



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

2017

DIRETTORE PROF. NEREO BRESOLIN

Via F. Sforza, 35 - 20122 Milano – Tel. 02.5503.3809 - Fax 02.5503.3800
E-mail: nereo.bresolin@unimi.it - centro.dinoferrari@policlinico.mi.it - www.centrodinoferrari.com

SEZIONI DEL “CENTRO DINO FERRARI”

- LABORATORIO RADIOISOTIPI DI BIOCHIMICA
E GENETICA Pag. 3
- LABORATORIO DI NEUROIMMUNOLOGIA CLINICA Pag. 19
- LABORATORIO CELLULE STAMINALI NEURALI Pag. 23
- LABORATORIO PARKINSON E ALTRI DISTURBI
DEL MOVIMENTO Pag. 35
- U.O.S.D. MALATTIE NEURODEGENERATIVE Pag. 43
- LABORATORIO DI CELLULE STAMINALI Pag. 55
- U.O.S.D. MALATTIE NEUROMUSCOLARI E RARE Pag. 65
- SEDE DISTACCATA DEL “CENTRO DINO FERRARI” PRESSO
U.O.NEUROLOGIA – STROKE UNIT E LABORA-
TORIO DI NEUROSCIENZE UNIVERSITA’ DEGLI STUDI
DI MILANO
I.R.C.C.S. ISTITUTO AUXOLOGICO ITALIANO Pag. 75
- ELENCO PUBBLICAZIONI 2017 Pag. 101

LABORATORIO DI BIOCHIMICA E GENETICA

- **RESPONSABILE:**

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

- MEDICI:

- Prof. Stefania Corti
- Dott. Francesca Magri
- Dott. Alessandra Govoni
- Dott. Daniele Velardo
- Dott. Roberta Brusa
- Dott. Eleonora Mauri
- Dott. Delia Gagliardi

- BIOLOGI:

- Dott. Roberto Del Bo
- Dott. Sabrina Lucchiari
- Dott. Daniela Piga

- BIOTECNOLOGI

- Dott. Dario Ronchi
- Dott. Serena Pagliarani
- Dott. Federico Ribaudo

- TECNICI

- Sig.Ra Andreina Bordoni
- Sig. Francesco Fortunato

STUDIO DELLE MALATTIE MITOCONDRIALI

Nel corso del 2017, il gruppo di lavoro sulle malattie mitocondriali del Laboratorio di Biochimica e Genetica del Centro Dino Ferrari ha proseguito gli esperimenti relativi al progetto Cariplo “*MITIPS, Assessing neuronal dysfunction in pediatric MITochondrial encephalopathies by induced pluripotent stem (iPS) cells: novel tools to investigate energetic metabolism as a potential therapeutic target*”.

Il progetto ha come tema lo studio della disfunzione mitocondriale nella patogenesi della neurodegenerazione che si osserva nelle encefalomiopatie mitocondriali ad esordio infantile (ed adulto). Nell’ambito di questo tema complesso sono stati perseguiti differenti obiettivivolti alla definizione delle cause molecolari mitocondriali nella genesi di patologie neurodegenerative e alla messa a punto di appropriati modelli cellulari per la loro indagine e la definizione di nuove terapie.

Uso di modelli cellulari innovativi per studiare la Sindrome di Leigh e la Sindrome di Alpers

Abbiamo continuato la caratterizzazione molecolare e biochimica di tre linee di fibroblasti cutanee ottenute da pazienti con le seguenti mutazioni nel gene SURF1 (P1: c.552delG / c.758_759delCA; P2: c.588+1G>A p.Gln251*; P3: c.240+1G>T / c.552delG) e di tre pazienti affetti da Sindrome di Alpers con mutazioni nel gene POLG1 (P4:p.Trp748Ser / p.Tyr1210*; P5: p.Arg232Gly / p.Thr251Ile+p.Pro587Leu; P6: p.Trp175Arg / p.Gly268Ala). Le analisi molecolari hanno confermato il genotipo parentale delle cellule e la compromissione del mantenimento del DNA mitocondriale nelle cellule dei pazienti POLG1 (ma non in quelli SURF1). Le analisi biochimiche e gli studi proteici condotti sulla catena respiratoria hanno documentato una massiva riduzione di assemblaggio (BN-PAGE), struttura (SDS-PAGE) e attività (spettrofotometria) del Complesso IV nei pazienti SURF1 mentre nelle linee POLG1 il difetto risulta meno importante ma più esteso, andando infatti ad interessare tutti i complessi proteici a codifica doppia (mitocondriale e nucleare, cI, cIII, cIV), mantenendo sostanzialmente inalterato il complesso IV. Abbiamo quindi iniziato protocolli di riprogrammazione per l’ottenimento di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) che sono state caratterizzate mediante l’uso di marcatori immunocitochimici e molecolari. Stiamo ora iniziando la fase di differenziamento in senso neuronale che ci porterà ad ottenere ed analizzare prima i progenitori neurali (neural stem cells, NSC) e poi neuroni differenziati maturi. In questo senso una validazione del protocollo è attualmente in corso su una linea di NSC controllo. Il completamento del processo di differenziamento, previsto in due settimane, e la dimostrazione della sua efficacia, ci consentirà di ottenere in tempi rapidi neuroni pazienti-specifici per riprodurre gli studi fin qui condotti su fibroblasti e provvedere ad una analisi accurata proteica e molecolare in un tipo cellulare affetto da queste due forme di encefalopatia mitocondriale.

Modelli neuronali per il “modelling” del Parkinsonismo associato a mutazioni nel gene che codifica per l’elicasi mitocondriale PEO1 (C10Orf2, Twinkle). Abbiamo ottenuto fibroblasti cutanei da 4 pazienti con mutazioni dominanti nel gene PEO1. Nel corso del 2017 abbiamo completato lo studio di queste cellule primarie documentando una ridotta capacità proliferativa e una modesta dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale, rispetto a cellule controllo. Nonabbiamo invece osservato una consistente alterazione nella sintesi e nella attività della catena respiratoria: questo risultato è atteso nei fibroblasti, cellule proliferanti che raramente consentono di evidenziare difetti biochimici negli adulti se non in presenza di gravi difetti strutturali o di assemblaggio della catena respiratoria, tipicamente associati a forme gravi di patologie mitocondriali ad esordio infantile e neonatale. Il contenuto di DNA mitocondriale (ma non di mitocondri) è invece risultato ridotto nelle cellule dei pazienti a confronto con quelle controllo. Inoltre, le cellule studiate hanno dimostrato una

ridotta capacità di riparazione in un test provocativo che le ha esposte ad una elevata concentrazione in acuto di acqua ossigenata.

In seguito abbiamo usato i fibroblasti per generare neuroni dopaminergici attraverso il passaggio di riprogrammazione in cellule staminali pluripotenti indotte. Le cellule staminali pluripotenti ottenute hanno evidenziato una riduzione del contenuto di DNA mitocondriale rispetto ai fibroblasti parentali ma nessuna differenza nel confronto tra cellule dei pazienti PEO1 e gruppo controllo. Questi dati confermano che è possibile ottenere cellule staminali pluripotenti indotte da pazienti con mutazioni nell'elisasi Twinkle. La riduzione di mtDNA osservata è imputabile al processo di riprogrammazione: è noto infatti che le cellule sottoposte a riprogrammazione vadano incontro ad una riduzione del contenuto di mtDNA durante il processo che è lo specchio di una attiva riduzione del numero di mitocondri e del metabolismo ossidativo delle cellule pluripotenti.

Infine abbiamo applicato, per la prima volta, un protocollo di induzione neurale per generare neuroni dopaminergici paziente-specifici in vitro con un difetto primario nell'omeostasi del DNA mitocondriale. Il protocollo utilizzato può essere portato a termine con un ampio grado di riproducibilità e in tempi relativamente brevi pur non presentando una elevata resa, a differenza di altri protocolli con una efficienza maggiore ma in grado di generare cellule dopaminergiche meno mature. I neuroni dopaminergici indotti dei pazienti PEO1 mostrano una riduzione di DNA mitocondriale in parallelo con quanto osservato nei neuroni isolati nei topi mutator (Polg; Dai et al., 2013) e deleter (Twinkle; Song et al., 2012). A differenza dei fibroblasti parentali, i neuroni postmitotici analizzati accumulano alterazioni qualitative del DNA mitocondriale che abbiamo dimostrato essere delezioni multiple. Sorprendentemente abbiamo osservato queste alterazioni anche nella linea controllo ma in misura minore e con una origine diversa rispetto a quelle dei pazienti. Studi neuropatologici hanno mostrato in precedenza che i neuroni dopaminergici, anche isolati da soggetti controllo, sono un tipo cellulare suscettibile ad alterazioni nel contenuto o nella integrità del DNA mitocondriale. Il sequenziamento clonale di frammenti del DNA mitocondriale dei neuroni ha evidenziato che nei pazienti le delezioni ritrovate sono la conseguenza di difetti primari nell'omeostasi del DNA mitocondriale supportando la nostra capacità di replicare nei neuroni dopaminergici le stesse alterazioni molecolari precedentemente osservate nel muscolo scheletrico.

Nel complesso gli studi sul DNA mitocondriale hanno mostrato un incremento del tasso di delezioni multiple del mtDNA nei pazienti e in parte nei controlli e l'assenza di varianti puntiformi, in analogia a quanto recentemente riportato da studi su neuroni isolati da autopsie di pazienti Parkinson analizzati mediante tecniche di sequenziamento di nuova generazione. Anche nelle nostre linee, studi di sequenziamento massivo del DNA mitocondriale e protocolli ad elevatissima sensibilità di digital-PCR, attualmente in corso, potranno essere utili per ottenere una visione più approfondita del grado di fedeltà e integrità dell'informazione contenuta nel DNA mitocondriale.

Gli studi proteici condotti sui neuroni dei pazienti hanno evidenziato, a parità di contenuto di mitocondri, un aumento del contenuto dei diversi complessi della catena respiratoria. In pazienti affetti da parkinsonismo legato a mutazioni in POLG è stata evidenziata neurodegenerazione a livello dello striato in presenza di danni al DNA che però esitano in una deplezione selettiva del complesso I. I neuroni generati in questo studio non confermano questo risultato nel momento in cui sono stati raccolti per l'analisi proteica e biochimica (DIV35). Questo risultato suggerisce che pur in presenza di marcatori apoptotici, la disfunzione energetica non ne costituisce una causa preminente.

Abbiamo infine voluto indagare lo stress ossidativo che è stato saggiato in modo indiretto attraverso la valutazione dell'espressione di proteine ad attività antiossidante come DJ-1, SOD1 e TRX che sono ridotte nei neuroni dei pazienti. I nostri dati sono quindi a supporto dell'idea che sia in atto una risposta indotta da stress ossidativo, la cui presenza va verificata mediante analisi del contenuto di ROS.

In parallelo alle misurazioni mitocondriali abbiamo anche indagato nei modelli neuronali generati l'alfa-Sinucleina (SNCA), una proteina importante per la patogenesi delle forme familiari e sporadiche di malattia di Parkinson, il cui accumulo è stato spesso associato a disfunzione mitocondriale, stress ossidativo o perturbazioni dell'autofagia. Nel nostro studio questa proteina è aumentata notevolmente nei neuroni dopaminergici dei pazienti rispetto al controllo sia a livello trascrizionale sia a livello proteico, in assenza di alterazioni nel numero di copie del gene nucleare SNCA. Questo suggerisce che l'induzione dell'espressione di questa proteina sia legata alle particolari condizioni in cui le cellule dei pazienti si vengono a trovare.

Identificazione di un nuovo difetto genetico associato ad alterazione dell'omeostasi del DNA mitocondriale nelle encefalomiopatie pediatriche ed adulte.

Il 2017 ha visto la conclusione di una ricerca iniziata alcuni anni fa che ha visto l'uso di tecniche di sequenziamento di nuova generazione su alcuni nostri pazienti adulti con alterata omeostasi del DNA mitocondriale (accumulo muscolare di delezioni multiple del mtDNA) e privi di diagnosi molecolare allo screening diagnostico che tradizionalmente viene fatto in laboratorio mediante metodiche classiche. In un nostro paziente è stata identificata una possibile causa genetica (mutazione omozigote) nel gene che codifica per la Complement component 1 Q subcomponent-binding protein (C1QBP; una proteina conosciuta anche come p32) una proteina con varie sedi di localizzazione intracellulare il cui ruolo è ancora poco conosciuto ma che sembra agire dopo localizzazione mitocondriale come un omotrimero in grado di interagire con altre proteine coinvolte nella replicazione e della trascrizione del DNA mitocondriale. Mutazioni nello stesso gene sono state anche identificate in pazienti pediatrici ed adulti nell'ambito di un network collaborativo, sempre in forma recessiva e dopo aver documentato un difetto nell'attività ossidativa mitocondriale nei tessuti affetti disponibili. I bambini presentano una forma di cardiomiopatia accompagnata da sintomi multisistemici (fegato, rene, cervello) mentre i pazienti adolescenti ed adulti, come il nostro, presentano una forma di miopatia con oftalmoplegia esterna progressiva. Nel corso dello studio abbiamo studiato nel muscolo e nei fibroblasti dei pazienti l'omeostasi del DNA mitocondriale, la stabilità e l'attività della catena respiratoria e delle proteine legate alla "dinamica" mitocondriale (fusione/fissione) documentando i deficit di questi meccanismi e riconducendoli ad una riduzione dei livelli di trascritto e proteina p32. Studi di complementazione funzionale hanno dimostrato che la espressione di C1QBP nella sua forma normale (wild-type) erano in grado di contrastare i cambiamenti patologici sia nei modelli cellulari primari (direttamente ottenuti dai pazienti), sia da quelli ad hoc generati mediante editing genomico.

Questo studio, in sintesi, identifica una nuova causa molecolare che sottende al vasto capitolo delle encefalomiopatie mitocondriali pediatriche e dell'adulto.

Aspetti molecolari collegati alle patologie con alterata omeostasi del DNA mitocondriale nell'adulto.

Abbiamo recentemente rivisto la distribuzione dei difetti genetici nucleari associati ad alterata omeostasi del DNA mitocondriale nella nostra popolazione di pazienti adulti (N=127) con malattie mitocondriali associate prevalentemente ad accumulo muscolare di delezioni multiple. Questi dati sono confluiti in una lettera con dati di ricerca originali pubblicata alla fine del 2017 su *Brain*, in risposta ad un lavoro di un gruppo italiano che identificava nuove mutazioni nel gene DGUOK in pazienti adulti con una forma di miopatia mitocondriale associata a Parkinsonismo. Nel 2012 avevamo descritto per primi difetti in questo gene nelle forme adulte di malattia mitocondriale (in precedenza erano note sole forme pediatriche caratterizzate da una grave deplezione del DNA mitocondriale risultante in una sindrome epatocerebrale). L'identificazione di nuovi pazienti adulti con mutazioni in DGUOK,

conferma i dati precedentemente pubblicati dal nostro gruppo ed estende il fenotipo osservato che adesso include anche Parkinsonismo. In particolare questo dato rafforza l'esistenza di un legame tra degenerazione dopaminergica ed alterazione nella omeostasi del DNA mitocondriale, una ipotesi suggerita da modelli animali, cellulari (vedi sopra) e genetici con mutazioni nei geni: POLG1 (Miguel et al., 2014), POLG2 (Van Maldergem et al., 2016), PEO1 (Kiferle et al., 2013), OPA1 (Carelli et al., 2015), MPV17 (Garone et al., 2012) e, da quest'anno, DGUOK (Caporali et al., 2017).

Applicazione della tecnica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) per l'analisi quantitativa del genoma nucleare e mitocondriale nella diagnosi di malattie neurologiche.

L'analisi quantitativa è un requisito fondamentale per l'analisi molecolare di un gene e permette di ottenere un miglioramento della performance diagnostica delle mutazioni associate a quel gene e l'identificazione di particolari condizioni (come lo stato di carrier per delezioni eterozigoti) che non sarebbero apprezzabili mediante approcci non quantitativi. Accanto ai tradizionali saggi di Southern blot e PCR quantitativa, si è rapidamente affermato l'uso di una tecnica indipendente nota come MLPA.

La tecnica MLPA si basa sul principio di ibridazione e amplificazione e permette di quantificare il numero di copie di un ampio numero di sequenze di DNA in un'unica reazione di PCR usando una sola coppia di primers. La caratteristica del MLPA è quella di amplificare non i campioni genomici bensì le sonde aggiunte a tali campioni.

In questo lavoro abbiamo applicato il MLPA a tre condizioni di interesse neurologico: l'amiotrofia spinale (SMA), l'angiomasosi multipla cerebrale (CCM), le mitocondriopatie con alterazioni del DNA mitocondriale (mtDNA). Per ogni scenario, la probemix di sonde corrispondente è stata prima validata, usando campioni a diagnosi nota, e successivamente impiegata nell'analisi di campioni incogniti. I principali risultati sono stati: la riconferma del genotipo SMN1 e un dosaggio più accurato del numero di copie di SMN2 (SMA); l'incremento dei casi con diagnosi molecolare in pazienti con mutazioni in KRIT1 e CCM2 (CCM); la possibilità di verificare simultaneamente la presenza di delezioni e mutazioni puntiformi comuni del mtDNA, accelerando il percorso diagnostico rispetto a Southern blot e sequenziamento del mtDNA.

In particolare, la tecnica MLPA nelle malattie mitocondriali è uno strumento di diagnosi e può essere inserita all'interno dei test diagnostici per l'analisi dei campioni con sospetto di malattia mitocondriale. È in grado di fornire uno screening delle mutazioni puntiformi più comuni del mtDNA e di suggerire la presenza di macroriarrangiamenti che però necessitano la successiva conferma con il southern blot. Infatti, l'analisi quantitativa del DNA mitocondriale rimane un aspetto cruciale nella diagnosi molecolare delle mitocondriopatie. Il sequenziamento tradizionale o di nuova generazione del DNA mitocondriale non è infatti in grado, con gli attuali sistemi di analisi e la piccola dimensione dei frammenti (reads) che vengono generati di individuare in modo efficace la presenza di riarrangiamenti complessi ma al massimo di suggerirne l'esistenza. Quindi gli approcci tradizionali come la long PCR e il Southern blot o quelli più innovativi come il MLPA si rivelano molto utili per offrire un'analisi completa delle variazioni primarie o secondarie del genoma mitocondriale.

Il lavoro svolto ha messo in luce l'utilità del MLPA per l'identificazione dei pazienti con delezioni multiple del DNA mitocondriale, un difetto dell'omeostasi prodotto da mutazioni in geni nucleari. Questo risultato è stato possibile grazie all'utilizzo di una piccola quantità di DNA di partenza che minimizza il contributo del DNA nucleare rispetto a quello mitocondriale, più abbondante nel campione. Vanno comunque notati limiti importanti dell'approccio MLPA: l'incapacità di stimare il valore di eteroplasmia del DNA debole o il tasso di accumulo delle delezioni multiple, due valori utili ai fini della prognosi e facilmente individuabili mediante Southern Blot e PCR quantitativa.

In conclusione l'indagine MLPA ha migliorato o accelerato la diagnosi in pazienti neurologici e nei loro familiari, un prerequisito per una migliore definizione diagnostica e prognostica, il counselling genetico e l'accesso a terapie molecolari o trial clinici.

PATOLOGIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE

Overespressione del gene PSAP, codificante per la proteina Prosaposina, per incrementare l'attività dell'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi (GBA1): una terapia chaperone genetica per la Malattia di Gaucher e il Parkinson sporadico.

Mutazioni recessive nel gene GBA1, che codifica per la glucocerebrosidasi lisosomiale, sono associate a una forma di patologia di accumulo lisosomiale ad esordio pediatrico o adulto nota come malattia di Gaucher. Mutazioni eterozigoti nello stesso gene sono epidemiologicamente più frequenti nei pazienti con malattia di Parkinson sporadica e si ritiene che ne costituiscano il principale fattore di rischio genetico. Questo dato "genetico" rafforza l'ipotesi che una corretta omeostasi lisosomiale sia fondamentale per la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici e che una alterazione del metabolismo di alcuni sfingolipidi possa causare un danno al sistema endo-lisosomiale favorendo alterazioni (come l'accumulo di aggregati lipidici o proteinacei, inclusa l'alfa-sinucleina) che con il tempo provocano la perdita dei neuroni dopaminergici e lo sviluppo dei sintomi cardinali del Parkinson.

PSAP codifica per il precursore della prosaposina che libera nei lisosomi 4 polipeptidi (saposine a, b, c, d) che accelerano e aumentano l'attività di vari enzimi lisosomiali. Il razionale del progetto prevede l'overespressione della prosaposina come strategia terapeutica per i deficit delle attività lisosomiali dipendenti dalla prosaposina. Fin qui abbiamo veicolato il gene PSAP con successo in due linee di fibroblasto controllo, tre linee di fibroblasti ottenuti da pazienti con malattia di Gaucher e tre linee cellulari di pazienti Parkinson con mutazioni eterozigoti nel gene GBA1 (PD-GBA). In tutte le cellule trasfettate abbiamo osservato un aumento dell'attività della GBA1, anche se apparentemente una eccessiva trasfezione è potenzialmente controproducente per l'incremento di attività enzimatica.

Nei nostri esperimenti preliminari la glucocerebrosidasi sembra essere l'unico enzima sensibile al trattamento con PSAP e stiamo quindi concentrando i nostri sforzi su questo enzima.

Gli esperimenti precedenti condotti dal nostro gruppo hanno dimostrato che PSAP agisce aumentando la stabilità di GBA (e quindi l'attività biochimica). La reazione adiuvante è specifica (non modifica l'attività di proteine simili per attività come GBA2 o per localizzazione come GAA) e non è basata su una azione di PSAP come tensioattivo (effetto ipotizzato in precedenza in letteratura). Inoltre riporta verso la normalità alcuni marcatori lisosomiali valutati in esperimento di western blot e immunocitochimica. Oltre ad aumentare la quota di proteina disponibile, sembra consentire un più efficace transito di GBA verso il lisosoma. Infine nelle cellule trattate abbiamo osservato l'aumento del marcitore lisosomiale LAMP1 e la riduzione della Catepsina D, due marcatori che sono stati precedentemente osservati come marcatori patogenetici in modelli analoghi in grado di ritornare verso la normalità dopo terapia con chaperone farmacologica.

Nelle ultime settimane stiamo lavorando ad un saggio di digestione con l'endoglicosidasi H, un enzima che ci consente di seguire la fase di maturazione e targeting intracellulare della GBA1. Questo saggio è utile per verificare la ritenzione di proteine glicosilate mutate all'interno del reticolo endoplasmatico e valutarne la capacità di fuga in seguito a trattamento farmacologico o con chaperone molecolare. L'applicazione di questo saggio ai linfociti potrà essere utilizzato per verificare la sensibilità di mutazioni GBA1 mai descritte a questo saggio (e quindi ad un possibile rescue terapeutico con chaperone genetiche o farmacologiche, come l'ambroxolo). Questo ci metterà in grado da una parte di validare una nuova variante GBA e

dall’altro di capire meglio come funziona (stabilità / catalisi) e quindi come eventualmente “curarla”.

Correzione transiente mediante oligonucleotidi antisenso modificati della mutazione comune IVS1-32-13T>G del gene GAA in fibroblasti ottenuti da pazienti adulti con glicogenosi di tipo II (GSD-II).

Mutazioni nel gene GAA sono responsabili delle forme pediatriche (Malattia di Pompe) ed adulte di glicogenosi di tipo 2 con compromissione della muscolatura respiratoria e cardiaca. In particolare nella popolazione adulta caucasica, la mutazione di splicing (leaky) IVS1-32-13T>G è frequentemente associata al fenotipo e determina l’esclusione parziale dell’esone 2 dal trascritto maturo con conseguente perdita della stabilità del trascritto e della proteina e riduzione dell’attività enzimatica corrispondente (deficit di maltasi acida). Il progetto mira alla messa a punto di una terapia molecolare per la glicogenosi di tipo 2 dell’adulto prendendo come bersaglio due regioni nel promotore del gene GAA: i) un repressore trascrizionale precedentemente identificato in letteratura; ii) una sequenza regolatrice che favorisce l’esclusione dell’esone 2 in presenza della mutazione comune IVS1-32-13T>G. Questa seconda regione è stata già usata come bersaglio di Morfolino Antiseno in altri lavori con sequenze nucleotidiche scelte su base sperimentale. Noi abbiamo optato per una sequenza simile identificata mediante l’uso di una matrice per elementi regolatori di splicing. Abbiamo scelto anche una chimica diversa (ASO con modifica MOE+PTO). Il repressore è bersagliato da MOE1, il modulatore di splicing da MOE2.

Abbiamo inizialmente caratterizzato RNA, attività e stabilità proteica in 4 linee di fibroblasti di pazienti adulti osservando sempre una massiccia perdita di trascritto che include l’esone 2, una riduzione di attività e una riduzione della proteina prodotta (sia precursore che forma matura). Abbiamo anche iniziato a fare una caratterizzazione del contenuto di glicogeno su fibroblasti che risulta pari al controllo o solo di poco aumentato al dosaggio biochimico. E’ comunque apprezzabile una differenza tra pazienti e controlli quando viene effettuata la colorazione PAS (i pazienti mostrano aggregati di glicogeno).

In seguito, abbiamo usato 3 linee di pazienti per mettere a punto le migliori condizioni di trasfezione per i differenti ASO variando tempi, concentrazioni e metodo di trasfezione (CaCl₂ versus Lipofectamina). Abbiamo anche provato a verificare l’efficienza di trasfezione usando una sequenza fluorescente che facesse da tracciante senza grosse differenze nel risultato variando il metodo di trasfezione impiegato. Abbiamo quindi effettuato la trasfezione delle cellule di una paziente con MOE1, MOE2 nei due modi di trasfezione verificando un aumento di attività tra le 3 e 4 volte rispetto alle cellule non trattate. Il western blot ha confermato l’aumento della proteina GAA con un aumento che corrella perfettamente con i dati della attività biochimica. Allo stesso modo due saggi di RT-PCR hanno dimostrato l’aumento dell’inclusione dell’esone 2 che appare più marcato nelle cellule trattate con la sequenza MOE2 rispetto a MOE1. Si osserva comunque un effetto incrociato di entrambe le sequenze su entrambe le attività potenzialmente terapeutiche: aumento stabilità dell’intero trascritto e aumento dell’inclusione dell’esone 2. I dati di RT-PCR sono stati anche confermati all’analisi quantitativa del trascritto (qRT-PCR).

Abbiamo infine valutato alcuni marcatori autofagici nei fibroblasti, pur sapendo che non riproducono l’aspetto del muscolo patologico. Infatti nei pazienti si osserva una riduzione della transizione LC3-I>II, una riduzione di p62 e una riduzione di LAMP1 rispetto ai controlli. Questa “riduzione” lisosomiale è confermata dall’analisi immunoistochimica con FA che appare diminuita nelle cellule dei pazienti rispetto ai controlli. Quanto osservato è l’opposto di ciò che si osserva nel muscolo dei pazienti adulti. Comunque, il trattamento con i MOE è in grado di revertire questi marcatori.

Ci proponiamo ora di estendere il disegno sperimentale a nuovi pazienti e nuovi modelli cellulari (cardiomiociti derivati da iPS ottenuti dai fibroblasti coinvolti nello studio).

ARTICOLI

Ronchi D, Piga D, Lamberti S, Sciacco M, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Pietro Comi G. Reply: **DGUOK recessive mutations in patients with CPEO, mitochondrial myopathy, parkinsonism and mtDNA deletions.** Brain. 2017 Dec 8. doi:10.1093/brain/awx302. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29228135.

Feichtinger RG, Oláhová M, Kishita Y, Garone C, Kremer LS, Yagi M, Uchiumi T, Jourdain AA, Thompson K, D'Souza AR, Kopajtich R, Alston CL, Koch J, Sperl W, Mastantuono E, Strom TM, Wortmann SB, Meitinger T, Pierre G, Chinnery PF, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Moggio M, Sciacco M, Comi GP, Ronchi D, Murayama K, Otake A, Rebello-Guiomar P, Kohda M, Kang D, Mayr JA, Taylor RW, Okazaki Y, Minczuk M, Prokisch H. **Biallelic C1QBP Mutations Cause Severe Neonatal-, Childhood-, or Later-Onset Cardiomyopathy Associated with Combined Respiratory-Chain Deficiencies.** Am J Hum Genet. 2017 Oct 5;101(4):525-538. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.08.015. Epub 2017 Sep 21. PubMed PMID: 28942965; PubMed Central PMCID: PMC5630164.

Santini A, Ronchi D, Garbellini M, Piga D, Protti A. **Linezolid-induced lactic acidosis: the thin line between bacterial and mitochondrial ribosomes.** Expert Opin Drug Saf. 2017 Jul;16(7):833-843. doi: 10.1080/14740338.2017.1335305. Epub 2017 Jun 1. Review. PubMed PMID: 28538105.

ABSTRACTS

Ribaudo F , Aureli M , Schiumarini D , Salani S , Tartari S , Garbellini M , Bordoni A , Tiziano D , Bertini E , Filosto M , Filocamo M , Sonnino S , De Francesco R , Corti S , Bresolin N , Comi GP, Ronchi D. "Patients derived cellular models to investigate the pathogenesis and to develop therapies for human disorders caused by acid ceramidase deficiency". XIX Convention Telethon, March 2017, Riva del Garda, Italy

Ronchi D, Ribaudo F , Aureli M , Schiumarini D , Salani S , Tartari S , Garbellini M , Bordoni A , Tiziano D , Bertini E , Filosto M , Filocamo M , Sonnino S , De Francesco R , Corti S , Bresolin N , Comi GP. "Patients derived cellular models to investigate the pathogenesis and to develop therapies for human disorders caused by acid ceramidase deficiency". 2017 Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Boston, USA

Sperimentazioni cliniche nelle patologie neuromuscolari

Nel corso del 2017, il gruppo di ricerca del Laboratorio di Biochimica e Genetica del Centro Dino Ferrari ha portato avanti numerose sperimentazioni cliniche Nazionali ed Internazionali in pazienti affetti da malattie neuromuscolari, in particolare per quanto riguarda le distrofinopatie, la Miopatia a Corpi Inclusi da mutazioni nel gene GNE e l'Amiotrofia Spinale (SMA).

1. PTC124-GD-019-DMD "An Open-Label Study for Previously Treated Ataluren (PTC124®) Patients with Nonsense Mutation Dystrophinopathy"
2. DSC/11/2357/43 "A Two-Part Study to Assess the Safety and Tolerability, Parmacokinetics, and Effects on Histology and Different Clinical Parameters of Givinostat in Ambulant Children with Duchenne Muscular Dystrophy"
3. PTC124-GD-020e-DMD "A Phase 3 Extension Study of Ataluren (PTC124) in patient with nonsense mutation dystrophinopathy".

4. UX001-CL301 “A Phase 3 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Sialic Acid Extended Release Tablets in Patients with GNE Myopathy (GNEM) or Hereditary Inclusion Body Myopathy (HIBM)”
5. UX001-CL302A phase 3b Open label extension study to evaluate the safety and efficacy of Aceneuramic Acid Extended-release (Ace-ER) Tablets in Patients with GNE Myopathy (GNEM) or Hereditary Inclusion Body Myopathy (HIBM)”
6. BN29854 "OLEOS multicenter, open-label, single arm study to evaluate long-term safety, tolerability and effectiveness of 10mg/kg olexosime in patients with SMA”
7. DSC/14/2357/48 “Randomised, Double Blind, Placebo Controlled, Multicentre Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Givinostat in Ambulant Patients With Duchenne Muscular Dystrophy”
8. PTC124-GD-025o-DMD “Long-Term Observational Study of Translarna Safety and Effectiveness in Usual Care”
9. DSC/14/2357/51 “Open label, long-term safety, tolerability, and efficacy study of GIVINOSTAT in all DMD patients who have been previously treated in one of the GIVINOSTAT studies” Protocollo
10. DSC/15/2357/53 “A randomised, double blind, placebo controlled study to evaluate the micro-macroscopic effects on muscles, the safety and tolerability, and the efficacy of givinostat in patients with Becker Muscular Dystrophy”
11. BP39056 “A Two Part Seamless, Open-label, Multicenter Study to Investigate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy of RO7034067 in Infants With Type 1 Spinal Muscular Atrophy” Protocollo
12. BP39055 “A Two-Part Seamless, Multi-Center Randomized, Placebo-Controlled, Double-blind Study to Investigate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy of RO7034067 in Type 2 and 3 Spinal Muscular Atrophy Patients”

Distrofia Muscolare di Duchenne

Per quanto riguarda la distrofia muscolare di Duchenne sono proseguiti le sperimentazioni con il farmaco Translarna, farmaco in grado di promuovere il reading through di stop codon patologici. Presso la nostra U.O. hanno partecipato alla sperimentazione 11 pazienti, seguiti nell’ambito di sperimentazioni internazionali con valutazioni periodiche ormai da più di quattro anni. I risultati di questi studi, pubblicati e presentati a congressi internazionali hanno consentito di dimostrare che questa molecola è in grado di rallentare la progressione della patologia. Questo ha portato alla autorizzazione alla messa in commercio del farmaco da parte di AIFA per pazienti affetti da DMD portatori da mutazioni nonsenso e deambulanti. E’ questo un passo molto importante in quanto Translarna rappresenta il primo farmaco approvato per la Distrofia Muscolare di Duchenne. Il nostro gruppo di ricerca è attualmente coinvolto in uno studio osservazionale durante il quale verranno raccolti dati dei pazienti precedentemente trattati nelle sperimentazioni al fine di valutare anche l’efficacia a lungo termine del farmaco.

Sempre in pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne è proseguito lo studio di fase II con farmaco Givinostat, molecola che agisce come inibitore dell’istone deacetilasi. Questo studio aveva l’obiettivo di dimostrare la sicurezza del farmaco e i suoi effetti sulla biopsia muscolare ed ha evidenziato dopo un anno di terapia, nei 19 bambini sottoposti al trattamento, un miglioramento a livello del tessuto biotico, in particolare un aumento del calibro delle fibre e della rigenerazione del tessuto. Questi risultati incoraggianti hanno portato al disegno di uno studio internazionale in doppio cieco di fase III, iniziato da settembre, che prevede l’arruolamento di 200 pazienti a livello internazionale al fine di dimostrare l’efficacia del farmaco anche dal punto di vista funzionale e confermare la sua sicurezza. E’ attualmente in corso il reclutamento.

Miopatia a corpi inclusi

Nel corso del 2017 è proseguito terminato lo studio di fase III con acido sialico in pazienti affetti da Miopatia a Corpi inclusi da mutazioni nel gene GNE. Tale forma di miopatia al momento attuale è priva di terapie efficaci, studi di fase II hanno dimostrato una stabilizzazione del quadro clinico nei pazienti trattati con acido sialico, purtroppo non confermati da questo studio di fase III, che ha comunque confermato la sicurezza del farmaco. Presso il nostro reparto sono stati trattati tre pazienti.

Distrofia Muscolare di Becker

Sulla scorta dei risultati promettenti derivati dal trattamento di soggetti affetti da DMD con farmaco Givinostat il gruppo di ricerca del Laboratorio Biochimica e Genetica ha partecipato e vinto un bando finanziato dalla regione Lombardia presentando un progetto che prevede il trattamento con farmaco Givinostat di pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Becker.

Si tratta di uno studio di fase due in doppio cieco contro placebo che prevede la partecipazione di un gruppo di 50 pazienti affetti da BMD deambulanti. I pazienti verranno trattati con il farmaco sperimentale per 12 mesi

L'obiettivo principale di questo studio è verificare se vi sia un miglioramento nella struttura del muscolo, mentre obiettivi secondari saranno la valutazione di eventuali effetti sulle abilità motorie e sul quadro di risonanza muscolare. I pazienti verranno sottoposti a valutazioni funzionali periodiche. Lo studio prevede inoltre all'inizio e alla fine del trattamento l'esecuzione di una biopsia e risonanza muscolare al fine di valutare gli effetti istologici e macroscopici.

Lo studio vuole dimostrare se anche in quest'altra forma di distrofia, il Givinostat, sia in grado di rallentare l'evoluzione della patologia. E' uno studio innovativo perché al momento attuale sono poche o inesistenti le sperimentazioni cliniche su forme di distrofie come la Distrofia Muscolare di Becker e se efficace potrebbe essere applicato anche ad altre forme di distrofia muscolare.

Atrofia Muscolare Spinale

Sperimentazioni cliniche per il trattamento dell'atrofia muscolare spinale.

E' continuato l'impegno nella gestione e nel trattamento di pazienti affetti da atrofia muscolare spinale. In particolare prosegue la sperimentazione clinica con il farmaco Olesoxime per pazienti affetti da atrofia spinale di tipo II e III.

Il nostro centro è risultato inoltre idoneo per la partecipazione alla sperimentazione clinica con la molecola RO7034067 impiegata negli studi Sunfish e Firefish e allo studio clinico di fase 3 con terapia genica per pazienti con SMA I.

Il personale medico risulta coinvolto nella partecipazione a congressi per la condivisione con gli altri centri responsabili a livello nazionale ed internazionale delle strategie terapeutiche ed organizzative per la somministrazione e gestione delle terapie emergenti.

In seguito alla recente approvazione durante il 2017 dell'Agenzia Europea per i Medicinali e dell'AIFA all'utilizzo del farmaco oligonucleotide antisenso Spinraza per il trattamento di pazienti affetti da SMA, il nostro centro è stato selezionato fra quelli dedicati in Lombardia alla somministrazione del farmaco.

- BN29854 – OLEOS ‘Multicenter, open-label, single arm study to evaluate long-term safety, tolerability, and effectiveness of 10 mg/kg Olesoxime in patients with SMA’
- A Two Part Seamless, Multi-Center Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study to Investigate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy of RO7034067 in Type 2 and 3 Spinal Muscular Atrophy Patients
- Investigate Safety, Tolerability, PK, PD and Efficacy of RO7034067 in Infants With Type1 Spinal Muscular Atrophy

- Phase 3, Open-Label, Single-Arm, Single-Dose Gene Replacement Therapy Clinical Trial for Patients with Spinal Muscular Atrophy Type 1 with One or Two SMN2 Copies Delivering AVXS-101 by Intravenous Infusion

Pubblicazioni

Bettica P, Petrini S, D'Oria V, D'Amico A, Catteruccia M, Pane M, Sivo S, Magri F, Brajkovic S, Messina S, Vita GL, Gatti B, Moggio M, Puri PL, Rocchetti M, De Nicolao G, Vita G, Comi GP, Bertini E, Mercuri E.

Histological effects of givinostat in boys with Duchenne muscular dystrophy.

Neuromuscul Disord. 2016 Oct;26(10):643-649.

Bertini E, Dessaud E, Mercuri E, Muntoni F, Kirschner J, Reid C, Lusakowska A, Comi GP, Cuisset JM, Abitbol JL, Scherrer B, Ducray PS, Buchbjerg J, Vianna E, van der Pol WL, Vuillerot C, Blaettler T, Fontoura P;

Olesoxime SMA Phase 2 Study Investigators. Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or non-ambulatory type 3 spinal muscular atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial.

Lancet Neurol. 2017 Jul;16(7):513-522.

McDonald CM(1), Campbell C(2), Torricelli RE(3), Finkel RS(4), Flanigan KM(5), Goemans N(6), Heydemann P(7), Kaminska A(8), Kirschner J(9), Muntoni F(10), Osorio AN(11), Schara U(12), Sejersen T(13), Shieh PB(14), Sweeney HL(15), Topaloglu H(16), Tulinius M(17), Vilchez JJ(18), Voit T(19), Wong B(20), Elfring G(21), Kroger H(21), Luo X(21), McIntosh J(21), Ong T(21), Riebling P(21), Souza M(21), Spiegel RJ(21), Peltz SW(21), Mercuri E(22); Clinical Evaluator TrainingGroup; ACT DMD Study Group. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACTDMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet.** 2017 Sep 23;390(10101):1489-1498.

Govoni A, Gagliardi D, Comi GP, Corti S.

Time Is Motor Neuron: Therapeutic Window and Its Correlation with Pathogenetic Mechanisms in Spinal Muscular Atrophy.

Mol Neurobiol. 2018 Jan 2.

Analisi del tempo impegato per rialzarsi da terra come un fattore predittivo di progressione della malattia nella distrofia muscolare di Duchenne: uno studio osservazionale.

Le prove funzionali a tempo, e più in particolare, il tempo per rialzarsi dal pavimento, sono state proposte come fattori prognostici precoci della progressione della malattia e della perdita della deambulazione. Lo scopo del nostro studio è stato quello di indagare la correlazione tra il tempo impiegato per rialzarsi da terra e il 6MWT per 12 mesi in una coorte di ragazzi Duchenne deambulanti. Un totale di 487 misurazioni a 12 mesi sono state raccolte da 215 ragazzi Duchenne deambulanti. L'età era compresa tra 5.0 e 20.0 anni (media 8.48 ± 2.48 DS).

I risultati del tempo per rialzarsi dal pavimento al basale variava da 1,2 a 29,4 secondi nei ragazzi che potevano eseguire il test. 49 pazienti sono stati in grado di eseguire il test al basale e 87 a 12 mesi. I valori 6MWT variava da 82 a 567 metri al basale. 3 pazienti hanno perso la capacità di effettuare il 6MWT a 12 mesi. La correlazione tra il tempo per rialzarsi dal pavimento e il 6MWT al basale è stata elevata ($r = 0.6$, $p < 0.01$). Sia il tempo per rialzarsi dal pavimento che la linea di base del 6MWT sono elementi validi per predire i cambiamenti del 6MWT nel gruppo di età superiore ai 7 anni, senza alcuna interazione tra le due misure. I

nostri risultati suggeriscono che il tempo per rialzarsi dal pavimento può essere considerato un ulteriore importante fattore prognostico dell'6MWT e, più in generale, di progressione della malattia.

Pubblicazioni

Mazzone ES, Coratti G, Sormani MP, Messina S, Pane M, D'Amico A, Colia G, Fanelli L, Berardinelli A, Gardani A, Lanzillotta V, D'Ambrosio P, Petillo R, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Bonfiglio S, De Sanctis R, Rolle E, Forcina N, Magri F, Vita G, Palermo C, Donati MA, Procopio E, Arnoldi MT, Baranello G, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Torrente Y, Previtali SC, Bruno C, Politano L, Comi GP, D'Angelo MG, Bertini E, Mercuri E.

Timed Rise from Floor as a Predictor of Disease Progression in Duchenne Muscular Dystrophy: An Observational Study.

PLoS One. 2017 Jan;55(1):55-68

Registro Italiano delle Distrofie Muscolari dei Cingoli: frequenza relativa, caratteristiche cliniche e diagnosi differenziale.

Le distrofie muscolari dei cingoli (LGMD) sono patologie degenerative caratterizzate da elevata eterogeneità clinica, frequente overlap e mancanza di miomarcatori specifici. Tuttavia una loro corretta definizione molecolare è fondamentale ai fini prognostici e terapeutici. Nell'ambito di un progetto collaborativo finanziato da Telethon abbiamo creato un registro italiano di pazienti affetti da LGMD che include 370 casi definiti dal punto di vista molecolare. Abbiamo rivisto i dati retrospettivi e prospettici e valutato gli aspetti utili per la diagnosi difefrenziale. Lo studio ha consentito di definire la prevalenza delle difefrenti forme in Italia e alcuni dati clinici fondamentali per ciascun sottotipo quali età di esordio, progressione clinica, coinvolgimento cardiaco e respiratorio.

In una sottogruppo di pazienti attentamente selezionati sono state applicate anche metodiche NGS che hanno consentito di giungere a una diagnosi nel 36,5% dei casi.

Pubblicazioni

Magri F, Nigro V, Angelini C, Mongini T, Mora M, Moroni I, Toscano A, D'Angelo MG, Tomelleri G, Siciliano G, Ricci G, Bruno C, Corti S, Musumeci O, Tasca G, Ricci E, Monforte M, Sciacco M, Fiorillo C, Gandossini S, Minetti C, Morandi L, Savarese M, Di Fruscio G, Semplicini C, Pegoraro E, Govoni A, Brusa R, Del Bo R, Ronchi D, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

The Italian LGMD registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis.

Muscle Nerve. 2016 May 17.

Miopatie congenite: fenotipi clinici e nuovi strumenti diagnostici.

Le miopatie congenite sono un gruppo di disordini neuromuscolari caratterizzati clinicamente da ipotonìa e debolezza, solitamente dalla nascita, e da un decorso clinico statico o lentamente progressivo. Storicamente, le miopatie congenite sono state classificate sulla base delle principali caratteristiche morfologiche osservate sulla biopsia muscolare. Tuttavia, diversi geni sono stati identificati come associati alle varie espressioni fenotipiche ed istologiche di questi disturbi e, negli ultimi anni, a causa della loro eterogeneità genetica e clinica inaspettatamente ampia, il sequenziamento della prossima generazione è stato sempre più utilizzato per la loro diagnosi.

In questo lavoro collaborativo con altri centri italiani è stata raccolta una ampia casistica di pazienti affetti da miopia congenita. Abbiamo raccolto dati clinici e dati relativi agli aspetti biotecnici e di risonanza muscolare al fine di identificare i principali fattori che possono orientare la diagnosi difefrenziale nelle difefrenti forme. Abbiamo esaminato le forme

cliniche e genetiche della miopatia congenita e definito possibili strategie per migliorare il rapporto costo-efficacia nella diagnosi istologica e di imaging. Lo studio NGS è stato utilizzato per definire i casi non ancora caratterizzati dal punto di vista molecolare esiste è dimostrato l'approccio migliore da adottare per la diagnosi genetica in quanto consente costi inferiori e tempi di analisi più brevi rispetto al sequenziamento tradizionale, soprattutto considerando le grandi dimensioni di geni come NEB, TTN e RYR1. È anche interessante notare come alcuni pazienti possono essere portatori di mutazioni diverse in più geni e che alcuni di questi possono avere un ruolo nell'espressione del fenotipo (modulatori del gene).

Pubblicazioni

Cassandrini D, Trovato R, Rubegni A, Lenzi S, Fiorillo C, Baldacci J, Minetti C, Astrea G, Bruno C, Santorelli FM,
Italian Network on Congenital Myopathies. Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools.
Ital J Pediatr. 2017 Nov 15;43(1):101.

Pubblicazioni

Bertini E, Dessaud E, Mercuri E, Muntoni F, Kirschner J, Reid C, Lusakowska A, **Comi GP**, Cuisset JM, Abitbol JL, Scherrer B, Ducray PS, Buchbjerg J, Vianna E, van der Pol WL, Vuillerot C, Blaettler T, Fontoura P;
Olesoxime SMA Phase 2 Study Investigators. Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or non-ambulatory type 3 spinal muscular atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial.
Lancet Neurol. 2017 Apr 28.

Victor RG, Sweeney HL, Finkel R, McDonald CM, Byrne B, Eagle M, Goemans N, Vandenborne K, Dubrovsky AL, Topaloglu H, Miceli MC, Furlong P, Landry J, Elashoff R, Cox D; Tadalafil DMD Study Group (**Comi G**). A phase 3 randomized placebo-controlled trial of tadalafil for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2017 Oct 24;89(17):1811-1820.

McDonald CM, Campbell C, Torricelli RE, Finkel RS, Flanigan KM, Goemans N, Heydemann P, Kaminska A, Kirschner J, Muntoni F, Osorio AN, Schara U, Sejersen T, Shieh PB, Sweeney HL, Topaloglu H, Tulinius M, Vilchez JJ, Voit T, Wong B, Elfring G, Kroger H, Luo X, McIntosh J, Ong T, Riebling P, Souza M, Spiegel RJ, Peltz SW, Mercuri E; *Clinical Evaluator Training Group; ACT DMD Study Group (Comi GP)*.
Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.
Lancet. 2017 Sep 23;390(10101):1489-1498.

CANALOPATIE MUSCOLARI

Le canalopatie muscolari sono caratterizzate da un'alterata eccitabilità della membrana delle cellule muscolari scheletriche. 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 100 soggetti Thomsen/Becker.

La nostra coorte consta, inoltre, di circa 30 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.

In collaborazione con l'UO di Neurologia dell'Università di Siena, abbiamo pubblicato su *Clinical Neurophysiology*:

“Motor axons excitability changes produced by sustained natural activity and response to mexiletine in myotonia congenita”; autori: Federica Ginanneschi, Andrea Mignarri, Sabrina Lucchiari, Gianna Ulzi, Giacomo P. Comi, Alessandro Rossi, Maria Teresa Dotti.

Il lavoro mette in relazione la natura della mutazione genetica con il tracciato elettromiografico, i sintomi clinici (debolezza e paresi transiente) del paziente e la risposta al trattamento farmacologico.

GLICOGENOSI DI TIPO III

La glicogenosi di tipo III (GSDIII) è una malattia genetica rara, con trasmissione autosomica recessiva, con abnorme accumulo di glicogeno nei tessuti, principalmente in fegato e muscolo scheletrico. E' causata da mutazioni nel gene *AGL* che codifica per l'enzima deramificante (GDE). La malattia in genere si manifesta nell'infanzia con epatomegalia, ritardo di crescita e crisi ipoglicemiche, mentre durante l'età adulta si sviluppano miopatia e sovente cardiomiopatia. Il nostro laboratorio studia da anni questa patologia attraverso il dosaggio del contenuto di glicogeno nei tessuti, il dosaggio dell'attività enzimatica e la diagnosi genetica. Abbiamo anche sviluppato un modello murino per la glicogenosi di tipo III che è stato ampiamente caratterizzato e che presenta le caratteristiche essenziali della malattia: epatomegalia, accumulo di glicogeno in tutti i tessuti, principalmente fegato e muscolo scheletrico, e intolleranza all'esercizio fisico. La caratterizzazione del modello animale è stata pubblicata su *BBA-Molecular basis of disease* nel 2014.

Il lavoro su questo modello si è sviluppato in un progetto a finanziamento Telethon (#) con il duplice scopo di:

a) testare a lungo termine diete atte a limitare la deposizione di glicogeno. Abbiamo testato una dieta ad elevato contenuto proteico e basso contenuto di carboidrati (HP diet), e a contenuto proteico ancora maggiore ma totalmente priva di glucosio. Entrambi i trattamenti hanno mostrato un miglioramento della funzionalità muscolare, anche se con grado diverso, valutata come capacità di correre sul treadmill.

b) somministrare a topi privi dell'enzima la proteina GDE funzionale mediante virus adenoassociati, in collaborazione con il Dott. Federico Mingozzi del Genethon di Parigi. Abbiamo testato i primi costrutti e due dei costrutti testati sono in grado di esprimere la proteina veicolata in vivo.

Lo studio relativo al trattamento dietetico è da poco stato sottomesso alla rivista *FASEB Journal* con il titolo “Glucose free/high protein diet improve hepatomegaly and exercise intolerance in Agl-KO mice”. Di seguito gli autori: Serena Pagliarani, Sabrina Lucchiari, Gianna Ulzi, Michela Rapolone, Raffaella Violano, Francesco Fortunato, Andreina Bordoni, Stefania Corti, Maurizio Moggio, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi.

Inoltre, la collaborazione con il team del Dr. Federico Migozzi del Genethon (Evry, Francia) è risultata nella pubblicazione sulla rivista Molecular Therapy del lavoro (appena accettato, Paper #MTJ-17-1544R3)

"Rescue of GSDIII phenotype with gene transfer requires liver- and muscle- targeted GDE expression", autori Patrice Vidal, **Serena Pagliarani**, Pasqualina Colella, Helena Costa Verdera, Louisa Jauze, Monika Gjorgjieva, Francesco Puzzo, Solenne Marmier, Fanny Collaud, Marcelo Sola, Severine Charles, **Sabrina Lucchiari**, Laetitia Van Wittenberghe, Alban Vignaud, Bernard Gjata, Isabelle Richard, Pascal Laforet, Edoardo Malfatti, Gilles Mithieux, Fabienne Rajas, **Giacomo Comi**, Giuseppe Ronzitti, and Federico Migozzi.

Infine, è stata recensita su Neuromuscular Disorders la stesura degli atti del 21th European NeuroMuscular Congres di Naarden 2015 sul tema delle glicogenosi:

"211th ENMC International Workshop: Development of diagnostic criteria and management strategies for McArdle Disease and related rare glycogenolytic disorders to improve standards of care. 17-19 April 2015, Naarden, The Netherlands.

Quinlivan R(1), Andreu AL(2), Martí R(2); Workshop Participants. Collaborators: Andreu A(3), Godfrey R(4), Haller R(5), Laforêt P(6), Lucía A(7), Martí R(3), Martín M(7), Martinuzzi A(8), Oldfors A(9), Ortega X(3), **Pagliarani S**(10), Piirila P(11), Piercy R(12), Pinós T(3), Quinlivan R(12), Scalco R(12), Schoser B(13), Toscano A(10), Vissing J(14), Wakelin A(15).

ATTIVITÀ DEL LABORATORIO DI NEUROIMMUNOLOGIA CLINICA

Prof. Giacomo P. Comi

Neurologo

Dott.ssa Domenica Saccomanno

Biologa

Laboratorio di Neuroimmunologia: Certificazione di qualità INSTAND (europeo) anno 2017
inerente la diagnostica delle neuropatie periferiche disimmuni e delle sindromi neurologiche paraneoplastiche.

Diagnostica:

Il Laboratorio di Neuroimmunologia si occupa del dosaggio dei principali anticorpi associati a neuropatie periferiche (NP) disimmuni quali: polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante (CIDP), neuropatia motoria multifocale (MMN), neuropatia sensitivo-motoria demielinizzante associata a gammopatia monoclonale IgM, sindrome di Guillain Barré (GBS), sue varianti e la sindrome di Miller Fisher (MFS). Si occupa altresì del dosaggio di anticorpi anti-neurone/cervelletto associati alle sindromi neurologiche paraneoplastiche quali: Sindrome di Stiff-person, Atassia cerebellare, Encefalite limbica, Encefalomielite e la Lambert-Eaton Myasthenic Syndrom (LEMS) mediante tecniche di immunofluorescenza indiretta ed immunoblot. Presso il nostro laboratorio è possibile eseguire la ricerca dei seguenti anticorpi: anti- HuD, Yo, Ri, CV2, Amfifisina, Ma1, Ma2, SOX1, Tr, Zic4 e GAD65. Anticorpi anti-MAG ed anticorpi anti-gangliosidi.

Ricerca:

Studio di collaborazione con il Dipartimento di Neuroscienze, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi di Firenze

STUDIO DI CONFRONTO DI METODICHE PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-MAG IN PAZIENTI AFFETTI DA POLINEUROPATIA CRONICA ASSOCIATA AD ANTICORPI ANTI-MAG E GAMMOPATIA MONOCLONALE IgM

(Matà S., Ambrosini S., Saccomanno D., Biagioli T., Carpo M., Amantini A., Giannini F., Barilaro A., Toscani L., Del Mastio M., Comi G. P., Sorbi S. Anti-MAG IgM: differences in antibody tests and correlation with clinical findings. European J. of Neurology. Submitted)

La Polineuropatia (PN) associata a gammopatia monoclonale IgM e ad autoanticorpi anti-MAG (Glicoproteina Associata alla Mielina) è una PN pura o prevalentemente sensitiva con decorso clinico cronico. La demielinizzazione delle fibre nervose evidenziata mediante indagini elettrofisiologiche è prevalentemente distale, ma sono stati riportati diversi casi con neuropatia assonale e forme miste.

Gli anticorpi anti-MAG di classe IgM presenti nel siero dei pazienti possono essere rilevati mediante diverse metodiche: Western Blot (WB); Enzyme-Immuno assay (ELISA) ed immunofluorescenza indiretta (IFA) su nervo di scimmia e sul sistema nervoso centrale di ratto. La metodica in uso nel nostro laboratorio consiste nell'analisi delle proteine mediante WB e permette di rilevare gli autoanticorpi diretti contro gli antigeni della mielina umana del sistema nervoso centrale, attraverso il riconoscimento dell'epitopo trisaccaride HNK-1 (human natural killer-1) presente sulla MAG con due bande intorno ai 100 kDa.

Confrontando i nostri risultati con quelli ottenuti con le altre metodiche , il WB risulta il metodo più specifico mentre l'ELISA e l'IFA sono metodiche con una maggiore sensibilità. Il 53% dei sieri risultati positivi all'ELISA ha mostrato una positività anti-MAG al WB, di cui 11 con titolo anticorpale uguale o superiore al cut-off e nessuna correlazione è stata osservata con le caratteristiche cliniche ed elettrofisiologiche.

I risultati ottenuti con la metodica ELISA, molto più sensibile del WB correlano con una neuropatia prevalentemente assonale mentre tutti i pazienti positivi agli anticorpi anti-HNK-1 rilevati mediante IFA sul sistema nervoso centrale di ratto mostrano una PN demielinizzante

classica prevalentemente distale con decorso benigno, suggerendo che le diverse metodiche per la determinazione degli autoanticorpi possono essere associate a fenotipi clinici diversi.

Studio di collaborazione con l'Unità di Sclerodermia dell'Immunologia Clinica della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Responsabile Dott. Beretta Lorenzo ed il Laboratorio di Autoimmunità del Devoto della nostra Fondazione.

AUTOANTICORPI IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLERODERMIA SISTEMICA CON COINVOLGIMENTO INTESTINALE

La sclerodermia sistemica (SSc) è una rara patologia autoimmune a carico del tessuto connettivo che colpisce la cute e gli organi interni (intestino, polmoni e reni) portando progressivamente a fibrosi e perdita di funzionalità. Il 90% dei pazienti sclerodermici presenta delle problematiche dell'apparato gastrointestinale, ma solo il 40% lo manifesta clinicamente. Le cause di tale coinvolgimento sono molteplici e non del tutto ancora note: il primo evento potrebbe essere rappresentato da un danno delle fibre nervose con atrofia muscolare e comparsa di fibrosi, ma un ruolo importante potrebbe essere anche esercitato dal sistema immunitario.

Tutti i pazienti sclerodermici sono positivi agli anticorpi anti-nucleo (ANA); i cosiddetti anticorpi SSc-specifici: anti-DNA topoisomerasi I (anti Scl-70), anti-RNA polimerasi III e anti-centromero, che mostrano una forte associazione con la malattia. In letteratura è stata riportata la presenza di anticorpi neuronali anti-mienterici in pazienti sclerodermici con coinvolgimento gastrointestinale, che mostravano una reattività Hu-like in immunofluorescenza su intestino di ratto, visibile dopo opportuno assorbimento del siero con estratto di timo, al fine di eliminare gli ANA presenti in tutti i pazienti sclerodermici.

La reattività anti-HuD su cervelletto è caratteristica di pazienti con sindrome neurologica paraneoplastica, ma è stata osservata anche su plesso mienterico in pazienti con pseudo-obstruzione intestinale cronica (CIPPO) e con aganglionite intestinale non paraneoplastica.

Nell'ipotesi di una possibile origine primariamente neuropatica alla base della sintomatologia esofagea ed intestinale della SSc, abbiamo ricercato nel siero dei pazienti l'eventuale presenza di anticorpi diretti contro i neuroni del plesso mienterico.

I sieri dei pazienti affetti da SSc con coinvolgimento più o meno severo, sono stati inizialmente testati mediante immunofluorescenza indiretta su cervelletto ed intestino di primato, tenendo anche conto della positività ANA e tra quelli positivi, alcuni di loro hanno mostrato una fluorescenza molto intensa su entrambi i tessuti. Pazienti con pattern ANA centromericò sono stati esclusi in quanto osservabili solo utilizzando come substrato cellule Hep-2. Il preassorbimento del siero con estratto di timo non ha determinato la negativizzazione degli anticorpi anti-ANA, che sono stati quindi tipizzati e quantificati dall'Autoimmunità, con riscontro di anticorpi anti-Scl-70 SSc-specifici.

Dopo aver trovato le giuste condizioni per i controlli positivi anti-Hu ed anti-Scl-70 in Western Blot (WB) su cellule umane di Purkinje estratte da cervelletto, lo stesso protocollo, con opportune modifiche è stato utilizzato su estratto proteico totale d' intestino crasso umano sano.

Bande aspecifiche e specifiche intorno ai 40kDa e 70kDa sono state osservate in quasi tutti i pazienti SSc, ma la maggior quantità di proteine contenute nell'estratto totale dell'intestino (comprendente non solo il plesso mienterico) e la presenza nel siero degli ANA ha reso decisamente più complicato discriminare tra le bande quella specifica rinviabile agli anticorpi ricercati con reattività Hu-like, che sembrerebbe più simile alla banda del controllo purificato anti-HuC/D e che dovrà essere confermata in WB, una volta isolato il plesso mienterico dal tessuto muscolare dell'intestino umano.

PUBBLICAZIONI

Magri F, Nigro V, Angelini C, Mongini T, Mora M, Moroni I, Toscano A, D'angelo MG, Tomelleri G, Siciliano G, Ricci G, Bruno C, Corti S, Musumeci O, Tasca G, Ricci E, Monforte M, Sciacco M, Fiorillo C, Gandossini S, Minetti C, Morandi L, Savarese M, Fruscio GD, Semplicini C, Pegoraro E, Govoni A, Brusa R, Del Bo R, Ronchi D, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

The italian limb girdle muscular dystrophy registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis.

Muscle Nerve. 2017 Jan;55(1):55-68. doi: 10.1002/mus.25192. PubMed PMID: 27184587.

Ginanneschi F., Mignarri A., Lucchiari S., Ulzi G., Comi G. P., Rossi A., Dotti M. T. *Neuromuscular excitability changes produced by sustained voluntary contraction and response to mexiletine in myotonia congenita.*

Neurophysiologie Clinique 2017 Jan 30. pii: S0987-7053(16)30358-6

Saccomanno D, Tomba C, Magri F, Backelandt P, Ronconi L, Doneda L, Bardella M.T., Comi G.P., Bresolin N, Conte D, Elli L.

Anti-sulfatide reactivity in patients with celiac disease.

Scand J Gastroenterol 2017: 52(4), 409-413.

Buongarzone G, Monfrini E, Franco G, Trezzi I, Borellini L, Frattini E, Melzi V, Di Caprio AC, Ronchi D, Monzio Compagnoni G, Cogiamanian F, Ardolino G, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Di Fonzo A.

Mutations in TMEM230 are rare in autosomal dominant Parkinson's disease.

Parkinsonism Relat Disord. 2017 Mar 9.

Rizzo F, Ramirez A, Compagnucci C, Salani S, Melzi V, Bordoni A, Fortunato F, Niceforo A, Bresolin N, Comi GP, Bertini E, Nizzardo M, Corti S.

Genome-wide RNA-seq of iPSC-derived motor neurons indicates selective cytoskeletal perturbation in Brown-Vialetto disease that is partially rescued by riboflavin.

Sci Rep. 2017;7:46271.

McLaughlin RL, Schijven D, van Rheenen W, van Eijk KR, O'Brien M, Kahn RS, Ophoff RA, Goris A, Bradley DG, Al-Chalabi A, van den Berg LH, Luykx JJ, Hardiman O, Veldink JH;

Project MinE GWAS (Comi GP) Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genetic correlation between amyotrophic lateral sclerosis and schizophrenia.

Nat Commun 2017 21;8:14774

D'Amico A, Catteruccia M, Baranello G, Politano L, Govoni A, Previtali SC, Pane M, D'Angelo MG, Bruno C, Messina S, Ricci F, Pegoraro E, Pini A, Berardinelli A, Gorni K, Battini R, Vita G, Trucco F, Scutifero M, Petillo R, D'Ambrosio P, Ardissoni A, Pasanisi B, Vita G, Mongini T, Moggio M, Comi GP, Mercuri E, Bertini E.

Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy in Italy in the last decade: Critical issues and areas for improvements.

Neuromuscul Disord. 2017 ;27(5):447-451.

Bertini E, Dessaud E, Mercuri E, Muntoni F, Kirschner J, Reid C, Lusakowska A, Comi GP, Cuisset JM, Abitbol JL, Scherrer B, Ducray PS, Buchbjerg J, Vianna E, van der Pol WL, Vuillerot C, Blaettler T, Fontoura P;

Olesoxime SMA Phase 2 Study Investigators. Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or non-ambulatory type 3 spinal muscular atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial.

Lancet Neurol. 2017 Apr 28.

Ripolone M, Violano R, Ronchi D, Mondello S, Nascimbeni A, Colombo I, Fagiolari G, Bordoni A, Fortunato F, Lucchini V, Saredi S, Filosto M, Musumeci O, Tonin P, Mongini T, Previtali S, Morandi L, Angelini C, Mora M, Sandri M, Sciacco M, Toscano A, Comi GP, Moggio M.

Effects of short-to-long term enzyme replacement therapy (ERT) on skeletal muscle tissue in late onset Pompe disease (LOPD).

Neuropathol Appl Neurobiol. 2017 Jun 2.

Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Federico A, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Santorelli FM, Servidei S, Tonin P, Ardissoni A, Bello L, Bruno C, Ienco EC, Diodato D, Filosto M, Lamperti C, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Primiano G, Ronchi D, Rubegni A, Salvatore S, Sciacco M, Valentino ML, Vercelli L, Toscano A, Zeviani M, Siciliano G, Mancuso M.

Revisiting mitochondrial ocular myopathies: a study from the Italian Network.

J Neurol. 2017 Aug;264(8):1777-1784.

Victor RG, Sweeney HL, Finkel R, McDonald CM, Byrne B, Eagle M, Goemans N, Vandenborne K, Dubrovsky AL, Topaloglu H, Miceli MC, Furlong P, Landry J, Elashoff R, Cox D; Tadalafil DMD Study Group (Comi G).

A phase 3 randomized placebo-controlled trial of tadalafil for Duchenne muscular dystrophy.

Neurology. 2017 Oct 24;89(17):1811-1820.

Cassandrini D, Trovato R, Rubegni A, Lenzi S, Fiorillo C, Baldacci J, Minetti, Astrea G, Bruno C, Santorelli FM;

Italian Network on Congenital Myopathies (Comi G). Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools.

Ital J Pediatr. 2017 Nov 15;43(1):101.

McDonald CM, Campbell C, Torricelli RE, Finkel RS, Flanigan KM, Goemans N, Heydemann P, Kaminska A, Kirschner J, Muntoni F, Osorio AN, Schara U, Sejersen T, Shieh PB, Sweeney HL, Topaloglu H, Tulinius M, Vilchez JJ, Voit T, Wong B, Elfring G, Kroger H, Luo X, McIntosh J, Ong T, Riebling P, Souza M, Spiegel RJ, Peltz SW, Mercuri E;

Clinical Evaluator Training Group; ACT DMD Study Group (Comi GP). Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.

Lancet. 2017 Sep 23;390(10101):1489-1498.

Feichtinger RG, Oláhová M, Kishita Y, Garone C, Kremer LS, Yagi M, Uchiumi T, Jourdain AA, Thompson K, D'Souza AR, Kopajtich R, Alston CL, Koch J, Sperl W, Mastantuono E, Strom TM, Wortmann SB, Meitinger T, Pierre G, Chinnery PF, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Moggio M, Sciacco M, Comi GP, Ronchi D, Murayama K, Ohtake A, Rebelo-Guiomar P, Kohda M, Kang D, Mayr JA, Taylor RW, Okazaki Y, Minczuk M, Prokisch H.

Biallelic C1QBP Mutations Cause Severe Neonatal, Childhood, or Later-Onset Cardiomyopathy Associated with Combined Respiratory Chain Deficiencies.

Am J Hum Genet. 2017 Sep 19

LABORATORIO CELLULE STAMINALI NEURALI

Responsabile:
Prof.ssa Stefania Corti

Medici:
Dott. Irene Favarelli

Biologi:
Dott. Sabrina Salani
Dott. Federica Rizzo
Dott. Valeria Parente
Dott. Giulia Forotti

Biotecnologi
Dott. Monica Nizzardo
Dott. Agnese Ramirez
Dott. Paola Rinchetti
Dott. Mafalda Rizzuti
Dott. Michela Taiana
Dott. Valentina Melzi
Dott. Luca Calandriello
Dott. Margherita Bersani

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

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

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

Sono qui presentati in sintesi i risultati ottenuti dalle nostre ricerche nel 2017.

L'analisi proteomica e di RNA-Seq condotta sui motoneuroni umani mostra una selettiva alterazione del citoscheletro nella malattia di Brown–Vialetto–Van Laere che viene parzialmente corretta grazie al trattamento con riboflavina (Rizzo et al. 2017)

La riboflavina (o vitamina B2) è essenziale in numerose reazioni di ossidoriduzione cellulare, ma non è sintetizzata dalle cellule di mammifero. L'assorbimento di riboflavina avviene attraverso i trasportatori umani RFVT1 e RFVT3 nell'intestino e RFVT2 nel cervello. Mutazioni in questi geni sono causativi della malattia di Brown–Vialetto–Van Laere (BVVL), sindrome neurodegenerativa infantile, caratterizzata da una selettiva degenerazione dei motoneuroni punto-bulbari (MN). Ad oggi, non si conosce ancora quale sia la diretta relazione tra le mutazioni nei geni RFVT e la selettiva degenerazione delle cellule neuronali. In questo studio, abbiamo differenziato motoneuroni da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) derivate da pazienti BVVL come modello *in vitro* della malattia. I motoneuroni derivati da iPSC-BVVL mostrano una riduzione marcata della lunghezza assonale, parzialmente migliorata con un supplemento di riboflavina. I dati di RNA sequence e gli studi proteici hanno dimostrato alterazioni nelle componenti chiave delle strutture del citoscheletro e in particolare del neurofilamento. Inoltre, mentre alcuni pathway mitocondriali risultano alterati dalle analisi di RNA sequence, non abbiamo osservato disregolazioni della funzionalità mitocondriale. Lo studio del pathway autofagico ha dimostrato una riduzione del flusso autofagico nei motoneuroni dei pazienti che è stato associato ad una ridotta espressione di Parkin e BNIP3, proteine che sono reclutate sui mitocondri prima della loro distruzione. Queste alterazioni vengono revertite a seguito del trattamento con riboflavina.

Questo studio ha contribuito ad evidenziare alcuni aspetti del meccanismo patogenetico di questa malattia, suggerendo la necessità di sviluppare nuove strategie molecolari complementari al trattamento con riboflavina per una terapia risolutiva.

-Rizzo F, Ramirez A, Compagnucci C, Salani S, Melzi V, Bordoni A, Fortunato F, Niceforo A, Bresolin N, Comi GP, Bertini E, Nizzardo M, Corti S. Genome-wide RNA-seq of iPSC-derived motor neurons indicates selective cytoskeletal perturbation in Brown-Vialetto disease that is partially rescued by riboflavin. *Sci Rep.* 2017 Apr 6;7:46271. doi: 10.1038/srep46271. PubMed PMID: 28382968; PubMed Central PMCID: PMC5382781. **IF: 4.847**

La proteina Sinaptotagmina 13 protegge i motoneuroni dalla degenerazione nella SMA e nella SLA

I meccanismi responsabili della degenerazione selettiva di alcuni sottotipi di motoneuroni nelle malattie del motoneurone, tra cui la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e l'Atrofia Muscolare Spinale (SMA), rimangono ampiamente sconosciuti. Le differenze di espressione dei neuroni oculomotori (OMN), sottopopolazione motoneuronale resistente alla degenerazione in queste malattie, e delle sottopopolazioni vulnerabili quali i motoneuroni (MN) spinali e del tronco encefalico, possono fornire indicazioni per spiegare tale vulnerabilità differenziale. In questo studio, abbiamo osservato che gli OMN esprimono preferenzialmente la proteina sinaptotagmina13 (SYT13) e che tale espressione viene mantenuta negli OMN e nei MN spinali sopravvissuti nei tessuti dei pazienti in fase terminale della malattia. L'overespressione di SYT13 nei modelli in vitro di SLA e SMA migliora la sopravvivenza dei MN umani e ne incrementa la lunghezza assonale. Abbiamo inoltre dimostrato che la somministrazione di SYT13 mediante AAV9 nei modelli murini SMA e SLA ne migliora il fenotipo patologico, ritardandone la denervazione muscolare e prolungandone la sopravvivenza. Queste osservazioni suggeriscono un ruolo della SYT13 come modificatore nella patologia della SMA e della SLA e come possibile bersaglio terapeutico per le malattie del motoneurone. In conclusione, il nostro lavoro dimostra che l'analisi della vulnerabilità dei differenti tipi cellulari potrebbe portare ad identificare nuove strategie terapeutiche per impedire la degenerazione nelle malattie del motoneurone.

- Nizzardo M., Rizzo F., Taiana M., Allodi I., Aguilera Benitez J., Nijssen J., Ulzi G., Melzi V., Del Bo R., Bresolin N., Comi GP, Hedlund E. and Corti S. Synaptotagmin 13 protects motor neurons from degeneration in ALS and SMA. *Articolo in preparazione.*

Analisi di RNA-Sequencing e dei motivi identifica un ruolo critico del complesso SMN/SYNCRIPI e del motivo 7 nell'Atrofia Spinale Muscolare

L'Atrofia Spinale Muscolare (SMA) è una malattia del motoneurone (MN) causata da mutazioni nel gene *SMN1*. Le ragioni per la selettiva vulnerabilità dei MN rimane ad oggi ancora poco chiara. In questo studio, abbiamo condotto un particolare tipo di RNA sequencing su MN umani derivati da pazienti SMA per individuare specifiche alterazioni di espressione genica o di splicing e per identificare la presenza di motivi comuni a questi geni deregolati.

Molti geni deregolati, come quelli appartenenti alla famiglia delle Neurexine o delle Sinaptotagmine, sono implicati in funzioni essenziali dei motoneuroni. Le analisi bioinformatiche dei geni deregolati, tra cui la Neurexina2 (*NRXN2*), hanno evidenziato la presenza di un motivo comune, il motivo 7, che è target di SYNCRIPI. SYNCRIPI interagisce solo con la forma full-length di SMN, legando e modulando diversi trascritti specifici dei MN, tra cui SMN stesso. L'overespressione di SYNCRIPI migliora il fenotipo patologico nei MN-SMA, a seguito di un incremento di espressione di SMN e della *NRXN2*, il loro target a valle, grazie alla presenza di un loop positivo tra queste tre proteine. Il complesso SMN/SYNCRIPI attraverso il motivo 7 potrebbe spiegare la selettiva degenerazione dei MN e rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico.

- Rizzo F, Nizzardo M, Vashisht S, Molteni E, Melzi V, Faravelli I, Salani S, Buccchia M, Taiana M, Bordoni A, Bresolin N, Comi GP, Pozzoli U and Corti S. RNA-Seq and Motif Analysis of Human Motor Neurons Reveal a critical Role of SMN/SYNCRIPI and RNA-Motif 7 in Spinal Muscular Atrophy. *Articolo in sottomissione.*

Una specifica sottopopolazione di cellule staminali neuronali derivate da iPSC, positiva per LewisX, CXCR4 e β1-integrina, migliora il fenotipo patologico in un modello murino di SMARD1

L'atrofia muscolare spinale con distress respiratorio di tipo 1 (SMARD1) è una patologia infantile genetica autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene *IGHMBP2* attualmente

senza cura. Una strategia terapeutica promettente è il trapianto di cellule staminali neurali (NSC) derivate da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), che migliora, anche se senza un recupero completo, il fenotipo del modello animale di SMARD1 nmd, proteggendo i motoneuroni endogeni. Abbiamo osservato che una sottopopolazione specifica di NSC che esprime il marker di staminalità LewisX (LeX), CXCR4 e β 1 integrina (β 1), utile per la migrazione cellulare, risulta essere terapeuticamente vantaggiosa in termini di distribuzione e attecchimento rispetto alle NSC non selezionate. Abbiamo somministrato intratecalmente la frazione selezionata di NSC in modelli murini SMARD1 al giorno postnatale 1 e abbiamo verificato che dopo l'infusione, le NSC LeX + CXCR4+ β 1+ migrano appropriatamente dal sistema nervoso centrale attecchendo nel parenchima del midollo spinale, in particolare nelle corna anteriori. Nei modelli nmd, l'attecchimento della sottopopolazione di NSC selezionata è risultata in un miglioramento significativo delle caratteristiche fenotipiche della malattia. I modelli murini nmd trapiantati hanno mostrato un miglioramento del fenotipo in generale, un recupero delle funzioni neuromuscolari ed un aumento della durata della vita. Abbiamo osservato che questa specifica sottopopolazione di NSC sembra proteggere i motoneuroni endogeni SMARD1 dalla degenerazione e oltre ad un effetto positivo sul corpo cellulare, abbiamo rilevato un effetto benefico anche in periferia, dove le giunzioni neuromuscolari risultano preservate. Inoltre il trapianto di questa specifica sottopopolazione di NSC ha avuto un effetto positivo anche sui tessuti muscolari, che presentano un miglioramento della morfologia e dell'organizzazione delle fibre e una diminuzione degli infiltrati di tessuto adiposo. Con questo lavoro abbiamo dimostrato che il trapianto di una frazione specifica di NSC derivata da iPSC umane selezionata per aumentarne la capacità di migrazione, sopravvivenza e attecchimento, ha un ruolo benefico nella modificazione del decorso della SMARD1, proteggendo i motoneuroni endogeni dalla degenerazione. I nostri risultati confermano il potenziale ruolo del trapianto di NSC nella terapia cellulo-mediata per SMARD1.

Studio di nuovi oligomeri con chimica morfolino per aumentare i livelli di SMN nell'Atrofia Muscolare Spinale

L'atrofia spinale muscolare (SMA) è una malattia del motoneurone autosomica recessiva ed è ad oggi la principale causa genetica di mortalità infantile. La SMA è causata da delezioni o mutazioni nel gene SMN1, che provocano un deficit della proteina SMN. Recentemente, è stato approvato un farmaco che consente la correzione dello splicing aberrante del gene parologo SMN2 mediante oligonucleotidi antiseno (ASO), portando alla produzione di proteina SMN full-length. Il nostro gruppo ha già dimostrato che una specifica sequenza di un ASO, con chimica Morfolino (MO), ha caratteristiche terapeuticamente ottimali per il suo profilo di sicurezza ed efficacia ed è in grado sia di aumentare i livelli di SMN, comportando un recupero del fenotipo patologico nel modello murino di SMA. In questo lavoro, abbiamo ottimizzato questa strategia testando l'efficacia di quattro nuove sequenze MO che presentano come bersaglio il gene SMN2. Due delle quattro nuove sequenze di MO hanno mostrato una migliore efficacia in termini di aumento della produzione della proteina SMN sia nelle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) derivate da pazienti SMA che nel modello murino SMA Δ 7. Inoltre, l'efficienza è stata migliorata in presenza di somministrazioni combinate delle diverse sequenze di MO.

L'ottimizzazione della sequenza target e l'utilizzo di un trattamento basato su una combinazione di diverse sequenze di MO potrebbero supportare ulteriori studi pre-clinici e la progressione verso futuri studi clinici.

-Agnese Ramirez, Sebastiano G. Crisafulli, Mafalda Rizzuti, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi, Stefania Corti, Monica Nizzardo. Accettato a *International Journal of Medical Science*.

Riprogrammazione neuronale guidata da microRNA come strategia terapeutica per le malattie neurologiche (Faravelli et al., 2017)

La perdita di neuroni dovuta a lesioni e malattie del Sistema Nervoso Centrale si traduce in un ampio spettro di condizioni neurologiche e neurodegenerative altamente invalidanti, considerata l'apparente limitata capacità di riparazione endogena di questo tessuto. Pertanto, è importante sviluppare tecnologie che possano promuovere la generazione di cellule staminali neurali e neuroni de novo. I recenti studi sullo sviluppo del sistema nervoso centrale e sulla riprogrammazione cellulare hanno fornito le conoscenze per modulare con precisione fattori di trascrizione e microRNA (miRNA) in modo da ottenere una neurogenesi corretta. In questo articolo, sono discusse le attuali conoscenze sulla riprogrammazione diretta di cellule somatiche non neuronali in cellule staminali neurali o specifici sottotipi neuronali in vitro e in vivo, con un focus particolare sulla riprogrammazione guidata da miRNA. I miRNA possono consentire la conversione diretta del fenotipo in modo rapido ed efficiente modulando i network dei geni attivi durante lo sviluppo che promuovono cambiamenti nell'assetto epigenetico globale, determinando il destino delle cellule. Inoltre, sono presentati gli avanzamenti degli studi sulle potenzialità terapeutiche dei miRNA che possono essere applicate alle patologie del sistema nervoso centrale. La maggiore comprensione del ruolo dei miRNA nello sviluppo e nelle malattie del sistema nervoso centrale, i recenti progressi nelle strategie terapeutiche basate sui miRNA e i metodi innovativi di somministrazione dei farmaci creano nuove prospettive per terapie efficaci per il trattamento delle patologie neurodegenerative.

- Faravelli I, Corti S. MicroRNA-Directed Neuronal Reprogramming as a Therapeutic Strategy for Neurological Diseases. Faravelli I, Corti S. Mol Neurobiol. 2017 Jun 29. doi: 10.1007/s12035-017-0671-7. **IF 6.190**

Il ruolo dei miRNA nella patogenesi e nella terapia dell'Atrofia Muscolare Spinale (Magri F et al., 2017)

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una malattia neurodegenerativa autosomica recessiva caratterizzata dalla selettiva degenerazione dei motoneuroni (MN) nel midollo spinale. La SMA è causata da mutazioni nel gene SMN1 con una conseguente ridotta espressione della proteina SMN full-length. I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Recenti evidenze hanno suggerito un importante ruolo dei miRNA nella patogenesi delle malattie del motoneurone, tra cui anche la SMA. La deregolazione dei miRNA neurone specifici nella SMA potrebbe essere implicata nella loro selettiva vulnerabilità. In questo studio, abbiamo analizzato in maniera critica le conseguenze dei difetti di SMN sui miRNA e sui loro target nei motoneuroni. Nel complesso, questi dati suggeriscono che cambiamenti cellulo-specifici dei miRNA non sono solo coinvolti nel fenotipo patologico dei MN, ma possono anche essere utilizzati come marcatori della malattia e come possibili bersagli terapeutici.

- Magri F, Vanoli F, Corti S. miRNA in spinal muscular atrophy pathogenesis and therapy. J Cell Mol Med. 2017 Nov 21. doi: 10.1111/jcmm.13450. **IF 4.938.**

Metabolismo e deregolazione dei microRNA nella Sclerosi Laterale Amiotrofica (Rinchetti et al., 2017)

I microRNA (miRNA) sono un gruppo di piccole molecole di RNA endogeno non-codificanti, coinvolti nella regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale. Alterazioni nei pathway biologici regolati dai miRNA nel sistema nervoso centrale sono state associate a grave danno neuronale e a morte cellulare, che possono determinare lo sviluppo di malattie neurodegenerative come la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA).

La SLA è una patologia fatale dell'adulto caratterizzata dalla perdita selettiva dei neuroni motori superiori ed inferiori. Nonostante la patogenesi della SLA sia ancora in gran parte sconosciuta, le forme familiari legate a mutazioni nei geni TDP-43 e FUS, così come le forme

sporadiche, mostrano alterazioni in diverse fasi del metabolismo dell'RNA, inclusa la biogenesi e la maturazione dei miRNA. In questo studio, presentiamo una dettagliata revisione della letteratura riguardante il metabolismo dei miRNA, le loro funzioni biologiche ed il ruolo cruciale che essi hanno nella patogenesi della SLA, con particolare attenzione ai differenti pathway biologici compromessi. Una maggiore comprensione del coinvolgimento dei miRNA nella SLA potrebbe essere utile non solo per chiarire il loro ruolo nell'eziopatogenesi, ma anche per chiarire il loro potenziale come marcatori della malattia e come nuovi bersagli terapeutici.

-Rinchetti P, Rizzuti M, Faravelli I, Corti S. MicroRNA Metabolism and Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Mol Neurobiol. 2017 Apr 18. doi: 10.1007/s12035-017-0537-z. PubMed PMID: 28421535. **IF 6.190**.

Meccanismi infiammatori come bersaglio di nuove strategie terapeutiche nella Sclerosi Laterale Amiotrofica (Crisafulli et al., 2017)

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia neurologica caratterizzata da una progressiva perdita dei motoneuroni (MN) corticali, bulbari e spinali. La manifestazione principale della SLA è una progressiva paralisi che porta alla morte in un lasso di tempo compreso tra 3 e 5 anni dopo l'esordio della malattia. Fino ad oggi, le cause patogenetiche supposte sono molteplici, ma nessuna causa comune di danno neuronale è stata ancora identificata. Il danno neuronale mediato dall'infiammazione è sempre più riconosciuto come un fattore importante che promuove la progressione della malattia e amplifica i processi di degenerazione dei MN, anche se fino ad oggi nessuna specifica popolazione ha dimostrato di svolgere un ruolo decisivo.

I dati presenti in letteratura mostrano la presenza di un'interazione complessa tra le cellule immunitarie residenti e le cellule non residenti, come monociti e linfociti T, e una deregolazione nel profilo delle citochine. Dopo una sintesi critica dei più importanti meccanismi coinvolti nella reazione infiammatoria nella SLA, questo lavoro di revisione si concentra sui nuovi strumenti terapeutici finalizzati a ridurre l'infiammazione per migliorare la funzionalità motoria e la sopravvivenza. In particolare, sono discussi studi clinici, in corso o già conclusi, che mirano a modificare il decorso fatale di questa malattia. Sono inoltre elencati alcuni composti anti-infiammatori che sono attualmente sottoposti a studi preclinici e che potranno essere utilizzati come nuovi bersagli molecolari.

-Crisafulli SG, Brajkovic S, Cipolat Mis MS, Parente V, Corti S. Therapeutic Strategies Under Development Targeting Inflammatory Mechanisms in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Mol Neurobiol. 2017 Apr 28. doi: 10.1007/s12035-017-0532-4. **IF 6.190**.

Profilo dei miRNA in iPSC SLA e in motoneuroni derivati da iPSC: implicazioni molecolari e terapeutiche

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia fatale caratterizzata dalla degenerazione progressiva dei motoneuroni (MN). I meccanismi alla base della malattia sono quasi sconosciuti, anche se la deregolazione del metabolismo dell'RNA, tra cui la produzione e la maturazione dei microRNA (miRNA), è già stata associata alla SLA. In effetti, diversi geni mutati nella SLA, come TDP43 e FUS, possono influenzare l'espressione e il processamento dei miRNA. Poiché i miRNA sono altamente espressi nel sistema nervoso centrale e sono necessari per la sopravvivenza di specifici tipi di MN, essi potrebbero svolgere ruoli importanti nell'eziologia o nella progressione della SLA e di altre malattie neurodegenerative. In questo lavoro, ci proponiamo di studiare la deregolazione dei miRNA nelle iPSC umane e nei MN spinali derivati da iPSC di pazienti SLA rispetto ai controlli sani. In particolare, abbiamo riprogrammato i fibroblasti dei pazienti e dei controlli in iPSC e li abbiamo successivamente differenziati in MN spinali. Abbiamo eseguito analisi di Next

Generation Sequencing (NGS) su queste linee per identificare i miRNA deregolati e i loro target biologici. In parallelo, abbiamo analizzato il profilo di espressione dei miRNA presenti in vescicole extracellulari isolate dai terreni di coltura delle iPSC e dei MN. I dati ottenuti saranno sottoposti ad analisi bioinformatica e saranno validati mediante studi molecolari e proteomici sia in modelli in vitro che in vivo della patologia. In conclusione, l'identificazione dei miRNA implicati nella malattia può portare alla scoperta di nuovi biomarcatori e bersagli terapeutici.

-Rizzuti M., Nizzardo M., Melzi V., Filosa G., Dioni L., Calandriello L., Bresolin N., Comi G.P., Barabino S., Corti S. *Articolo in preparazione*.

La riduzione di espressione dell'enzima glutammico decarbossilasi causa difetti sinaptici in modelli di *Drosophila* silenziate per TDP-43

La Sclerosi Laterale Amiotrofica è una malattia neurodegenerativa progressiva che interessa il sistema motorio, in particolare i motoneuroni e le cellule della glia. I difetti neuronali o gliali in presenza di mutazioni di TDP43 comportano una paralisi dovuta ad una degenerazione delle sinapsi neuromuscolari in *Drosophila*. Per approfondire questi aspetti, abbiamo valutato le differenze in termini di espressione proteica tra le *Drosophila* normali e quelle silenziate per TDP43. I risultati hanno mostrato che le *Drosophila* mutanti presentano livelli ridotti dell'enzima glutammico decarbossilasi (Gad1) e una maggiore concentrazione extracellulare di glutammato. Una riespressione di Gad1 nei neuroni o nella glia è sufficiente per recuperare la locomozione delle *Drosophila*, l'organizzazione sinaptica e i livelli di glutammato. Un recupero analogo è stato ottenuto trattando le *Drosophila* silenziate per TDP-43 con antagonisti del recettore del glutammato, dimostrando che Gad1 promuove la sinaptogenesi e previene l'eccitotossicità. Il silenziamento di TDP-43 provoca la riduzione di espressione di GAD67, la proteina omologa di Gad1, in linee cellulari di neuroblastoma umano e modificazioni analoghe sono state osservate nei motoneuroni derivati da iPSC di pazienti con mutazioni in TDP-43, identificando meccanismi patologici conservati alla base della malattia.

- Giulia Romano, Raffaella Klima, Federica Grilli, Nikola Holodkov, Corrado Guarnaccia, Monica Nizzardo, Federica Rizzo, Rodolfo Garcia and Fabian Feiguin. Articolo sottomesso a *Scientific Report*. **IF: 4.847**.

ELENCO LAVORI SCIENTIFICI 2017

Articoli in esteso

Magri F, Vanoli F, Corti S.

miRNA in spinal muscular atrophy pathogenesis and therapy.

J Cell Mol Med. 2017 Nov 21. doi: 10.1111/jcmm.13450. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29160009.

Ronchi D, Piga D, Lamberti S, Sciacco M, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Pietro Comi G.

Reply: DGUOK recessive mutations in patients with CPEO, mitochondrial myopathy, parkinsonism and mtDNA deletions.

Brain. 2017 Dec 8. doi:10.1093/brain/awx302. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29228135.

Faravelli I, Corti S.

MicroRNA-Directed Neuronal Reprogramming as a Therapeutic Strategy for Neurological Diseases.

Mol Neurobiol. 2017 Jun 29. doi: 10.1007/s12035-017-0671-7. PubMed PMID: 28664454.

Crisafulli SG, Brajkovic S, Cipolat Mis MS, Parente V, Corti S.

Therapeutic Strategies Under Development Targeting Inflammatory Mechanisms in Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Mol Neurobiol. 2017 Apr 28. doi: 10.1007/s12035-017-0532-4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28455693.

Rinchetti P, Rizzuti M, Faravelli I, Corti S.

MicroRNA Metabolism and Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Mol Neurobiol. 2017 Apr 18. doi: 10.1007/s12035-017-0537-z. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28421535.

Rizzo F, Ramirez A, Compagnucci C, Salani S, Melzi V, Bordoni A, Fortunato F, Niceforo A, Bresolin N, Comi GP, Bertini E, Nizzardo M, Corti S.

Genome-wide RNA-seq of iPSC-derived motor neurons indicates selective cytoskeletal perturbation in Brown-Vialetto disease that is partially rescued by riboflavin.

Sci Rep. 2017 Apr 6;7:46271. doi: 10.1038/srep46271. PubMed PMID: 28382968; PubMed Central PMCID: PMC5382781.

Buongarzone G, Monfrini E, Franco G, Trezzi I, Borellini L, Frattini E, Melzi V, Di Caprio AC, Ronchi D, Monzio Compagnoni G, Cogiamanian F, Ardolino G, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Di Fonzo A.

Mutations in TMEM230 are rare in autosomal dominant Parkinson's disease.

Parkinsonism Relat Disord. 2017 Mar 9. pii: S1353-8020(17)30088-3.

Magri F, Nigro V, Angelini C, Mongini T, Mora M, Moroni I, Toscano A, D'Angelo MG, Tomelleri G, Siciliano G, Ricci G, Bruno C, Corti S, Musumeci O, Tasca G, Ricci E, Monforte M, Sciacco M, Fiorillo C, Gandossini S, Minetti C, Morandi L, Savarese M, Di Frusco G, Semplicini C, Pegoraro E, Govoni A, Brusa R, Del Bo R, Ronchi D, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

The Italian LGMD registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis.

Muscle Nerve. 2017 Jan;55(1):55-68. doi: 10.1002/mus.25192.

Abstracts presentati a Congressi Internazionali

Nizzardo M., Rizzo F., Taiana M., Rinchetti P., Buccia M., Brajkovic S., Bresolin N., Comi G.P., Barabino S., Corti S.

C9ORF7 2 patient specific iPSC-derived lines as ALS in vitro model.

28th International Symposium on ALS/MND, Boston, USA, 2017.

Rizzuti M., Nizzardo M., Melzi V., Filosa G., Dioni L., Calandriello L., Bresolin N., Comi G.P., Barabino S., Corti S.

MiRNA profiling of ALS iPSCs and iPSC-derived motor neurons: molecular and therapeutic implication.

28th International Symposium on ALS/MND, Boston, USA, 2017.

Nizzardo M., Rizzo F., Taiana M., Allodi I., Aguilabenitez J., Nijssen J., Ulzi G., Melzi V., Del Bo R., Bresolin N., Comi G.P., Hedlund E. and S. Corti.

Synaptotagmin 13 protects motor neurons from degeneration in ALS and SMA.

The Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting, Washington, USA, 2017.

Rizzuti M., Nizzardo M., Melzi V., Filosa G., Dioni L., Calandriello L., Locatelli M., Bresolin N., Barabino S., Comi G.P., Corti S.

microRNAs profile of iPSCs-derived motor neurons as molecular therapy for ALS.

The Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting, Washington, USA, 2017.

Taiana M., Forotti G., Nizzardo M., Bucchia M., Ramirez A., Rizzo F., Bresolin N., Comi G., Corti S.

A specific iPSC-derived neural stem cells subpopulation improves the SMARD1 pathology in human and rodent models.

2017 Annual SMA Conference, Orlando, USA, 2017.

Rizzo F., Nizzardo M., Bucchia M., Vashisht S., Salani S., Melzi V., Bordoni A., Bresolin N., Comi GP, Pozzoli U., and Corti S.

SMN deficiency impairs its interaction with hnRNP proteins altering expression and splicing of axonal and synaptic genes in spinal muscular atrophy.

2017 Annual SMA Conference, Orlando, USA, 2017.

Rizzuti M, Nizzardo M, Melzi V, Filosa G, Dioni L, Calandriello L, Locatelli M, Bresolin N, Barabino S, Comi G, Corti S. Exploiting Integrated miRNAs Analysis of Patient-derived iPSCs-Motor Neurons to Develop a Molecular Therapy for ALS.

American Academy of Neurology Boston, USA, 2017.

Rizzo F., Nizzardo M., Vashisht S., Melzi V., Faravelli I., Salani S., Bucchia M., Taiana M., Bordoni A., Bresolin N., Pozzoli U., Comi G., Corti S.

A Subset of Axonal and Synaptic Genes with Altered Expression/Splicing in SMA-MNs Harbour a Common Motif that Interacts with SMN/SYNCRIPI Complex.

American Academy of Neurology Boston, USA, 2017.

Ronchi D, Ribaudo F , Aureli M , Schiumarini D , Salani S , Tartari S , Garbellini M , Bordoni A , Tiziano D , Bertini E , Filosto M , Filocamo M , Sonnino S , De Francesco R , Corti S , Bresolin N , Comi GP.

"Patients derived cellular models to investigate the pathogenesis and to develop therapies for human disorders caused by acid ceramidase deficiency".

2017 Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Boston, USA

Faravelli I., Rinchetti P., Calandriello L., Forotti G., Cordigliero C., Bresolin N., Comi G.P., Nizzardo M. and Corti S.

Modelling Spinal Muscular Atrophy with human 3D culture systems for pathogenic studies and therapeutic development.

SIBBM 2017, Milan, Italy.

Nizzardo M., Melzi V., Rizzuti M., Filosa G., Calandriello L., Locatelli M., Perego M., Dioni L., Bresolin N., Comi G.P., Barabino S., Corti S.

MicroRNAs analysis of patient-derived iPSCs as molecular therapy for ALS.

ENCALS meeting 2017, Ljubljana, Slovenia, 2017.

Nizzardo M., Rizzo F., Taiana M., Tamanini S., Allodi I., Aguila Benitez J., Nijssen J., Melzi V., Del Bo R., Bresolin N., Comi GP, Hedlund E., Corti S.

Synaptotagmin 13 protects motor neurons from degeneration in

ALS. ENCALS meeting 2017, Ljubljana, Slovenia, 2017.

Brajkovic S., Bucchia M., Nizzardo M., Ramirez A., Rizzo F., Rizzuti M., Rinchetti P., Ulzi G., Bordoni A., Bresolin N., Comi G.P., Corti S.

Antisense oligonucleotides-based therapy as a promising therapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis.

European Academy of Neurology, Amsterdam, 2017.

Abstracts presentati a Congressi Nazionali

Ramirez A, Rizzuti M, Crisafulli S, Rizzo F, Rinchetti P, Taiana M, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Nizzardo M.

Peptide-conjugated Morpholino Oligomers for treatment of Spinal Muscular Atrophy.

Convention Telethon 2017, Riva del Garda, Italy.

Ribaudo F, Aureli M, Schiumarini D, Salani S, Tartari S, Garbellini M, Bordoni A, Tiziano D, Bertini E, Filosto M, Filocamo M, Sonnino S, De Francesco R, Corti S, Bresolin N, Comi GP, Ronchi D.

"Patients derived cellular models to investigate the pathogenesis and to develop therapies for human disorders caused by acid ceramidase deficiency".

XIX Convention Telethon, March 2017, Riva del Garda, Italy

Nizzardo M., Rizzo F., Vashisht S., Salani S., Melzi V., Taiana M., Bresolin N., Comi G.P., Pozzoli U., Corti S.

Axonal and synaptic genes with altered expression/splicing in human Spinal Muscular Atrophy motor neurons: molecular and therapeutic implications.

XVII Congresso Nazionale SINS 2017, Ischia, Italy.

Melzi V, Rizzuti M, Dioni L, Locatelli M, Taiana M, Calandriello L, Filosa G, Comi GP, Nizzardo M, Barabino S, Corti S.

ALS molecular therapy exploiting integrated small RNAs analysis of patient-derived iPSCs.

Simposio nazionale sulla SLA: i passi avanti della ricerca e i nuovi trattamenti, Torino, Italy.

Govoni A., Magri F., Salani S., Del Bo R., Bresolin N., Comi G.P., Nizzardo M., Corti S. *Correlation between IGHMBP2 protein levels in human motor neuron and non-neuronal somatic cells and phenotype of 5 patients affected with spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1.*

17° Congresso Nazionale Associazione Italiana di Miologia, 2017 Siracusa, Italia.

Collaborazioni scientifiche in atto con istituti nazionali ed internazionali:

1. "Studio dei meccanismi molecolari non-cell autonomous nelle malattie del motoneurone" e Progetto NO-MND— "Transferring Non autonomous cell degeneration models" Motor Neuron Center, Columbia University, Prof. S. Przedborski, director of the Center, and Prof. D. Re, New York, N.Y., USA.

2. Progetto NO-MND— "Transferring Non autonomous cell degeneration models", Prof. L. Stefanis Biomedical Foundation, Academy of Athens, Grecia. ("No: 612578, NOMND— Transferring Non autonomous cell degeneration models between EU and USA for development of effective therapies for Motor Neuron Diseases (No-MND) Call FP7- 12 PEOPLE-2013-IRSES").

3. "Studio di nuovi approcci di terapia genica per l'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) e l'atrofia muscolare spinale con Distress Respiratorio (SMARD1)", Prof. Brian K Kaspar, Ph.D, Professore Associato, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital/ The Ohio State University, Center for Gene Therapy, Columbus, Ohio, USA.

4. "Identificazione di molecole con un ruolo neuroprotettivo nelle malattie del motoneurone", Prof. Eva Hedlund, PhD, Professore Associato di Neurobiologia, Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm Sweden

5. "Patogenesi molecolare delle SLA familiare associata a FUS", Dr. Marc Ruepp and Prof. Müehlemann O, University of Bern. Il programma ha previsto lo scambio di ricercatori tra l'University of Bern e UNIMI.
6. "Studio di oligonucleotidi coniugati con peptidi per lo sviluppo di una strategia terapeutica della SMA", Prof. H. Moulton Oregon University.
7. "Ruolo dei trasportatori della riboflavin nelle malattie del motoneurone: Analisi genetiche delle Sindromi Brown Vialecto Van Laere e Fazio Londe e sviluppo di nuove strategie terapeutiche per le malattie del motoneurone" Dr. Enrico Bertini, Laboratorio di Medicina Molecolare, Dipartimento di Neuroscienze, IRCCS Ospedale Bambino Gesu', Roma 13
8. "Basi Molecolari della Sclerosi Laterale Amiotrofica" SLAGEN consortium
9. "European ALS population study", EURALS Consortium
10. "Sviluppo di una strategia terapeutica per mitofusinopatie" in collaborazione con l'Associazione Mitofusina 2 (<http://www.progettomitofusina2.com/it/associazione>).
11. "Studi elettrofisiologici di motoneuroni derivati da cellule staminali in vitro e in vivo", Prof. Luca Imeri, Dipartimento di Fisiologia Umana, Università degli Studi di Milano, Milano
12. "Basi molecolari della SMA", Dr. Uberto Pozzoli, IRCCS E. Medea Bosisio, Parini, Italy
13. "Sintesi di oligomeri morfolinici con nuova struttura chimica per lo sviluppo di strategie terapeutiche per le malattie del motoneurone", Prof. ML Gelmi, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano.
14. "Studio dei meccanismi patogenetici e di possibili approcci terapeutici in Drosophila in comparazione con modelli umani", Prof F. Feiguin, Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Trieste.
15. ALS molecular therapy exploiting integrated small RNAs analysis of patient-derived induced pluripotent stem cells, Prof S. Barabino, Università degli Studi di Milano-Bicocca.

Finanziamenti per progetti di ricerca ottenuti da enti pubblici o privati

1. Telethon Grant "Peptide-conjugated Morpholino for treatment of Spinal Muscular Atrophy", PI, Dott.ssa Nizzardo. 2014-2017
2. Ministry of Health Grant, 2013-2016 "ROLE OF RIBOFLAVIN TRANSPORTERS IN MOTOR NEURON DISEASES: Genetic analysis of the Brown Vialecto Van Laere and Fazio Londe syndromes and development of potential treatment strategies for motor neuron diseases"
3. Cariplò 2013-2016 "Pathogenetic role of differentially expressed/spliced genes in Spinal Muscular Atrophy" PI Dott.ssa Corti.
5. 7PQ NO-MND 2014-2018— Transferring NOn autonomous cell degeneration models between EU and USA for development of effective therapies for Motor Neuron Diseases (MND). FP7-PEOPLE- 2013-IRSES (Finanziamento Comunità Europea).
6. ARISLA grant 2014-2017: ALS molecular therapy exploiting integrated small RNAs analysis of patient-derived induced pluripotent stem cells Project Acronym: smallRNALS
7. JPND grant 2014-2017: Elucidation of common transcriptional targets in vulnerable DopAmine, MotorNeuron and frontotemporal Dementia disease PATHwayS (Finanziamento Comunità Europea).
8. TLF grant 2017-2019: Modulating motor neuron vulnerability using the oculomotor restricted genes IGF-2 and SYT13 for ALS therapy
- 9 Cariplò grant, Young Researcher Biomedical Research 2016-2018: Assessing the pathogenetic role of tRNA and rRNA deregulation in disease-specific human and mouse models to understand pathogenesis and identify molecular therapeutics targets for Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress type 1 (SMARD1) (Finanziamento Cariplò)
10. Sviluppo di una strategia terapeutica per mitofusinopatie" (Finanziamento Associazione Mitofusina 2)

CENTRO PARKINSON ED ALTRI DISTURBI DEL MOVIMENTO

- **Responsabile:**

- **Dr. Alessio Di Fonzo**

- Medici:

- Dott. Emanuele Frattini
- Dott. Edoardo Monfrini
- Dr.ssa Giulia Franco
- Dr.ssa Linda Borellini
- Dr.ssa Ilaria Trezzi
- Dr.ssa Federica Arienti
- Dr.ssa Giulia Lazzeri

- MD/PhD Student

- Dr. Giacomo Monzio Compagnoni

- Biotecnologi:

- Dott.ssa Valentina Melzi

- Medici in training:

- Giacomo Bitetto
- Maria Vizziello
- Arianna Manini

Nel corso dell'anno 2017 le attività del gruppo di ricerca dedicato alla malattia di Parkinson ed altri disturbi del movimento hanno riguardato le indagini molecolari e biochimiche volte ad indagare l'eziologia e la patogenesi dei pazienti che afferiscono all'ambulatorio dedicato.

Grazie all'ingresso del Gruppo Parkinson nel Fresco Institute Center of Excellence è stata implementata l'attività clinico assistenziale e di ricerca in modo sostanziale. Sono iniziati studi promossi dalla National Parkinson Foundation (Parkinsons' Outcome Project) volti a definire aspetti di qualità di vista e di storia naturale dell'evoluzione della malattia di Parkinson.

Oltre all'attività inherente la ricerca clinica, nel 2017 sono stati condotti anche studi relativi all'individuazione di biomarcatori specifici per la malattia di Parkinson e i parkinsonismi. In particolare è stato condotto uno studio mediante Risonanza Magnetica volto a definire specifiche differenze nei parkinsonismi relativamente alle sequenze per la Neuromelanina in collaborazione con l'Unità di Neuroradiologia di questo Ospedale, il Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano e il Vanderbilt University Medical Center di Nashville (USA).

Inoltre, gli studi sugli aspetti genetici della malattia di Parkinson, condotti con la collaborazione d'istituti a carattere nazionale e internazionale, hanno permesso di individuare nuove mutazioni genetiche sia nelle forme giovanili sia in quelle adulte della malattia. Il lavoro condotto ha portato a numerose pubblicazioni scientifiche e presentazioni a congressi internazionali (Movement Disorder Meeting, World Parkinson Congress e International Congress on Parkinsonisms and Related Disorders).

Parallelamente sono stati portati avanti diversi progetti finalizzati all'identificazione di deficit enzimatici, in particolare dell'enzima lisosomiale Glucocerebrosidasi, sia nei linfociti che nei fibroblasti dei pazienti.

La ricerca del 2017 ha consentito di raggiungere importanti risultati nella comprensione dei meccanismi implicati anche in altri disturbi del movimento quali le atassie spino cerebellari, nelle quali è stato in particolare identificato un nuovo gene responsabile di una forma infantile. Si è venuta così a creare una fruttuosa collaborazione a livello internazionale nello studio dei neuroni di una forma di atassia spastica di recente identificazione.

Inoltre sono stati portati avanti gli ambiziosi progetti di studio della patogenesi della malattia di Parkinson e dell'Atrofia Multisistemica in modelli cellulari di neuroni, oligodendrociti e organoidi cerebrali generati a partire da cellule staminali pluripotenti indotte di pazienti affetti.

Più recentemente sono ancora in corso due studi osservazionali multicentrici volti alla creazione di registri nazionali e internazionali. In particolare il primo studio è promosso dal Centro per le Malattie Neurodegenerative dell'A.O.U. Ruggi d'Aragona di Salerno e si propone di creare un registro nazionale sui disordini del movimento rari e tremori. Mentre il secondo a carattere internazionale, promosso dalla National Parkinson Foundation (USA) e dal titolo "Parkinson's Outcomes Project", ha come obiettivo primario quello di creare un registro internazionale di pazienti con malattia di Parkinson.

1) Screening genetici nella Atrofia Multisistemica e nelle atassie spinocerebellari.

Lo studio dei parkinsonismi atipici parte dalla raccolta di campioni biologici dei pazienti con atrofia multisistema di cui il Policlinico è centro di riferimento. Sono stati raccolti oltre 80 campioni di sangue da cui è stato estratto il DNA per valutare i fattori genetici causativi di atrofia multi sistemica. Inoltre lo studio di una famiglia con atassia ad esordio adolescenziale ha portato all'identificazione di un nuovo gene implicato in questa forma.

- Mutations in endocytic recycling protein Rab11FIP3 are associated with ataxia and intellectual disability. Monfrini E, Ronchi D, Di Biase E, Franco G, Melzi V, Bordoni A,

Borellini L, Trezzi I, Compagnoni GM, Frattini E, Bonato S, Bresolin N, Corti S, Comi GP, Di Fonzo A. *Scientific Reports, submitted*

- **Evaluation of mitochondrial dysfunction in fibroblasts and iPSC-derived dopaminergic neurons of patients affected by Multiple System Atrophy.** Compagnoni GM, Frattini E, Fortunato F, Ronchi D, Bordoni A, Garbellini M, Salani S, Guida M, Bresolin N, Corti S, Comi GP, Di Fonzo A. (2017). In *MOVEMENT DISORDERS* (Vol. 32). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY.

2) Screening genetico e analisi funzionale in pazienti con malattia di Parkinson.

Le varianti eterozigoti del gene GBA rappresentano il fattore di rischio genetico più frequente della malattia di Parkinson. Abbiamo analizzato per mutazioni dell'intero gene circa cento pazienti affetti da forme familiari e sporadiche della malattia identificando mutazioni in circa il 10%. Inoltre partendo da linfociti dei pazienti affetti sono state eseguite analisi biochimiche volte a determinare sia l'attività enzimatica del gene che i livelli di proteina. I risultati sono stati oggetto di relazione a congressi internazionali e sono in fase di submission come lavoro scientifico in collaborazione con altri 5 centri Italiani che hanno eseguito l'analisi genetica e hanno inviato presso il nostro centro i linfociti per le analisi funzionali. Inoltre studi di analisi di linkage e di analisi mutazionali di lati geni sono stati eseguiti e hanno portato a importanti risultati volti ad identificare nuovi geni coinvolti nella malattia di Parkinson.

Malaguti, M.C., Monfrini, E., Straniero, L., Duga, S., Di Fonzo, A.

-*SNCA duplication and heterozygous STUB1 mutation in a patient whit spastic ataxia.*

Verona 2017

III Congresso Accademia LIMPE-DISMOV.

Ciammola, A., Carrera, P., Cinnante, C., Villa, R., Poletti, B., Girotti, F., Buongarzone, G., Monfrini, E., Sassone, J., Silani, V., D'Adamo, P., Di Fonzo, A., Bonati, M. T.

A novel RAB39B gene mutation in an Italian family.

Verona 2017 –

III Congresso Accademia LIMPE-DISMOV.

Buongarzone, G., Monfrini, E., Franco, G., Trezzi, I., Borrellini, L., Frattini, E., Ardolino, G., Cogiamanian, F., Di Fonzo, A.

TMEM230 mutations are not frequent in Italian patients with autosomal dominant Parkinson's disease.

Verona 2017

III Congresso Accademia LIMPE-DISMOV.

Monfrini, E., Buongarzone, G., Dilena, R., Di Fonzo, A.

Identification of a novel de novo heterozygous C19orf12 frameshift mutation in a young woman with Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA).

Verona 2017

III Congresso Accademia LIMPE-DISMOV.

Buongarzone G., Fenoglio, C., Nicoli, J., Monfrini, E., Trezzi, I., Arighi, A., ... & Corti, S. (2017).

Glucocerebrosidase mutations in neurodegenerative disorders other than Parkinson's Disease.

In *Movement Disorders* (Vol. 32). 111 River St, Hoboken 07030-5774, NJ USA: Wiley.

Trezzi, I., Frattini, E., Monfrini, E., Compagnoni, G.M., Arienti, F., Bordoni, A., Salani, S., Bitetto, G., Cassinerio, E., Motta, I., Nascimbeni, F., Carubbi, F., Scarpini, E., Bresolin, N., Comi, G., Corti, S., Cappellini, M., Di Fonzo, A.

The role of glucocerebrosidase in neurodegeneration associated to Gaucher's Disease and other neurodegenerative diseases.

(XLVIII Congresso Nazionale SIN, 14-17 Ottobre 2017, NAPOLI).

Monfrini, E., Melzi, V., Buongarzone, G., Franco, G., Ronchi, D., Dilena, R., Scola, E., Vizziello, P., Bordoni, A., Bresolin, N., Comi, G.P., Corti, S., Di Fonzo, A.

A de novo C19orf12 heterozygous mutation in a patient with MPAN.

Parkinsonism & Related Disorders, submitted

Buongarzone G., Monfrini E., Franco G., Trezzi I., Borellini L., Frattini E., Melzi V., Di Caprio A.C., Ronchi D., Monzio Compagnoni G., Cogiamanian F., Ardolino G., Bresolin N., Comi G.P., Corti S., Di Fonzo A (2017).

Mutations in TMEM230 are rare in autosomal dominant Parkinson's disease.

Parkinsonism & Related Disorders, 39, 87-88.

Linkage to chromosome 2q36 in a large pedigree with Parkinson's disease,
Vietnam 2017-

XXII World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders

3) Generazione e caratterizzazione di neuroni dopaminergici e midbrain orgnaoids da cellule staminali pluripotenti indotte da pazienti con atrofia multisistmeica e malattia di Parkinson
Lo studio iniziato nel 2015 è proseguito anche quest'anno portando risultati innovativi. Per quanto riguarda l'MSA infatti la caratterizzazione dei neuroni ha portato a identificare una aumentata quantità di alpha-synuclein, la proteina che in questa malattia si accumula sia negli oligodendrociti che nei neuroni, soprattutto nel citoplasma. Per meglio definire l'origine dell'aumento dell'alpha-synuclein sono stati eseguite analisi di RNA che hanno mostrato anche un aumento del trascritto del gene, e in collaborazione con il dipartimento di genetica medica anche studi epigenetici gene SNCA che hanno mostrato una riduzione della metilazione del gene e conseguente aumento dell'espressione genica. Gli studi sul Parkinson hanno portato invece alla generazione di neuroni di iPSCs di pazienti con diversi forme monogeniche di malattia. In questi casi abbiamo valutato l'attività di alcuni enzimi lisosomiali e identificato una risposta ottimale alla somministrazione di molecole chaperon nel ristabilire i normali livelli di attività di questi enzimi.

Infine abbiamo generato un modello innovativo, l'organoida con differenziamento mesencefalico, per meglio studiare la patogenesi della malattia in un tessuto simile a quello dei pazienti.

I risultati sono stati presentati a congressi internazionali, nazionali e sono in fase di submission come lavori scientifici originali.

Compagnoni GM, Frattini E, Fortunato F, Ronchi D, Bordoni A, Garbellini M, Salani S, Guida M, Bresolin N, Corti S, Comi GP, Di Fonzo A. (2017).

Evaluation of mitochondrial dysfunction in fibroblasts and iPSC-derived dopaminergic neurons of patients affected by Multiple System Atrophy.

In Movement Disorders (Vol. 32). 111 River St, Hoboken 07030-5774, NJ USA: Wiley.

Lavori scientifici

Monfrini E, Melzi V, Buongarzone G, Franco G, Ronchi D, Dilena R, Scola E, Vizziello P, Bordoni A, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Di Fonzo A.

A de novo C19orf12 heterozygous mutation in a patient with MPAN.

Parkinsonism Relat Disord. 2017 Dec 27

Straniero L, Rimoldi V, Samarani M, Goldwurm S, **Di Fonzo A**, Krüger R, Deleidi M, Aureli M, Soldà G, Duga S, Asselta R. (2017).

The GBAP1 pseudogene acts as a ceRNA for the glucocerebrosidase gene GBA by sponging miR-22-3p.

Scientific Reports, 7, 12702.

Ciammola A, Carrera P, Di Fonzo A, Sassone J, Villa R, Poletti B, Ferrari M, Girotti F, Monfrini E, Buongarzone G, Silani V, Cinnante CM, Mignogna ML, D'Adamo P, Bonati MT. *X-linked Parkinsonism with Intellectual Disability caused by novel mutations and somatic mosaicism in RAB39B gene.*

Parkinsonism & related disorders.

Borellini L, Lanfranconi S, Bonato S, Trezzi I, Franco G, Torretta L, Bresolin N, **Di Fonzo A**. (2017).

Progressive Encephalomyelitis with Rigidity and Myoclonus Associated With Anti-GlyR Antibodies and Hodgkin's Lymphoma: A Case Report.

Frontiers in neurology, 8, 401.

Monfrini E, **Di Fonzo A**. (2017).

Leucine-Rich Repeat Kinase (LRRK2) Genetics and Parkinson's Disease.

In **Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)** (pp. 3-30). Springer International Publishing.

Buongarzone G, Monfrini E, Franco G, Trezzi I, Borellini L, Frattini E, Melzi V, Di Caprio AC, Ronchi D, Monzio Compagnoni G, Cogiamanian F, Ardolino G, Bresolin N, Comi GP, Corti S, **Di Fonzo A**. (2017).

Mutations in TMEM230 are rare in autosomal dominant Parkinson's disease.

Parkinsonism & Related Disorders, 39, 87-88.

Borellini L, Cogiamanian F, Carrabba G, Locatelli M, Rampini P, **Di Fonzo A**, Bana C, Barbieri S, Ardolino G. (2017).

Globus pallidus internus deep brain stimulation in PINK-1 related Parkinson's disease: A case report.

Parkinsonism & Related Disorders, 38, 93-94.

Abstracts presentati a Congressi Nazionali ed Internazionali

Trezzi, I., Frattini, E., Monfrini, E., Compagnoni, G.M., Arienti, F., Bordoni, A., Salani, S., Bitetto, G., Cassinerio, E., Motta, I., Nascimbeni, F., Carubbi, F., Scarpini, E., Bresolin, N., Comi, G., Corti, S., Cappellini, M., Di Fonzo, A.

The role of glucocerebrosidase in neurodegeneration associated to Gaucher's Disease and other neurodegenerative diseases.

(**XLVIII Congresso Nazionale SIN, 14-17 Ottobre 2017, Napoli**).

Malaguti, M.C., Monfrini, E., Straniero, L., Duga, S., Di Fonzo, A.

SNCA duplication and heterozygous STUB1 mutation in a patient with spastic ataxia.

Verona 2017 –

III Congresso Accademia LIMPE-DISMOV.

Ciammola, A., Carrera, P., Cinnante, C., Villa, R., Poletti, B., Girotti, F., Buongarzone, G., Monfrini, E., Sassone, J., Silani, V., D'Adamo, P., Di Fonzo, A., Bonati, M. T.

A novel RAB39B gene mutation in an Italian family.

Verona 2017

III Congresso Accademia LIMPE-DISMOV.

Buongarzone, G., Monfrini, E., Franco, G., Trezzi, I., Borrellini, L., Frattini, E., Ardolino, G., Cogiamanian, F., Di Fonzo,

TMEM230 mutations are not frequent in Italian patients with autosomal dominant Parkinson's disease.

A. Verona 2017 -

III Congresso Accademia LIMPE-DISMOV.

Monfrini, E., Buongarzone, G., Dilena, R., Di Fonzo, A.

Identification of a novel de novo heterozygous C19orf12 frameshift mutation in a young woman with Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA).

Verona 2017

III Congresso Accademia LIMPE-DISMOV.

Collaborazioni scientifiche in atto con istituti nazionali ed internazionali:

1. "Studio del ruolo di alpha-synuclein tra membrana mitocondriale esterna e reticolo endoplasmatico in neuroni dopaminergici di pazienti con mutazione del gene SNCA" Cristina Guardia La Guarta, Columbia University, Prof. S. Przedborski, director of the Center, and Prof. D. Re, New York, N.Y., USA.
2. "Biochemical analysis of LRRK2 kinase in human cell lined of Parkinson's disease", Hardy Rideout Biomedical Foundation, Academy of Athens, Grecia.
3. "Analisi della sintesi del Coenzima Q10 in fibroblasti e neuroni da iPSCs di pazienti con atrofia multisistemica", Prof. Catarina Quinzii, PhD, Columbia University, New York, N.Y., USA
4. "Neuromelanin-mri of substantia nigra subregions in Parkinson's disease", Dr. Daniel Claassen il Vanderbilt University Medical Center, Nashville US.
5. "Studio dei neuroni corticali da pazienti con atassia spastica con mutazione del gene GBA2". Professor Kyproula Christodoulou, PhD Senior Scientist / Medical Geneticist, Head of the Neurogenetics Department, The Cyprus Institute of Neurology and Genetics. Medical Genetics Programme Coordinator, Cyprus School of Molecular Medicine
6. "Studio delle vescicole e del traffico vescicolare dei neuroni da iPSC di pazienti con atrofia multi sistemica e malattia di Parkinson". Lorenza Lazzari, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
7. "Studio dell'attività della Glucocerebosidasi in neuroni dopaminergici e midbrain organoids di pazienti con Parkinson's disease", Dr. Massimo Aureli, Ph.D, Università Degli Studi di Milano, Ospedale san Raffaele, Milano
8. "Studio dei neuroni dopaminergici da cellule staminali pluripotenti indotte da pazienti con malattia di Parkinson" Michela Deleidi, Assistant Professor of Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Department of Neurodegenerative Diseases, University of Tübingen
9. "Registro Italiano Disordini del Movimento rari e tremori", Prof. Paolo Barone, Centro per le Malattie Neurodegenerative della A.O.U. Ruggi d'Aragona di Salerno
10. "Studio osservazionale Parkinson's Outcomes Project (Progetto di valutazione della Malattia di Parkinson)". Centro Promotore: National Parkinson Foundation, USA.

Finanziamenti per progetti di ricerca ottenuti da enti pubblici o privati

1. Intesa San Paolo Finanziamento per lo studio "Generazione di organoidi cerebrali per lo studio e lo sviluppo di nuove terapie per la malattia di Parkinson"
2. Unicredit Finanziamento per lo "Studio del misfolding di proteine che causano morte neuronale nella malattia di Parkinson"

3. Fresco Parkinson Institute Italia e National Parkinson Foundation per lo studio
“Parkinson’s Outcomes Project”

UOSD MALATTIE NEURODEGENERATIVE

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

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

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 Emanuela Oldoni

Dottoranda di Ricerca Medicina Molecolare – Università di Milano

Dott.ssa Maria Serpente

Dottore di Ricerca in Medicina Molecolare – Assegnista Università di Milano

Dott.ssa Sara Cioffi

Biologa - Borsista OMP

Dott.ssa Marina Arcaro

Bioteecnologa-Borsista OMP

Dott.ssa Marianna D'Anca

Dottore di Ricerca- Assegnista Università di Milano

Dott.ssa Milena De Riz

Neurologa Specialista – Dirigente medico OMP - t. indet.

Dott.ssa Anna Pietroboni

Neurologa Specialista – Dirigente medico OMP – co.co.co

Dott. Andrea Arighi

Neurologo Specialista - Dirigente medico OMP- t. indet.

Dott. Giorgio Fumagalli

Neurologo Specialista – Dirigente medico OMP – co.co.co

Dott.ssa Laura Ghezzi

Neurologa Specialista - Dirigente medico OMP – co.co.co

Dott. Alberto Calvi

Medico Specializzando

Dott.ssa Paola Basilico

Medico Specializzando

Dott.ssa Marta Scarioni

Medico Specializzando

Dott.ssa Tiziana Carandini

Medico Specializzando

Dott.ssa Annalisa Colombi

Medico Specializzando

Dott. Roberto Vimercati

Psicologo – Dirigente psicologo OMP – co.co.co

Dr.ssa Emanuela Rotondo

Psicologa- Dirigente psicologo OMP – co.co.co

Dr.ssa Priscilla Corti	Psicologa- Dirigente psicologo OMP – co.co.co
Dott. Matteo Mercurio	Psicologo – Dirigente psicologo OMP – co.co.co
Sig.ra Daniela Da Lisca	Segretaria – co.co.co 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 (demenza Frontotemporale, demenza a corpi di Lewy). 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 2017 sono giunti all’ambulatorio per le Malattie Demielinizzanti circa 120 nuovi pazienti.

Il numero totale di visite nel corso del 2017 è stato di più di 800 in ambulatori dedicati alla Sclerosi Multipla, attivi tutti i giorni sia al mattino che al pomeriggio.

È operativo un servizio di “Macro Attività Complessa” (MAC) per consentire ai pazienti di sottoporsi a trattamenti quali la somministrazione di cortisonici ad alto dosaggio e. v. e l’infusione di Immunoglobuline e.v. nonché di effettuare tutte le procedure diagnostiche. Sono stati effettuati circa 200 ricoveri in regime di MAC.

Il Servizio è riconosciuto tra i Centri Provinciali autorizzati dalla Regione Lombardia alla dispensazione di: beta-Interferone Ia e Ib, Copaxone (glatiramer acetato), Tysabri (Natalizumab), Gylenia (Fingolimod), Tecfidera (Dimetilfumarato), Aubagio (Teriflunomide), Lemtrada (Alemtuzumab), Ocrelizumab. In dettaglio, sono al momento registrati in File F per il trattamento circa 250 pazienti.

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

Nel corso dell’anno sono giunti all’ambulatorio per la Diagnosi e la Terapia dei Disturbi Cognitivi e della Memoria circa 250 nuovi pazienti. Complessivamente sono state eseguite circa 1500 visite, in ambulatori attivi dal lunedì al venerdì, sia la mattina che il pomeriggio.

Sono stati effettuati 200 ricoveri in regime di MAC per accertamenti diagnostici.

Dall’ottobre 2000 il Centro è stato riconosciuto da parte della Regione Lombardia come “Unità Valutazione Alzheimer” (U.V.A) ed inserito nel Progetto CRONOS del Ministero della Sanità. Presso tale Centro afferiscono pazienti con sospetto decadimento cognitivo, inviati dal medico di base o dallo specialista, onde essere sottoposti ad un inquadramento diagnostico rivolto alla malattia di Alzheimer e demenze correlate, ai fini dell’inserimento nel progetto CRONOS che prevede l’erogazione gratuita dei nuovi farmaci anticolinesterasici. Ad oggi, risultano al momento registrati per terapia con anticolinesterasici 250 pazienti. Inoltre, alcuni 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: circa 200
- dosaggio Amiloide, Tau totale e fosforilata nel liquor per diagnosi Alzheimer: 250
- progranulina plasmatica: 150
- estrazione DNA, mutazioni MAPT, progranulina, PS1 e 2, APP: 100.

2. Sperimentazioni cliniche (multicentriche, randomizzate)

- Long term, prospective, non-interventional, multinational, parallel-cohort study monitoring safety in patients with Multiple Sclerosis 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 Multiple Sclerosis who switch from natalizumab to fingolimod, Novartis, prot. CFTY720D2405
- Studio multicentrico, in aperto, a un solo gruppo di trattamento per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia a lungo termine di 0.5 mg di fingolimod (FTY720) somministrato per via orale una volta al giorno in pazienti con sclerosi multipla, Novartis, prot. CFTY720D2399
- Open-label, single-arm extension study to the double-blind, randomized, multicenter, placebo-controlled, parallel-group study comparing the efficacy and safety of 0.5 mg FTY720 administered orally once daily versus placebo in patients with primary progressive multiple sclerosis CFTY720D2306E1
- A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of Natalizumab on reducing disability progression in subjects with Secondary Progressive Multiple Sclerosis, with optional open-label extension, Biogen, prot. 101MS326
- A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled variable treatment duration study evaluating the efficacy and safety of Siponimod (BAF312) in patients with secondary progressive Multiple Sclerosis, Novartis, prot. CBAF312A2304
- 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 Multiple Sclerosis patients, Receptos, prot. RPC1063
- A prospective observational study to depict the role of adherence as a tool of treatment decision making in RMS subject experiencing first clinical relapse with 1st line DMDs (CHOICE)
- A randomized, multicountry study to evaluate the effectiveness of florbetapir (18F) PET imaging in changing patient management and to evaluate the relationship between florbetapir (18F) PET scan status and cognitive decline (AVID)
- Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group, 12-Month trial of leucomethylthioninium bis (hydromethanesulfonate) in subjects with Mild to moderate AD, TauRx Therapeutics Ltd, prot. Trx-237-015
- A Placebo-controlled, double-blind, parallel-group, Bayesian Adaptive randomization design and dose Regimen-finding Study to evaluate safety, tolerability and efficacy of BAN2401 in subjects with Early Alzheimer's Disease, Eisai, prot. BAN2401
- Randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, fixed-dose study of Lu AE58054 in patients with mild-moderate Alzheimer's disease treated with donepezil, Lundbeck, 14861A
- A randomized, Placebo Controlled, Parallel-group, Double Blind efficacy and safety Trial of MK-8931 in Subjects with mild to moderate Alzheimer's Disease, Merck Serono, MK-8931-017
- A phase III, Randomized, placebo-controlled, parallel-group, double-blind clinical trial to study the efficacy and safety of MK-8931 in subjects with Amnestic Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer's Disease (Prodromal AD), MK-8931-019
- Continued Efficacy and Safety monitoring of solanezumab, an anti-amyloid beta antibody in patients with Alzheimer's disease, H8A-MC-LZAO)

- Effect of passive Immunization on the progression of mild Alzheimer's disease: Solanezumab (LY2062430) versus Placebo, H8A-MC-LZAX
- A randomized, double-blind, Placebo-controlled, Parallel-group, 26-week, phase 3 study of two doses of EVP-6124 or placebo in subjects with mild to moderate AD currently or previously receiving an Acetylcholinesterase Inhibitor Medication EVP-6124-025
- A 24-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel- Group, efficacy, safety, tolerability, biomarker and pharmacokinetic of AZD3293 in early Alzheimer's disease (The AMARANTH study)
- A multinational, multicenter, randomized, parallel Group, open-label study to assess medication satisfaction in patient with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) treated with subcutaneous injection of Copaxone 40 mg/mL Three Times a Week compared to 20 mg daily (TY44400)
- An open-label study to evaluate the efficacy and safety of Ocrelizumab in patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis who have a suboptimal response to an adequate course of disease-modifying treatment (MA30005)

3. ATTIVITÀ DI RICERCA DI BASE

È attualmente presente presso la UOSD Malattie Neurodegenerative e Demielinizzanti una banca biologica comprendente:

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

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

2) circa 600 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 2017 l'attività del gruppo si è articolata sulle seguenti tematiche:

1) Ruolo dei microRNA e dei long non coding RNA nella patogenesi della Sclerosi Multipla (SM) e nella risposta alle terapie immunomodulanti.

Sono state completate le ricerche iniziate nel corso degli scorsi anni, sui microRNA (miRNA), che diverse evidenze sperimentali suggeriscono come possibili marcatori in patologie di varia natura ed eziogenesi. I miRNA sono dei modulatori trascrizionali di numerosissimi geni tra i quali anche geni propriamente implicati nella patogenesi della SM. Lo scopo di questo filone di ricerca è stato quello di verificare la funzione e il livello di espressione di queste molecole al fine di stabilire la loro possibile utilità predittori del decorso della patologia e nella risposta ai trattamenti immunomodulanti. Nel corso degli scorsi anni abbiamo identificato alcuni microRNA deregolati nelle cellule circolanti di pazienti con SM (Fenoglio et al., Multiple Sclerosis 2013), e messo a punto una tecnica per dosare i livelli di miRNA circolanti, che permette di ottenere dati senza bisogno di isolare le cellule. Nel corso dell'anno abbiamo proseguito questi studi in pazienti sottoposti a diversi tipi di trattamento immonomodulante, e correlato l'andamento dei livelli di miRNA con i dati clinici e radiologici, al fine di identificare un marcitore che predica la risposta al trattamento. Inoltre, abbiamo intrapreso lo studio dei long non coding RNA, che sono molecole composte da >200 nucleotidi, che regolano l'espressione di diversi geni target e abbiamo valutato i livelli di queste molecole negli esosomi

di origine neuronale, che hanno il vantaggio di essere facilmente isolati dal sangue e contemporaneamente di riflettere la composizione delle cellule del cervello che li originano.

2) Isolamento di esosomi circolanti di origine neuronale da pazienti con malattia di Alzheimer e Demenza Frontotemporale

E' stata messa a punto la metodica per l'isolamento di esosomi circolanti di origine neuronale, tramite citofluorimetria e analisi al microscopio elettronico. In seguito, abbiamo isolato il contenuto delle vescicole e prevediamo di analizzare il profilo di espressione e proteico.

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

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

Tra i primi vi sono:

- Prof. A. Maggi, Centro di Biotecnologie Farmacologiche, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano
- Dott. G. Forloni, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano
- Prof. S. Cappa, IRCCS S. Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia
- 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, Dr. Yolande Pijnenburg, Dept. of Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands
- Dr. Howard Feldman, Dept. of Neurology, University of British Columbia, Vancouver, Canada
- Dr. Anne Cross, University of Saint Louis, USA
- Prof. Philippe Amouyel, Lille, France
- Dr. Jonathan Rohrer, UCL, London, UK
- Prof. An Goris, Leuven, Belgium
- Dr. Manuel Comabella, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

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

- Malattia di Alzheimer (IGAP: International Genomics of Alzheimer's Disease Project).
- Demenza Frontotemporale (GENFI: GENetics of Frontotemporal dementia Initiative)
- Sclerosi Multipla (IMSC: International Multiple Sclerosis Collaboration).

4. PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI CENSITE 2017

Bonanni L, Cagnin A, Agosta F, Babiloni C, Borroni B, Bozzali M, Bruni AC, Filippi M, Galimberti D, Monastero R, Muscio C, Parnetti L, Perani D, Serra L, Silani V, Tiraboschi P, Padovani A;

DLB-SINdem study group (including Scarpini E). The Italian dementia with Lewy bodies study group (DLB-SINdem): toward a standardization of clinical procedures and multicenter cohort studies design.

Neurological Sciences 2017;38(1):83-91.

IF=1,749

Pietroboni AM, Schiano di Cola F, Scarioni M, Fenoglio C, Spanò B, Arighi A, Cioffi SM, Oldoni E, De Riz MA, Basilico P, Calvi A, Fumagalli GG, Triulzi F, Galimberti D, Bozzali M, Scarpini E.

CSF β-amyloid as a putative biomarker of disease progression in multiple sclerosis.

Multiple Sclerosis 2017;23(8):1085-1091.

IF=4,84

Galimberti D, Scarpini E.

Pioglitazone for the treatment of Alzheimer's disease.

Expert Opinion on Investigational Drugs 2017;26(1):97-101.

IF=4,03

Galimberti D, Cioffi SM, Fenoglio C, Serpente M, Oblak AL, Rodriguez-Porcel F, Oldoni E, Hagen MC, Arcaro M, Scarpini E, Ghetti B,

Espay AJ. Rapidly progressive primary progressive aphasia and parkinsonism with novel GRN mutation.

Movement Disorders 2017;32(3):476-8. IF=7,072

Ferrari R, Wang Y, Vandrovčová J, Guelfi S, Witeolar A, Karch CM, Schork AJ, Fan CC, Brewer JB;

International FTD-Genomics Consortium (IFGC); International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC); International Genomics of Alzheimer's Project (IGAP, including Galimberti D and Scarpini E), Momeni P, Schellenberg GD, Dillon WP, Sugrue LP, Hess CP, Yokoyama JS, Bonham LW, Rabinovici GD, Miller BL, Andreassen OA, Dale AM, Hardy J, Desikan RS. Genetic architecture of sporadic frontotemporal dementia and overlap with Alzheimer's and Parkinson's diseases.

Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 2017;88(2):152-164. IF=7,341

Ferrari R, Grassi M, Graziano F, Palluzzi F, Archetti S, Bonomi E, Bruni AC, Maletta RG, Bernardi L, Cupidi C, Colao R, Rainero I, Rubino E, Pinessi L, Galimberti D, Scarpini E, Serpente M, Nacmias B, Piaceri I, Bagnoli S, Rossi G, Giaccone G, Tagliavini F, Benussi L, Binetti G, Ghidoni R, Singleton A, Hardy J, Momeni P, Padovani A, Borroni B.

Effects of Multiple Genetic Loci on Age at Onset in Frontotemporal Dementia.

Journal of Alzheimer's Disease 2017;56(4):1271-8. IF=3,731

van Waalwijk van Doorn LJ, Gispert JD, Kuiperij HB, Claassen JA, Arighi A, Baldeiras I, Blennow K, Bozzali M, Castelo-Branco M, Cavedo E, Emek-Savaş DD, Eren E, Eusebi P, Farotti L, Fenoglio C, Ormaechea JF, Freund-Levi Y, Frisoni GB, Galimberti D, Genc S, Greco V, Hampel H, Herukka SK, Liu Y, Lladó A, Lleó A, Nobili FM, Oguz KK, Parnetti L, Pereira J, Picco A, Pikkarainen M, de Oliveira CR, Saka E, Salvadori N, Sanchez-Valle R, Santana I, Scarpini E, Scheltens P, Soininen H, Tarducci R, Teunissen C, Tsolaki M, Urbani A, Vilaplana E, Visser PJ, Wallin AK, Yener G, Molinuevo JL, Meulenbroek O, Verbeek MM.

Improved Cerebrospinal Fluid-Based Discrimination between Alzheimer's Disease Patients and Controls after Correction for Ventricular Volumes.

Journal of Alzheimer's Disease 2017;56(2):543-555. IF=3,731

Paroni M, Maltese V, De Simone M, Ranzani V, Larghi P, Fenoglio C, Pietroboni AM, De Riz MA, Crosti MC, Maglie S, Moro M, Caprioli F, Rossi R, Rossetti G, Galimberti D, Pagani M, Scarpini E, Abrignani S, Geginat J.

Recognition of viral and self-antigens by TH1 and TH1/TH17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2017;140(3):797-808.

IF=13,081

Buoli M, Serati M, Caldiroli A, Galimberti D, Scarpini E, Altamura AC.

Pharmacological Management of Psychiatric Symptoms in Frontotemporal Dementia: A Systematic Review.

Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology 2017;30(3):162-169.

IF=2,109

Dianzani C, Bellavista E, Liepe J, Verderio C, Martucci M, Santoro A, Chiocchetti A, Gigliotti CL, Boggio E, Ferrara B, Riganti L, Keller C, Janek K, Niewienda A, Fenoglio C, Sorosina M, Cantello R, Kloetzel PM, Stumpf MP, Paul F, Ruprecht K, Galimberti D, Martinelli Boneschi F, Comi C, Dianzani U, Mishto M.

Extracellular proteasome-osteopontin circuit regulates cell migration with implications in multiple sclerosis.

Scientific Reports 2017;7:43718. IF=4,259

Premi E, Grassi M, van Swieten J, Galimberti D, Graff C, Masellis M, Tartaglia C, Tagliavini F, Rowe JB, Laforce R Jr, Finger E, Frisoni GB, de Mendonça A, Sorbi S, Gazzina S, Cosseddu M, Archetti S, Gasparotti R, Manes M, Alberici A, Cardoso MJ, Bocchetta M, Cash DM, Ourselin S, Padovani A, Rohrer JD, Borroni B;

Genetic FTD Initiative (GENFI) (including Scarpini E). Cognitive reserve and TMEM106B genotype modulate brain damage in presymptomatic frontotemporal dementia: a GENFI study.

Brain 2017;140(6):1784-91.

IF=10,292

Engelborghs S, Niemantsverdriet E, Struyfs H, Blennow K, Brouns R, Comabella M, Dujmovic I, van der Flier W, Frölich L, Galimberti D, Gnanapavan S, Hemmer B, Hoff E, Hort J, Iacobaeus E, Ingelsson M, Jan de Jong F, Jonsson M, Khalil M, Kuhle J, Lleó A, de Mendonça A, Molinuevo JL, Nagels G, Paquet C, Parnetti L, Roks G, Rosa-Neto P, Scheltens P, Skårsgård C, Stomrud E, Tumani H, Visser PJ, Wallin A, Winblad B, Zetterberg H, Duits F, Teunissen CE. *Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases.*

Alzheimers Dementia (Amst) 2017;8:111-126.

Geginat J, Paroni M, Pagani M, Galimberti D, De Francesco R, Scarpini E, Abrignani S. *The Enigmatic Role of Viruses in Multiple Sclerosis:*

Molecular Mimicry or Disturbed Immune Surveillance?

Trends in Immunology 2017;38(7):498-512.

IF=13,287

Sudre CH, Bocchetta M, Cash D, Thomas DL, Woollacott I, Dick KM, van Swieten J, Borroni B, Galimberti D, Masellis M, Tartaglia MC, Rowe JB, Graff C, Tagliavini F, Frisoni G, Laforce R Jr, Finger E, de Mendonça A, Sorbi S, Ourselin S, Cardoso MJ, Rohrer JD;

Genetic FTD Initiative, GENFI (including Scarpini E). White matter hyperintensities are seen only in GRN mutation carriers in the GENFI cohort.

Neuroimage Clin. 2017;15:171-180.

IF=4,384

Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, Bellenguez C, Badarinarayanan N, Jakobsdottir J, Kunkle BW, Boland A, Raybould R, Bis JC, Martin ER, Grenier-Boley B, Heilmann-Heimbach S, Chouraki V, Kuzma AB, Sleegers K, Vronskaya M, Ruiz A, Graham RR, Olaso R, Hoffmann P, Grove ML, Vardarajan BN, Hiltunen M, Nöthen MM, White CC, Hamilton-Nelson KL,

Epelbaum J, Maier W, Choi SH, Beecham GW, Dulary C, Herms S, Smith AV, Funk CC, Derbois C, Forstner AJ, Ahmad S, Li H, Bacq D, Harold D, Satizabal CL, Valladares O, Squassina A, Thomas R, Brody JA, Qu L, Sánchez-Juan P, Morgan T, Wolters FJ, Zhao Y, Garcia FS, Denning N, Fornage M, Malamon J, Naranjo MCD, Majounie E, Mosley TH, Dombroski B, Wallon D, Lupton MK, Dupuis J, Whitehead P, Fratiglioni L, Medway C, Jian X, Mukherjee S, Keller L, Brown K, Lin H, Cantwell LB, Panza F, McGuinness B, Moreno-Grau S, Burgess JD, Solfrizzi V, Proitsi P, Adams HH, Allen M, Seripa D, Pastor P, Cupples LA, Price ND, Hannequin D, Frank-García A, Levy D, Chakrabarty P, Caffarra P, Giegling I, Beiser AS, Giedraitis V, Hampel H, Garcia ME, Wang X, Lannfelt L, Mecocci P, Eiriksdottir G, Crane PK, Pasquier F, Boccardi V, Henández I, Barber RC, Scherer M, Tarraga L, Adams PM, Leber M, Chen Y, Albert MS, Riedel-Heller S, Emilsson V, Beekly D, Braae A, Schmidt R, Blacker D, Masullo C, Schmidt H, Doody RS, Spalletta G, Jr WTL, Fairchild TJ, Bossù P, Lopez OL, Frosch MP, Sacchinelli E, Ghetti B, Yang Q, Huebinger RM, Jessen F, Li S, Kamboh MI, Morris J, Sotolongo-Grau O, Katz MJ, Corcoran C, Dunstan M, Braddel A, Thomas C, Meggy A, Marshall R, Gerrish A, Chapman J, Aguilar M, Taylor S, Hill M, Fairén MD, Hodges A, Vellas B, Soininen H, Kloszewska I, Daniilidou M, Uphill J, Patel Y, Hughes JT, Lord J, Turton J, Hartmann AM, Cecchetti R, Fenoglio C, Serpente M, Arcaro M, Caltagirone C, Orfei MD, Ciaramella A, Pichler S, Mayhaus M, Gu W, Lleó A, Fortea J, Blesa R, Barber IS, Brookes K, Cupidi C, Maletta RG, Carrell D, Sorbi S, Moebus S, Urbano M, Pilotto A, Kornhuber J, Bosco P, Todd S, Craig D, Johnston J, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Fox NC, Hardy J; ARUK Consortium, Albin RL, Apostolova LG, Arnold SE, Asthana S, Atwood CS, Baldwin CT, Barnes LL, Barral S, Beach TG, Becker JT, Bigio EH, Bird TD, Boeve BF, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Burns JM, Buxbaum JD, Cairns NJ, Cao C, Carlson CS, Carlsson CM, Carney RM, Carrasquillo MM, Carroll SL, Diaz CC, Chui HC, Clark DG, Cribbs DH, Crocco EA, DeCarli C, Dick M, Duara R, Evans DA, Faber KM, Fallon KB, Fardo DW, Farlow MR, Ferris S, Foroud TM, Galasko DR, Gearing M, Geschwind DH, Gilbert JR, Graff-Radford NR, Green RC, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Honig LS, Huentelman MJ, Hulette CM, Hyman BT, Jarvik GP, Abner E, Jin LW, Jun G, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Kowall NW, Kramer JH, LaFerla FM, Lah JJ, Leverenz JB, Levey AI, Li G, Lieberman AP, Lunetta KL, Lyketsos CG, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Morris JC, Murrell JR, Myers AJ, O'Bryant S, Olichney JM, Pankratz VS, Parisi JE, Paulson HL, Perry W, Peskind E, Pierce A, Poon WW, Potter H, Quinn JF, Raj A, Raskind M, Reisberg B, Reitz C, Ringman JM, Roberson ED, Rogaeva E, Rosen HJ, Rosenberg RN, Sager MA, Saykin AJ, Schneider JA, Schneider LS, Seeley WW, Smith AG, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Swerdlow RH, Tanzi RE, Thornton-Wells TA, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Van Eldik LJ, Vinters HV, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Wilhelmsen KC, Williamson J, Wingo TS, Woltjer RL, Wright CB, Yu CE, Yu L, Garzia F, Golamally F, Septier G, Engelborghs S, Vandenberghe R, De Deyn PP, Fernandez CM, Benito YA, Thonberg H, Forsell C, Lilius L, Kinjhult-Ståhlbom A, Kilander L, Brundin R, Concari L, Helisalmi S, Koivisto AM, Haapasalo A, Dermecourt V, Fievet N, Hanon O, Dufouil C, Brice A, Ritchie K, Dubois B, Himali JJ, Keene CD, Tschanz J, Fitzpatrick AL, Kukull WA, Norton M, Aspelund T, Larson EB, Munger R, Rotter JI, Lipton RB, Bullido MJ, Hofman A, Montine TJ, Coto E, Boerwinkle E, Petersen RC, Alvarez V, Rivadeneira F, Reiman EM, Gallo M, O'Donnell CJ, Reisch JS, Bruni AC, Royall DR, Dichgans M, Sano M, Galimberti D, St George-Hyslop P, Scarpini E, Tsuang DW, Mancuso M, Bonuccelli U, Winslow AR, Daniele A, Wu CK; GERAD/PERADES, CHARGE, ADGC, EADI, Peters O, Nacmias B, Riemschneider M, Heun R, Brayne C, Rubinsztein DC, Bras J, Guerreiro R, Al-Chalabi A, Shaw CE, Collinge J, Mann D, Tsolaki M, Clarimón J, Sussams R, Lovestone S, O'Donovan MC, Owen MJ, Behrens TW, Mead S, Goate AM, Uitterlinden AG, Holmes C, Cruchaga C,

Ingelsson M, Bennett DA, Powell J, Golde TE, Graff C, De Jager PL, Morgan K, Ertekin-Taner N, Combarros O, Psaty BM, Passmore P, Younkin SG, Berr C, Gudnason V, Rujescu D, Dickson DW, Dartigues JF, DeStefano AL, Ortega-Cubero S, Hakonarson H, Campion D, Boada M, Kauwe JK, Farrer LA, Van Broeckhoven C, Ikram MA, Jones L, Haines JL, Tzourio C, Launer LJ, Escott-Price V, Mayeux R, Deleuze JF, Amin N, Holmans PA, Pericak-Vance MA, Amouyel P, van Duijn CM, Ramirez A, Wang LS, Lambert JC, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD.

Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease.

Nature Genetics 2017;49(9):1373-84. IF=27,959

Cova I, Grande G, Cucumo V, Ghiretti R, Maggiore L, Galimberti D, Scarpini E, Mariani C, Pomati S. *Self-Awareness for Memory Impairment in Amnestic Mild Cognitive Impairment: A Longitudinal Study.*

American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias 2017;32(7):401-407. IF=1,864

Calvi A, De Riz M, Lecchi E, Pietroboni A, Ghezzi L, Scarioni M, Carandini T, Pellegrinelli A, Maurichi A, Galimberti D, Scarpini E.

Merkel cell carcinoma in a patient with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with fingolimod.

Journal of the Neurological Sciences 2017;381:296-297.

IF=2,295

Palluzzi F, Ferrari R, Graziano F, Novelli V, Rossi G, Galimberti D, Rainero I, Benussi L, Nacmias B, Bruni AC, Cusi D, Salvi E, Borroni B, Grassi M. *A novel network analysis approach reveals DNA damage, oxidative stress and calcium/cAMP homeostasis-associated biomarkers in frontotemporal dementia.*

PLoS One 2017;12(10):e0185797.

IF=2,806

Iaffaldano P, Simone M, Lucisano G, Ghezzi A, Coniglio G, Brescia Morra V, Salemi G, Patti F, Lugaresi A, Izquierdo G, Bergamaschi R, Cabrera-Gomez JA, Pozzilli C, Millefiorini E, Alroughani R, Boz C, Pucci E, Zimatore GB, Sola P, Lus G, Maimone D, Avolio C, Cocco E, Sajedi SA, Costantino G, Duquette P, Shaygannejad V, Petersen T, Fernández Bolaños R, Paolicelli D, Tortorella C, Spelman T, Margari L, Amato MP, Comi G, Butzkueven H, Trojano M; Italian iMedWeb Registry and the MSBase Registry (including Scarpini E). Prognostic indicators in pediatric clinically isolated syndrome.

Annals of Neurology 2017;81(5):729-39.

IF=9,89

Landi D, De Rossi N, Zagaglia S, Scarpazza C, Prosperini L, Albanese M, Buttari F, Mori F, Marfia GA, Sormani MP, Capra R, Centonze D; Italian PML study group (including Scarpini E). No evidence of beneficial effects of plasmapheresis in natalizumab-associated PML.

Neurology 2017;88(12):1144-52.

IF=8,32

Comi G, Patti F, Rocca MA, Mattioli FC, Amato MP, Gallo P, Centonze D, Pozzilli C, Saccà F, Bergh FT, Bartezzaghi M, Turrini R, Filippi M; Golden Study Group (including Scarpini E). Efficacy of fingolimod and interferon beta-1b on cognitive, MRI, and clinical outcomes in relapsing-remitting multiple sclerosis: an 18-month, open-label, rater-blinded, randomised, multicentre study (the GOLDEN study).

Journal of Neurology 2017;264(12):2436-49.

IF=3,389

Morandi A, Di Santo SG, Cherubini A, Mossello E, Meagher D, Mazzone A, Bianchetti A, Ferrara N, Ferrari A, Musicco M, Trabucchi M, Bellelli G; ISGoD Group (including Scarpini E). Clinical Features Associated with Delirium Motor Subtypes in Older Inpatients: Results of a Multicenter Study.

American Journal of Geriatric Psychiatry 2017;25(10):1064-71.

IF=2,868

Dobson R, Kuhle J, Middeldorp J, Giovannoni G, on behalf of the International CIS study investigators (including Scarpini E, Fenoglio C, Galimberti D).

Epstein-Barr-negative MS: a true phenomenon?

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2017;4(2):e318.

Vigna L, Galimberti D, De Giuseppe R, Cossovich A, Sommaruga D, de Liso F, Gori F, Ingenito MR, Napolitano F, Tomaino L, Novembrino C, Fenoglio C, Bamonti F.

Natural vegan meal replacement: metabolic and oxidative modulation on overweight subjects. **Progress in Nutrition** 2017;19(2):127-37. IF=0,311

Ghezzi L, Carandini T, Arighi A, Fenoglio C, Arcaro M, De Riz M, Pietroboni AM, Fumagalli GG, Basilico P, Calvi A, Scarioni M, Colombi A, Serpente M, Marotta G, Benti R, Scarpini E, Galimberti D.

Evidence of CNS β-amyloid deposition in Nasu-Hakola disease due to the TREM2 Q33X mutation.

Neurology 2017; 89:2503-5.

IF=8,32

5. COMUNICAZIONI SU RIVISTE CENSITE 2017

Carandini T, Pietroboni AM, Scarioni M, Basilico P, Arighi A, Cadioli M, Caprioli M, Ghezzi L, Fumagalli GG, De Riz MA, Calvi A, Triulzi F, Galimberti D, Scarpini E. *Assessing the independent associations of CSF biomarkers and white matter hyperintensities with grey matter atrophy in dementia.*

European Journal of Neurology 24 (Suppl. 1): 449, 2017.

3° Meeting of the European Academy of Neurology, Amsterdam, June 24-27, 2017.

Fumagalli GG, Basilico P, Arighi A, Mercurio M, Galimberti D, Scarpini E.

Sulcal opening in behavioural variant frontotemporal dementia: Comparison between automated and manual measures.

European Journal of Neurology 24 (Suppl. 1): 530, 2017.

3° Meeting of the European Academy of Neurology, Amsterdam, June 24-27, 2017.

Scarioni M, Pietroboni AM, Carandini T, Basilico P, Arighi A, Cadioli M, Caprioli M, Ghezzi L, Fumagalli GG, Calvi A, De Riz MA, Triulzi F, Galimberti D, Scarpini E.

Assessing the relationship between CSF β-amyloid and white matter damage in AD.

European Journal of Neurology 24 (Suppl. 1): 615, 2017.

3° Meeting of the European Academy of Neurology, Amsterdam, June 24-27, 2017.

Carandini T, Pietroboni AM, Dell'Arti L, Scarioni M, Arighi A, Ghezzi L, Triulzi F, Scarpini E, Viola F, Galimberti D.

Retinal damage begins in the ganglion cell layer and correlates with brain atrophy from the very early stages of the disease in MS patients.

Multiple Sclerosis 2017; 23(Suppl. 3): 561.

7th Joint ECTRIMS - ACTRIMS Meeting, October 25-28, 2017, Paris, France.

Oldoni E, Fenoglio C, Serpente M, De Riz M, Comi C, Lecchi E, Calvi A, Ghezzi L, Pietroboni AM, Arcaro M, Cioffi SMG, Mallants K, Dubois B, Goris A, Cantello R, Galimberti D, Scarpini E.

Long non coding RNA expression profile in Peripheral Blood Mononuclear Cells from multiple sclerosis patients: potential biomarkers of disease susceptibility and progression.

Multiple Sclerosis 2017; 23(Suppl. 3): 580.

7th Joint ECTRIMS - ACTRIMS Meeting, October 25-28, 2017, Paris, France.

6. PARTECIPAZIONEN 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 – Associate Editor della rivista Journal of Alzheimer's disease
- Prof. E. Scarpini – membro Editorial Board della rivista Neurological Reviews
- Prof. E. Scarpini – membro Advisory Board Eli Lilly e Merck

7. MEMBERSHIP SOCIETÀ SCIENTIFICHE

Dott.ssa D. Galimberti – Secretary of the Dementia Panel della European Academy of Neurology (EAN)

Prof. E. Scarpini, Dott.ssa D. Galimberti: membri Assembly of Delegates della EAN

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

Dott.ssa D. Galimberti – segretaria della SINDEM

8. FINANZIAMENTI

- Joint Program for Neurodegenerative Disorders “Searching for therapeutic interventions in frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansions in the presymptomatic stage” 40.000 € (Nov 2015-Ott 2017)
- Ricerca Corrente, Ministero della Salute “Marcatori diagnostici e prognostici da esosomi circolanti di origine neuronale per la diagnosi e la risposta al trattamento dei pazienti con patologie neurodegenerative e demielinizzanti” 161.636 €
- Progetto di rete Ministero della Salute “New strategies for diagnostic, therapeutics and clinical care in neurological diseases” 70.000 € (Nov 2015-Ott 2018)
- Eranet JPND finanziato dal Ministero della Salute “Synapse-to-nucleus communication in Alzheimer’s disease (STAD) 70.000 € (Giu 2016-Mag 2019)
- Eranet JPND finanziato dal Ministero della Salute “Common pathways of protein misfolding in neurodegenerative diseases and molecular determinants of strains formation (PREFONTALS)” 40.000 € (Mar 2016-Feb 2019)
- Fondazione Monzino – “Ricerca di marcatori da associare alla patologia mediante studi genetici, proteomici e di espressione per migliorare la diagnosi e l’efficacia terapeutica” – 200.000 €

LABORATORIO CELLULE STAMINALI

Responsabile:

- Professor 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 indeterminato di tecnico di laboratorio laureato universitario
- Andrea Farini biologo, PostDoc con borsa annuale ospedaliera
- Silvia Erratico biotecnologa, contrattista annuale
- Paola Frattini, biotecnologa con borsa annuale ospedaliera
- Stefania Banfi, biologa PostDoc con assegno universitario di tipo A annuale
- Andrea Brambilla, biotecnologo con borsa annuale ospedaliera
- Chiara Villa, bioingegnere, PostDoc con assegno universitario di tipo B annuale
- Pamela Bella biologa con borsa annuale ospedaliera
- Mariella Legato, studente della facoltà di Biologia tirocinante per tesi magistrale dei 5 anni
- Davide Pravettoni, studente di Biologia Applicata alle Scienze della Nutrizione per tesi magistrale dei 5 anni
- Federica Di Lorenzo studente della facoltà di Biologia tirocinante per tesi magistrale dei 5 anni
- Laura Andrea Varela Pinzon studente della facoltà di Biologia tirocinante per tesi magistrale dei 5 anni
- Naima Guarrrata, dottore in economia, project manager contrattista

Nel corso dell'anno 2017 il gruppo di lavoro diretto dal professor Torrente ha proseguito la propria ricerca nell'ambito della distrofia muscolare ed in particolare ha studiato il ruolo delle microvescicole nel favorire la rigenerazione muscolare pubblicando sulla rivista scientifica internazionale **"Human Molecular Genetics"**, un lavoro in cui vengono descritte e sviluppate nuove strategie finalizzate alla ricerca di prospettive terapeutiche per le distrofie congenite quali le α -dystroglycanopatie, un gruppo di distrofie muscolari, causate da un deficit di glicosilazione dell' α -distroglicano (α -DG). Dal momento che i siti glicosilici dell' α -DG favoriscono il legame tra le proteine della matrice extracellulare e le proteine del citoscheletro della miofibra, un'ipoglicosilazione causa la rottura del legame, con sviluppo di fragilità del sarcolemma e necrosi cellulare. Ad oggi, non esistono terapie risolutive applicabili alle α -dystroglycanopatie. Sono stati identificati vari geni coinvolti nello sviluppo del fenotipo clinico, codificanti per glicosiltransferasi coinvolte nella glicosilazione dell' α -DG. Tra questi, la mutazione del gene FKRP comporta l'insorgenza di un ampio spettro di fenotipi distrofici: da forme lievi (distrofia muscolare dei cingoli di tipo 2I), a forme molto severe (tra cui la distrofia muscolare congenita di tipo 1C, MDC1C). FKRP esercita la sua funzione trasferendo un gruppo ribitolo fosfato da un CDP-ribitolo all' α -DG. Benchè il pathway di glicosilazione delle proteine avvenga a livello intracellulare, in accordo con quanto osservato, è stata riportata la presenza di glicosiltransferasi extracellulari. Queste ultime possono circolare liberamente nel torrente circolatorio o, in alternativa, all'interno di una sottopopolazione di microvescicole di dimensioni nanometriche, fisiologicamente secreta dalle cellule: gli esosomi. In questo lavoro viene proposto un approccio combinato di terapia cellulare e genica atta a ripristinare l'espressione del gene FKRP e la sua funzionalità. Viene, inoltre, proposto il trasporto e rilascio di FKRP nel tessuto muscolare tramite esosomi, per il ripristino della funzionalità genica ed un recupero della glicosilazione dell'alfa-distroglicano. Si ipotizza che la proteina FKRP sia libera nella circolazione sanguigna e che, trasportata dagli esosomi, possa esercitare la sua funzione glicosiltransferasica anche in siti distanti da quello di secrezione. La possibilità di sviluppare un approccio terapeutico combinato, basato su terapia cellulare e genica, promuoverebbe fisiologicamente lo sviluppo di una terapia mediata da esosomi. Il trapianto autologo di cellule staminali ingegnerizzate con un vettore lentivirale esprimente la forma wild-type del gene FKRP, potrebbe favorire il recupero di espressione della proteina ed un effetto di rigenerazione del tessuto distrofico, superando così il limite di un approccio basato solo sulla terapia cellulare. Inoltre, gli esosomi secreti dalle cellule staminali ingegnerizzate e trapiantate nel muscolo, potrebbero mediare un effetto terapeutico sistematico, favorendo un generale miglioramento del fenotipo distrofico.

Da molti anni il gruppo del dott. Torrente collabora con numerosi gruppi di ricerca che operano all'interno dell'Università degli Studi di Milano e convenzionati con la Fondazione IRCCS Ca' Grande Ospedale Maggiore di Milano; in particolare, durante il 2017, la sinergia di diverse conoscenze cliniche, biologiche e un differente expertise tecnologico ha permesso la pubblicazione sulla rivista scientifica **"International Journal of Cancer"** di uno studio realizzato in collaborazione con il gruppo di ricerca diretto dalla Prof.ssa Anna Spada afferente all' U.O.C. Endocrinologia e Malattie Metaboliche della Fondazione.

In questo lavoro è stato valutato il ruolo di progenitori/cellule staminali nella tumorigenesi pituitaria, tumori resistenti a trattamenti farmacologici e la cui recidiva è ancora poco chiara. Gli autori hanno investigato la presenza di progenitori/cellule staminali in adenomi ipofisari non funzionanti (NFPTs) ed hanno testato l'efficacia degli agonisti del recettore di tipo 2 della dopamina (DRD2) e del recettore di tipo 2 della somatostatina (SSTR2) ad inibirne la proliferazione cellulare in vivo. Lo studio mostra che il 70% dei NFPTs formano sfere coesplimenti marcatori delle cellule staminali, fattori di trascrizione (DAX1,SF1, ERG1) e gonadotropine. L'analisi dell'andamento del tumore dimostra che la formazione di sfere è associata alla invasività del tumore. In circa la metà delle cellule dei NFPTs si osserva una riduzione della proliferazione in vitro da parte di agonisti dopaminergici e somatostatinergici

sia nelle cellule tumorali che nei progenitori/cellule staminali, sottolineando la necessità di realizzare ulteriori trial clinici con questi composti nella terapia medica adiuvante NFPTs.

Durante quest'anno sono proseguite importanti collaborazioni che hanno permesso l'integrazione di diverse competenze consentendo al gruppo del professor Torrente di concretizzare le proprie ricerche in pubblicazioni in importanti riviste scientifiche. In tal senso la proficua collaborazione con il gruppo di ricerca diretto da Francesco Meinardi, Professore di Fisica della Materia dell'Università di Milano Bicocca, ha dato origine ad una pubblicazione sulla rivista internazionale "**Scientific Reports**", permettendo di sviluppare la sinergia tra specialisti di vari settori (fisica, biologia, bioingegneria). In questo lavoro gli autori utilizzano un approccio sinergico per la realizzazione di cluster metallici multifunzionali combinando un incremento di luminescenza con una forte e duratura attività di ROS scavenging, basata sulla fabbricazione e sulla protezione in situ di nanocluster di argento (Ag) con un layer sopramolecolare di atomi tiolati di oro (Ag/Au-t). Le analisi di imaging al microscopio confocale e la valutazione della vitalità sottolinea la biocompatibilità del Ag/Au-t e la sua idoneità quale bio-markers. L'analisi della concentrazione di radicali liberi dell'ossigeno rivelano la notevole attività di scavenging dei cluster di Ag. L'analisi della proliferazione delle cellule coltivate in condizioni di stress evidenziano il loro prolungato effetto anticitotossico rispetto ai sistemi con oro, garantendo un positivo rate di proliferazione che si mantiene uguale per un prolungato tempo di incubazione.

Durante l'anno 2017 è proseguita anche la collaborazione internazionale con il Dr Ricordi, Professore di chirurgia e medicina della Divisione Trapianti cellulari presso l'Università di Miami e Direttore del prestigioso Diabetes Research Institute, che ha permesso di realizzare due importanti pubblicazioni. Un lavoro, pubblicato sulla rivista "**Transplantation**", in cui gli autori descrivono gli effetti del trapianto di microcapsule di alginato (Micro) nel ben confinato e vascolarizzato cuscinetto adiposo dell'epididimo (EFP) nel topo, modello dell'omento umano, invece di lasciarlo libero nella cavità peritoneale. Inoltre, in questo studio vengono esaminati gli effetti del polietilenglicole (PEG) utilizzato per rinforzare l'alginato, poichè il PEG a differenza dell'alginato, è resistente allo stress osmotico. Vengono create delle microcapsule mischiando PEG e alginato (MicroMix) o creando nelle microcapsule di alginato con uno strato di PEG di $15\pm2\mu\text{m}$ (Double). I risultati dello studio suggeriscono che la composizione della capsula ed il sito di trapianto influenzano gli esiti dell'innesto attraverso i loro effetti sulla disponibilità di nutrienti, la stabilità della capsula, e la biocompatibilità. Un altro lavoro, pubblicato sulla rivista "**American Journal of Transplantation**", inoltre mostra che il trapianto di isole pancreatiche confinato in un sito ben vascolarizzato come il cuscinetto adiposo dell'epididimo (EFP) migliora l'esito del trapianto, ma solo le isole pancreatiche con un coating conforme (CC) possono essere impiantate in questi siti in dosi curative. Gli autori dimostrano che il CC costituito da polietilenglicole (PEG) e alginato (ALG), non è immunoisolante a causa della sua permeabilità selettività e della forte risposta allogenica di cellule T. Inoltre in ricercatori hanno purificato la composizione CC ed esplorato isole pancreatiche incapsulate PEG e matrice extracellulare (Matrigel) al fine di aumentare l'immunoisolamento diminuendo la loro permeabilità selettività e immunogenicità, ma mantenendone la fisiologica funzione. Gli autori hanno mostrato che le isole CC (PEG MG) ottenute da topi Balb/c completamente MHC-mismatched, trapiantate nel sito EFP di topi C57BL/6 diabetici (750-1000 isole/topo), mostrano una prolungata sopravvivenza (> 100 giorni) in assenza di immunosoppressione. È stata osservata inoltre la mancanza di penetrazione delle cellule immunitarie e della predisposizione alla risposta allogenica. Questi studi quindi supportano l'uso di CC (PEG MG) per l'incapsulamento ed il trapianto di isole in siti clinicamente rilevanti senza ricorrere a trattamenti di immunosoppressione cronica. Infine la collaborazione con il professore Gorka Orive del Dipartimento di Farmacologia dell'Università dei Paesi Baschi di Vittoria ha dato origine all'elaborazione e pubblicazione di un capitolo nel libro "**Cell**

Therapy" dal titolo "Stem Cell Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy". Gli autori in questo capitolo descrivono il potenziale terapeutico delle cellule staminali nel trattamento della distrofia muscolare di Duchenne (DMD). Inoltre sono stati esaminati i pro e i contro dell'uso di cellule staminali in trials clinici e l'insieme di problemi legati alla messa a punto di protocolli finalizzati alla generazione di un gran numero di cellule da trapiantare. Sono stati descritti gli studi sperimentali incentrati sull'analisi della sopravvivenza e sull'efficacia funzionale delle cellule innestate e sulla possibile comparsa di effetti avversi, come una reazione immunitaria e la formazione di tumori. Durante il 2017 il professor Torrente ha continuato la sua attività di revisore di lavori scientifici per numerose prestigiose riviste internazionali e di progetti di ricerca ministeriali e internazionali; inoltre fa parte dell'editorial board della rivista scientifica CellIR4, un giornale multidisciplinare focalizzato in particolare sulla riprogrammazione, differenziamento e rigenerazione cellulare. Infine nel 2017 il professor Torrente, ha proseguito la sua attività didattica presso l'Università degli Studi di Milano quale docente del V anno di Medicina e della scuola di specializzazione in Neurologia e per la lezione "Cellule staminali e medicina rigenerativa" all'interno del Master di Farmacologia Oncologica del Prof Alberto Corsini del Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, docente per il seminario integrativo "Fisiologia e biochimica cellulare di cellule staminali per la terapia di malattie neuromuscolari" del Corso di Fisiologia (Docente Ref. Prof. Roberto Maggi) CdL Magistrale a ciclo unico in Farmacia – Facoltà di Scienze del Farmaco e Docente per il VII° modulo del Corso di Master in Farmacia e Farmacologia Oncologica del Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,

PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA 2017

ELENCO PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI RECENSITE

Paola Frattini, Chiara Villa, Francesca De Santis, Mirella Meregalli, Marzia Belicchi¹, Silvia Erratico, Pamela Bella, Manuela Teresa Raimondi, Qilong Lu and Yvan Torrente

Autologous intramuscular transplantation of engineered satellite cells induces exosome-mediated systemic expression of Fukutin-related protein and rescues disease phenotype in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy type 2I

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

Human Molecular Genetics, 2017, Vol. 0, No. 0 1–17 I.F.: 5.34

Chiara Villa, Vita Manzoli, Maria M. Abreu, Connor A. Verheyen, Michael Seskin, Mejdi Najjar, R. Damaris Molano, Yvan Torrente, Camillo Ricordi, and Alice A. Tomei

Effects of Composition of Alginate-PolyethyleneGlycol Microcapsules and Transplant Site on Encapsulated Islet Graft Outcomes in Mice

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

Transplantation May 2017 Volume 101 Number 5 I.F.: 3.678

B. Santiago-Gonzalez, A. Monguzzi, M. Caputo, C. Villa, M. Prato , C. Santambrogio, Y. Torrente, F. Meinardi & S. Brovelli

Metal Nanoclusters with Synergistically Engineered Optical and Buffering Activity of Intracellular Reactive Oxygen Species by Compositional and Supramolecular Design

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

E. Peverelli, E Giardino, D. Treppiedi, M. Meregalli, M. Belicchi, V. Vaira, S. Corbetta, C. Verdelli, E. Verrua, A. L. Serban, M. Locatelli, G. Carrabba, G. Gaudenzi, E. Malchiodi, L. Cassinelli, A. G. Lania, S. Ferrero, S. Bosari, G. Vitale, Y. Torrente, A. Spada, and G. Mantovani

Dopamine receptor type 2 (DRD2) and somatostatin receptor type 2 (SSTR2) agonists are effective in inhibiting proliferation of progenitor/stem-like cells isolated from nonfunctioning pituitary tumors

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

Int. J. Cancer: 140, 1870–1880 (2017) **I.F.: 6.513**

Vita Manzoli, Chiara Villa, Allison L. Bayer,| Laura C. Morales, R. Damaris Molano, Yvan Torrente, Camillo Ricordi, Jeffrey A. Hubbell, Alice A. Tomei

Immunoisolation of murine islet allografts in vascularized sites through conformal coating with polyethylene glycol

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

Am J Transplant. 2017;1–14. **I.F.: 6.165**

CAPITOLI DI LIBRO

Cell Therapy

Stem Cell Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy

Meregalli M, Belicchi M, Torrente Y

Molecular and Translational Medicine Cap 14 pag 297-317

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

ELENCO CONGRESSI 2017

1. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
Terapie cellulari/geniche. Convegno Atassia di Friedreich: prospettive di trattamento e orizzonti di terapia.
Y. Torrente.
Fondazione Mondino, Pavia. 25 Novembre 2017.
2. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Poster presentation)
Autologous intramuscular transplantation of engineered satellite cells induces exosome-mediated systemic expression of Fukutin-Related Protein and rescues disease phenotype in a murine model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2I. *P.*
Frattini, C.Villa, F. De Santis, M. Meregalli, M. Belicchi, S. Erratico, P. Bella, M. T. Raimondi, Q. Lu and Y. Torrente.
14th IIM Meeting, Assisi. 12-15 Ottobre 2017
3. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
Combining multiple therapeutic strategies for Friedreich's ataxia (FRDA): antioxidant metallic nanoclusters as coadjuvants for gene and stem cell therapy.
Y. Torrente.

IARC 2016. Pisa. 27-30 Settembre 2017

4. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
Cell therapy in muscular dystrophies.
Y. Torrente.
Cell Therapy Symposium. Paris, France. 19-20 Giugno 2017
5. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
Autologous intramuscular transplantation of engineered satellite stem cells induces exosome-mediated systemic expression of Fukutin-Related Protein and rescues disease phenotype in a murine model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2I.
C. Villa. P. Frattini, Y. Torrente.
VIII meeting Stem Cell Research Italy. Chieti, Italy. 25-27 Maggio 2017.
6. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
1. Studio monocentrico in doppio cieco randomizzato dell'effetto di una miscela di flavonoidi ed acidi grassi naturali in pazienti affetti da distrofia muscolare.
Y. Torrente.
Update in Fisiopatologia Venosa e muscolare: attività motorie ed integrazione nutrizionale per migliorare la qualità della vita.
Monza Medicina, Monza. 20 Maggio 2017
7. Comunicazione scientifica su riviste non censite (Oral presentation, Invited speaker)
Implication of a new classification system for patients.
S.Swanepoel, L. Rufibach, Y. Torrente, L. Jacobs, M. Kroneman, S. Vaja.
Workshop session 4. 229th ENMC International Workshop “Limb Girdle Muscular Dystrophies – Nomenclature and reformed Classification”.
Naarden, The Netherlands. 17-19 Aprile 2017

ELENCO DEI PROGETTI DI RICERCA FINANZIATI ED ANCORA IN CORSO

- 1.“Gene transfer of human frataxin protein (FXN) using engineered stem cells for the treatment of Friedreich’s ataxia (FRDA)” - Associazione “Ogni Giorno” - per Emma ONLUS, Associazione “Per il sorriso di Ilaria di Montebruno” ONLUS
- 2.“Tracking di nanoparticelle ph sensibili in modelli murini quale strumento diagnostico per le distrofie muscolari” - Ricerca Corrente – Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
- 3.“New international collaborative team on bag3 myofibrillar myopathy” - Fondazione Roby
4. “Gene therapy for alpha-dystroglycan muscular dystrophy (MDC1C)” _Fondazione Opis Onlus
5. “Multimodal nanotracking for exosome-based therapy in DMD” (Rif. RF-2016-02362263), - Ricerca Finalizzata 2016 (Linea di ricerca: “Theory-enhancing”)
6. “Therapeutic potential of immunoproteasome inhibition in Duchenne muscular dystrophy” (rif. 21104) – AFM Telethon Grant 2017

ELENCO COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI E NAZIONALI

- Luis Garcia, UPMC Um76, Inserm U974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, Paris, France
- Camillo Ricordi, Director of the Diabetes Research Institute (DRI) and the Cell Transplant Center, University of Miami (UM), Miami, Florida
- Giulio Cossu, Institute of Infalmmation and repair, University of Manchester, Manchester, UK
- Fulvio Mavilio, Scientific Director of Genethon, Evry, France
- Pura Muñoz Cánores, ICREA Research Professor and Cell Biology Professor at the Department of Experimental and Life Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain
- Jacques Tremblay, Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada
- Joao da Silva Bizario, AADM/UNAERP Ribeirao Preto, Sao Paolo, Brazil
- Humberto Cerrel Bazo, direttore Dipartimento Medicina riabilitativa AUSL Piacenza
- Adolfo Lopez de Munain Arregui, Grupo Nerogenética, Hospital Donostia-Unidad Experimental San Sebastian, Espana
- Kay Davies, Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, Oxford, UK
- Maurilio Sampaolesi, Stem Cell Research Institute, University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium, Human Anatomy Section, University of Pavia, Pavia, Italy, Interuniversity Institute of Myology (IIM), Italy
- Gillian Butler-Brown and Vincent Mouly, Institut de Myologie, Institut national de la sante et de la recherche me dicale, and L'Universite Pierre et Marie Curie Paris, Paris, France
- Giuseppe Perale, I.B.I. S/A, Svizzera, Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica "Giulio Natta" Sezione Chimica Fisica Applicata, Politecnico di Milano, Milano
- Roberto Maggi, Professore universitario di seconda fascia Fisiologia, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Milano
- Mario Pellegrino, Prof. Associato presso il Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa
- Daniele Cusi, Professore di Nefrologia, Università degli Studi di Milano
- Cristina Barlassina, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano
- Anna Spada, U.O. di Endocrinologia e Diabetologia, Dipartimento di Scienze Mediche, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico
- Irene Cettin, Direttore UO Complessa di Ostetricia e Ginecologia, Direttore Centro di Ricerche Fetali Giorgio Pardi, Università degli Studi di Milano - Polo Universitario Ospedale L.Sacco di Milano

- Paola Rossi, Professore universitario per il settore scientifico disciplinare BIO09 (Fisiologia Generale) presso il Dipartimento di Scienze Fisiologiche e Farmacologiche cellulari e molecolari- Sezione di Fisiologia dell’Università di Pavia.
- Angelo Poletti, Biologia Applicata, Università degli Studi di Milano, Facoltà di Farmacia, Università degli studi di Milano
- Silvio Bicciato, bioinformatics unit, Faculty of Biosciences and Biotechnologies, University of Modena and Reggio Emilia
- Enrico Tagliafico , clinical Biochemistry, University of Modena and Reggio Emilia
- Sergio Abrignani, direttore del National Institute of Molecular Genetics (INGM), Milan, Italy
- Silvano Bosari, direttore UOC Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano
- Carlo Agostoni, Direttore della Clinica Pediatrica II dell’Università degli Studi, IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
- Lorenza Lazzari e Rosaria Giordano, Cell Factory Center for Transfusion Medicine, Cell Therapy and Criobiology, Department of Regenerative Medicine, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
- Agostino Cortelezzi, direttore UOC Ematologia I e Centro Trapainti Midollo, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico
- Giuseppe D’Antona, Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy LUSAMMR, Laboratory for Motor Activities in Rare Diseases, Sport Medicine, Centre Voghera, Voghera, Italy
- Enzo Nisoli, Center for Study and Research on Obesity, Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy;
- Dario Parazzoli, Imaging Facility IFOM Foundation – The FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation, Milan, Italy
- Stefano Campaner, Center for Genomic Science of IIT@SEMM; Istituto Italiano di Tecnologia (IIT); Milan, Italy
- Francesco Nicassio, Department of Experimental Oncology, European Institute of Oncology, IFOM-IEO Campus
- Luciano Conti, Laboratory of Stem Cell Biology, CiBio, Università di Trento
- Alessandro Quattrone, Director of CiBio, University of Trento
- Elena Cattaneo, Department of Biosciences and Centre for Stem cell Research, Università degli Studi di Milano
- Giovanna Cantarella, Dirigente Medico Otorinolaringoiatra e Foniatria, Padiglione Monteggia, Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
- Mauro Pluderi e Nadia Grimoldi, UO Neurochirurgia, Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
- Paolo Vezzoni, Dirigente di Ricerca e Responsabile dell’Unità Operativa di Supporto (UOS) dell’Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) del CNR.
- Marina Bouchè, Unit of Histology, and IIM, Sapienza University, DAHFMO, Rome, Italy

- Davide Gabellini, Dulbecco Telethon Institute and Division of Regenerative Medicine, San Raffaele Scientific Institute, Milan
- Franco Rustichelli, Dipartimento di Scienze Cliniche e Odontostomatologiche, Sezione di Biochimica, Biologia e Fisica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy
- Silvia Della Bella, Lab of Clinical and Experimental Immunology, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano (MI), Italy, Department of Medical Biotechnologies and Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy
- Aldo Pagano, Department of Experimental Medicine, University of Genoa, Genoa, Italy, IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino-IST, Genoa, Italy
- Francesco Meinardi, Professore di Fisica della Materia, l'Università di Milano Bicocca
- Jose F Rodriguez-Matas-, Associate professor, LabS (www.labsmech.polimi.it) Chemistry, Materials and Chemical Engineering Department “Giulio Natta”Politecnico di Milano, Italy
- Giorgio Roberto Merlo, Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la salute- Università di Torino

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

- Responsabile:
- M. Moggio

Dirigente Medico Fondazione - Neurologo, direttore UOD malattie neuromuscolari e rare e direttore "Banca tessuto muscolare scheletrico, nervo periferico, DNA e colture cellulari"

- Collaboratori:
- M. Sciacco:

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

- G. Fagiolari:
- P. Ciscato:
- M. Ripolone:
- R. Violano:
- L. Peverelli:
- A. Lerario:
- L. Villa:
- P. Valentini:
- R. Tironi:
- E. Conca:
- V. Galimberti:
- S. Brajkovic:

Biologo - Tecnico ospedaliero Fondazione
Tecnico ospedaliero Fondazione
Biologo - Contrattista Fondazione
Biologo - Contrattista Fondazione
Neurologo - Contrattista Fondazione
Neurologo - Contrattista Fondazione
Specializzanda in Neurologia (fino a luglio 2017)
Architetto - amministrativa - Contrattista Telethon
Tecnico - Contrattista Unimi/Fondazione
Biologo - Contrattista Telethon (fino a luglio 2017)
Biologo - Contrattista Telethon (da ottobre 2017)
Neurologo – Borsista Fondazione

ATTIVITÀ DIAGNOSTICA

1) Nell'anno 2017 l'attività assistenziale riguardante le malattie neuromuscolari è sovrapponibile a quella dell'anno precedente.

In particolare:

- effettuate n. 1100 visite nell'ambulatorio per le malattie neuromuscolari in collaborazione con la UO di Neurologia.
- effettuati n. 320 accessi in regime MAC per le suddette patologie.

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

- studiate e refertate 211 biopsie muscolari, 17 biopsie di nervo periferico e due biopsie cutanee.

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

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

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

3) Attività della “Banca di tessuti muscolari, nervo periferico, DNA e colture cellulari” della UOSD:

- Sono state effettuate spedizioni di campioni biologici di pazienti affetti da malattie Rare Neuromuscolari a n. 16 centri di diagnostica e ricerca sia nazionali sia internazionali.
- Sono state effettuate spedizioni per un totale di n. 100 campioni biologici (tessuti muscolari, DNA, colture).

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

- Dall'anno 1999 il Laboratorio ha avuto il riconoscimento di “Biobanca Telethon di tessuto muscolare scheletrico, nervo periferico, DNA e colture cellulari”. I diversi campioni biologici stoccati nella banca sono a disposizione dei ricercatori italiani e stranieri interessati e sono elencati in un dedicato sito web:
<http://www.centrodinoferrari.com/laboratori/u-o-d-diagnostica-malattie-neuromuscolari-e-rare/>.

- Dall’anno 2001 la banca è parte dell’EuroBiobank, un network di banche di Istituti scientifici di diversi paesi della Comunità Europea.
- Dall’anno 2002 la banca è anche parte del Progetto Finalizzato dell’Ospedale Maggiore “Biorepository”.
- Da Luglio 2002 l’Unità operativa ha ottenuto la certificazione ISO 9001:2000 per “Progettazione ed erogazione di servizi di diagnostica morfologica e ricerca nell’ambito di malattie rare neuromuscolari, in regime di degenza, ambulatoriale e in convenzione per enti terzi. Gestione di una Banca di tessuto muscolare, nervo periferico e DNA”.
- Dal 2008 è partner del “Telethon Network of Genetic Biobanks”.
- Da Luglio 2013 è entrata a far parte dell’Infrastruttura di ricerca europea Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI).
- Dal 2013 la Biobanca è parte di RD-Connect.

Biopsie Muscolari

Microscopia ottica

Durante l’anno 2017 sono state eseguite n. 210 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 2670 tests.

Microscopia elettronica

Le biopsie muscolari sono state studiate con metodiche ultrastrutturali quando ritenuto necessario e sono stati eseguiti 37 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 2017 sono state eseguite n. 18 biopsie di nervo periferico. Tutti i prelievi biotecnici 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 87 tests (istologia e reazioni immunocitochimiche).

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

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

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

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

Microscopia elettronica

Le biopsie di nervo sono state incluse in resine epossidiche e tecnicate per le osservazioni in microscopia elettronica, per l'isolamento delle singole fibre nervose e per la valutazione quantitativa della densità fibrale. A tal fine sono stati eseguiti circa 72 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 2017 i seguenti risultati:

Cucchiari D, Colombo I, Amato O, Podestà MA, Reggiani F, Valentino R, Faravelli I, Testolin S, Moggio M, Badalamenti S.

Exertional rhabdomyolysis leading to acute kidney injury: when genetic defects are diagnosed in adult life.

CEN Case Rep. 2017 Dec 12. doi: 10.1007/s13730-017-0292-z.

Linea: Epidemiologia Clinica

Tipologia: Case Report

Ricaduta assistenziale: Si

Il lavoro descrive il caso di un paziente affetto da rhabdomiolisi in cui è stato riscontrato un difetto nel metabolismo dei lipidi e una mutazione nel gene codificante l'enzima Carnitina Palmitoil-transferasi II.

Cassandrini D, Trovato R, Rubegni A, Lenzi S, Fiorillo C, Baldacci J, Minetti C, Astrea G, Bruno C, Santorelli FM; Italian Network on Congenital Myopathies.

Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools.

Ital J Pediatr. 2017 Nov 15;43(1):101. doi: 10.1186/s13052-017-0419-z. Review.

IF 1.668

Linea: Medicina di genere

Tipologia: Articolo originale/Review

Ricaduta assistenziale: No

Le miopatie congenite sono un gruppo di malattie ereditarie rare che colpiscono primitivamente il muscolo scheletrico in seguito a mutazioni genetiche nelle proteine strutturali del muscolo. Generalmente le miopatie congenite esordiscono nel bambino molto piccolo, tuttavia è possibile l'esordio anche nell'età adulta. In questo lavoro, sono state esaminate le forme cliniche e genetiche delle miopatie congenite e sono state definite le

possibili caratteristiche istologiche e di imaging che possono migliorare il rapporto costo-efficacia nella diagnosi.

Cortese A, Laurà M, Casali C, Nishino I, Hayashi YK, Magri S, Taroni F, Stuani C, Saveri P, Moggio M, Ripolone M, Prelle A, Pisciotta C, Sagnelli A, Pichieccio A, Reilly MM, Buratti E, Pareyson D.

Altered tdp-43 dependent splicing in hspb8-related distal hereditary motor neuropathy and myofibrillar myopathy.

Eur J Neurol. 2017 Oct 13. doi: 10.1111/ene.13478. [Epub ahead of print]

IF 3.988

Linea: Epidemiologia Clinica

Tipologia: Articolo originale/Review

Ricaduta assistenziale: No

Mutazioni nel gene codificante la proteina heat shock HSPB8 sono associate a casi di neuropatia motoria ereditaria distale (dHMN), e a casi di miopatia miofibrillare (MFM) con aggregati proteici e inclusioni TDP-43 positive.

In questo lavoro è stata descritta una nuova famiglia portatrice della mutazione K141E in HSPB8, in particolare, lo studio della biopsia muscolare di un membro della famiglia ha permesso di stabilire una correlazione tra la presenza di aggregati proteici e l'alterata funzione di TDP43.

Feichtinger RG, Oláhová M, Kishita Y, Garone C, Kremer LS, Yagi M, Uchiumi T, Jourdain AA, Thompson K, D'Souza AR, Kopajtich R, Alston CL, Koch J, Sperl W, Mastantuono E, Strom TM, Wortmann SB, Meitinger T, Pierre G, Chinnery PF, Chrzanowska-Lightowers ZM, Lightowers RN, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Moggio M, Sciacco M, Comi GP, Ronchi D, Murayama K, Ohtake A, Rebelo-Guiomar P, Kohda M, Kang D, Mayr JA, Taylor RW, Okazaki Y, Minczuk M, Prokisch H.

Biallelic C1QBP Mutations Cause Severe Neonatal-, Childhood-, or Later-Onset Cardiomyopathy Associated with Combined Respiratory-Chain Deficiencies.

Am J Hum Genet. 2017 Oct 5;101(4):525-538. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.08.015. Epub 2017 Sep 21.

IF 9.025

Linea: Epidemiologia Clinica

Tipologia: Articolo originale/Review

Ricaduta assistenziale: No

C1QBP è una proteina altamente conservata dal punto di vista evolutivo, localizzata principalmente nella matrice mitocondriale, con funzioni ancora non del tutto conosciute.

In questo lavoro vengono descritti quattro pazienti appartenenti a famiglie tra loro non correlate, in cui mutazioni bialleliche nella proteina C1QBP sono associate ad un difetto nel metabolismo energetico mitocondriale.

In tutti gli individui affetti è stato riscontrato un deficit dei complessi I, III e IV della catena respiratoria associati all'accumulo di delezioni multiple del DNA mitocondriale.

Lo spettro clinico comprende cardiomiopatia accompagnata da coinvolgimento multisistematico (fegato, reni e cervello) nei neonati, mentre bambini e adulti presentano miopatia e oftalmoplegia esterna progressiva.

Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, Federico A, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Santorelli FM, Servidei S, Tonin P, Ardissoni A, Bello L, Bruno C, Ienco EC, Diodato D, Filosto M, Lamperti C, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Primiano G, Ronchi D, Rubegni A, Salvatore S, Sciacco M, Valentino ML, Vercelli L, Toscano A, Zeviani M, Siciliano G, Mancuso M.

Revisiting mitochondrial ocular myopathies: a study from the Italian Network.

J Neurol. 2017 Aug;264(8):1777-1784. doi: 10.1007/s00415-017-8567-z. Epub 2017 Jul 10.

IF 3.389

Linea: Epidemiologia Clinica

Tipologia: Studio Multicentrico

Ricaduta assistenziale: No

Uno studio retrospettivo è stato condotto su un'ampia coorte di pazienti appartenenti al “Nation-wide Italian Collaborative Network of Mitochondrial Diseases”, con lo scopo di analizzare i fenotipi clinici dei pazienti affetti da miopatie oculari.

Dallo studio si evince che la maggior parte dei pazienti affetti da mitocondriopatie (55,3%) presentano miopia oculare associata a singole delezioni del DNA mitocondriale e a mutazioni nel gene POLG.

Salera S, Menni F, Moggio M, Guez S, Sciacco M, Esposito S.

Nutritional Challenges in Duchenne Muscular Dystrophy.

Nutrients. 2017 Jun 10;9(6). pii: E594. doi: 10.3390/nu9060594. Review.

IF 3.550

Linea: Medicina di Genere

Tipologia: Articolo originale/Review

Ricaduta assistenziale: No

Le complicazioni nutrizionali sono frequenti nei pazienti affetti da malattie neuromuscolari e spesso sono sottostimate.

Questa review analizza gli aspetti nutrizionali e le complicazioni che possono manifestarsi nei bambini affetti da distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e aumentare con il progredire dell'età. Tali aspetti devono essere considerati attentamente soprattutto nella fase di transizione tra l'età pediatrica e quella giovanile, infatti è stato dimostrato che un'adeguata assistenza nutrizionale può aiutare a migliorare la qualità della vita dei pazienti affetti da DMD.

Ripolone M, Violano R, Ronchi D, Mondello S, Nascimbeni A, Colombo I, Fagiolari G, Bordoni A, Fortunato F, Lucchini V, Saredi S, Filosto M, Musumeci O, Tonin P, Mongini T, Previtali S, Morandi L, Angelini C, Mora M, Sandri M, Sciacco M, Toscano A, Comi GP, Moggio M.

Effects of short-to-long term enzyme replacement therapy (ERT) on skeletal muscle tissue in late onset Pompe disease (LOPD).

Neuropathol Appl Neurobiol. 2017 Jun 2. doi: 10.1111/nan.12414. [Epub ahead of print]

IF 5.347

Linea: Terapia personalizzata

Tipologia: Studio multicentrico

70

Ricaduta assistenziale: Si

La malattia di Pompe è una malattia lisosomiale dovuta a mutazioni nel gene che codifica per l'enzima α -glucosidasi acida (GAA). Dal 2006 è disponibile in Italia la terapia enzimatica sostitutiva. In questo lavoro sono stati studiati 18 pazienti adulti affetti dalla malattia di Pompe che hanno eseguito due biopsie muscolari, una prima e una dopo aver assunto la terapia. Dal confronto tra le due biopsie, è stato dimostrato che la ERT ha effetti benefici nei pazienti, sia dal punto di vista clinico, sia dal punto di vista bioptico. Le biopsie post-ERT, infatti, hanno mostrato dopo 6 mesi di trattamento, una riduzione dei vacuoli, soprattutto quelli di piccole dimensioni, un miglioramento del flusso autofagico e un aumento dell'attività dell'enzima GAA.

D'Amico A, Catteruccia M, Baranello G, Politano L, Govoni A, Previtali SC, Pane M, D'Angelo MG, Bruno C, Messina S, Ricci F, Pegoraro E, Pini A, Berardinelli A, Gorni K, Battini R, Vita G, Trucco F, Scutifero M, Petillo R, D'Ambrosio P, Ardissoni A, Pasanisi B, Vita G, Mongini T, Moggio M, Comi GP, Mercuri E, Bertini E.

Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy in Italy in the last decade: Critical issues and areas for improvements.

Neuromuscul Disord. 2017 May;27(5):447-451. doi: 10.1016/j.nmd.2017.02.006. Epub 2017 Feb 14.
IF 2.969

Linea: Epidemiologia Clinica

Tipologia: Studio Multicentrico

Ricaduta assistenziale: No

Nonostante gli importanti progressi raggiunti negli ultimi 50 anni nella diagnosi precoce della distrofia muscolare di Duchenne (DMD), la diagnosi, nella maggior parte dei paesi nel mondo, avviene verso i 4-5 anni. In questo lavoro è stato condotto uno studio retrospettivo su 384 ragazzi, seguiti in 16 centri italiani nel corso degli ultimi 10 anni (dal 2005 al 2014) al fine di definire l'età a cui viene diagnosticata la DMD. Inoltre sono stati esaminati i più importanti segni clinici che possono indicare l'insorgenza della malattia e il percorso per arrivare alla diagnosi. L'età media alla diagnosi nella nostra coorte di pazienti era di circa 10-12 mesi inferiore a quella riportata in altri paesi.

Böhm J, Bulla M, Urquhart JE, Malfatti E, Williams SG, O'Sullivan J, Szlauer A, Koch C, Baranello G, Mora M, Ripolone M, Violano R, Moggio M, Kingston H, Dawson T, DeGoede CG, Nixon J, Boland A, Deleuze JF, Romero N, Newman WG, Demaurex N, Laporte J.

ORAI1 Mutations with Distinct Channel Gating Defects in Tubular Aggregate Myopathy.

Hum Mutat. 2017 Apr;38(4):426-438. doi: 10.1002/humu.23172. Epub 2017 Feb 2.
IF 4.601

Linea: Neuroscience

Tipologia: Articolo originale/Review

Ricaduta assistenziale: No

La miopatia con aggregati tubulari (TAM) e la sindrome di Stormorken sono causate da una mutazione gain-of-function dominante dei geni che codificano per due proteine (STIM1 e ORAI1) coinvolte nel rilascio di calcio all'interno del reticolo endoplasmatico. Tramite sequenziamento esonomico, sono state identificate nuove mutazioni nel gene ORAI1 in pazienti affetti da TAM. In particolare le mutazioni G98S e V107M rendono costitutivamente

permeabile il canale del calcio mentre la mutazione T184M è responsabile di un'alterazione che coinvolge la permeabilità del canale. Con questo studio si evidenzia come, ad ogni aberrazione relativa all'omeostasi del rilascio di calcio, corrispondano un fenotipo ed un preciso meccanismo patogenetico del muscolo scheletrico.

Magri F, Nigro V, Angelini C, Mongini T, Mora M, Moroni I, Toscano A, D'angelo MG, Tomelleri G, Siciliano G, Ricci G, Bruno C, Corti S, Musumeci O, Tasca G, Ricci E, Monforte M, Sciacco M, Fiorillo C, Gandossini S, Minetti C, Morandi L, Savarese M, Fruscia GD, Semplicini C, Pegoraro E, Govoni A, Brusa R, Del Bo R, Ronchi D, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

The Italian limb girdle muscular dystrophy registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis.

Muscle Nerve. 2017 Jan;55(1):55-68. doi: 10.1002/mus.25192. Epub 2016 Oct 28.

IF 2.605

Linea: Epidemiologia Clinica

Tipologia: Studio Multicentrico

Ricaduta assistenziale: No

Le distrofie muscolari dei cingoli (LGMD) sono un gruppo di malattie geneticamente determinate, caratterizzate da debolezza muscolare progressiva, nelle quali è coinvolta in maniera predominante la muscolatura del cingolo pelvico o scapolare. La definizione molecolare è fondamentale per scopi sia prognostici, sia terapeutici.

In questo studio è stato creato un registro in cui sono stati inseriti 370 pazienti definiti molecolarmente. La caratterizzazione clinica dettagliata, e l'analisi del tessuto muscolare sono fondamentali per guidare la diagnosi differenziale e la scelta dei test molecolari opportuni. L'analisi mediante Next Generation Sequencing (NGS) ha identificato mutazioni nel 36,5% dei nostri pazienti.

PROGETTI IN CORSO:

- Prosegue il progetto “Correlazioni genotipo fenotipo nella distrofia Facio Scapolo Omerale (FSHD)” nell’ambito del Consorzio Italiano per la FSHD con particolare attenzione per i casi con “aplotipi permissivi” A166. Lo studio è condotto su 23 famiglie che appartengono ai circa 700 casi indice studiati in corso del precedente progetto. Si tratta di un progetto in collaborazione con tutti i centri presenti in Italia che seguono pazienti affetti da tale malattia e che sono riuniti nel Telethon network of FSHD. È iniziato uno studio relativo all'espressione della malattia in familiari di pazienti affetti da FSHD. Al momento stiamo analizzando 34 famiglie.
- È in fase di validazione la messa a punto di una nuova e aggiornata scheda di valutazione clinica di pazienti affetti da FSHD che, rispetto a quella in uso, approfondisce maggiormente il quadro clinico il che consente di effettuare migliori correlazioni genotipiche. Il progetto è in pratica ultimato e si è passati all'applicazione della nuova scheda nei centri del network.
- Prosegue il percorso per un consenso attinente i requisiti diagnostici dei pazienti affetti da FSHD2, ovvero tutti quei pazienti che, pur presentando un quadro clinico compatibile con la distrofia FSHD, non sono portatori di una contrazione dell'allele D4Z4.
- Continua lo studio di una famiglia composta da due germani, un maschio di 30 anni e una femmina di 23 anni, entrambi affetti da distrofia facio-scapolare omerale (FSHD) con

compromissione clinica rispettivamente moderata e lieve. Entrambi sono portatori di un frammento corto D4Z4 sul cromosoma 4q35 considerato diagnostico della patologia in questione. Anche la madre e il nonno materno presentano lo stesso difetto genetico, ma non sono clinicamente compromessi. Ciò potrebbe essere spiegato da una penetranza incompleta della patologia, in alternativa, potrebbe trattarsi di una forma a trasmissione autosomica recessiva nella quale il frammento corto D4Z4, ereditato in questo caso per via materna, unitamente ad un fattore genetico sconosciuto ereditato per via paterna, determina la malattia. Nel corso dell'ultimo anno, i risultati di uno studio di Next Generation Sequencing (NGS) hanno evidenziato nei probandi una serie di alterazioni in eterozigosi di geni responsabili di altre malattie neuromuscolari

- E' stato completato e pubblicato lo studio che ha valutato l'effetto della terapia con enzima ricombinante (ERT) in 18 pazienti affetti da Glicogenosi di tipo II. Alcune delle biopsie acquisite saranno ora utilizzate per la valutazione, mediante approcci di proteomica e lipidomica, degli effetti che il deficit di GAA determina sui vari pathways metabolici e anabolici nel muscolo scheletrico.
- 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". Il progetto ha assunto le caratteristiche di un progetto multicentrico che coinvolge alcuni dei laboratori italiani che si dedicano a tali patologie.
- È stato completato il progetto "Analisi biochimica, istologica e test comportamentali per lo studio della glicogenosi di tipo III nel modello murino knockout Agl" in collaborazione con il Prof. Comi Giacomo Pietro, Laboratorio di Genetica e Biochimica - Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università di Milano – Fondazione IRCCS Ca' Granda – Ospedale Maggiore Policlinico di Milano. Abbiamo iniziato lo studio dei modelli knockout, trattati con terapia retro virale (adenovirus), per verificare se tale terapia porta ad una diminuzione delle vaste raccolte di glicogeno libero intramuscolare. In particolare, nel corso dell'ultimo anno, abbiamo esaminato gli effetti della dieta ad alto contenuto proteico e del ripristino dell'attività enzimatica con adenovirus. Il lavoro è attualmente in corso di pubblicazione.
- La UOD Malattie Neuromuscolari è stata accreditata dalla UE per partecipare agli ERN europei dedicati alle "Neuromuscular Rare Diseases" e alle "Musculoskeletal connective Diseases".
- Studio multicentrico "Studio in doppio cieco, multinazionale, multicentrico, randomizzato in fase 3 per mettere a confronto l'efficacia e la sicurezza di infusioni bisettimanali ripetute di neoGAA (GZ402666) e alglucosidase alfa (Myozyme®/Lumizyme®) in pazienti naïve al trattamento affetti da malattia di Pompe ad esordio tardivo. Sponsor: Sanofi genzyme
- Progetto Becker Regione "Studio multicentrico, randomizzato, in doppio-cieco, placebo-controlled per valutare gli effetti micro-macroscopici sui muscoli, la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia di givinostat in soggetti affetti da Distrofia Muscolare di Becker (BMD). Sponsor: Italfarmaco.
- Studio multicentrico. "Studio familiare ed analisi dell'esoma per identificare i fattori genetici associati alla variabilità clinica della Malattia di Pompe ad esordio tardivo (Late Onset Pompe Disease – LOPD). Principal Investigator. Prof Cesare Danesino (Istituto Mondino IRCCS, Pavia) Sponsor: Sanofi

- Studio multicentrico. “Studio prospettico non-interventistico in soggetti affetti da Malattia di Pompe ad esordio tardivo che attualmente stanno assumendo terapia con Enzima Ricombinante (POM-003). Sponsor: Amicus Therapeutics

FINANZIAMENTI IN CORSO:

- Ministero della Salute Ricerca Corrente 2017
- “Follow-up di pazienti affetti da Malattia di Pompe in trattamento con terapia enzimatica sostitutiva”.
- Telethon Network
- “Progetto Telethon Network of Genetic Biobanks” anni 2014-2018
- Telethon Network
- “Development of the Italian National Registry for FSHD” anni 2014-2017
- Collaborazione con IRCCS Auxologico Italiano al progetto di ricerca finalizzata dal titolo "Understanding the biological continuum between Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Fronto-temporal dementia (FTD): a step towards a more efficient assistance model for the affected patients" - Resp. Scientifico UOSD Dr. Maurizio Moggio
- Progetto Becker Regione “Studio multicentrico, randomizzato, in doppio-cieco, placebo-controlled per valutare gli effetti micro-macroscopici sui muscoli, la sicurezza, la tollerabilità e l’efficacia di givinostat in soggetti affetti da Distrofia Muscolare di Becker (BMD). Sponsor: Italfarmaco.

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 Adobatti	Dirigente I° Livello – Stroke Unit IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Luca Maderna	Dirigente I° Livello - Neurofisiologia IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Stefano Messina	Dirigente I° Livello - Neurologia IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Andrea Ciammola	Dirigente I° Livello - Neurologia IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Barbara Corrà	Dirigente I° Livello – Stroke Unit IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Nicola Ticozzi	Ricercatore Universitario Neurologia Università degli Studi di Milano IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Claudia Morelli	Dirigente I° Livello - Neurologia IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Luca Campana	Neurologo, Contrattista in Convenzione IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Riccardo Doronzo	Neurologo, Consulente in Convenzione IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Carolina Lombardi	Dirigente I° Livello - Centro Sonno IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Paola Mattaliano	Dirigente I° Livello - Centro Sonno IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Alberto Doretti	Neurologo, Consulente in Convenzione IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Federico Verde	Neurologo, Consulente in Convenzione IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Davide Sangalli	Neurologo, Consulente in Convenzione IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Ignazio Keller Sarmiento	Specializzando in Neurologia Università degli Studi di Milano IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott. Gianluca Demirtzidis	Tecnico di Neurofisiologia Coordinatore Trial Clinici IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Barbara Poletti	Dirigente I° Livello - Psicologia 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 Tipo	Psicologa, Assegnista di ricerca Post doc - A Università degli Studi di Milano IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Alessandra Gnesa	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 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 Genetista, Contratto di Consulenza IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Patrizia Bossolasco	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Claudia Colombrita	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Cinzia Tiloca	IRCCS Istituto Auxologico Italiano Biotecnologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Valentina Gumina Molecolare e	Biologa, Dottoranda in Medicina
Milano Dott.ssa Annamaria Maraschi	Traslazionale - Università degli Studi di IRCCS Istituto Auxologico Italiano Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Silvia Peverelli	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Francesca Sassone	Biologa, Contrattista a Progetto IRCCS Istituto Auxologico Italiano
Dott.ssa Clara Volpe Molecolare e Milano	Medico, Dottoranda in Medicina Traslazionale Università degli Studi di IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Rapporti di collaborazione:

Nazionali:

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

“Centro Dino Ferrari”

Dott.ssa Cinzia Gellera, Dott. Franco Taroni,
Prof. Giuseppe Lauria, Dott.ssa Giacomina
Rossi, Dott. Frabrizio Tagliavini

IRCCS Istituto C. Besta, Milano

Dott.ssa Lorenza Lazzari

IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico

Dott. Fabio Blandini,
Dr. Cristina Cereda

IRCCS Istituto Mondino, Pavia

Dott. Christian Lunetta, Dott.ssa Valeria
Sansone

Centro Clinico Nemo

Prof. Luca Persani

Dipartimento di Endocrinologia
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Dott.ssa Palma Finelli,
Dott.ssa Daniela Giardino

Laboratorio di Citogenetica
IRCCS Istituto Auxologico Italiano

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

Dipartimento di Farmacologia
Università di Milano - CEND

Prof. Fabio Triulzi
Dott. Alessandro Sillani
Dott.ssa Clara Sina

IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico

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

Neuroimaging Research Unit and
Department of Neurology,
Institute of Experimental Neurology,

Prof. Andrea Falini

Division of Neuroscience and
Department of Neuroradiology,
Vita-Salute University and
San Raffaele Scientific Institute, Milan

Dott. Emanuele Buratti

Laboratory of Molecular Pathology

International Centre for Genetic Engineering
and Biotechnology (ICGEB), Trieste

Prof. Angelo Poletti

Dipartimento di Scienze Farmacologiche
e Biomolecolari, CEND,
Università degli Studi di Milano

Prof. Emanuele Borgonovo
Dott. ssa Raffaella Piccarreta

Dipartimento di Scienze Decisionali
Università Commerciale “L. Bocconi”

Internazionali:

Prof. Robert H. Brown, Prof. John Landers

University of Massachusetts Medical
School, Department of Neurology
Worcester, MA, USA

Prof. Albert Ludolph

Università di Ulm, Germania
Dipartimento di Neurologia

Prof. Ammar Al-Chalabi
Prof. Christopher Shaw
Prof. John Powell

King's College, London
Dipartimento di Neurologia

Prof. Leonard Petrucelli

Mayo Clinic, Florida, USA
Department of Neurology

Prof. Markus Weber

Dipartimento di Neurologia
Università di St. Gallen, Svizzera

Prof. Dale J. Lange

Department of Neurology
New York – USA

Prof. Hiroshi Mitsumoto

Department of Neurology
Eleanor and Lou Gehrig MDA/ALS
Research Center
Columbia University Medical Center
New York – USA

Prof. Merit E. Cudkowicz

Neuromuscular Division Neurology
Massachusetts General Hospital
Boston - USA

Prof. Stanley H. Appel

Department of Neurology
Methodist Neurological Institute Chair
Houston -USA

Prof. Sharon Abrahams

Euan Mac Donald Centre for Motor
Neurone Disease Research
University of Edinburgh - UK

La Sede Distaccata del Centro "Dino Ferrari" presso la U.O. di Neurologia e Laboratorio di Neuroscienze dell' Università degli Studi di Milano - IRCCS Istituto Auxologico Italiano ha prodotto nel 2017 un numero rilevante di contributi scientifici volti a definire i meccanismi patogenetici responsabili delle diverse patologie neurodegenerative e cerebrovascolari, con attenta traslazione tra clinica ed laboratorio.

Le diverse patologie neurodegenerative - Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e Malattie del Motoneurone, Demenza Frontotemporale (FTD), Malattia di Alzheimer (AD) e altre Demenze, Malattia di Parkinson (PD) e parkinsonismi, Malattia di Huntington (HD) - sono state indagate utilizzando Centri dedicati alla valutazione clinica, raccolta di biomarcatori ed elaborazione di innovative strategie terapeutiche. Nel 2017 è stato riconosciuto dalla Regione Lombardia ed inserito nell' elenco dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) il Centro per i Disturbi Cognitivi e Demenze (CDCD) afferente, appunto, alla U.O. di Neurologia dell' IRCCS Istituto Auxologico Italiano di cui risulta responsabile il Prof. V. Silani.

Parallelamente alla intensa attività clinica e di ricerca è proseguita la formazione di giovani medici, MD/PhD, biologi/biotecnologi che sono stati anche inviati per periodi variabili in Laboratori sia in Nord America che in Europa. E', inoltre, proseguita, anche la formazione di giovani psicologi/neuropsicologi.

La crescita degli investimenti in apparecchiature dedicate in particolare alla genetica ed alla biologia molecolare ha dato rilievo alla collezione di materiale biologico ed ha permesso di continuare l'operato del Consorzio SLAGEN con un lavoro sinergico tra 6 diverse Istituzioni Italiane tra cui 4 IRCCS a cui si sono formalmente aggiunti nel 2017 altri 4 Centri altamente qualificati. Il Centro "Dino Ferrari" continua a rappresentare un interlocutore internazionalmente riconosciuto per casistiche di pazienti affetti da diverse malattie neurodegenerative, di cui SLA/FTD in particolare. Nel 2017 l'IRCCS Istituto Auxologico Italiano è entrato a far parte degli ERN europei con riferimento alla patologia motoneuronale e neuromuscolare (ERN-MND). Il Centro SLA dell' IRCCS Istituto Auxologico Italiano è stato, inoltre, ammesso a far parte del Northeast ALS Consortium (USA), avviando una stretta collaborazione con diversi Centri Nord-Americanini dedicati alle malattie del motoneurone ed alla SLA in particolare.

La FTD è oggi da considerare un continuum biologico-clinico con la SLA sulla scorta delle crescenti evidenze sperimentali e il Centro ha aderito all'Italian Frontotemporal Dementia Network (FTD Group – SINDEM).

È proseguita sotto la direzione della U.O. di Neurologia l'attività della moderna Stroke Unit coordinata dalla Dott. Laura Adobbati, fornita di 6 letti di cui 4 con monitorizzazione fissa che ha comportato l'acquisizione e la formazione di nuovo personale specializzato, medico e infermieristico. È stata avviata una intensa attività clinica con monitoraggio 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 sistemica ed intraarteriosa con limitata incidenza di effetti collaterali, contando sulla consulenza neurochirurgica della medesima istituzione. L'utilizzo della RM 3 Tesla ha permesso di sviluppare adeguatamente diversi studi relativi alla patologia neurodegenerativa e cerebrovascolare. L'aprirsi degli interessi alla patologia cerebrovascolare ha fornito nuovi spunti di ricerca intersecati alla patologia neurodegenerativa: è maturato, infatti, un largo interesse per l' angiopatia amiloidotica primitiva dei vasi cerebrali.

Nel 2017 è stato ulteriormente sviluppato il Servizio di Neurofisiologia coordinato dal Dott. Luca Maderna, con studio Doppler del nervo periferico integrato all' EMG/ENG classico, con ulteriore definizione di una moderna tecnica per la determinazione del numero di motoneuroni fisiologicamente attivi (MUNE) e con studio della patologia nel sonno, mediante proficua interazione con la U.O. di Cardiologia diretta dal Prof. Gianfranco Parati. Nel 2017 l'IRCCS

Istituto Auxologico Italiano ha aperto un nuovo sito ambulatoriale di Via Procaccini, rivolto alla clientela internazionale che fa riferimento all’Istituzione per un pronto inquadramento diagnostico e terapeutico: in particolare l’area extrapiramidale e le cefalee sono state implementate con ambulatori dedicati.

Nel 2017 è stato ulteriormente sviluppato il Servizio di Neuropsicologia e Psicologia Clinica coordinato dalla Dott.ssa Barbara Poletti, dove a fianco all’intensa attività clinica rivolta allo screening, alla diagnosi differenziale ed alla riabilitazione dell’impairment cognitivo e delle Demenze, nonché del sostegno psicologico ai pazienti affetti da patologia neurodegenerativa e dei loro caregiver, si sono ulteriormente approfondite alcune linee di ricerca che hanno visto la messa a punto e l’implementazione di innovative metodiche per lo studio e la valutazione del funzionamento cognitivo, quali la Brain-Computer Interface (BCI) e l’Eye Tracking (ET). È stata sviluppata, in collaborazione con la Prof.ssa Sharon Abrahams dell’Università di Edinburgh, la versione italiana dell’Edinburgh Cognitive and Behavioural ALS Screen (ECAS), strumento gold standard per l’assessment cognitivo-comportamentale dell’spettro fronto-temporale nella SLA. Sono stati poi implementati percorsi multidisciplinari per la valutazione ed il trattamento sia della cefale che dell’insonnia, quest’ultima in collaborazione con il Centro di Medicina del Sonno, diretto dalla Dott.ssa Carolina Lombardi. La formazione di équipe multidisciplinari è stata perseguita ed è tutt’ora oggetto di sviluppo per diverse patologie al fine di implementare i percorsi di diagnosi e cura delle stesse. Infine sono stati sviluppati studi di ricerca dei pazienti affetti da patologia neurodegenerativa mediante l’utilizzo della RM 3 Tesla.

Un moderno ed umano approccio alle più temibili malattie neurodegenerative rappresenta, infatti, l’obiettivo perseguito della U.O. di Neurologia di cui il Centro “Dino Ferrari” è parte operante, vicino alla matrice storica della IRCCS Fondazione Ca’ Granda Ospedale Maggiore di Milano dove è originariamente nato.

Il momento riabilitativo ha molto occupato l’attenzione del Centro “Dino Ferrari” che ha collaborato a disegnare le fasi successive alla diagnosi nelle diverse patologie, proponendo studi clinici ed innovativi approcci riabilitativi, in sintonia con gli organismi Sanitari Regionali anche per l’analisi dei costi.

La 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 (SNP) in relazione alle patologie neurodegenerative di cui il Centro “Dino Ferrari” per tradizione si occupa, ha permesso di sviluppare ulteriormente il progetto di associazione genica tipo “genome wide” (GWA) per la definizione di geni di suscettibilità nella SLA sporadica con l’importante contributo del Consorzio SLAGEN per la raccolta dei campioni di DNA e una sincronia di ricerca presso i diversi Centri Italiani. La diagnostica molecolare è stata ulteriormente arricchita potendo fornire oggi un pannello diagnostico completo per le malattie del motoneurone (SLA), le Demenze (FTD e la Malattia di Alzheimer), per i disturbi extrapiramidali (Malattia Parkinson): le malattie con amplificazione come la SLA legata al gene C9orf72 vengono separatamente sequenziate. Relativamente alla SLA/FTD, dopo il completamento nel 2014 della più vasta metanalisi di GWA in oltre 13.000 campioni di DNA con identificazione di un locus sul cromosoma 17 associato alla SLA sporadica (Fogh et al., Hum Mol Gen 2014), vi sono state ulteriori conferme in più ampi GWA (van Rheenen et al., Nat Gen 2016). Lo studio dell’esoma di un numero rilevante di pazienti affetti da SLA/FTD ha permesso di identificare due nuovi geni causativi nell’ambito di una vasta collaborazione internazionale: ANXA11 (Smith et al., 2017) e KIF5A (Nicolas et al., submitted).

I rapporti con diversi ricercatori del Centro “Dino Ferrari” sono stati molto attivi con l’avanzamento di comuni progetti. In particolare, lo 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. Nero Bresolin, Prof. Giacomo Comi, Prof. Stefania Corti). Nel 2017, inoltre, il Centro “Dino Ferrari” ha mantenuto la funzione direttiva nell’ ambito dell’ European ALS Consortium (ENCALS), organizzazione Europea dedicata allo sviluppo delle problematiche inerenti le malattie del motoneurone (il Prof. V. Silani ne è stato Chairman). Diversi Teaching Course sono stati organizzati nell’ ambito della European Academy of Neurology (EAN): il Prof. Silani è tuttora co-chairman del l’EAN Subspeciality Scientific panel ALS and Frontotemporal Dementia (Dicembre 2015).

Il Centro “Dino Ferrari” 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. Nel 2017 continua a svolgere parte attiva nel Consorzio Italiano della Demenza a Corpi di Lewy e nel Consorzio Italo-Tedesco per la FTD. Di notevole impatto è stato il ruolo riconosciuto nell’ European Reference Network for Rare Neuromuscular Diseases o EURO-NMD (2017). Il Prof. Silani è stato Referente SINDEM per la Piattaforma Italiana per le Malattie Neurodegenerative (ItalPlaNeD).

La migliore espressione dell’attività svolta dalla Sede Distaccata del Centro “Dino Ferrari” sta nell’ ulteriore consenso internazionale raggiunto nel 2017 anche per un rilevante numero di ricercatori (no. 3) che stanno svolgendo o hanno completato periodi formativi in qualificati Laboratori in Europa o nel Nord-America con cui il Centro “Dino Ferrari” ha scambi collaborativi di elevato livello. In particolare, la Dr.ssa Isabella Fogh si è occupata dello studio di geni modificatori regolanti la SLA sporadica. In particolare nel 2017 ha studiato una popolazione europea di pazienti sporadici SLA portatori dell’espansione patologica G4C2 nel gene C9orf72. In collaborazione con il Professor John Powell e Professor Chris Shaw presso il Dipartimento di Clinical e Basic Neuroscience al King’s College London, ha analizzato dati genotipici di tutto il genoma (GWAS) in un gran numero di pazienti Europei e nord Americani raccolti da consortia internazionali quali SLAGEN, ALSGEN e Project MinE.

Il Dr. Niccolò Mencacci, conseguito il dottorato di ricerca in Neurogenetica con il Professor John Hardy presso University College London, si trova ora presso la Feinberg School of Medicine - Northwestern University - Chicago, USA

Il Dott. Federico Verde, Specializzando in Neurologia, è stato ammesso al Department of Neurology della Università di Ulm diretto dal Prof. Albert Ludolph ed ha concluso nel 2017 un periodo formativo di ricerca della durata di un anno con acquisizione di diversi risultati scientifici.

L’ IRCCS Istituto Auxologico Italiano è entrato a fare parte della Rete Italiana dei NeuroIRCCS ed il Prof. V. Silani ha spesso coadiuvato il Direttore Scientifico Prof. Alberto Zanchetti nella spiegazione dei diversi compiti istituzionali, rappresentando l’ IRCCS in diverse occasioni.

Il Prof. Vincenzo Silani è parte all’ editorial Board di European Neurology, ALS/FTD, American Journal of Neurodegenerative Diseases e, dal 2017, di Annals of Transplantation Research.

PRINCIPALI ARGOMENTI DI RICERCA

IDENTIFICATION OF RISK VARIANTS ASSOCIATED WITH ALS SUSCEPTIBILITY USING A CASE-CONTROL, RARE VARIANT BURDEN ANALYSIS ON WES DATA

Nell’ambito del progetto IrisALS, il Centro ha collaborato al sequenziamento dell’esoma di una coorte di circa 1500 pazienti affetti da SLA familiare e sporadica, al fine di identificare varianti rare associate alla suscettibilità per la malattia, utilizzando diverse strategie di analisi. Lo studio di questi dati ha prodotto i seguenti risultati:

- mediante analisi manuale delle varianti rare comuni a più esomi di casi indice affetti da SLA familiare, sono state evidenziate mutazioni comuni nel gene *ANXA11*. Tale gene codifica per una proteina la cui funzione è largamente sconosciuta, benché probabilmente coinvolta nell'omeostasi del calcio intracellulare. Cellule trasfettate con costrutti *ANXA11*mut formano aggregati citoplasmatici simili a quelli osservati in pazienti portatori di mutazioni in altri geni associati alla SLA (Smith et al., 2017);

- effettuando una *rare-variant burden analysis* su 1138 esomi di pazienti affetti da SLA familiare vs 19494 controlli sani, abbiamo identificato un eccesso di varianti rare (soprattutto mutazioni non senso e/o *frameshift*, determinanti perdita di funzione della proteina) nel gene *KIF5A*. Tale osservazione è stata validata indipendentemente da un ampio studio GWA su 20806 casi di SLA sporadica vs 59804 controlli sani, con la scoperta di una associazione della mutazione missenso p.P986L di *KIF5A* con la suscettibilità di sviluppare la malattia. *KIF5A* codifica per una proteina della famiglia delle kinesine, coinvolta nel trasporto assonale anterogrado. Mutazioni nel dominio motorio N-terminale di *KIF5A* sono state precedentemente associate a forme di paraparesi spastica (SPG10) o neuropatia (CMT2A) ereditarie; le varianti individuate nei pazienti affetti da SLA, invece, sono tutte localizzate nel dominio C-terminale, responsabile per il legame con i cargo proteici. La scoperta delle mutazioni in *KIF5A* supporta l'ipotesi che le alterazioni del citoscheletro e/o del trasporto assonale giocano un ruolo determinante nella patogenesi della malattia (Nicolas et al., submitted).

Nel 2018 ci proponiamo di sviluppare tale linea di ricerca mediante il sequenziamento dell'intero genoma (whole genome sequencing) della coorte di pazienti con SLA familiare, così da poter studiare anche le regioni non codificanti del genoma, ed ottimizzando i protocolli di analisi bioinformatica in modo da aumentarne la sensibilità.

IDENTIFICATION OF VARIANTS ASSOCIATED WITH GENETIC MODIFIERS IN SPORADIC AMYOTROPHIC LATERAL SCEROSIS AND C9orf72 CARRIERS

Nonostante l'aspettativa media di vita non superi i tre anni, il 5% dei pazienti SLA puo' vivere piu' di una decade. Allo scopo di studiare tale variabilita', abbiamo cercato possibili geni modificatori associati al sub-phenotype survival. Nel 2015-16, la Dr. Fogh ha raccolto dati clinici di circa 6000 pazienti Europei e Nord Americani, i dati genotipici originali presenti sulle piattaforme GWAS sono stati amplificati tramite analisi di imputazione genome wide. Oltre 7 milioni di SNPs sono stati poi analizzati per associazione con il survival utilizzando un metodo statistico innovativo quale la Cox Proportional Hazard regression (CPH) analysis su scala genomica (ProbABEL program). Tale metodo ha permesso di studiare ogni singolo polimorfismo come fattore rischio di morte indipendente, portando all'identificazione di un nuovo gene, *CAMTA1*, capace di ridurre la sopravvivenza nei pazienti sporadici di circa 4 mesi.

Nel 2017 la Dr. Fogh ha studiato geni modificatori che regolano l'eta' di insorgenza e il tempo di sopravvivenza in pazienti sporadici SLA portatori dell'espansione patologica G4C2 nel gene C9orf72. Dati genotipici e clinici erano disponibili per 386 carriers europei con fenotipo SLA e SLA-FTD (~30%) forniti dai nostri collaboratori del Project MinE e dello SLAGEN Consortium. Tramite il metodo di genome wide CPH sopra descritto e di regressione lineare sono stati analizzati rispettivamente per associazione con survival ed eta' di insorgenza piu' di 7 milioni di varianti geniche. Un locus sul cromosoma 6p2.1e' stato identificato significativamente associato ($P < 5 \times 10^{-8}$) con l'eta' di esordio nei carriers con l'espansione nel gene C9orf72. I carriers con il genotipo rischio CG correlano con un anticipo di 9 anni dell'eta' di esordio. L'identificazione di questo gene potrebbe consentire studi di

follow up clinici con farmaci mirati che potrebbero ritardare l'esordio del fenotipo SLA. Questi risultati interessanti sono stati presentati al 28th MNDA Symposium 2017 a Boston nel Dicembre 2017.

STUDIO INTERNAZIONALE DELLE VARIANTI GENOTIPICHE PRESENTI SUL CROMOSOMA X

Insieme con età e storia familiare, il sesso maschile è considerato uno dei maggiori fattori rischio per l'insorgenza della SLA con una prevalenza di 1.6:1 entro le prime 5 decadi di vita. Tale prevalenza diminuisce con l'invecchiamento suggerendo nelle donne un possibile ruolo protettivo degli estrogeni nel periodo pre-menopausa. In accordo con tali dati clinici, nel 2015-16 la Dr.ssa Fogh aveva studiato il contributo al fenotipo SLA delle varianti geniche sul cromosoma X analizzando una coorte internazionale di 6000 casi e 7000 controlli. Dopo amplificazione delle varianti X-linked mediante analisi di imputazione X-wide, diversi test di associazione sono stati eseguiti utilizzando programmi specifici per le analisi X-WIDE come XWAS v1.0 e GWAMA. Nessun locus è risultato associato significativamente ($P\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$) alla suscettibilità della SLA. In seguito a questi dati preliminari, la direzione del consorzio Project MinE ha ora proposto alla Dr.Fogh di completare lo studio del cromosoma X su una coorte allargata che include dati di nuovi pazienti raccolti dai vari consorzi europei e che comprende più di 33,000 individui (~13,000 casi e 20,000 controlli). Lo studio prevede l'identificazione di geni rischio e modificatori per diversi sub-fenotipi SLA (in progress).

LA METILAZIONE DEL GENE C9ORF72 COME FATTORE MODIFICATORE DEL FENOTIPO CLINICO SLA/FTD

Dati di letteratura riportano un'aumentata metilazione del gene *C9orf72* con espansione patologica della sequenza esanucleotidica GGGGCC ripetuta a livello del promotore e anche a livello della espansione stessa (RE) rispetto ai pazienti SLA non mutati e a controlli sani. Nei tessuti cerebrali e nel sangue la metilazione del promotore di *C9orf72* mutato associa con una ridotta espressione genica con una ridotta formazione sia di foci di RNA espanso sia di dipeptidi ripetuti derivanti da traduzione RAN dell'RNA espanso, suggerendo un ruolo neuroprotettivo della metilazione in presenza di mutazione in *C9orf72*. Nella nostra coorte di pazienti SLA e FTD mutati *C9orf72* (60 campioni) abbiamo caratterizzato la metilazione del promotore (26 siti CpG) e della RE in DNA genomico da sangue che, da dati di letteratura, sembra riflettere lo stato di metilazione a livello di tessuto cerebrale. Mediante conversione del DNA genomico con bisolfito e successivo sequenziamento di Sanger abbiamo confermato che, anche nella nostra coorte, il 65% dei pazienti *C9orf72*-positivi ha il promotore metilato (il 35% presenta più di 4 siti CpG metilati) rispetto al 3% dei pazienti SLA non mutati. Abbiamo inoltre dimostrato, mediante Repeat Primed-PCR modificata dopo trattamento con bisolfito, che in tutti i pazienti *C9orf72* la RE è essa stessa altamente metilata. Abbiamo identificato a monte del promotore di *C9orf72* una sequenza CpG shore contenente ulteriori 7 siti CpG che risultano essere quasi sempre metilati in tutti i pazienti *C9orf72*, indipendentemente dal grado di metilazione del promotore. Su materiale biologico disponibile da sangue abbiamo estratto l'RNA totale e condotto saggi di Real time PCR per saggiare l'espressione genica di *C9orf72*. I nostri risultati mostrano una correlazione inversa tra livello di metilazione del promotore ed espressione genica di tutte e 3 le isoforme del gene *C9orf72*. Stiamo ancora valutando le possibili correlazioni tra grado di metilazione del promotore e caratteristiche cliniche dei pazienti mutati *C9orf72* per definire l'eventuale effetto modificatore di tali modificazioni epigenetiche.

STUDIO DELLA SUMOILAZIONE DELLA PROTEINA TDP-43 NELLA SLA

La proteina TDP-43 rappresenta il marcitore neuropatologico della SLA familiare e sporadica nonché di alcune forme di FTD ed è soggetta a diverse modificazioni post-traduzionali, quali fosforilazione e acetilazione, che ne possono influenzare la stabilità e la propensione all'aggregazione in condizione di malattia. Il nostro studio si è focalizzato su un altro tipo di modifica post-traduzionale, la SUMOilazione, molto simile all'ubiquitinazione e che ha importanti ruoli regolatori a livello di trascrizione, trasporto nucleo-citoplasma e proprietà biochimiche delle proteine bersaglio (stabilità, solubilità, aggregazione). Mediante esperimenti di immunoprecipitazione abbiamo dimostrato che una frazione di proteina TDP-43 è fisiologicamente SUMOilata in cellule HEK e di neuroblastoma umano a livello del dominio N-terminale importante per il legame agli RNA (RRM1). Poiché studi di predizione *in silico* evidenziano un potenziale sito di SUMOilazione in posizione K136, abbiamo mutagenizzato tale sito (K136R) e studiato la proteina SUMO-resistente in termini di stabilità, sub-localizzazione cellulare e attività di splicing. La proteina mutante TDP-43 K136R mostra una normale distribuzione a livello nucleare ma, in condizioni di insulto da arsenite, non è in grado di essere reclutata negli stress granules come risposta adattativa a condizioni di stress cellulare, a differenza dei mutanti puntiformi nella porzione C-terminale identificati nei pazienti SLA familiari (Q331K, M337V, A382T). Abbiamo inoltre osservato che la proteina mutante K136R ha una ridotta capacità di legare i trascritti bersaglio, quale *TNIK*, in esperimenti di UV-CLIP e una ridotta attività di splicing dei geni *TNIK* e *POLDIP3* mediante saggi di minigene. L'inibizione della SUMOilazione in generale mediante over-espressione dell'enzima deconjugante SENP1 determina una maggior localizzazione di TDP-43 wild-type nel citoplasma probabilmente favorendo una possibile e graduale sua aggregazione patologica. Stiamo valutando la modulazione della SUMOilazione quale potenziale approccio per favorire un efficiente trasporto nucleo-citoplasma di TDP-43 e diminuire la sua localizzazione citoplasmatica.

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLO STRESS OSSIDATIVO IN FIBROBLASTI DI PAZIENTI SLA FAMILIARI

Colture primarie di fibroblasti ottenuti da paziente rappresentano un buon modello periferico di malattia e alterazioni a livello del metabolismo mitocondriale sono già state da noi descritte in fibroblasti SLA con mutazione nei geni causativi *TARDBP* e *C9orf72* (Onesto et al, 2015). Utilizzando gli stessi modelli cellulari abbiamo quest'anno studiato la risposta allo stress ossidativo da arsenite sia in condizioni acute come da letteratura (30min-1hr) sia in condizione di insulto prolungato (48hr-5gg) per mimare una situazione più fisiologica di stress cronico caratterizzante il processo neurodegenerativo. Sono state allestite 3 diverse linee di fibroblasti di pazienti SLA con la mutazione A382T nel gene *TARDBP*, 3 con espansione patologica nel gene *C9orf72* e 3 controlli sani. Valutando la capacità di tali cellule di formare stress granules (SG), grossi complessi ribonucleoproteici citoplasmatici in cui si ha un temporaneo arresto della traduzione in seguito ad insulto, abbiamo osservato che la risposta allo stress ossidativo è diversa tra cellule mutate e sane e diversa anche tra i due gruppi di cellule mutate. In particolare, le cellule SLA mutate formano un maggior numero di SG in seguito ad insulto acuto (0.5M per 1hr) rispetto ai controlli e il 90% dei fibroblasti *C9orf72* forma SG rispetto al 58% dei fibroblasti *TARDBP*, a parità di vitalità cellulare. La dimensione degli SG non sembra però essere diversa nei vari gruppi. Abbiamo quindi testato varie condizioni di stress, abbassando la concentrazione di arsenite (<50µM) e allungando il tempo di esposizione a 48h e a 5 giorni. Anche in queste condizioni osserviamo la formazione di SG, dato non ancora riportato in letteratura, e una diversa risposta delle cellule mutate rispetto ai controlli sani. Contrariamente alla condizione di stress ossidativo acuto, entrambi i fibroblasti SLA mutati formano un minor numero di SG (30-35%) rispetto ai controlli sani

(55%) durante l'esposizione prolungata allo stress e le dimensioni di tali granuli sono significativamente maggiori nelle cellule *C9orf72*. Inoltre i nostri dati indicano che anche la proteina TDP-43 viene reclutata negli SG in queste condizioni di stress cronico, a sostegno dell'ipotesi che gli SG possano rappresentare il primo step nella formazione degli aggregati patologici di TDP-43 nei tessuti cerebrali affetti dei pazienti SLA.

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

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) ottenute mediante riprogrammazione di cellule adulte presentano caratteristiche del tutto simili alle cellule embrionali ma non sono soggette a limitazioni di ordine etico. Le iPSCs si sono rivelate essere un potente strumento di studio per la comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari, fisiologici o causativi di diverse patologie potendosi propagare indefinitamente *in vitro* e differenziare in qualsiasi tipo di cellula somatica. Le iPSCs sono particolarmente utili qualora si intendano studiare meccanismi relativi a cellule difficilmente isolabili direttamente da un organismo. Le iPSCs possono essere differenziate *in vitro* sia in cellule staminali neurali che in cellule differenziate quali astrociti e neuroni di vario tipo. Numerosi lavori suggeriscono che nella SLA, oltre al motoneurone, altri tipi cellulari del sistema nervoso centrale contribuiscono alla progressione di malattia, inclusi astrociti, microglia ed oligodendrociti. Lo studio delle interazioni tra diversi tipi cellulari risulta quindi di primaria importanza per la comprensione dei meccanismi alla base dello sviluppo e della progressione di malattia e per la valutazione di nuove strategie terapeutiche non solo nella SLA ma anche in altre patologie neurodegenerative. In particolare, l'individuazione di un preciso ruolo svolto dalle cellule accessorie al motoneurone consentirebbe di identificare possibili nuovi target terapeutici per la cura della malattia. Attualmente è in corso l'allestimento di una banca di iPSCs.

Fibroblasti cutanei e cellule mononucleate derivanti da pazienti affetti da SLA e da donatori sani vengono riprogrammate mediante l'utilizzo di Sendai virus. Per ogni campione (al momento sono stati riprogrammati 15 campioni) vengono selezionati, espansi e congelati dai 6 ai 12 cloni di iPSCs. Questi vengono testati mediante RT-PCR e immunocitochimica per l'espressione di marcatori di staminalità e la non espressione di marcatori specifici per cellule differenziate. Ne viene inoltre testata *in vitro* la capacità di differenziamento spontaneo. Le iPSCs vengono inoltre differenziate in motoneuroni ed altri tipi neuronali per diversi studi *in vitro*. In particolare sono stati analizzati motoneuroni derivanti da iPSCs ottenute per riprogrammazione di cellule mononucleate da paziente con mutazione TDP-43 e sono stati confrontati con quelli ottenuti da un donatore sano. Principalmente, non si è osservata nessuna differenza nelle capacità di riprogrammazione e differenziamento tra paziente e controllo. Risultava inoltre inalterata la localizzazione della proteina TDP-43. Sono al momento in fase iniziale una collaborazione che prevede la riprogrammazione da parte del nostro istituto di cellule da pazienti con FTD (provenienti dall' IRCCS Istituto C. Besta, Milano) ed una collaborazione interna all'Istituto Auxologico (Laboratorio di Citogenetica) con sangue periferico proveniente da pazienti affetti da Smith-Magenis. In entrambe le collaborazioni, le cellule verranno riprogrammate e differenziate in neurone per studiare alcuni meccanismi sottostanti le patologie.

LIVELLI SIERICI DELLA CATENA LEGGERA DEL NEUROFILAMENTO (NFL) MEDIANTE ELISA DIGITALE PER LA DIAGNOSI DI SLA

La diagnosi di SLA si fonda tuttora principalmente su criteri clinici e gli esami strumentali o di laboratorio hanno la funzione di supportare la diagnosi e di escludere diagnosi alternative. I biomarcatori su fluidi biologici (liquor e sangue) non sono ancora inclusi nei criteri diagnostici e non vengono ancora utilizzati sistematicamente in ambito clinico. Essi sono

tuttavia oggetto di crescenti studi. Ad oggi gli unici biomarcatori che presentino una buona performance diagnostica nella discriminazione tra SLA ed altre condizioni sono la catena pesante fosforilata e la catena leggera dei neurofilamenti (pNFH e NFL rispettivamente). I neurofilamenti sono costituenti strutturali del citoscheletro degli assoni mielinizzanti di grosso calibro e sono rilasciati nel liquor in condizioni di danno o degenerazione assonale. Pertanto la loro concentrazione liquorale è aumentata nella SLA in confronto a controlli sani e anche ad altre malattie neurologiche. Una metodica di analisi ultrasensibile di recente introduzione (single molecule array ELISA, anche noto come ELISA digitale) consente ora la misurazione della concentrazione dei neurofilamenti su sangue (siero o plasma) che, essendo molto bassa a causa dell'origine liquorale di queste molecole, sfugge alla rilevazione da parte di metodiche più tradizionali. Mentre è stato dimostrato che nella SLA le concentrazioni ematiche di NFL e pNFH sono più elevate che in controlli sani, non è stato ancora condotto uno studio della performance diagnostica di questi biomarcatori ematici nella discriminazione tra la SLA ed altre categorie di malattie neurologiche, con speciale riferimento alle altre malattie neurodegenerative e alle sindromi neurologiche incluse nella diagnosi differenziale della SLA, ovvero i cosiddetti "ALS mimics". Utilizzando questa metodica in collaborazione con il Laboratorio di neurologia sperimentale e neurochimica dell'Università di Ulm (Germania), il nostro Centro ha analizzato i livelli di NFL nel siero di 124 pazienti con SLA e 159 controlli, così ripartiti: 50 controlli privi di malattie neurodegenerative o malattie infiammatorie del sistema nervoso centrale, 44 pazienti con "ALS mimics", 20 pazienti con malattia di Alzheimer, 20 pazienti con demenza frontotemporale, 19 pazienti con malattia di Parkinson e 6 pazienti con malattia di Creutzfeldt-Jakob. I pazienti con SLA presentano concentrazioni sieriche di NFL significativamente superiori rispetto a tutte le altre categorie eccetto la malattia di Creutzfeldt-Jakob, ed il biomarcatore presenta una soddisfacente performance diagnostica nella discriminazione tra SLA e le altre condizioni, con sensibilità e specificità molto simili a quelle dello stesso biomarker misurato su liquor nonché a quelle dei biomarker liquorali correntemente utilizzati per la diagnosi di malattia di Alzheimer (frammento amiloide A-beta e proteina tau).

Questo lavoro pone quindi all'attenzione della comunità scientifica NFL come biomarcatore sierico candidato per la diagnosi di SLA.

I livelli sierici di NFL nei pazienti con SLA correlano inoltre con la velocità di progressione della malattia e sono associati alla sopravvivenza, in quanto i pazienti con livelli più bassi tendono a sopravvivere meno a lungo di quelli con livelli più alti. Infine, misurazioni ripetute di NFL sierico in una subcoorte di pazienti con SLA hanno mostrato che i livelli del biomarcatore sono piuttosto stabili nel corso della malattia nel singolo paziente. Questa caratteristica, unita alla correlazione dei livelli di NFL con la velocità di progressione della malattia e quindi con l'aggressività biologica della stessa, conferisce a NFL il valore aggiuntivo di biomarcatore prognostico e lo rende potenzialmente utilizzabile per supportare la stratificazione dei pazienti in futuri trial terapeutici nonché per il monitoraggio della risposta a farmaci impiegati nei trial stessi. Il lavoro è stato sottomesso ad una rivista internazionale peer-reviewed.

LIVELLI LIQUORALI E SIERICI DI NEUROFILAMENTI NELLA SLA IN FASE PRECOCE

In questo studio, condotto in collaborazione con il Laboratorio di neurologia sperimentale e neurochimica dell'Università di Ulm (Germania), sono stati analizzati i livelli liquorali di pNFH e NFL, nonché i livelli sierici di NFL, in 54 pazienti con sclerosi laterale amiotrofica (SLA) con esordio recente della malattia (entro 6 mesi), 135 pazienti con esordio risalente a oltre 6 mesi prima, e pazienti con altre malattie neurologiche o "ALS mimics". Il lavoro ha dimostrato che i neurofilamenti presentano una soddisfacente performance diagnostica nella discriminazione tra SLA e altre condizioni anche nei pazienti con esordio recente della SLA,

facendo di questi biomarcatori dei validi candidati per la diagnosi anche nei primi mesi dall'esordio della malattia. Inoltre le concentrazioni dei neurofilamenti non differiscono tra i pazienti con SLA appartenenti alle diverse categorie di probabilità diagnostica previste dai criteri diagnostici in uso.

LIVELLI DI CROMOGRANINA A NEL LIQUOR DI PAZIENTI CON SLA

In collaborazione con il laboratorio di neurologia sperimentale e neurochimica dell'Università di Ulm (Germania), ha analizzato i livelli di cromogranina A (CgA) nel liquor di pazienti con SLA ($n = 32$) e controlli non affetti da malattie neurodegenerative o malattie infiammatorie del sistema nervoso centrale ($n = 32$). Spunto per lo studio è stato la pubblicazione di un precedente lavoro che segnalava livelli aumentati della molecola nel liquor di pazienti con SLA rispetto a controlli. La CgA è una proteina di 439 aminoacidi, costituente delle "large dense-core vesicles" delle cellule neuroendocrine e dei neuroni e coinvolta principalmente nella regolazione della secrezione. Alcune evidenze precliniche suggeriscono una sua rilevanza nella patogenesi della SLA. La nostra analisi, condotta su una casistica più ampia del lavoro precedente, non ha confermato l'aumento dei livelli della molecola nei pazienti con SLA, bensì ha mostrato che essi sono lievemente ridotti rispetto ai controlli. Questo vale soprattutto per i pazienti maschi, che mostrano livelli liquorali di CgA significativamente inferiori sia rispetto ai controlli maschi sia rispetto alle femmine affette da SLA. Tuttavia esiste un'ampia sovrapposizione tra i livelli liquorali di CgA dei pazienti e dei controlli, cosicché la discriminazione tra le due categorie consentita dal marcitore è largamente subottimale, a differenza di quanto osservato nella stessa casistica per i livelli della catena pesante fosforilata del neurofilamento (pNFH), che con il suo elevato potere discriminativo rappresenta un accertato biomarcatore diagnostico per la SLA. La CgA non sembra quindi un promettente biomarcatore per la diagnosi di SLA, ma ciò non esclude che le differenze riscontrate rispetto ai controlli, soprattutto nella popolazione maschile, riflettano meccanismi fisiopatologicamente rilevanti e con ciò meritevoli di ulteriori studi di laboratorio. Il lavoro è stato recentemente sottomesso ad una rivista internazionale peer-reviewed.

LIVELLI DEL MARKER DI MICROGLIA E MACROFAGI CHITOTRIOSIDASI (CHIT1) NEL LIQUOR DEI PAZIENTI CON SLA

In questo studio, condotto in collaborazione con il laboratorio di neurologia sperimentale e neurochimica dell'Università di Ulm (Germania), sono stati analizzati i livelli liquorali del marcitore di microglia e macrofagi chitotriosidasi (Chit1) in una coorte di 266 pazienti comprendenti pazienti con SLA ($n = 60$), "ALS mimics" ($n = 46$), pazienti con altre malattie neurodegenerative ($n = 135$, suddivisi tra pazienti con malattia di Alzheimer, malattia di Parkinson, demenza frontotemporale e malattia di Creutzfeldt-Jakob) e controlli esenti da malattie neurodegenerative o da malattie infiammatorie del sistema nervoso ($n = 25$). I livelli liquorali di Chit1 sono più elevati nei pazienti con SLA che nei controlli, nei pazienti con "ALS mimics" e nei pazienti con altre malattie neurodegenerative eccetto la malattia di Creutzfeldt-Jakob. I livelli di Chit1 correlano inoltre con la velocità di progressione della malattia. Una analisi istopatologica mostra inoltre che Chit1 è espresso dalla microglia e dai macrofagi a livello del tratto corticospinale nel midollo spinale dei pazienti con SLA ma non nei controlli, nei pazienti con malattia di Alzheimer o nei pazienti con malattia di Creutzfeldt-Jakob. Chit1 emerge quindi come interessante biomarcatore diagnostico e prognostico e indica nella attivazione microgliale e macrofagica a livello del midollo spinale un meccanismo di possibile rilevanza nella eziopatogenesi della SLA.

LIVELLI DI PNFH NEL LIQUOR DI PAZIENTI CON SLA DOVUTA A ESPANSIONE DEL GENE C9ORF72

Questo studio, condotto in collaborazione con il Dipartimento di neuroscienze della Mayo Clinic di Jacksonville (Florida, USA), ha analizzato i livelli liquorali di pNFH nei pazienti con la forma di SLA dovuta a espansione esanucleotidica del gene *C9orf72* (C9-ALS), che costituisce la causa più frequente della forma familiare della SLA nonché di una percentuale fino al 5% delle forme apparentemente sporadiche. Come dimostrato in precedenza per la SLA nel suo complesso, anche nella C9-ALS pNFH liquorale è elevato, correla con la velocità di progressione della malattia ed è associato alla sopravvivenza. Inoltre i livelli di pNFH sono più elevati nella C9-ALS che nelle forme non dovute a questa mutazione, in accordo con la maggiore aggressività biologica della suddetta forma. Lo studio ha anche mostrato che i livelli di pNFH sono più elevati nei pazienti con C9-ALS clinicamente conclamata che nei portatori asintomatici della mutazione, e discriminano con precisione tra le due condizioni. Infine nei pazienti con C9-ALS i livelli liquorali di pNFH sono stabili nel tempo, rendendo il biomarcatore un promettente candidato per il monitoraggio della risposta a farmaci in futuri trial terapeutici dedicati a questa forma di malattia.

VALUTAZIONE DEI DIPEPTIDI GPn NEL LIQUOR DI PAZIENTI SLA E DI INDIVIDUI PRESINTOMATICI CON MUTAZIONE NEL GENE C9ORF72

In collaborazione col Prof. L. Petrucci (Mayo Clinic, Florida) specifici saggi immunoenzimatici ad eletrochemiluminescenza utilizzando la tecnologia MSD (Meso Scale Discovery) permettono di rilevare la presenza di dipetidi GPn e GA derivanti dalla traduzione RAN degli RNA patologici di *C9orf72* con espansione nel liquor. I saggi sono stati ottimizzati per la rilevazione dei dipeptidi anche nei lisati cellulari di cellule PBMC con un'elevata specificità e sensibilità. Attraverso studi longitudinali su un'ampia casistica di pazienti mutati *C9orf72* abbiamo osservato che i livelli liquorali rimangono inalterati durante la progressione di malattia, rendendo tali dipeptidi biomarcatori ottimali in caso di futuri trials clinici (Gendron et al, 2017). L'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (ASO) contro la sequenza ripetuta espansa infatti è in grado di abbassare il livello di dipeptidi sia in modelli murini di malattia che in neuroni umani derivati da cellule iPS di pazienti *C9orf72*, come misurato dal nostro saggio MSD. Inoltre negli individui *C9orf72* presintomatici abbiamo dimostrato che il saggio MSD è in grado di rilevare la presenza specifica dei dipeptidi nel liquor molto precocemente, supportando ulteriormente la validità di tali biomarcatori per futuri trials terapeutici mirati contro il gene *C9orf72*.

CARATTERIZZAZIONE DEI LIVELLI CIRCOLANTI DI ADIPONECTINA IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE NEURODEGENERATIVE (ADI-SLA)

Lo studio è stato condotto in collaborazione con la Dott.ssa Raffaella Cancello afferente al Dipartimento di Scienze Mediche e Riabilitative ad indirizzo Endocrino-Metabolico, IRCCS Istituto Auxologico Italiano e per la parte clinica, con la Dr.ssa Claudia Morelli e il Dott. Nicola Ticozzi del Dipartimento di Neurologia. I campioni di pazienti con demenza frontotemporale sono ottenuti nell'ambito di una collaborazione con il laboratorio del Prof. Scarpini, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Milano, IRCCS-Fondazione Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano. Nel corso del 2017 sono stati pubblicati su una rivista internazionale peer review i dati precedentemente ottenuti sulle significative variazioni dei valori di adiponectina in pazienti affetti da diverse malattie neurodegenerative. Conseguentemente nel corso dell'anno ci si è prefissati di ampliare la casistica dei pazienti affetti da Demenza Frontotemporale (FTD) per confermare i nostri dati preliminari attestanti una più elevata concentrazione di adiponectina, probabilmente correlata al decadimento cognitivo, come precedentemente dimostrato in letteratura per i pazienti affetti da malattia di Alzheimer. La collaborazione con il Prof Scarpini del Policlinico di Milano ci ha permesso di aggiungere ulteriori 17 campioni di pazienti affetti da FTD (8 femmine e 9 maschi) da

analizzare mediante enzyme-linked immunosorbent assay kits (ELISA). Questi campioni hanno però dimostrato una elevata variabilità nei valori di adiponectina spaziando da concentrazioni elevate paragonabili a quelle rilevate nel lavoro precedente a concentrazioni molto più basse. Stiamo ampliando ulteriormente la casistica e contemporaneamente analizzando i dati clinici disponibili con i collaboratori sui pazienti già testati per comprendere e correttamente valutare i dati ottenuti poiché l'adiponectina è direttamente correlata al peso e alle condizioni nutrizionali del paziente ed influenza direttamente l'omeostasi del glucosio e il metabolismo degli acidi grassi.

Contemporaneamente è stata ampliata la casistica di pazienti con mutazione C9orf72 che risulta essere la causa genetica più comune della demenza frontotemporale (FTD) e della sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Sono stati testati i valori di adiponectina nel siero di 4 pazienti maschi con la mutazione stoccati nella biobanca presente in Istituto ed afferente al nostro Dipartimento di Neurologia ed attualmente stiamo analizzando i risultati ottenuti ed ampliando la casistica con nuovi pazienti.

RETE NEUROIRCCS ed OTTIMIZZAZIONE/ARMONIZZAZIONE DI SEQUENZE RM IN STUDI MULTICENTRICI

Nel 2017 la nostra U.O. ha preso parte, nell'ambito di una collaborazione con la Neuroradiologia della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale maggiore Policlinico ed unitamente ad altri 21 IRCCS, al progetto “Criteri per l’ottimizzazione e l’armonizzazione di sequenze RM nell’ambito di studi multicentrici di neuro-imaging ad alto campo”, promosso dal ministero della Salute. Scopo del progetto è lo sviluppo di metodi, linee guida e standardizzazione per l’acquisizione, elaborazione e condivisione di protocolli di imaging di risonanza magnetica multi-parametrici specifici per le patologie identificate tra i diversi IRCCS della rete, al fine di aumentare il potere diagnostico e prognostico dei parametri quantitativi ottenuti dalle varie tecniche. L’Istituto Auxologico è capofila per il gruppo di lavoro inerente le malattie del motoneurone.

STUDIO IN RM 3 TESLA DI DEPOSITI DI FERRO NELLA CORTECCIA MOTORIA DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIA MOTONEURONALE (SLA)

Nel corso del 2017 è stato avviato un progetto di ricerca corrente dal titolo “Studio dei depositi di ferro nella corteccia motoria di pazienti affetti da MND mediante risonanza magnetica cerebrale 3 Tesla”, volto a valutare mediante la sequenza SWI (Susceptibility-Weighted Imaging) in risonanza magnetica ad alto campo (3T), l’entità e la distribuzione di sostanze paramagnetiche nella corteccia motoria nei pazienti affetti da malattia del motoneurone sia rispetto a soggetti sani sia rispetto ad altri pazienti, affetti da altre malattie neurodegenerative. In particolare, scopo dello studio è definire un eventuale marcatore radiologico di malattia e la correlazione tra eventuale pattern dei depositi paramagnetici e fenotipo di malattia. Al momento, sono stati arruolati nello studio complessivamente 113 soggetti (pazienti affetti da malattia del motoneurone e soggetti di controllo).

STUDIO CLINICO CONTROLLATO CON MASITINIB IN PAZIENTI AFFETTI DA SLA

Nel corso del 2017 è terminato il trial terapeutico di fase 2/3 sull’efficacia e la sicurezza di masitinib a confronto con placebo in combinazione con riluzolo nel trattamento di pazienti affetti da SLA. Lo studio ha dimostrato che l’effetto del trattamento con masitinib sul declino della ALS-FRS a 48 mesi è stato statisticamente significativo nella popolazione di pazienti “normal progressor” che assumevano masitinib al dosaggio di 4.5 mg/Kg/die, con un profilo di sicurezza accettabile.

STUDIO CLINICO CONTROLLATO CON TIRASEMTIV IN PAZIENTI AFFETTI DA SLA

Nel corso del 2017 è terminato il trial terapeutico di fase 3 sulla efficacia e sicurezza di tirasemtiv a confronto con placebo in combinazione con riluzolo nel trattamento di pazienti affetti da SLA che non ha dato alcun risultato clinico di rilievo, con un profilo di sicurezza accettabile.

SICUREZZA ED EFFICACIA DELL'INIBIZIONE DI SOD1 CON PIRIMETAMINA NELLA SLA FAMILIARE

Il trial clinico è stato concluso e i dati elaborati grazie alla collaborazione di 5 Centri internazionali e l'arruolamento di 32 pazienti affetti da SLA con mutazione del gene SOD1. Il trattamento ha determinato una significativa riduzione dei livelli di SOD1 liquorale, senza rilevanti effetti collaterali. Il trial clinico ha fornito la prima evidenza di un trattamento farmacologico in grado di ridurre i livelli di SOD1 liquorale nei pazienti affetti da SOD1SLA (Lange et al., 2017).

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

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

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

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

Sono stati oggetto di una recente pubblicazione i risultati del lavoro inerente la validazione dell'ECAS in lingua italiana, raccolti su una popolazione di 107 pazienti affetti da SLA e 248 soggetti sani. I risultati hanno evidenziato una soddisfacente sensibilità diagnostica, mostrando quale prevalente compromissione cognitiva nei pazienti affetti da SLA, quella riguardante le funzioni esecutive e la fluenza verbale. Sono state inoltre evidenziate correlazioni tra le prestazioni ottenute all'ECAS ed a strumenti di screening cognitivo e comportamentale tradizionali, sostenendo la sua piena validità convergente. I risultati dello

studio sono ad oggi disponibili per usi clinici e di ricerca, fornendo uno strumento efficace, rapido e sensibile, utile ad identificare i diversi profili di deterioramento cognitivo-comportamentale nella SLA.

BRAIN COMPUTER INTERFACE ED EYE-TRACKING NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA: L'IMPIEGO DELLE NUOVE TECNOLOGIE PER LA VALUTAZIONE COGNITIVA IN PRESENZA DI DIFFICOLTA' VERBO-MOTORIE

Un ulteriore contributo alla valutazione delle funzioni cognitive nella SLA, anche in presenza di limitazioni verbo-motorie ed in stadi avanzati di malattia, consiste nell'impiego di nuove tecnologie, quali l'Eye-Tracker (ET) e la Brain Computer Interface (BCI), oggetto di un recente studio. In particolare, quali ulteriori sotto-oggettivi del lavoro, risultano:

- La realizzazione di una batteria di test neuropsicologici, adattati ad una versione computerizzata somministrabile mediante entrambe le metodiche, tali da mantenere requisiti di aderenza e validità rispetto alle versioni tradizionali, in forma '*carta e matita*'.
- La validazione di tale nuova metodica di assessment neuropsicologico su pazienti affetti da SLA e controlli sani, al fine di definire i seguenti aspetti: usabilità delle metodiche, intesa come utilità percepita e qualità dell'esperienza realizzata durante i test; validità concorrente rispetto alle tradizionali misure di screening cognitivo; sensibilità diagnostica nel discriminare tra pazienti affetti da SLA con lievi difettualità cognitive e controlli sani.
- Il confronto tra le due metodiche (BCI ed ET) rispetto agli aspetti sopra descritti, al fine di individuare vantaggi e svantaggi dei due approcci sviluppati, per specifiche tipologie di pazienti affetti da SLA, in termini di stadio di malattia, livello di compromissione cognitiva e specifici aspetti motivazionali e psicologici che possono contribuire a determinare diversi gradi di usabilità delle due metodiche.
- L'integrazione dei risultati inerenti le prestazioni ai test neuropsicologici, ottenuti mediante le due metodiche, con dati comportamentali e clinici, inclusa la presenza di mutazioni genetiche, al fine di meglio definire aspetti prognostici e percorsi di cura individualizzati.

Nel biennio 2016-2017 sono stati pubblicati due lavori, riportanti i risultati preliminari inerenti le due metodiche. In particolare, sono stati confermati, su una popolazione di 15 pazienti affetti da SLA e 15 controlli, gli aspetti di usabilità e sensibilità diagnostica della batteria realizzata mediante BCI. E' stato inoltre condotta un'indagine preliminare su 30 soggetti di controllo inerente la batteria somministrata mediante ET, evidenziandone gli aspetti di usabilità e di validità concorrente (Poletti et al., 2017). E' in corso di pubblicazione la validazione della batteria ET su pazienti affetti da SLA ed il confronto tra le due metodiche.

DISFAGIA in HD

La Malattia di Huntington (MH - MIM ID #143100), è una patologia neurodegenerativa a trasmissione autosomica dominante causata dall'espansione di una tripletta CAG nel gene IT-15. La malattia ha una prevalenza di 5-10/100.000 persone ed esordio nella vita adulta (35-40 anni). Le caratteristiche cliniche della MH includono sintomi motori, alterazioni cognitive e disturbi psichiatrici principalmente legati alla disfunzione ed alla perdita dei neuroni dei gangli della base. La MH ha un decorso lentamente progressivo che porta al decesso dopo 15-20 anni, generalmente causato da polmonite *ab ingestis* a seguito della disfunzione della muscolatura bulbare. La disfagia in corso di Malattia di Huntington è ancora poco caratterizzata. Infatti, sebbene la pratica clinica sembrerebbe suggerire che difficoltà deglutitorie si presentino anche in fase relativamente precoce, l'entità e la frequenza in relazione allo stadio di malattia ed alla terapia farmacologica in atto non sono ancora state studiate in maniera accurata.

Lo studio, in collaborazione con il Reparto di Foniatria dell' Ospedale L. Sacco (Prof. A. Schindler) si propone di: 1) valutare l'incidenza del disturbo disfagico in pazienti affetti da

Malattia di Huntington a diversi stadi di malattia; 2) identificare quali disordini motori, cognitivi e/o comportamentali correlino con specifiche alterazioni della dinamica deglutoria; 3) individuazione di interventi riabilitativi e compensativi in MH e valutazione di efficacia tramite re-testing a 6 mesi.

Nel corso del 2017 sono stati studiati più di 20 pazienti affetti da Malattia di Huntington.

L' attività del Centro "Dino Ferrari" si è articolata nel 2017 nei seguenti Centri:

CENTRO SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA)

Nell'anno 2017, circa 300 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*, *TARDBP*, *FUS*, *OPTN*, *VCP*, *C9orf72*, *PFN1*, *TUBA4A*, *TBK1*, *NEK1* 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 (*TARDBP*, *FUS*, *C9orf72* in particolare). Oggi il Centro offre la diagnostica molecolare delle principali patologie motoneuronali nonchè neurodegenerative perché ha di recente sviluppato un pannello genico con tecnologia NGS per lo screening dei principali geni responsabili delle varie patologie;
- sviluppo di nuovi parametri neurofisiologici per definizione del numero residuo di Unità Motorie (MUNE) ed analisi neurofisiologica della funzionalità diaframmatici per porre indicazione alla NIV;
- analisi delle caratteristiche nutrizionali con studio della PEG, BMI, etc, in collaborazione con l'Unità di Endocrinologia dell'IRCCS Istituto Auxologico Italiano;
- valutazione neuropsicologica longitudinale del paziente affetto da SLA mediante valutazione seriata per evidenziare specifici deficit neuropsicologici; particolare attenzione al coinvolgimento fronto-temporale anche con tecniche di eye-tracking e sviluppo di BCI (studio ECAS) anche per approntamento grazie al Servizio di Neuropsicologia della versione italiana (Poletti et al., 2016);
- determinazione di algoritmi diagnostici, predittivi e prognostici mediante utilizzo di tecnologia *artificial neural network* (ANN), in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Decisionali, Università Commerciale "I. Bocconi";
- partecipazione a nuovi trial terapeutici (Pirimetamina nella SLA Familiare *SOD1* mutata, Masitinib, Tirasemtiv, etc).

Il Centro "Dino Ferrari" ha partecipato a diverse iniziative nazionali ed internazionali per l'ottimizzazione delle cure palliative, la definizione dei costi della malattia, l'educazione dei medici e paramedici in stretto rapporto con l'AISLA (Associazione Italiana Sclerosi Laterale Amiotrofica), la definizione dei criteri di invalidità in collaborazione con la Regione Lombardia. Il Centro "Dino Ferrari" è implicato nel Gruppo di Studio Malattie del Motoneurone della Società Italiana di Neurologia - SIN) e nell' European ALS Consortium (ENCALS) e, più recentemente, nel Northeast ALS Consortium. Il Prof. Silani è membro del Website Management Committee della World Federation of Neurology in rapporto alla ALS/MND.

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

CENTRO MALATTIE EXTRAPIRAMIDALI

Nel corso dell'anno 2017, oltre 400 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 1.500 visite ambulatoriali. È stata creata una stretta collaborazione con l'Associazione Parkinson Milano di cui il Prof. V. 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 fisiatri nell'intento di fornire un approccio interdisciplinare al paziente, garantendo così un supporto ed un riferimento costante nel tempo che è stato esteso anche ai familiari. Nell'ambito della Malattia di Huntington l'assenza di una cura risolutiva della malattia comporta un particolare impatto emotivo nel soggetto che ancora asintomatico decide di testarsi per la mutazione. Ciò impone un continuo supporto psicologico al paziente durante tutto il lungo processo che porta alla diagnosi pre-clinica. Per questo è stato sviluppato ed applicato un protocollo di test predittivo nella Malattia di Huntington secondo le linee guida dell'International Huntington Association e della Federazione Mondiale di Neurologia. Sono state seguite varie famiglie affette da Malattia di Huntington e seguiti sei pazienti nell'iter del test predittivo. Dal 2005 il Centro è in grado di formulare diagnosi molecolare di Malattia di Huntington. Alla valutazione clinica sono state accostate diverse indagini ed iniziative terapeutiche quali lo studio del sonno nei pazienti affetti da M. di Huntington in collaborazione con il Centro del Sonno (Dott.ssa Carolina Lombardi). Particolare attenzione è oggi dedicata alla cura della disfagia, principale causa di morte dei pazienti accanto alle complicanze polmonari. Il Dott. Andrea Ciammola ha dato particolare impulso a questa iniziativa unitamente alla équipe multidisciplinare dedicata.

CENTRO per i DISTURBI COGNITIVI e le DEMENZE (CDCD)

Nell'anno 2017 vi è stato un ulteriore ed importante incremento del numero di pazienti che si sono rivolti al nostro Centro per una valutazione diagnostica di tipo neuropsicologico; infatti sono state effettuate oltre 7.000 prestazioni neuropsicologiche e psicodiagnostiche per pazienti degenzi in regime di ricovero ordinario o in Day Hospital, nonché 1.000 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'approssimazione 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 e pubblicati nel 2017, 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. Nel corso del 2017 il Centro per i Disturbi Cognitivi e le Demenze (CDCD) afferente alla U.O. di Neurologia dell' IRCCS Istituto Auxologico Italiano di cui risulta responsabile il Prof. V. Silani è stato riconosciuto dalla Regione Lombardia ed inserito nell' elenco dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS): tale acquisizione, motivata dalla crescente attività del Centro in rapporto alla patologia neurodegenerativa con demenza rappresenta un importante presupposto all'ulteriore sviluppo della attività clinica e di ricerca nell'area specifica.

CENTRO DI MEDICINA DEL SONNO

È continuata nel corso del 2017 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 2017 sono state eseguite circa oltre 900 visite ambulatoriali e polisonnografie portatili, 200 video polisonnografie in laboratorio di medicina del sonno, 60 monitoraggi polisonnografici prolungati (24 ore) e 20 actigrafie.

Le patologie osservate nel centro, vista anche l'ispirazione volutamente multidisciplinare, riguardano ad ampio spettro le malattie cardiovascolari associate a disturbi respiratori durante il sonno (ipertensione arteriosa, scompenso cardiaco, stroke) e tutte le patologie neurologiche coinvolgenti il sonno, comprendendo quindi i disturbi del respiro in corso di sonno (Sindrome delle Apnee Ostruttive nel Sonno – OSAS -, Sindrome delle Apnee Centrali, Ipoventilazione Centrale, alterazioni del pattern ventilatorio nelle patologie neuromuscolari), le ipersonnie (narcolessia, ipersonnie secondarie a malattie neurodegenerative), le parassonnie 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 insomnia.

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

STROKE UNIT

Nel 2017 l'attività della Stroke Unit a direzione neurologica si è ulteriormente consolidata con ottimizzazione della moderna struttura che offre 6 letti di cui 4 completamente monitorizzati con possibilità di inquadramento del paziente affetto da evento cerebrovascolare acuto. L'attività direttiva della Dott.ssa Laura Adobbati, coordinatrice, e dalla Dott.ssa Barbara Corrà con il Dott. Davide Sangalli 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. Oltre 50 trombolisi intravenose sono state eseguite nel 2017 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 collaborazione è attivamente 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 riabilitativo 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 e RM 3 Tesla e da un'attività di ricerca volta ulteriormente ad ottimizzare la diagnosi precoce dell' evento ischemico nella prospettiva della più adeguata terapia.

PRODUZIONE SCIENTIFICA 2017

Pubblicazioni su Riviste Internazionali Indicizzate

Casana R, Tolva V, Odero A Jr, Malloggi C, Paolucci A, Triulzi F, Silani V.

Safety and Efficacy of the New Micromesh-Covered Stent CGuard in Patients Undergoing Carotid Artery Stenting: Early Experience From a Single Centre.

Eur J Vasc Endovasc Surg 2017 Dec;54(6):681-687. doi: 10.1016/j.ejvs.2017.09.015.

Epub 2017 Oct 28;

I.F. 4.061

Carelli L, Solca F, Faini A, Meriggi P, Sangalli D, Cipresso P, Riva G, Ticozzi N, Ciambola A, Silani V, Poletti B.

Brain-Computer Interface for Clinical Purposes: Cognitive Assessment and Rehabilitation.
Biomed Res In 2017:1695290. doi: 10.1155/2017/1695290.

Epub 2017 Aug 23. Review;

I.F. 2.476

Ciambola A, Carrera P, Di Fonzo A, Sassone J, Villa R, Poletti B, Ferrari M, Girotti F, Monfrini E, Buongarzone G, Silani V, Cinnante CM, Mignogna ML, D'Adamo P, Bonati MT. *X-linked Parkinsonism with Intellectual Disability caused by novel mutations and somatic mosaicism in RAB39B gene.*

Parkinsonism Relat Disord 2017 Nov;44:142-146. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.08.021.

Epub 2017 Aug 26;

I.F. 4.484

Banfi P, Volpatto E, Valota C, D'Ascenzo S, Alunno CB, Lax A, Nicolini A, Ticozzi N, Silani V, Bach JR.

Use of Noninvasive Ventilation During Feeding Tube Placement.

Respir Care 2017 Nov;62(11):1474-1484. doi: 10.4187/respcare.05031.

Epub 2017 Aug 14. Review;

I.F. 1.733

Bella ED, Tramacere I, Antonini G, Borghero G, Capasso M, Caponnetto C, Chiò A, Corbo M, Eleopra R, Filosto M, Giannini F, Granieri E, Bella V, Lunetta C, Mandrioli J, Mazzini L,

Messina S, Monsurrò MR, Mora G, Riva N, Rizzi R, Siciliano G, Silani V, Simone I, Sorarù G, Volanti P, Lauria G.

Protein misfolding, amyotrophic lateral sclerosis and guanabenz: protocol for a phase II RCT with futility design (PromISE trial).

BMJ Open 2017 Aug 11;7(8):e015434. doi: 10.1136/bmjopen-2016-015434;

I.F. 2.369

van Doormaal PTC, Ticozzi N, Weishaupt JH, Kenna K, Diekstra FP, Verde F, Andersen PM, Dekker AM, Tiloca C, Marroquin N, Overste DJ, Pensato V, Nürnberg P, Pulit SL, Schellevis RD, Calini D, Altmüller J, Francioli LC, Muller B, Castellotti B, Motamony S, Ratti A, Wolf J, Gellera C, Ludolph AC, van den Berg LH, Kubisch C, Landers JE, Veldink JH, Silani V, Volk AE.

The role of de novo mutations in the development of amyotrophic lateral sclerosis.

Hum Mutat 2017 Nov;38(11):1534-1541. doi: 10.1002/humu.23295. Epub 2017 Aug 3;

I.F. 4.601

Gendron TF; C9ORF72 Neurofilament Study Group, Daugherty LM, Heckman MG, Diehl NN, Wu J, Miller TM, Pastor P, Trojanowski JQ, Grossman M, Berry JD, Hu WT, Ratti A, Benatar M, Silani V, Glass JD, Floeter MK, Jeromin A, Boylan KB, Petruccielli L.

Phosphorylated neurofilament heavy chain: A biomarker of survival for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis.

Ann Neurol 2017 Jul;82(1):139-146. doi: 10.1002/ana.24980;

I.F. 9.890

Lanfranconi F, Ferri A, Corna G, Bonazzi R, Lunetta C, Silani V, Riva N, Rigamonti A, Maggiani A, Ferrarese C, Tremolizzo L.

Inefficient skeletal muscle oxidative function flanks impaired motor neuron recruitment in Amyotrophic Lateral Sclerosis during exercise.

Sci Rep 2017 Jun 7;7(1):2951. doi: 10.1038/s41598-017-02811-z;

I.F. 4.259

Poletti B, Carelli L, Solca F, Lafronza A, Pedroli E, Faini A, Ticozzi N, Ciambella A, Meriggi P, Cipresso P, Lulé D, Ludolph AC, Riva G, Silani V.

An eye-tracker controlled cognitive battery: overcoming verbal-motor limitations in ALS.

J Neurol 2017 Jun;264(6):1136-1145. doi: 10.1007/s00415-017-8506-z. Epub 2017 May 13;

I.F. 3.389

Lange DJ, Shahbazi M, Silani V, Ludolph AC, Weishaupt JH, Ajroud-Driss S, Fields KG, Remanan R, Appel SH, Morelli C, Doretti A, Maderna L, Messina S, Weiland U, Marklund SL, Andersen PM.

Pyrimethamine significantly lowers cerebrospinal fluid Cu/Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 mutations.

Ann Neurol 2017 Jun;81(6):837-848. doi: 10.1002/ana.24950. Epub 2017 Jun 9;

I.F. 9.890

Smith BN, Topp SD, Fallini C, Shibata H, Chen HJ, Troakes C, King A, Ticozzi N, Kenna KP, Soragia-Gkazi A, Miller JW, Sato A, Dias DM, Jeon M, Vance C, Wong CH, de Majo M, Kattuah W, Mitchell JC, Scotter EL, Parkin NW, Sapp PC, Nolan M, Nestor PJ, Simpson M, Weale M, Lek M, Baas F, Vianney de Jong JM, Ten Asbroek ALMA, Redondo AG, Esteban-Pérez J, Tiloca C, Verde F, Duga S, Leigh N, Pall H, Morrison KE, Al-Chalabi A, Shaw PJ, Kirby J, Turner MR, Talbot K, Hardiman O, Glass JD, De Belleroche J, Maki M, Moss SE, Miller C, Gellera C, Ratti A, Al-Sarraj S, Brown RH Jr, Silani V, Landers JE, Shaw CE.

Mutations in the vesicular trafficking protein annexin A11 are associated with amyotrophic lateral sclerosis.

Sci Transl Med 2017 May 3;9(388). pii: eaad9157. doi: 10.1126/scitranslmed.aad9157;
I.F. 16.761

Poletti B, Carelli L, Lafronza A, Solca F, Faini A, Ciommola A, Grobberio M, Raimondi V, Pezzati R, Ardito RB, Silani V.

Cognitive-constructivist Approach in Medical Settings: The Use of Personal Meaning Questionnaire for Neurological Patients' Personality Investigation.

Front Psychol 2017 Apr 11;8:582. doi: 10.3389/fpsyg.2017.00582. eCollection 2017;
I.F. 2.321

Bossolasco P, Cancello R, Doretti A, Morelli C, Silani V, Cova L.

Adiponectin levels in the serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients: possible influence on neuroinflammation?

J Neuroinflammation 2017 Apr 20;14(1):85. doi: 10.1186/s12974-017-0861-2;
I.F. 5.102

Gendron TF, Chew J, Stankowski JN, Hayes LR, Zhang YJ, Prudencio M, Carlomagno Y, Daugherty LM, Jansen-West K, Perkerson EA, O'Raw A, Cook C, Pregent L, Belzil V, van Blitterswijk M, Tabassian LJ, Lee CW, Yue M, Tong J, Song Y, Castanedes-Casey M, Rousseau L, Phillips V, Dickson DW, Rademakers R, Fryer JD, Rush BK, Pedraza O, Caputo AM, Desaro P, Palmucci C, Robertson A, Heckman MG, Diehl NN, Wiggs E, Tierney M, Braun L, Farren J, Lacomis D, Ladha S, Fournier CN, McCluskey LF, Elman LB, Toledo JB, McBride JD, Tiloca C, Morelli C, Poletti B, Solca F, Prelle A, Wu J, Jockel-Balsarotti J, Rigo F, Ambrose C, Datta A, Yang W, Raitcheva D, Antognetti G, McCampbell A, Van Swieten JC, Miller BL, Boxer AL, Brown RH, Bowser R, Miller TM, Trojanowski JQ, Grossman M, Berry JD, Hu WT, Ratti A, Traynor BJ, Disney MD, Benatar M, Silani V, Glass JD, Floeter MK, Rothstein JD, Boylan KB, Petruccielli L.

Poly(GP) proteins are a useful pharmacodynamic marker for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis.

Sci Transl Med 2017 Mar 29;9(383). pii: eaai7866. doi: 10.1126/scitranslmed.aai7866;
I.F. 16.761

Sassone J, Serratto G, Valtorta F, Silani V, Passafaro M, Ciommola A.

The synaptic function of parkin.

Brain 2017 Sep 1;140(9):2265-2272. doi: 10.1093/brain/awx006. Review;
I.F. 10.292

McLaughlin RL, Schijven D, van Rheenen W, van Eijk KR, O'Brien M, Kahn RS, Ophoff RA, Goris A, Bradley DG, Al-Chalabi A, van den Berg LH, Luykx JJ, Hardiman O, Veldink JH;

Project MinE GWAS Consortium; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genetic correlation between amyotrophic lateral sclerosis and schizophrenia.

Nat Commun 2017 Mar 21;8:14774. doi: 10.1038/ncomms14774;
I.F. 12.124

Tripolszki K, Csányi B, Nagy D, Ratti A, Tiloca C, Silani V, Kereszty É, Török N, Vécsei L, Engelhardt JI, Klivényi P, Nagy N, Széll M.

Genetic analysis of the SOD1 and C9ORF72 genes in Hungarian patients with amyotrophic lateral sclerosis.

Neurobiol Aging 2017 May;53:195.e1-195.e5. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.01.016.
Epublish 2017 Jan 29;

I.F. 5.117

Poletti B, Carelli L, Solca F, Lafronza A, Pedroli E, Faini A, Zago S, Ticozzi N, Ciommola A, Morelli C, Meriggi P, Cipresso P, Lulé D, Ludolph AC, Riva G, Silani V.

An eye-tracking controlled neuropsychological battery for cognitive assessment in neurological diseases.

Neurol Sci 2017 Apr;38(4):595-603. doi: 10.1007/s10072-016-2807-3. Epub 2017 Jan 11;

I.F. 1.749

Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, Woolley S, McLaughlin P, Snowden J, Mioshi E, Roberts-South A, Benatar M, Hortobágyi T, Rosenfeld J, Silani V, Ince PG, Turner MR.

Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria.

Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2017 May;18(3-4):153-174. doi: 10.1080/21678421.2016.1267768. Epub 2017 Jan 5;

I.F. 3.054

Van Der Spek RA, Van Rheenen W, Pulit SL, Kenna KP, Ticozzi N, Kooyman M, McLaughlin RL, Moisse M, Van Eijk KR, Van Vugt JJFA, Andersen P, Nazli Basak A, Blair I, De Carvalho M, Chio A, Corcia P, Couratier P, Drory VE, Glass JD, Hardiman O, Mora JS, Morrison KE, Mitne-Neto M, Robberecht W, Shaw PJ, Panadés MP, Van Damme P, Silani V, Gotkine M, Weber M, Van Es MA, Landers JE, Al-Chalabi A, Van Den Berg LH, Veldink JH;

PROJECT MINE ALS SEQUENCING CONSORTIUM. Reconsidering the causality of TIA1 mutations in ALS.

Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2017 Dec 13:1-3. doi: 10.1080/21678421.2017.1413118.

I.F. 3.054

TOTALE I.F. : 123,487

Finanziamenti per progetti di ricerca

- Progetto Ricerca Finalizzata dal titolo: "The role of the novel NEK1 and C21orf2 genes associated to DNA repair in the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis".
- Progetto di Rete NeuroIRCCS dal titolo: "Criteri per l'ottimizzazione e l'armonizzazione di sequenze RM nell'ambito di studi multicentrici di neuro-imaging ad alto campo".

Registri di Malattia

- Registro Nazionale delle Malattie Rare - Istituito dall'Istituto Superiore di Sanità.
- Studio Epidemiologico sull'incidenza delle malattie rare: 35 nuovi casi ad oggi 11/12/2017
- Registro Lombardo della Sclerosi Laterale Amiotrofica.
- Studio epidemiologico su pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica: 31 ad oggi 11/12/2017

Corsi ECM

- La Demenza FrontoTemporale - Sala Convegni Ospedale San Luca – Milano, 9/09/2017

- La malattia di Alzheimer: attualità clinico-patogenetiche - Sala Convegni Ospedale San Luca - Milano, 16/11/2017

Charcotiadi : i giovedì dell'aggiornamento

- Clinico
- Laboratorio di Neuroscienze
- Clinico/Laboratorio
- Lezioni magistrali di diversi ospiti

I mercoledì dell'aggiornamento del Laboratorio di Neuroscienze

- 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
- Annals of Transplantation Research

Stage all'estero di ricercatori:

- Dott.ssa Isabella Fogh - Department of Basic and Clinical Neuroscience, Institute of Psychiatry, Psychology & Neuroscience King's College London, UK
- Clara Volpe, Studentessa di Medicina - Department of Neurology Università di Ulm diretta dal Prof. Albert Ludolph
- Dott.ssa Claudia Colombrita
- Dott. Federico Verde - Department of Neurology Università di Ulm diretto dal Prof. Albert Ludolph

Ricercatori stabilmente all'estero

- Dott. Niccolò Mencacci – Feinberg School of Medicine - Northwestern University - Chicago, USA
- Dott.ssa Claudia Fallini - University of Massachusetts Medical School of Boston

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