proceduto al dosaggio di marcatori di infiammazione (IgG ed IgM liquorali, ricerca di bande oligoclonali all'immunolettrofocusing) e di neurodegenerazione classici (Abeta42, Tau, p-Tau181). Abbiamo inoltre studiato i livelli di angiogenina (ANG) liquorale in 81 pazienti, dimostrando una perdita della fisiologica correlazione di tale marcatore con sesso ed età rispetto ai controlli. L'attuale mancanza di kit ELISA commerciali per TDP-43 e FUS ha reso necessaria la creazione di una nuova metodica, con notevoli difficoltà metodologiche. Ad oggi si è proceduto al dosaggio di TDP-43 ricombinante mediante colorazione Comassie, al fine di determinare le concentrazioni standard della proteina da utilizzare per l'ELISA. Non è ancora perfezionata la creazione della curva di taratura e si sta cercando di aumentare sensibilità e specificità del test, modificando opportunamente i vari parametri (concentrazione dell'anticorpo di coating e di rilevazione, per esempio). È previsto che lo studio dell'espressione liquorale di FUS venga avviato al termine del dosaggio di TDP-43.

## *5. Diagnosi precoce delle disfunzioni respiratorie in Pazienti affetti da SLA: valutazione neurofisiologica, pneumologica e polisonnigrafica.*

Nel corso del progetto abbiamo studiato elettromiograficamente l'attività diaframmatica in 10 pazienti con diagnosi di SLA, ricoverati presso l'U.O. Neurologia – Istituto Auxologico Italiano. I dati neurofisiologici sono stati valutati alla luce dello studio polisonnografico che con esami della funzione respiratoria (EGA, spirometria). L'elettromiografia diaframmatica, secondo la nostra opinione, potrebbe rivelarsi un marker di disfunzione respiratoria precoce, consentendo quindi di intervenire tempestivamente con presidi terapeutici efficaci (es. ventiloterapia non invasiva).

## *6. Studio neuropsicologico di Pazienti affetti da SLA*

Sono stati ad oggi esaminati 45 pazienti che hanno soddisfatto i requisiti diagnostici e clinici espressi negli obiettivi. Circa 35 di essi hanno eseguito il follow-up a sei mesi di distanza e 30

un secondo follow-up a 12 mesi. I dati ottenuti sia dalle batterie neuropsicologiche convenzionali che dallo studio mediante *Eye-tracker* sono attualmente in corso di analisi.

#### 7. Studio neuroradiologico di Pazienti affetti da SLA-

Nel corso del Progetto sono stati reclutati per essere sottoposti a RMN morfometrica su scanner £ Tesla 15 pazienti, di cui 4 affetti da Sclerosi Laterale Primaria e 11 da SLA sporadica. Due pazienti sono risultati portatori di mutazioni patogenetiche nei geni SOD1 e C9ORF72. Sebbene 4 pazienti siano usciti dalla sperimentazione, gli 11 pazienti rimasti hanno completato tutte le valutazioni cliniche e radiologiche di follow-up previste dal protocollo. L'analisi dei dati è attualmente in corso.

#### 8. Caratterizzazione genetica di Pazienti affetti da SLA e correlazioni genotipo-fenotipo

Nel corso degli anni, al fine di caratterizzare la nostra coorte da un punto di vista genetico e di evidenziare eventuali correlazioni genotipo-fenotipo, abbiamo sequenziato in tutti i Pazienti afferenti alla nostra U.O. i geni SOD1, ANG, TARDBP e FUS alla ricerca di mutazioni patogenetiche. Nell'ambito del presente Progetto, abbiamo esteso tale studio ad altri geni, più recentemente identificati come patogenetici nella SLA sporadica (SALS) e familiare (FALS). Tali studi sono stati svolti sotto l'egida del Consorzio SLAGEN, di cui l'Istituto Auxologico Italiano è centro coordinatore.

a) Analisi gene OPTN. L'analisi del gene Optineurina (OPTN), è stata condotta su una casistica di 274 casi (161 FALS e 113 SALS). Sono state identificate 6 nuove mutazioni (3 missenso, 1 nonsense e 2 di splicing), in pazienti con la forma sia sporadica che familiare.

b) Analisi gene VCP. Abbiamo analizzato il gene VCP in 166 FALS, 14 ALS-FTD e 285 soggetti di controllo. L'analisi non ha rilevato la presenza di varianti patogenetiche nel gene.

c) Analisi gene UBQLN2. Abbiamo analizzato il gene UBQLN2 in 819 SALS, 226 FALS, 53 ALS-FTD, 63 FTD e 845 controlli sani. L'analisi ha permesso di identificare 5 varianti patogenetiche (p.P497H, p.P506S, p.P533L, p.M446R, p.V538L) ed una variante identificata in un soggetto di controllo (p.N439I).

d) Analisi gene C9ORF72. Abbiamo analizzato un totale di 183 FALS, 6 FALS-FTD, 1111 SALS, 53 SALS-FTD e 97 Pazienti SLA portatori di mutazioni patogenetiche in altri geni al fine di valutare la presenza dell'espansione ripetuta dell'esanucleotide GGGGCC nel gene C9ORF72. I risultati ottenuti dall'analisi della casistica sono di particolare rilevanza per l'alta frequenza mutazionale osservata in tutti i sottogruppi considerati (25% nei casi familiari, 10% in ALS-FTD e 5% in SALS).

e) Analisi gene PFN1. A seguito dell'identificazione di PFN1 come nuovo gene malattia (vedi punto 6), abbiamo studiato il gene in una coorte costituita da 1168 SALS e 1330 controlli sani. Questo lavoro ha permesso l'identificazione di una variante precedentemente descritta, p.E117G e di due varianti sinonime p.L112L e p.G15G.

#### 9. Identificazione di geni candidati nella SLA familiare mediante exome sequencing

a) Selezione e preparazione dei campioni. Tra i pazienti risultati negativi per mutazioni patogenetiche sono stati selezionati per exome sequencing 111 individui, di cui 80 casi indice e 31 soggetti appartenenti a 10 famiglie affette da SLAF. Tra i campioni selezionati sono risultati di particolare interesse una famiglia di origine caucasica (Famiglia #1) ed una di origine ebraica sefardita (Famiglia #2). Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico usando protocolli standardizzati; la concentrazione è stata determinata utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop; la qualità del DNA è stata infine valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio.

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

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

**c) *Identificazione di mutazioni patogenetiche del gene PFN1 nella SLA familiare.*** Con il metodo di filtraggio sopra descritto, abbiamo osservato come le due più grandi famiglie da noi studiate con exome sequencing (Famiglie # 1 e # 2) ospitavano due mutazioni diverse (C71G e M114T) (Figure 1a e 1b) all'interno di un singolo gene comune, profilina 1 (PFN1) localizzato sul cromosoma 17p13.2. PFN1 è una proteina di 140 amminoacidi in grado di legare l'actina monomeric (G-actina) promuovendone la polimerizzazione a formare actina filamentosa (F-actina). Per confermare che le mutazioni in PFN1 fossero davvero responsabili della SLAF, abbiamo sequenziato l'intera regione codificante di PFN1 in una seconda coorte composta da 272 individui con SLAF, negativi per le più comuni mutazioni patogenetiche. Abbiamo così identificato cinque ulteriori casi di SLAF con mutazioni di PFN1 (Tabella 1). È interessante notare come la mutazione C71G, originariamente identificata nella Famiglia # 1, sia stata scoperta in due ulteriori famiglie. In un caso (Family # 3), il sequenziamento degli altri membri affetti della famiglia ha mostrato una cosegregazione della mutazione con la malattia (Figura 1c). Lo screening di questa coorte ha anche reso possibile l'identificazione di due nuove mutazioni (E117G e G118V), interessanti residui aminoacidici evolutivamente conservati (Figura 1d), supportando l'ipotesi che queste mutazioni siano patogeniche. Il sequenziamento di PFN1 in 816 individui affetti da SLA sporadica (SLAS), infine, ha rivelato la presenza della mutazione E117G in due casi.

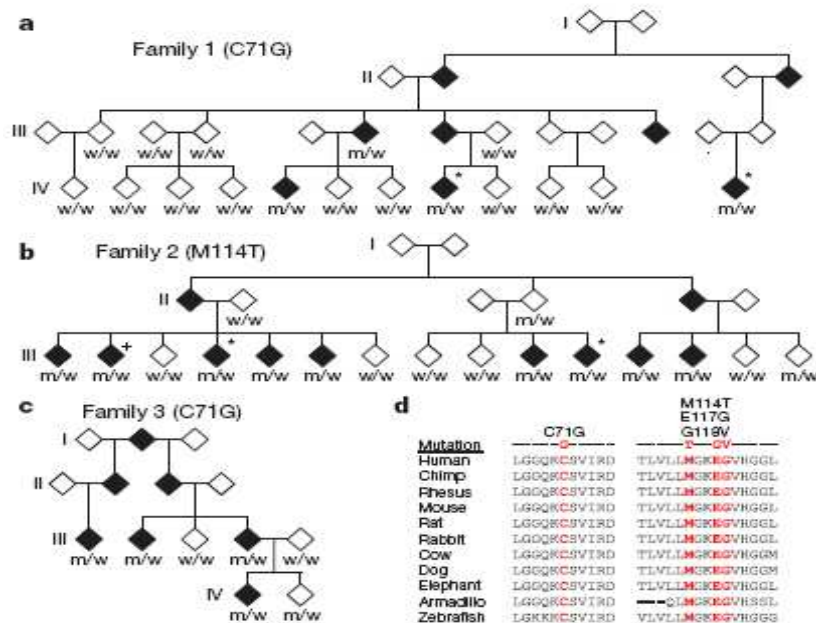


Figure 1

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

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

Tabella 1

La presenza di aggregati insolubili citoplasmatici rappresenta la caratteristica neuropatologica distintiva della maggior parte delle malattie neurodegenerative tra cui la SLA, la malattia di Parkinson e la malattia di Alzheimer. Al fine di indagare se le mutazioni di PFN1 inducessero la formazione di aggregati insolubili, abbiamo transfettato cellule N2A con costrutti wild-type o con i quattro mutanti e successivamente abbiamo effettuato un Western Blot delle frazioni solubili ed insolubili. Mentre la proteina wild-type era presente prevalentemente nella frazione solubile delle cellule transfettate, una frazione considerevole dei costrutti mutati C71G, M114T e G118V sono stati rilevati nella frazione insolubile (Figura 2a). Inoltre, abbiamo anche

osservato diverse specie di peso molecolare elevato, indicative della presenza di oligomeri di PFN1 SDS-resistenti. Il costrutto mutante E117G, al contrario, esprime un comportamento più simile al wild-type, con la maggior parte della proteina rilevata nella frazione solubile.

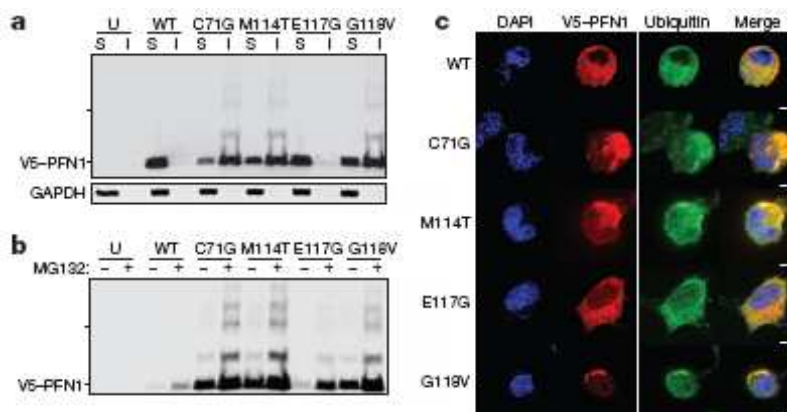


Figure 2

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

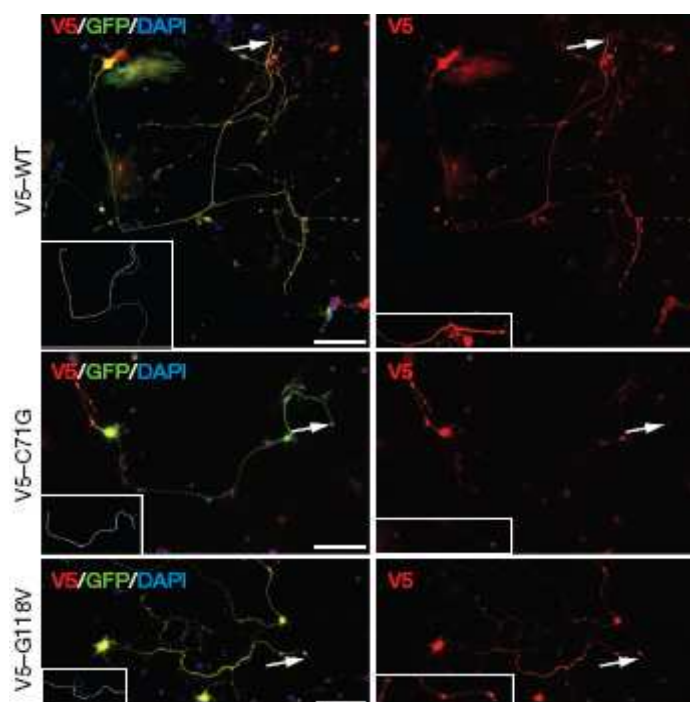


Figura 3



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

#### **8. SICUREZZA ED EFFICACIA DELL'INIBIZIONE DI SODI DA PIRIMETAMINA NELLA SLA FAMILIARE**

Tra il gennaio 2013 ed il gennaio 2014 sono stati arruolati sette pazienti. 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), come da protocollo.

#### **9. 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**

Nel corso del 2013 è stata verificata l'ipotesi che parkin interagisca con GluK2, promuovendo l'ubiquitinazione di GluK2. Tramite esperimenti di immunoprecipitazione e pull down assay è stato osservato che il dominio UBL di parkin interagisce con due regioni situate sulla coda C-terminale di GluK2. Tramite esperimenti di immunoprecipitazione abbiamo verificato che l'interazione tra KAR e parkin è specifica per gluk2 perchè parkin non coimmunoprecipita con altre subunità KAR. Inoltre sono state preparate e caratterizzate iPS da pazienti PARK2. La preparazione di iPS è in corso fa fibroblasti di 2 pazienti PARK2. Tramite la collaborazione in corso con la Keio University di Tokio abbiamo iniziato ad analizzare i livelli di GluK2 nelle cellule PARK2 e abbiamo osservato dei livelli significativamente aumentati rispetto ai controlli

#### **10. STUDIO DELLA MOTILITÀ E DEL RILASCIO DI FATTORI TROFICI IN CELLULE STAMINALI UMANE MARCATE CON NANOPARTICELLE PARAMAGNETICHE**

In assenza di trattamenti farmacologici efficaci per la terapia della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), una promettente strategia clinica appare il trapianto di cellule staminali per il rimpiazzo e/o la protezione dei neuroni in degenerazione. Un'importante e irrisolta sfida è la visualizzazione in tempo reale delle cellule staminali una volta impiantate per valutare il loro destino ed interazione con il tessuto circostante. Un procedura clinica standard prevede la marcatura delle cellule staminali con piccole nanoparticelle magnetiche (SPION) evidenziabili con risonanza magnetica (e quindi teoricamente direttamente applicabili al paziente).

Gli obiettivi di questo studio erano quindi volti ad evidenziare vantaggi e svantaggi dell' applicazione della marcatura con SPIOn dall'*in vitro* all'*in vivo* nel modello animale di topo wobbler, ben riconosciuto come modello per lo studio della degenerazione motoneuronale.

La marcatura con SPIOn di cellule staminali umane derivate da liquido amniotico provenienti da eccedenze diagnostiche con fenotipo normale provenienti dalla Citogenetica del nostro Istituto è stata effettuata per 72 ore congiuntamente a uno specifico colorante vitale del DNA cellulare. La capacità migratoria delle cellule post marcatura con SPIOn è stata quindi valutata tramite saggio di migrazione cellulare. Le cellule sono state anche iniettate intracerebroventricolarmente nel topo wobbler e monitorate a diversi tempi post iniezione (24 ore e 2,6,8 settimane post impianto).

È stato verificato come la doppia marcatura non interferisca con le capacità cellulari di proliferazione e sopravvivenza, ma è stato osservato per la prima volta come la marcatura con SPIOn riduca significativamente la migrazione delle cellule staminali. La compromissione della attività di migrazione è direttamente proporzionale alla quantità di SPIOn utilizzata per la marcatura e il ripristino della capacità di migrazione è solo parzialmente ripristinata dall'influenza di un ambiente circostante, attivamente in degenerazione. Post iniezione nel topo l'analisi con risonanza magnetica dimostra un segnale persistente e significativo confinato nel compartimento ventricolare fino alla 2 settimana mentre nelle successive 6 e 8 settimane si assiste a un decremento del segnale che sussiste però evidenziabile nelle stesse regioni. Studi *ex vivo* utilizzando la marcatura del DNA dimostrano la coincidenza tra segnale di risonanza e marcatura tissutale.

Lo studio ha quindi dimostrato che le principali proprietà biologiche delle cellule staminali non vengono alterate dalla marcatura; che la marcatura con SPIOn influenza la migrazione in misura dose dipendente evidenziando un altro parametro cruciale per la creazione di nuovi protocolli clinici; che un ambiente circostante in degenerazione può parzialmente recuperare una normale motilità; che *in vivo* le cellule trapiantate si possono distribuire nel sistema ventricolare con un segnale diminuito nel tempo, ma comunque significativo alla risonanza magnetica; che la localizzazione delle cellule staminali non appare influenzata dallo stato patologico che affligge il topo wobbler. Complessivamente i nostri risultati dimostrano che la criticità dell'ottimizzazione della dose di SPIOn necessaria per la marcatura. La marcatura deve permettere sia un'eccellente visualizzazione delle cellule trapiantate tramite imaging sia il mantenimento delle capacità migratorie per poter garantire il miglior effetto terapeutico.

## ***11. PROGETTO PILOTA SULLA MISURAZIONE DELLA PRODUZIONE DI RADICALI LIBERI NEL SANGUE MISURATI CON TECNICA QUANTITATIVA EPR (RISONANZA PARAMAGNETICA ELETTRONICA) IN PAZIENTI AFFETTI DA DIABETE MELLITO E NEUROPATIA PERIFERICA E DELLA POSSIBILE EFFICACIA DELL'ACIDO R-TIOCTICO NEL RIDURRE I RADICALI LIBERI E NEL MIGLIORARE LA SINTOMATOLOGIA NEUROPATICA PERIFERICA***

Nell'anno 2012 abbiamo reclutato 8 pazienti diabetici (4 M e 4 F). Al mese di dicembre 2 pazienti sono arrivati al 4 mese di controllo, 4 al 2° mese e gli ultimi due al controllo del 1° mese.

Dai risultati ottenuti valutando i pazienti nel mese di febbraio 2013 (vedi allegato) con le valutazioni al 4° mese di 7 pazienti si è osservato una significativa riduzione dei ROS e del danno ossidativo già dopo la prima somministrazione dell'acido R-Tioctico che permane costante nei primi due mesi per poi risalire verso i valori iniziali pre-trattamento, questo a fronte di valori di glicemia in tutti i pazienti sempre molto elevati. Anche per quanto riguarda i dati elettromiografici si è osservato in tutti i pazienti un progressivo miglioramento di tutti i valori presi in esame con conseguente riduzione della sintomatologia avvalorata dalla scala VAS.

Dall'analisi di questi dati preliminari sembrerebbe essere confermata l'utilità terapeutica dell'acido R-Tioctico nel ridurre la quantità di radicali liberi nel sangue e conseguentemente il danno e la sintomatologia neuropatica. Inoltre la presenza di tali risultati in pazienti scompensati dal punto di vista glicemico fa presupporre un risultato terapeutico ancora migliore in situazione di normo-glicemia.

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

In primo luogo, il presente studio è 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 verbomotorie. 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, renderà 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.

## ***13. IMPORTANZA DELL'ECTASIA ARTERIOSA DEL CIRCOLO POSTERIORE NELL'EZIOPATOGENESI DELLO STROKE***

Sono stati arruolati nello studio 160 pazienti della Stroke Unit, così classificati:

- 27 pazienti con stroke vertebro-basilare
- 133 pazienti con stroke in altro territorio vascolare

L'eziologia degli eventi ischemici è stata stabilita utilizzando la scala TOAST.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a TC encefalo e/o RMN encefalo; 20 pazienti sono stati sottoposti ad AngioTC del circolo intracranico.

Sono state ottenute misure del diametro vertebrale per tutti i 160 pazienti, su immagini bidimensionali degli esami EDTSA eseguiti con Ecografo GE Vivid 7 ed EsaoteMyLabClassC.

L'analisi dei dati ha dimostrato che l'ipoplasia vertebrale sinistra valutata con EDTSA è correlata in modo statisticamente significativo con lo stroke del circolo posteriore. L'analisi successiva confronterà i dati attuali con quelli provenienti dalle immagini neuroradiologiche e si concentrerà sulla correlazione eventuale fra anatomia sfavorevole e sindrome metabolica.

## CENTRO SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA)

Nell'anno 2013, circa 350 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;
- partecipazione a nuovi trial terapeutici (Pirimetamina nella SLA Familiare SOD1 mutata).

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 dell' ENS ed EFNS . Nell'ambito della nascente EAN il Prof. V. Silani è stato nominato referente per il gruppo Malattie del Motoneurone e Demenza Frontotemporale.

## CENTRO MALATTIE EXTRAPIRAMIDALI

Nel corso dell'anno 2013, oltre 300 nuovi pazienti circa affetti da diversi disordini extrapiramidali del movimento (Morbo di Parkinson, Paralisi Sopranucleare Progressiva, Atrofia Multisistemica e Degenerazione Cortico-Basale, Corea di Huntington, ect.) sono stati esaminati e trattati presso il "Centro Disturbi del Movimento" che ha eseguito circa 900 visite ambulatoriali. 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).

### CENTRO DISTURBI COGNITIVI

Nell'anno 2013 vi è stato un ulteriore incremento di pazienti rivoltisi al nostro centro per una valutazione diagnostica di tipo neuropsicologico; infatti sono state effettuate oltre 6.000 prestazioni neuropsicologiche e psicodiagnostiche per pazienti degenti in regime di ricovero ordinario o in Day Hospital, nonché 900 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.

### CENTRO DI MEDICINA DEL SONNO

È continuata nel corso del 2013 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 2013 sono state eseguite circa oltre 600 visite ambulatoriali e polisonnografie portatili, 150 video polisonnografie in laboratorio di medicina del sonno, 50 monitoraggi polisunnografici prolungati (24 ore) e 10 actigrafie.

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

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

### STROKE UNIT

Nel 2013 l'attività della Stroke Unit a direzione neurologica si è ulteriormente consolidata con ottimizzazione della moderna struttura che offre 6 letti di cui 4 completamente monitorizzati con possibilità di inquadramento del paziente affetto da evento cerebrovascolare acuto. L'attività direttiva della Dott.ssa Laura Adobbati è stata particolarmente efficace, avendo portato gli standards dell'attività della Stroke Unit a livello competitivo sia dal punto di vista medico che organizzativo. Il paziente che accede al Pronto Soccorso in tempo utile viene rapidamente inquadrato e può essere sottoposto nei casi indicati a trombolisi intravenosa, intrarteriosa o posizionamento di stent in rapida sequenza anche per la attiva collaborazione con la U.O. di Neuroradiologia e Neurochirurgia dell'IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore di Milano. L'angiografia diagnostica classica viene eseguita nella sala angiografica dell'Istituto Auxologico Italiano come il posizionamento di stents extracranici ed una serie di procedure è stata conclusa con successo: 15 trombolisi intravenose sono state eseguite nel 2013 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 équipe).

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

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

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

### PRODUZIONE SCIENTIFICA 2013

Pubblicazioni su Riviste Internazionali Indicizzate

1. Canu E, Agosta F, Galantucci S, Chiò A, Riva N, Silani V, Falini A, Comi G, Filippi M.  
*Extramotor damage is associated with cognition in primary lateral sclerosis patients.*  
**PLoS One.** 2013 Dec 5;8(12):e82017  
I.F. 3.730
2. Fogh I, Ratti A, Gellera C, Lin K, Tiloca C, Moskvina V, Corrado L, Sorarù G, Cereda C, Corti S, Gentilini D, Calini D, Castellotti B, Mazzini L, Querin G, Gagliardi S, Del Bo R, Conforti FL, Siciliano G, Inghilleri M, Saccà F, Bongioanni P, Penco S, Corbo M, Sorbi S, Filosto M, Ferlini A, Di Blasio AM, Signorini S, Shatunov A, Jones A, Shaw PJ, Morrison KE, Farmer AE, Van Damme P, Robberecht W, Chiò A, Traynor BJ, Sendtner M, Melki J, Meininger V, Hardiman O, Andersen PM, Leigh NP, Glass JD, Overste D, Diekstra FP, Veldink JH, van Es MA, Shaw CE, Weale ME, Lewis CM, Williams J, Brown RH, Landers JE, Ticozzi N, Ceroni M, Pegoraro E, Comi GP, D'Alfonso S, van den Berg LH, Taroni F, Al-Chalabi A, Powell J, Silani V; the SLAGEN Consortium Collaborators.  
*A genome-wide association meta-analysis identifies a novel locus at 17q11.2 associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.*  
**Hum Mol Genet.** 2013 Nov 20 [Epub ahead of print]  
I.F. 7.692
3. Diana V, Bossolasco P, Moscatelli D, Silani V, Cova L.  
*Dose dependent side effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle labeling on cell motility in two fetal stem cell populations.*  
**PLoS One.** 2013 Nov 7;8(11):e78435  
I.F. 3.730
4. Resting state functional connectivity alterations in primary lateral sclerosis. Agosta F, Canu E, Inuggi A, Chiò A, Riva N, Silani V, Calvo A, Messina S, Falini A, Comi G, Filippi M.  
**Neurobiol Aging.** 2014 Apr;35(4):916-25  
I.F. 6.166
5. Ticozzi N, Tiloca C, Calini D, Gagliardi S, Altieri A, Colombrita C, Cereda C, Ratti A, Pezzoli G, Borroni B, Goldwurm S, Padovani A, Silani V.  
doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.037. Epub 2013 Oct  
*C9orf72 repeat expansions are restricted to the ALS-FTD spectrum.*  
**Neurobiol Aging.** 2014 Apr;35(4):936.e13-7  
I.F. 6.166
6. Rossi G, Bastone A, Piccoli E, Morbin M, Mazzoleni G, Fugnanesi V, Beeg M, Del Favero E, Cantù L, Motta S, Salsano E, Pareyson D, Erbetta A, Elia AE, Del Sorbo F, Silani V, Morelli C, Salmona M, Tagliavini F.  
*Different mutations at V363 MAPT codon are associated with atypical clinical phenotypes and show unusual structural and functional features.*  
doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.004. Epub 2013 Sep 7.

- Neurobiol Aging.** 2014 Feb;35(2):408-17.  
I.F. 6.166
7. Sassone J, Maraschi A, Sassone F, Silani V, Ciammola A.  
*Defining the role of the Bcl-2 family proteins in Huntington's disease.*  
**Cell Death Dis.** 2013 Aug 15;4:e772  
I.F. 6.044
  8. Casana R, Halliday A, Bianchi P, Fresa E, Silani V, Parati G, Blengino S, Cireni L, Adobbati L, Calvillo L, Tolva VS.  
*Carotid artery stenting in patients with acute coronary syndrome: a possible primary therapy for symptomatic carotid stenosis.*  
**J Endovasc Ther.** 2013 Aug;20(4):546-51
  9. Körner S, Hendricks M, Kollewe K, Zapf A, Dengler R, Silani V, Petri S.  
*BMC Weight loss, dysphagia and supplement intake in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): impact on quality of life and therapeutic options.*  
**Neurol.** 2013 Jul 12;13:84  
I.F. 2.564
  10. Calini D, Corrado L, Del Bo R, Gagliardi S, Pensato V, Verde F, Corti S, Mazzini L, Milani P, Castellotti B, Bertolin C, Sorarù G, Cereda C, Comi GP, D'Alfonso S, Gellera C, Ticozzi N, Landers JE, Ratti A, Silani V; SLAGEN Consortium.  
*Analysis of hnRNPA1, A2/B1, and A3 genes in patients with amyotrophic lateral sclerosis.*  
doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.025. Epub 2013 Jul 2  
**Neurobiol Aging.** 2013 Nov;34(11):2695.e11-2.  
I.F. 6.166
  11. Cova L, Bigini P, Diana V, Sitia L, Ferrari R, Pesce RM, Khalaf R, Bossolasco P, Ubezio P, Lupi M, Tortarolo M, Colombo L, Giardino D, Silani V, Morbidelli M, Salmona M, Moscatelli D.  
*Biocompatible fluorescent nanoparticles for in vivo stem cell tracking.*  
**Nanotechnology.** 2013 Jun 21;24(24):245603  
I.F. 3.842
  12. Querin G, Melacini P, D'Ascenzo C, Morandi L, Mazzini L, Silani V, Romito S, Mandrioli J, Raimondi M, Pegoraro E, Soraru' G.  
*No evidence of cardiomyopathy in spinal and bulbar muscular atrophy*  
**Acta Neurol Scand.** 2013 Dec;128(6):e30-2  
I.F. 2.474
  13. Cova L, Gelosa P, Mura E, Mauro A, Stramba-Badiale M, Michailidis G, Colonna A, El Assawy N, Pignieri A, Busca G, Tremoli E, Silani V, Sironi L, Zanchetti A.  
*Vascular and parenchymal lesions along with enhanced neurogenesis characterize the brain of asymptomatic stroke-prone spontaneous hypertensive rats.*  
**J Hypertens.** 2013 Aug;31(8):1618-28  
I.F. 3.806
  14. Querin G, D'Ascenzo C, Peterle E, Ermani M, Bello L, Melacini P, Morandi L, Mazzini L, Silani V, Raimondi M, Mandrioli J, Romito S, Angelini C, Pegoraro E, Sorarù G.  
*Pilot trial of clenbuterol in spinal and bulbar muscular atrophy*  
**Neurology.** 2013 Jun 4;80(23):2095-8  
I.F. 8.249



15. Agosta F, Galantucci S, Riva N, Chiò A, Messina S, Iannaccone S, Calvo A, Silani V, Copetti M, Falini A, Comi G, Filippi M.  
*Intrahemispheric and interhemispheric structural network abnormalities in PLS and ALS.*  
**Hum Brain Mapp.** 2013 Apr 30. doi: 10.1002/hbm.22286. [Epub ahead of print]  
I.F. 6.878
  
16. Colombrita C, Silani V, Ratti A.  
*ELAV proteins along evolution: back to the nucleus?*  
**Mol Cell Neurosci.** 2013 Sep;56:447-55  
I.F. 3.837
  
17. Beghi E, Pupillo E, Bonito V, Buzzi P, Caponnetto C, Chiò A, Corbo M, Giannini F, Inghilleri M, Bella VL, Logroscino G, Lorusso L, Lunetta C, Mazzini L, Messina P, Mora G, Perini M, Quadrelli ML, Silani V, Simone IL, Tremolizzo L; Italian ALS Study Group.  
*Randomized double-blind placebo-controlled trial of acetyl-L-carnitine for ALS.*  
**Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.** 2013 Sep;14(5-6):397-405  
I.F. 2.369
  
18. Lerario A, Ciammola A, Poletti B, Girotti F, Silani V.  
*Charles Bonnet syndrome: two case reports and review of the literature.*  
**J Neurol.** 2013 Apr;260(4):1180-6 Review  
I.F. 3.578
  
19. Calzarossa C, Bossolasco P, Besana A, Manca MP, De Grada L, De Coppi P, Giardino D, Silani V, Cova L.  
*Neurorescue effects and stem properties of chorionic villi and amniotic progenitor cells.*  
**Neuroscience.** 2013 Mar 27;234:158-72  
I.F. 3.122
  
20. Gellera C, Tiloca C, Del Bo R, Corrado L, Pensato V, Agostini J, Cereda C, Ratti A, Castellotti B, Corti S, Bagarotti A, Cagnin A, Milani P, Gabelli C, Riboldi G, Mazzini L, Sorarù G, D'Alfonso S, Taroni F, Comi GP, Ticozzi N, Silani V; SLAGEN Consortium.  
*Ubiquilin 2 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia.*  
**J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2013 Feb;84(2):183-7  
I.F. 4.924
  
21. Ticozzi N, Tiloca C, Mencacci NE, Morelli C, Doretto A, Rusconi D, Colombrita C, Sangalli D, Verde F, Finelli P, Messina S, Ratti A, Silani V.  
*Oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with disease-associated mutations.*  
**J Neurol.** 2013 Jan;260(1):85-92  
I.F. 3.578
  
22. Smith BN, Newhouse S, Shatunov A, Vance C, Topp S, Johnson L, Miller J, Lee Y, Troakes C, Scott KM, Jones A, Gray I, Wright J, Hortobágyi T, Al-Sarraj S, Rogelj B, Powell J, Lupton M, Lovestone S, Sapp PC, Weber M, Nestor PJ, Schelhaas HJ, Asbroek AA, Silani V, Gellera C, Taroni F, Ticozzi N, Van den Berg L, Veldink J, Van Damme P, Robberecht W, Shaw PJ, Kirby J, Pall H, Morrison KE, Morris A, de Belleruche J, Vianney

de Jong JM, Baas F, Andersen PM, Landers J, Brown RH Jr, Weale ME, Al-Chalabi A, Shaw CE.

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

**Eur J Hum Genet.** 2013 Jan;21(1):102-8

I.F. 4.319

## Registri

- Registro Nazionale delle Malattie Rare - Istituito dall'Istituto Superiore di Sanità.
- Studio Epidemiologico sull'incidenza delle malattie rare: 50 nuovi casi
- Registro Lombardo della Sclerosi Laterale Amiotrofica.
- Studio epidemiologico su pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica: 31

## Corsi ECM

- I Parkinsonismi Atipici  
Sala Convegni CIERRECI – Milano, 21/02/2013
- Le Demenze Fronto-temporali (FTD)  
Sala Convegni Ospedale San Luca – Milano, 20/06/2013
- Genetica della SLA: nuove scoperte  
Sala Convegni CIERRECI – Milano, 19/09/2013

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

## **SEDE DISTACCATA DEL CENTRO “DINO FERRARI”**

PRESSO IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE,  
CITOGENETICA, ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE, BIOINFORMATICA -  
IRCCS E. MEDEA

### **Responsabile Prof. Nereo Bresolin**

#### **Personale strutturato:**

Dott.ssa 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. Maria Elisabetta Raggi- Biologo IRCCS E. Medea  
Dott.ssa Manuela Sironi - Biologo IRCCS E. Medea

#### **Personale Borsista laureato:**

Dott.ssa Chiara Vantaggiato - Biologo Borsista IRCCS E. Medea  
Dott.ssa Alessia Arnoldi - Biologo Borsista IRCCS E. Medea  
Dott. Giovanni Airoidi - Biotecnologo Borsista IRCCS E. Medea  
Dott.ssa Silvana Beri - Biologo Borsista IRCCS E. Medea  
Dott.ssa Francesca Ciceri - Biologo Borsista IRCCS E. Medea

Ing. Claudia Tresoldi – Ingegnere Biomedico, Borsista IRCCS E. Medea

#### **Dottorandi:**

Dott. Diego Forni, Biotecnologo - Università degli Studi Milano

#### **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

#### **Personale tecnico borsista**

Stefania Riva - tecnico di laboratorio borsista IRCCS E. Medea  
Giorgia Menozzi - Programmatrice borsista IRCCS E. Medea

## Attività scientifica – Anno 2013

L'attività del laboratorio dell'IRCCS E. Medea - Ass.ne La Nostra Famiglia, sede distaccata del Centro "Dino Ferrari", nel corso del 2013 si è focalizzata su diverse linee di ricerca distribuite nelle sezioni di biologia molecolare, citogenetica e bioinformatica. Nelle sezioni di biologia molecolare e citogenetica sono attualmente in corso progetti incentrati sulla caratterizzazione genetico-molecolare di forme di 1) ritardo mentale e autismo 2) patologie e neurodegenerative dell'età pediatrica o giovane-adulta. 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 su patologie con ritardo mentale sindromico e autismo si è continuata l'attività iniziata nell'anno precedente sulla caratterizzazione di casi di sindrome di Phelan McDermid (PMS, MIM 606232) che contiene il gene SHANK3, un gene molto importante per il corretto funzionamento del cervello umano. Tutti i pazienti con PMS mostrano ritardo dello sviluppo e del linguaggio; molti hanno problemi motori, comportamenti di tipo autistico, e talvolta sintomi epilettici.

Questi studi scientifici hanno promosso un contatto diretto tra ricercatori e famiglie colpite da PMS, da cui è scaturita una rete di contatti tra famiglie che si è concretizzata con la nascita dell'Associazione Italiana per la Sindrome di Phelan-McDermid ONLUS (AISPHEM ONLUS). L'IRCCS E. Medea, attraverso una partecipazione attiva di AISPHEM, ha avviato l'implementazione di una biobanca per la collezione di campioni biologici di pazienti con PMS con l'obiettivo di promuovere la ricerca nel campo di questa malattia. I pazienti che hanno ricevuto una diagnosi di Sindrome di Phelan-McDermid sono per la maggior parte bambini. Per questo motivo, a tutt'oggi non si conoscono l'evoluzione clinica e la storia naturale della sindrome. Sono inoltre poco chiare le cause dell'estrema variabilità dei sintomi clinici, solo parzialmente imputabili alle diverse dimensioni della porzione di cromosoma 22 deleta nei diversi pazienti. È in corso pertanto presso l'IRCCS E. Medea un progetto di ricerca clinico-genetico che prevede l'analisi di una coorte di 60 pazienti di età differenti, tra cui bambini, adolescenti e adulti affetti da PMS. L'obiettivo è delineare con maggiore precisione le correlazioni genotipo/fenotipo attraverso un approccio clinico inter-disciplinare e un follow-up sistematico. Cercheremo di conoscere anche il funzionamento del loro cervello mediante studi elettroencefalografici (EEG) e di risonanza magnetica (MRI 3 Tesla). Allo stesso tempo, verificheremo se i pazienti, al di là della comune delezione del cromosoma 22, abbiano altre modifiche genetiche (mutazioni/polimorfismi) che possano spiegare la variabilità dei sintomi nei diversi pazienti con PMS mediante tecniche di next-generation sequencing.

I dati sono in corso di analisi.

Una seconda linea di ricerca si occupa di malattie del motoneurone ad insorgenza precoce ed in particolare di paraparesi spastiche ereditarie. Si è proseguita l'attività di genotipizzazione della casistica dei pazienti a disposizione per i geni nuovi identificati nel 2013 con l'identificazione di nuove mutazioni in SPG56, SPG46 e SPG54 (Citterio et al., 2013). 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.

Alla luce dell'interazione della Spastizina con Beclin1, abbiamo verificato se la Spastizina era in grado di interagire anche con le proteine chiave che sono coinvolte nella formazione dei complessi di Beclin1 che regolano la formazione e la maturazione degli autofagosomi. 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 Uvrag 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).

Abbiamo analizzato le interazioni della Spastizina con le proteine dei complessi di Beclin1 utilizzando cellule HeLa. L'anticorpo anti-Beclin1 co-immunoprecipita la Spastizina in condizioni normali e di induzione di autofagocitosi, confermando l'interazione delle due proteine. In seguito abbiamo utilizzato un anticorpo anti-Spastizina per analizzare le interazioni con Vps34, Atg14, UVRAG e Rubicon. L'anticorpo anti-Spastizina co-immunoprecipita Beclin1 e Vps34, sia in condizioni normali che in condizioni di induzione di autofagocitosi, indicando che la Spastizina interagisce con il complesso centrale Beclin1-Vps34. Inoltre l'anticorpo anti-Spastizina co-immunoprecipita anche Rubicon e UVRAG, ma non Atg14, suggerendo che la Spastizina interagisce con il complesso di Beclin1 che contiene UVRAG e Rubicon, ma non con il complesso contenente Atg14. I dati sono stati confermati anche tramite immunofluorescenza. Complessivamente questi dati dimostrano che la Spastizina è un componente dei complessi autofagici di Beclin1, ma è esclusa dal complesso Atg14-Beclin1.

Abbiamo poi analizzato l'effetto delle mutazioni in spastizina su queste interazioni dimostrando che le mutazioni della Spastizina alterano le interazioni con Beclin1, Rubicon, UVRAG e Vps34. Inoltre la Spastizina non si localizza sugli autofagosomi o sulle *isolation membranes* e le sue mutazioni non alterano la formazione degli autofagosomi. Infine abbiamo dimostrato che le mutazioni della Spastizina e il suo silenziamento inducono accumulo di autofagosomi immaturi nel citosol dei fibroblasti di pazienti e in neuroni ippocampali. Questo dimostra che la spastizina concorre alla maturazione degli autofagosomi e che le sue mutazioni o la sua assenza rallentano questo processo.

Nei neuroni primari abbiamo dimostrato che la spastizina colocalizza parzialmente con il PI3P, gli endosomi precoci ed il reticolo endoplasmatico, confermando i dati della localizzazione della forma transfettata nelle *cos7* e suggerendo che la proteina potrebbe effettivamente avere un ruolo nella regolazione del traffico endosomale. Abbiamo poi testato l'effetto del silenziamento della spastizina nelle prime fasi del differenziamento neuronale utilizzando colture embrionali di ippocampo ottenute da embrioni al 18° giorno di vita embrionale. Il silenziamento della spastizina ha determinato una diminuzione nella lunghezza del neurite nei neuroni derivanti dalle P19, in modo analogo a quanto osservato nell'ippocampo (Vantaggiato et al 2013).

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 inter-specifico (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. Conseguentemente, il pattern di variabilità genetica nell'uomo è determinato anche dalla esposizione agli agenti patogeni subita

dalle popolazioni umane in diverse aree geografiche. In particolare, tale sovrapposizione è evidente per i geni che codificano per molecole regolatorie dell'attivazione dei linfociti T (Forni et al., *Immunity*, 2013). Inoltre, abbiamo potuto identificare nuove varianti di suscettibilità al morbo di Crohn applicando un approccio evolutivo (Cagliani et al., *Mol Biol Evol*, 2013). In particolare, abbiamo dimostrato che numerose varianti di rischio per tale malattia sono aumentate in frequenza nelle popolazioni umane a causa di una pressione selettiva esercitata da protozoi.

Similmente, è probabile che la variabilità genetica in loci coinvolti nello sviluppo delle facoltà cognitive sia stata modellata da forze selettive. Ad esempio, abbiamo studiato il gene *THBS4*, che codifica per una glicoproteina coinvolta in diversi processi tra cui infiammazione e sinaptogenesi. Il gene *THBS4* è espresso a livelli molto più alti nel cervello umano rispetto ai cervelli di scimpanze e macachi e la proteina si accumula nelle placche di beta-amiloide. Abbiamo identificato una regione del gene *THBS4* che è stata sottoposta a selezione bilanciante durante la storia evolutiva dell'uomo. Tale regione porta varianti che modulano l'espressione cerebrale del gene e che hanno un effetto sulla modulazione del volume di sostanza grigia (misurati tramite risonanza magnetica) in pazienti affetti da malattia di Alzheimer (Cagliani et al., 2013).

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 2013 presso il Laboratorio di biologia molecolare citogenetica e bioinformatica:**

- 1) Meccanismi molecolari di degenerazione di motoneuroni in forme complicate di paraparesi spastica ad esordio in età pediatrica.
- 2) Variabilità fenotipica e aploinsufficienza nella sindrome di Phelan/McDermin: identificazione di nuovi geni mediante sequenziamento dell'esoma.
- 3) Alterazioni bioenergetiche e delle vie di clearance cellulare: ruolo nella patogenesi delle patologie degenerative del sistema muscolare e nervoso.
- 4) Analisi di mutazione in geni candidati per epilessie idiopatiche.
- 5) Approccio integrato (genetica di popolazione e next generation sequencing) per l'identificazione di varianti funzionali con effetto patologico
- 6) Identificazione e implementazione di tecniche computazionali per la caratterizzazione RNA-seq di profili di espressione e pattern di splicing.
- 7) Studio del pattern selettivo di geni di risposta antivirale finalizzato all'identificazione di varianti di suscettibilità alla sclerosi multipla

## **Publicazioni Laboratorio Biologia Molecolare, Citogenetica e Bioinformatica**

Al-Daghri Nasser M., Clerici Mario, Al-Attas Omar, Forni Diego, Alokail Majed S., Alkharfy Khalid M., Sabico Shaun, Mohammed Abdul Khader, Cagliani Rachele, Sironi Manuela (2013); *A Nonsense Polymorphism (R392x) In Tlr5 Protects from obesity but predisposes to diabetes;* **The Journal of Immunology**, 190(7):36716-3720  
Doi: 10.4049/jimmunol.1202936 PMID: 23455496  
I.F. 2012: 5,520

Baroncini Anna, Bertuzzo Sara, Quarantini Rita, Ricciardelli Paolo, Giorda Roberto, Bonaglia Maria Clara (2013);  
8q12 Microduplication including chd7: clinical report on a new patient with duane retraction syndrome type 3;  
**Molecular Cytogenetics**, 6(1):49  
Doi: 10.1186/1755-8166-6-49 PMID: 24206642  
I.F. 2012: 2,36

Beri Silvana, Bonaglia Maria Clara, Giorda Roberto (2013);  
Low-Copy repeats at the human *vipr2* gene predispose to recurrent and nonrecurrent rearrangements;  
**European Journal of Human Genetics**, 21(7):757-761  
Doi: 10.1038/ejhg.2012.235 PMID: 23073313  
I.F. 2012: 4,319

Biasin Mara\*, Sironi Manuela\*, Saulle Irma, De Luca Mariacristina, La Rosa Francesca, Cagliani Rachele, Forni Diego, Agliardi Cristina, Lo Caputo Sergio, Mazzotta Francesco, Trabattoni Daria, Macias Juan, Pineda Juan A., Caruz Antonio, Clerici Mario (2013);  
*Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 (erap2) haplotypes play a role in modulating susceptibility to hiv infection; aids*, 27(11):1697-1706  
\* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro  
Doi: 10.1097/QAD.0b013e3283601cee PMID: 23435305  
I.F. 2012: 6,407

Cagliani Rachele, Pozzoli Uberto, Forni Diego, Cassinotti Andrea, Fumagalli Matteo, Giani Matteo, Fichera Marco, Lombardini Marta, Ardizzone Sandro, Asselta Rosanna, De Franchis

Roberto, Riva Stefania, Biasin Mara, Comi Giacomo Pietro, Bresolin Nereo, Clerici Mario, Sironi Manuela (2013);

*Crohn's disease loci are common targets of protozoa-driven selection;*

**Molecular Biology and Evolution**, 30(5):1077-1087

Doi: 10.1093/molbev/mst020 PMID: 23389767

I.F. 2012: 10,353

Cagliani Rachele, Sironi Manuela (2013);

Pathogen-driven selection in the human genome;

**International Journal of Evolutionary Biology**, 2013(ID204240)

Doi: 10.1155/2013/204240 PMID: 23533945

Cagliani Rachele, Forni Diego, Riva Stefania, Pozzoli Uberto, Colleoni Marta, Bresolin Nereo, Clerici Mario, Sironi Manuela (2013);

*Evolutionary analysis of the contact system indicates that kininogen evolved adaptively in mammals and in human populations;*

**Molecular Biology and Evolution**, 30(6):1397-1408

Doi: 10.1093/molbev/mst054 PMID: 23505046

I.F. 2012: 10,353

Cagliani Rachele, Guerini Franca Rosa, Rubio-Acero Raquel, Baglio Francesca, Forni Diego, Agliardi Cristina, Griffanti Ludovica, Fumagalli Matteo, Pozzoli Uberto, Riva Stefania, Calabrese Elena, Sikora Martin, Casals Ferran, Comi Giacomo Pietro, Bresolin Nereo, Caceres Mario, Clerici Mario, Sironi Manuela (2012);

*Long-Standing balancing selection in the thbs4 gene: influence on sex-specific brain expression and gray matter volumes in alzheimer disease;*

**Human Mutation**, 34(5):743-753

Doi: 10.1002/humu.22310 PMID: 23420636

I.F. 2012: 5,213

Cagliani Rachele\*, Forni Diego\*, Tresoldi Claudia, Pozzoli Uberto, Filippi Giulia, Rainone Veronica, De Gioia Luca, Clerici Mario, Sironi Manuela (2013);

Rig-1-like receptors evolved adaptively in mammals, with parallel evolution at lgp2 and rig-1;

**Journal of Molecular Biology**, in press \* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.040 PMID: 24211720

I.F. 2012: 3,905

Citterio Andrea, Arnoldi Alessia, Panzeri Elena, D'Angelo Maria Grazia, Filosto Massimiliano, Dilena Robertino, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Castelli Marianna, Maghini Cristina, Germiniasi Chiara, Menni Francesca, Martinuzzi Andrea, Bresolin Nereo, Bassi Maria Teresa (2013);

Mutations in cyp2u1, ddhd2 and gba2 genes are rare causes of complicated forms of hereditary spastic paraparesis;

**Journal of Neurology**, in press Doi: 10.1007/s00415-013-7206-6 PMID: 24337409

I.F. 2012: 3,578

Forni Diego, Cagliani Rachele, Pozzoli Uberto, Colleoni Marta, Riva Stefania, Biasin Mara, Filippi Giulia, De Gioia Luca, Gnudi Federica, Comi Giacomo Pietro, Bresolin Nereo, Clerici Mario, Sironi Manuela (2013);

*A 175 million year history of t cell regulatory molecules reveals widespread selection, with adaptive evolution of disease alleles;*



**Immunity**, 38(6):1129-1141

Doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.008 PMID: 23707475

I.F. 2012: 19,795

Forni Diego, Cleynen Iasbelle, Ferrante Marc, Cassinotti Andrea, Cagliani Rachele, Ardizzone Sandro, Vermeire Severine, Fichera Maria, Lombardini Marta, Maconi Giovanni, De Franchis Roberto, Asselta Rosanna, Biasin Mara, Clerici Mario\*, Sironi Manuela\* (2013);

*Abo histo-blood group might modulate the predisposition to crohn's disease and affects disease behavior*;

**Journal of Crohn's and Colitis**, in press\* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.16/j.crohns.2013.10.014 PMID: 24268527

I.F. 2012: 3,385

Ranieri Michela, Brajkovic Simona, Riboldi Giulietta, Ronchi Dario, Rizzo Federica, Bresolin Nereo, Corti Stefania, Comi Giacomo Pietro (2013);

*Mitochondrial fusion proteins and human diseases*;

**Neurology Research International**, 2013:293893

Doi: 10.1155/2013/293893 PMID: 23781337

Romaniello Romina, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Citterio Andrea, Tonelli Alessandra, Sforzini Cinzia, Rizzari Carmelo, Pessina Marco, Triulzi Fabio, Bassi Maria Teresa, Borgatti Renato (2013); *Cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts (crmcc) associated with ctcl and ndp mutations*;

**Journal of Child Neurology**, 28(12):1702-1708

Doi: 10.1177/0883073812467849 PMID: 23220793

I.F. 2012: 1,385

Romaniello Romina, Zucca Claudio, Tenderini Erika, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Ragona Francesca, Zorzi Giovanna, Bassi Maria Teresa, Borgatti Renato (2013);

*A novel mutation in stxbp1 gene in a child with epileptic encephalopathy and an atypical electroclinical pattern*;

**Journal of Child Neurology**, in press

Doi: 10.1177/0883073813506936 PMID: 24170257

I.F. 2012: 1,385

Ronchi Dario\*, Di Fonzo Alessio\*, Lin Weiqiang\*, Bordoni Andreina, Liu Changwei, Fassone Elisa, Pagliarani Serena, Rizzuti Mafalda, Zheng Li, Filosto Massimiliano, Ferrò Maria Teresa, Ranieri Michela, Magri Francesca, Peverelli Lorenzo, Li Hongzhi, Yuan Yate-Ching, Corti Stefania, Sciacco Monica, Moggio Maurizio, Bresolin Nereo, Shen Binghui, Comi Giacomo Pietro (2013);

*Mutations in dna2 link progressive myopathy to mitochondrial dna instability*;

**American Journal of Human Genetics**, 92(2):293-300 \* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Doi: 10.1016/J.AJHG.2012.12.014 PMID: 23352259

I.F. 2012: 11,202

Ruggieri Margherita, Riboldi Giulietta, Brajkovic Simona, Bucchia Monica, Bresolin Nereo, Comi Giacomo Pietro, Corti Stefania (2013);

*Induced neural stem cells: methods of reprogramming and potential therapeutic applications*;

**Progress in Neurobiology**, in press Doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.001 PMID: 24246715

I.F. 2012: 9,035

Vantaggiato Chiara, Crimella Claudia, Airoidi Giovanni, Polishchuk Roman, Bonato Sara, Brighina Erika, Scarlato Marina, Musumeci Olimpia, Toscano Antonio, Martinuzzi Andrea, Santorelli Filippo Maria, Ballabio Andrea, Bresolin Nereo, Clementi Emilio, Bassi Maria Teresa (2013); *Defective autophagy in spastizin mutated patients with hereditary spastic paraparesis type 15*;

**Brain**, 136(Pt 10):3119-3139Doi: 10.1093/brain/awt227 PMID: 24030950

I.F. 2012: 9,915

Vantaggiato Chiara, Cantoni Orazio, Guidarelli Andrea, Romaniello Romina, Citterio Andrea, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Doneda Chiara, Castelli Marianna, Airoidi Giovanni, Bresolin Nereo, Borgatti Renato, Bassi Maria Teresa (2013);

*Novel setx variants in a patient with ataxia, neuropathy and oculomotor apraxia are associated with normal sensitivity to oxidative dna damaging agents*;

**Brain and Development**, in press Doi: 10.1016/j.braindev.2013.10.003 PMID: 24183476

I.F. 2012: 1,668

“Centro Dino Ferrari”  
Il Direttore  
Prof. Nereo Bresolin