



**Partecipazione
a progetti
di ricerca
finalizzata
di altri enti**

*Partecipazione al progetto di ricerca finalizzata
Fondazione Centro S. Raffaele del Monte Tabor - Milano*

**CELLULE STAMINALI NEURALI UMANE
COME FONTE DI CELLULE MIELINOGENICHE
PER LA TERAPIA CELLULARE DELLE
MALATTIE DEMIELINIZZANTI**

Responsabile: ANGELA GRITTI
Fondazione Centro S. Raffaele del Monte Tabor

U.O. 5: GIOVANNA BORSELLINO
IRCCS S. Lucia

MOTIVAZIONI E OBIETTIVO FINALE

Lo scopo di questo progetto è quello di valutare l'efficacia delle cellule staminali neurali umane come nuova sorgente cellulare nel trattamento delle sindromi demielinizzanti del SNC. Il progetto verrà svolto in due fasi e con approcci metodologici integrati (studi *in vitro* e *in vivo*).

Nella *prima fase* verranno studiati i segnali extracellulari che inducono e regolano il commitment delle hNSCs preferenzialmente verso il lineage oligodendrogliale al fine di ottenere preparazioni cellulari arricchite in cellule oligodendrogliali progenitrici a specifici stadi di maturazione. Questo consentirà di selezionare le preparazioni cellulari migliori in termini di capacità proliferativa e migratoria (U.O. 1), due caratteristiche fondamentali per garantire buone probabilità di successo nella fase successiva del progetto. Le hNSCs, durante questa fase, verranno inoltre caratterizzate per la presenza di antigeni di superficie specifici di cellule oligodendrogliali immature e mature (recettori per fattori di crescita, sulfatidi, proteoglicani). Le molecole di adesione cellulare e i recettori per le principali chemochine rilasciate in corso di infiammazione rappresentano i bersagli principali che potrebbero consentire alle hNSCs di migrare attraverso la barriera emato-encefalica e/o emato-liquorale e successivamente di entrare all'interno del parenchima cerebrale in corso di trapianto. L'espressione cellulare delle principali molecole di adesione cellulare e dei principali recettori per chemochine verrà studiata in questa fase tramite analisi citofluorimetrica (FACS) (U.O. 5) ed immunocitochimica (U.O. 1), sia su hNSC indifferenziate che su colture ottenute esponendo per tempi diversi le cellule a varie citochine e/o chemochine, fattori di crescita e ormoni che sono stati descritti essere importanti per la proliferazione, sopravvivenza e maturazione di OPCs in altre specie. Questi esperimenti serviranno per stabilire il profilo temporale di differenziamento delle hNSCs in oligodendrociti e per definire le migliori condizioni per ottenere colture arricchite in precursori oligodendrogliali a stadi di differenziamento e maturazione specifici.

Da queste colture sarà possibile purificare ulteriormente i precursori oligodendrogliali utilizzando un processo selezione immunomagnetica (IMS) e/o FACS. La capacità migratoria di queste cellule sarà valutata con saggi di migrazione specifici (U.O. 6). Il profilo molecolare e le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle varie preparazioni cellulari derivate da hNSCs verranno comparati con cellule del lineage oligodendrocitario umano (cellule NG2+, PDGFRalfa+, o O4+) identificati in colture primarie allestite da tessuto cerebrale biotico.

Nella *seconda fase* del progetto verranno verificati la capacità di sopravvivenza e integrazione e il potenziale mielinogenico e remielinizzante delle preparazioni cellulari sopradescritte, tramite studi funzionali eseguiti in modelli animali di demielinizzazione acuta e cronica del SNC. Le preparazioni di hNSC (a diversi gradi di arricchimento in precursori oligodendrogliali) verranno iniettate direttamente in un modello di lesione focale demielinizzante indotta nel corpo calloso con gliotossine (U.O. 3), che permette un facile read out (mediante istologia e immunoistochimica) della remielinizzazione

a carico delle cellule esogene. Alternativamente, le hNSC saranno iniettate i.c. o i.v. in topi affetti da demielinizzazione autoimmune del SNC (es. EAE) (U.O. 2), un modello più complesso da analizzare ma più vicino alla reale patologia umana. Le cellule umane trapiantate verranno rivelate utilizzando anticorpi diretti contro antigeni cellulari umani, senza modificare geneticamente le cellule con vettori virali contenenti geni reporter.

La valutazione di integrazione, migrazione e differenziamento e l'attività remielinizzante delle cellule trapiantate verranno valutate tramite immunoistochimica e microscopia elettronica (U.O. 4).

Criteri e indicatori per la verifica dei risultati finali

1 - Identificazione dei segnali epigenetici che inducono il fenotipo oligodendrogliale in cellule staminali neurali umane (hNSCs) e ne favoriscono la proliferazione, la migrazione e il differenziamento in oligodendrociti maturi.

2 - Protocolli *in vitro* per ottenere colture cellulari arricchite in precursori oligodendrogliali umani.

3 - Informazioni sulla fattibilità ed efficacia della terapia cellulare con cellule mielinogeniche derivate da hNSCs in modelli animali di demielinizzazione del SNC. Questo rappresenterà il primo importante passo per ottenere una fonte rinnovabile di cellule con potenziale mielinogeniche di origine umana.

4 - Verifica dei risultati ottenuti attraverso una rete di scambi scientifici tra le U.O., presentazioni a congressi nazionali e internazionali, e preparazione di lavori che verranno inviati a riviste internazionali specializzate.

OBIETTIVI INTERMEDI

1 - Realizzazione di studi di time-course *in vitro* per verificare quale/i molecole, in quale/i combinazione/i e in quale finestra temporale producano il massimo numero di precursori oligodendrogliali a partire da hNSCs.

2 - Validazione degli studi funzionali da realizzare in collaborazione con le U.O. 1, 5, 6 (sorting ad alta velocità, analisi fenotipica, saggi di chemiotassi).

3 - Ottimizzazione dei protocolli trapianto nei modelli animali proposti e delle tecniche di visualizzazione delle cellule trapiantate tramite immunoistochimica ed immuno-elettronica).

Criteri e indicatori per la verifica dei risultati intermedi

- Preparazioni di pubblicazioni scientifiche da sottoporre a riviste internazionali.

- Comunicazioni a congressi.

- Alla fine della prima fase del progetto il responsabile dell'U.O. scriverà un riassunto dei risultati ottenuti, descrivendo le priorità sperimentali nei successivi 12 mesi per portare a termine gli obiettivi proposti.

METODOLOGIA

WP 1 - Coltura, espansione, caratterizzazione fenotipica e funzionale di cellule staminali neurali umane (hNSCs)

1 - Studio dei segnali epigenetici che ne regolano il commitment verso il lineage oligodendrogliale, in modo da preparare colture di hNSCs arricchite in cellule oligodendrogliali a stadi di differenziamento specifici. Sarà valutato l'effetto di molecole note per indurre proliferazione/differenziamento/maturazione di progenitori oligodendrogliali murini e di ratto: FGF2, PDGFAA, neurotrofina 3 (NT3), neureguline, sonic hedgehog, CNTF, LIF, triiodotironina (T3), IGF. Queste molecole verranno usate da sole o in combinazione, simultaneamente o in sequenza (U.O. 1).

2 - Purificazione e arricchimento di progenitori oligodendrogliali in base all'espressione di molecole di superficie specifiche (PDGFR α ; O4, NG2). Le diverse preparazioni cellulari e frazioni purificate verranno mantenute in coltura per verificare la possibilità di espansione a lungo termine (U.O. 1). Sulle diverse preparazioni e frazioni cellulari arricchite verranno analizzate:

a) espressione di molecole di adesione e recettori per chemochine (CD31, CD49d, CD43, CD11c, CD11a, CD162, CD44, CXCR1, CCR5, CCR3, CCR4, CXCR4, CCR-D6, CCR7, CCR8, CCR9 e CCR10) (U.O. 5).

b) profilo di espressione genica e risposta funzionale (variazione di Ca⁺⁺ intracellulare e capacità migratoria) in risposta a fattori di crescita e agenti chemiotattici. In questo studio le hNSCs verranno comparate a cellule oligodendrogliali (NG2+, PDGFR α +, o O4+) umane identificate e isolate da colture primarie allestite da tessuto biotico umano (U.O. 6).

Metodologie: colture cellulari, immunocitochimica e immunofluorescenza, microscopia confocale; separazione immunomagnetica, citometria a flusso con citofluorimetro a tre laser (MoFlo, DakoCytomation), che permette di eseguire analisi multiparametriche e di separare ad alta velocità le diverse sottopopolazioni cellulari; microdissezione laser, RT-PCR, video imaging con sonde fluorescenti, saggi di chemotassi.

WP 2 - Verifica del potenziale mielinogenico delle hNSCs in modelli animali di demielinizzazione del SNC

1 - Lesione focale. Iniezione di lisolecitina 1% (gliotossina) nel corpo calloso, di topi SCID in modo da creare una perdita focale di mielina, accompagnata da morte degli oligodendrociti. Le diverse preparazioni e frazioni arricchite di hNSCs verranno iniettate nel sito immediatamente adiacente la lesione 3-5 giorni dopo il trattamento con lisolecitina (U.O. 3). Il grado di integrazione, sopravvivenza e remielinizzazione esogena verranno valutati tramite immunocitochimica e microscopia elettronica a 7, 21 e 45 giorni dal trapianto (U.O. 3, U.O. 4).

2 - Lesione cronica. Induzione del modello sperimentale di MS (EAE) in topi di ceppo C57BL/6 e SJL e iniezione (i.v. e i.c.) delle diverse preparazioni di hNSCs arricchite in precursori oligodendrogliali a tempi diversi (precedenti,

coincidenti o seguenti l'onset della lesione autoimmune negli animali). Gli animali saranno sacrificati dopo 10, 30, 60 e 120 giorni dal trapianto. Le cellule trapiantate saranno visualizzate mediante immunisto chimica utilizzando anticorpi specifici per proteine nucleari o mitocondriali umane. I parametri valutati per stabilire l'efficacia del trattamento saranno: grado di integrazione e dispersione delle cellule nel parenchima cerebrale e nel midollo spinale; grado di riduzione della gliosi reattiva, grado di differenziamento delle cellule trapiantate nei tre lineages neurali, grado di remielinizzazione, grado di riduzione del danno assonale, produzione di citochine pro-e anti-infiammatorie, valutazione clinica degli animali trattati (U.O. 2, U.O. 4).

Metodologie: PCR, microarrays, istologia classica, immunisto chimica, microscopia elettronica.

TRASFERIBILITÀ DEI RISULTATI E DEI PRODOTTI

– Sviluppo di protocolli per ottenere colture arricchite in precursori oligodendrogliali umani a partire da cellule staminali neurali fetali umane mantenute in colture a lungo termine, una fonte cellulare rinnovabile e sicura che elimina la necessità di ricorrere all'uso sistematico di tessuto fetale primario.

– Sviluppo di protocolli sperimentali che prevedono l'integrazione di cellule oligodendrogliali derivate da cellule staminali neurali umane in aree di demielinizzazione acuta e/o cronica del SNC. Questo processo di "riparazione" tissutale neurale viene ottenuto tramite trapianto di cellule staminali esogene.

In caso di successo questo progetto rappresenterà il primo importante passo per ottenere una fonte rinnovabile di cellule con potenziale mielinogenico di origine umana costituendo una solida base per una futura traduzione in area clinica di strategie terapeutiche cellulo-mediate per la cura delle malattie demielinizzanti, in particolare della sclerosi multipla.

ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE

U.O. 1 – Istituto di Ricerca Cellule Staminali (SCRI), Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor – Milano

U.O. 2 – Neuroimmunologia, Dipartimento di Neuroscienze, Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor – Milano

U.O. 3 – Laboratorio di Terapia Genica delle malattie neurodegenerative, TIGET, Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor – Milano

U.O. 4 – Neuroimmunopatologia del sistema nervoso periferico, Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor – Milano

U.O. 5 – Laboratorio di Neuroimmunologia, Fondazione Santa Lucia IRCCS – Roma

U.O. 6 – Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità – Roma

Si allega il programma dettagliato dell'Unità Operativa 5 facente capo alla Fondazione Santa Lucia IRCCS.

U.O. 5 – Laboratorio di Neuroimmunologia

Giovanna Borsellino

OBIETTIVO FINALE DEL CONTRIBUTO

L'uso delle cellule staminali nella terapia delle malattie degenerative rappresenta una promettente innovazione di questi ultimi anni. In particolare, è stato dimostrato di recente che nel topo affetto da encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), il modello animale di sclerosi multipla, l'iniezione per via endovenosa di cellule staminali neurali determina un miglioramento clinico significativo. Diventa quindi cruciale studiare in dettaglio i meccanismi e le molecole coinvolte nella migrazione delle cellule staminali all'interno dei tessuti danneggiati.

È noto che l'EAE è caratterizzata da infiltrati linfocitari di cellule patogenetiche che aggrediscono il rivestimento dei neuroni, determinando la sintomatologia clinica. È verosimile che i meccanismi che regolano la migrazione delle cellule staminali nei tessuti presentino aspetti in comune ai meccanismi che dirigono il traffico dei leucociti nei siti infiammatori. Per definire accuratamente il pannello delle molecole coinvolte nella migrazione all'interno dei tessuti (molecole di adesione e recettori per le chemochine) da parte delle cellule staminali neurali umane fornite dalla U.O. 1, effettueremo un'analisi policromatica (9 colori) con un sofisticato citofluorimetro. In particolare, verranno studiate le seguenti molecole: CD31 (clone MEC 13.3), CD49d (clone 9C10), CD43 (clone S7), CD11c (clone HL3), CD11a (clone 2D7), CD162 (clone 2PH1), CD44 (clone IM7), CD62L, P-Selectin, CD11a, CXCR1, CCR5, CCR3, CCR4, CXCR4, CCR-D6, CCR7, CCR8, CCR9 e CCR10 coniugati con FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PECy7, APC, o con biotina. Questi marker sono stati selezionati in quanto rappresentano molecole di adesione cruciali per le interazioni con le cellule endoteliali durante la migrazione all'interno dei tessuti, e recettori per le chemochine i cui ligandi sono prodotti da diversi tessuti tra cui il SNC. Le eventuali sottopopolazioni di cellule staminali neurali che esprimono molecole di adesione o recettori per le chemochine verranno sortate ed utilizzate negli esperimenti di migrazione *in vitro*.

Criteri e indicatori per la verifica dei risultati finali

- Pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.
- Identificazione di markers fenotipici o funzionali espressi sulle cellule staminali neurali.

OBIETTIVI INTERMEDI PREVISTI

- Validazione delle tecniche di sorting ad alta velocità e di analisi fenotipica a 9 colori mediante citofluorimetria per gli obiettivi prefissati.

– Studio delle caratteristiche fenotipiche delle cellule staminali isolate dal tessuto nervoso fetale umano e mantenute in coltura a lungo termine.

Criteri ed indicatori per la verifica dei risultati intermedi

- Pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.
- Comunicazioni a congressi.
- Alla fine della prima fase del progetto il responsabile dell'U.O. dovrebbe scrivere un riassunto dei risultati ottenuti, descrivendo le priorità sperimentali nei successivi 12 mesi per portare a termine gli obiettivi proposti.

METODOLOGIA

Il nostro laboratorio è equipaggiato con un citofluorimetro (MoFlo, DakoCytomation) a tre laser, che ci permette di effettuare marcature a più colori. Lo stesso citofluorimetro è poi in grado di separare ad alta velocità le popolazioni cellulari di interesse. Verrà effettuata una dettagliata analisi fenotipica citofluorimetrica multicolore che ci permetterà di ottenere un'elevata quantità di informazioni sulle cellule staminali neurali.

Campioni biologici - Le diverse preparazioni di cellule staminali neurali umane saranno fornite dall'U.O. 1.

Anticorpi - Verranno utilizzati i seguenti anticorpi: CD31 (clone MEC 13.3), CD49d (Clone 9C10), CD43 (clone S7), CD11c (clone HL3), CD11a (clone 2D7), CD162 (clone 2PH1), CD44 (clone IM7), CD62L, P-Selectin, CD11a, CXCR1, CCR5, CCR3, CCR4, CXCR4, CCR-D6, CCR7, CCR8, CCR9 e CCR10. Questi anticorpi sono coniugati con i seguenti fluorocromi: fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), CyChrome™ (Cy5 PE), Allophycocyanin (APC), PE-Cy7, APC-Cy7, e PE-TxRed.

Nel caso di anticorpi purificati verrà utilizzato il sistema della Zenon Technologies che permette di coniugare piccole quantità di anticorpi evitando l'utilizzo di anticorpi secondari.

Analisi al FACS - L'analisi dei campioni verrà effettuata su citofluorimetro MoFlo (DakoCytomation, Fort Collins, CO) utilizzando il software Summit e FlowJo per la compensazione multiparametrica. Le cellule staminali verranno sortate ad alta velocità ed utilizzate per gli studi funzionali in vitro dalle U.O.1 e 6.

*Partecipazione al progetto di ricerca finalizzata
Centro Cardiologico Monzino IRCCS - Milano*

**IDENTIFICAZIONE E ANALISI
DEI MECCANISMI MOLECOLARI
VOLTI A FAVORIRE LA RIGENERAZIONE
DEL TESSUTO CARDIACO**

Responsabile: LUCA DAINESE
Centro Cardiologico Monzino IRCCS

U.O. 2: GIOVANNA BORSELLINO
IRCCS S. Lucia

MOTIVAZIONI E OBIETTIVO FINALE

Il progetto si propone principalmente di identificare e studiare il ruolo della citochina HMGB1 nella rigenerazione del tessuto cardiaco, al fine di sviluppare una strategia terapeutica mirata alla mobilizzazione e al reclutamento di cellule staminali endogene nel tessuto danneggiato. Tali studi saranno affiancati da valutazioni effettuate su pazienti e volte ad identificare una correlazione tra mobilizzazione di cellule CD34+ in seguito ad infarto del miocardio e il diverso decorso della malattia tra i vari pazienti (U.O. 3). In particolare, gli obiettivi che ci proponiamo di raggiungere in questo progetto sono i seguenti:

1) *Identificazione di cellule staminali cardiache e loro ruolo nel processo rigenerativo* - Dati preliminari ottenuti dalla U.O. 1 dimostrano l'esistenza di una popolazione di cellule con caratteristiche di staminalità residenti nel miocardio. In questo progetto ci proponiamo di isolare tali cellule e di caratterizzarle a livello biochimico e funzionale. Questo programma di lavoro sarà sviluppato nel WP 1 e 2 dalle U.O. 1, 2, 5, 7 e 9.

2) *Identificazione di molecole coinvolte nel reclutamento di cellule staminali midollari e cardiache, studi in vivo* - Nell'ambito di questo obiettivo ci proponiamo di studiare *in vivo* il ruolo delle chemochine e delle citochine, nei processi di reclutamento e attivazione delle cellule staminali con particolare riguardo alla citochina HMGB1, al suo recettore e al recettore per chemochine CCR8. Ciò sarà realizzato utilizzando un modello murino di infarto del miocardio disponibile nella U.O. 1. In particolare ci proponiamo di:

a) Studiare l'effetto della somministrazione di HMGB1 nel tessuto cardiaco infartuato. Poichè è stato dimostrato che HMGB1 stimola la produzione di citochine pro-infiammatorie, come IL1 e TNF alfa, ci proponiamo di valutare se la somministrazione di HMGB1 nel miocardio infartuato modula la produzione di fattori che potrebbero avere un ruolo nei processi di rigenerazione. Ciò permetterà di chiarire se l'effetto rigenerativo mediato da HMGB1 è diretto o coinvolge altre molecole.

b) Analizzare i processi rigenerativi in modelli animali in cui il recettore è stato deletato. È noto che HMGB1 espleta le sue funzioni interagendo con il recettore RAGE. Tale recettore è inoltre coinvolto, insieme al recettore per la galectina-3, nella traduzione di segnali mediati dagli AGE, implicati a loro volta nella genesi delle alterazioni cardiache e vascolari associate al diabete. L'U.O. 8 valuterà il ruolo degli AGE e dei suoi recettori nello scompenso post-ischemico in corso di diabete. Infine l'U.O. 6 caratterizzerà il ruolo del recettore per chemochine CCR8, nella risposta angiogenica in seguito ad infarto del miocardio. Dati preliminari evidenziano una maggiore risposta angiogenica in topi in cui il gene codificante per CCR8 è stato deletato. Questi obiettivi verranno perseguiti nel WP 2 dalle U.O. 1, 6, 8.

3) *Identificazione di molecole coinvolte nel reclutamento di cellule staminali midollari e cardiache, studi in vitro* - L'U.O. 4 esaminerà come il segnale veicolato da HMGB1 extracellulare venga decodificato dalle cellule staminali midollari e cardiache. L'U.O. 4 ha dimostrato che RAGE è un recettore per HMGB1. Non è noto quali proteine vi si associno, nè se sia fosforilabile in Serina/Tirosina. Studi preliminari dimostrano che la tossina della pertosse inibisce il segnale veicolato da HMGB1, suggerendo un possibile coinvolgimento di una proteina Go/1 associata direttamente o indirettamente a RAGE. Quindi verranno effettuati studi al fine di chiarire la via di trasduzione del segnale attivata da RAGE. Tale obiettivo sarà raggiunto nel WP 3 dalla U.O. 4.

Criteri ed indicatori per la verifica dei risultati finali

- 1) Identificazione e caratterizzazione biochimica e funzionale di cellule staminali cardiache.
- 2) Identificazione di fattori in grado di indurre rigenerazione del tessuto cardiaco mediante attivazione e reclutamento di cellule staminali (HMGB1, G-CSF, ligandi del recettore CCR8).
- 3) Valutazione *in vivo* dell'effetto rigenerativo.
- 4) Caratterizzazione del meccanismo di azione della proteina HMGB1 in cellule staminali isolate e coltivate in vitro.
- 5) Valutazione della capacità rigenerativa del tessuto cardiaco infartuato in modelli murini in cui i recettori RAGE e CCR8 sono stati deleti.

OBIETTIVI INTERMEDI PREVISTI

- 1) Messa a punto di condizioni di coltura per cellule staminali isolate dal midollo osseo e dal miocardio.
- 2) Messa a punto del modello sperimentale di infarto del miocardio in modelli murini di animali Knock out per i recettori RAGE e HMGB1.
- 3) Sviluppo di protocolli per l'iniezione di HMGB1 nel tessuto infartuato.

Criteri ed indicatori per la verifica dei risultati intermedi

- 1) Analisi della capacità proliferativa e differenziativa di cellule staminali cardiache in condizioni di coltura standard.
- 2) Valutazione della risposta di topi Knock out per CCR8 e RAGE all'infarto del miocardio mediante analisi immunoistochimiche.

I dati ottenuti saranno inoltre quantificati come numero di abstracts da sottoporre a Congressi nazionali ed internazionali ed eventuali manoscritti in preparazione.

METODOLOGIA

WP 1 – Identificazione di cellule staminali cardiache e analisi del differenziamento cardiaco, studi in vitro

Le cellule staminali cardiache fornite dalla U.O. 2, saranno isolate e caratterizzate utilizzando un citofluorimetro MoFlo (DakoCytomation) con tre laser, che permette di misurare 11 parametri in simultanea su ogni singola cellula. Le cellule staminali saranno identificate mediante la marcatura con Hoechst33342, espressione di markers di superficie (Sca, cKit, CD45) e molecole di adesione necessarie per la migrazione all'interno del tessuto cardiaco (CD44, P-Selectin, LFA-1, CD31, L-Selectin). Verrà studiata l'espressione di recettori per le chemiochine, che permettono di dirigere il traffico all'interno di tessuti danneggiati. Queste cellule saranno "sortate" ed utilizzate in esperimenti in vitro. Le U.O. 8 e 9 analizzeranno il potenziale differenziativo di tali cellule e la loro risposta ad HMGB1 e/o a molecole la cui sintesi è modulata da trattamenti con HMGB1. La presenza di cardiomiociti neoformati sarà valutata mediante immunofluorescenza con anticorpi diretti contro proteine espresse nelle cellule cardiache (l'actina sarcomerica, la connessina 43, i fattori trascrizionali MEF2, Nkx2.5 e GATA4) (U.O. 1). Le cellule neoformate saranno caratterizzate a livello elettrofisiologico con la tecnica del patch-clamp (U.O. 5), e a livello molecolare mediante laser-microdissection (U.O. 9).

WP 2 – Identificazione di molecole coinvolte nel reclutamento di cellule staminali midollari e cardiache, studi in vivo

La capacità rigenerativa di HMGB1 verrà valutata *in vivo* utilizzando un modello murino di infarto del miocardio. Brevemente, nel topo anestetizzato, intubato con procedura endoscopica e meccanicamente ventilato, si procederà all'apertura del torace in quarto spazio intercostale sinistro, alla visualizzazione dell'arteria coronaria discendente e alla legatura della stessa con un filo di sutura 6-0 in accordo a quanto già descritto in letteratura (Li et al.). Il trattamento con HMGB1 sarà effettuato a 4 ore dall'induzione dell'infarto, iniettando la proteina nella regione peri-infartuale. Dopo 1 settimana dall'iniezione saranno effettuate valutazioni emodinamiche mediante indagini ecocardiografiche (sonda da 13 Mhz) e cateterismo cardiaco (Millar da 1.4F). Si procederà quindi con l'analisi immunoistochimica (WP 1) per individuare la presenza di cellule cardiache neoformate (U.O. 1). I cuori ottenuti da un secondo gruppo di animali saranno processati per analisi mediante RPA per valutare l'espressione di chemochine, citochine e loro recettori dopo infarto e a trattamento con HMGB1 (U.O. 6). Mediante laser capture microdissection e macroarray l'U.O. 9 analizzerà il microambiente della lesione ischemica e caratterizzerà le vie di traduzione del segnale coinvolte nell'induzione di segnali paracrini. Lo stesso tipo di analisi biochimica e funzionale sarà condotta in topi KO per RAGE, galectina-3, resi diabetici con streptozocina e CCR8, dopo 4 settimane dall'induzione dell'infarto (U.O. 6 e 8). Lo studio nei pazienti post-infartuati sarà condotto analizzando la presenza di cellule staminali nel sangue periferico in presenza e in assenza di trattamenti con G-CSF.

WP 3 – Identificazione di molecole coinvolte nel reclutamento di cellule staminali midollari e cardiache, studi in vitro

La via di traduzione del segnale mediata da RAGE sarà analizzata utilizzando i seguenti approcci:

- a) proteomico, identificando tutte le proteine che cambiano stato di fosforilazione dopo trattamento con HMGB1;
- b) genetico, testando se cellule KO per uno specifico trasduttore del segnale (per es. UKKalfa, che attiva il pathway NF-kB) sono sensibili ad HMGB1;
- c) farmacologico, utilizzando i numerosi inibitori specifici che inibiscono vari trasduttori del segnale;
- d) genomico, in cui verranno confrontati i pattern di espressione genica prima e dopo trattamento con HMGB1 (U.O. 4).

TRASFERIBILITÀ DEI RISULTATI E DEI PRODOTTI

Le tecnologie sviluppate in questo progetto, anche se limitate ad una sperimentazione animale, potrebbero rappresentare uno strumento unico per lo sviluppo di terapie per il trattamento dell'infarto del miocardio e dell'insufficienza cardiaca. È importante ricordare che l'obiettivo del progetto è indurre una rigenerazione del tessuto cardiaco utilizzando cellule staminali endogene. L'identificazione di fattori in grado di mobilizzare e soprattutto reclutare tali cellule in un tessuto danneggiato al fine di favorirne il differenziamento costituisce un obiettivo importante. I risultati ottenuti permetteranno di valutare la potenzialità pratica dell'uso delle terapie proposte nel progetto al fine di contrastare non soltanto l'infarto acuto ma anche fasi più avanzate dell'insufficienza cardiaca. Considerato l'impatto che l'insufficienza cardiaca ha acquisito in termini di mortalità e di ospedalizzazione tra i portatori di cardiopatie in uno stadio avanzato, a causa della scarsa disponibilità di cuori da trapiantare e delle lunghe liste di attesa per questo tipo di intervento, il raggiungimento degli obiettivi descritti in questo progetto potrebbe permettere di ritardare un eventuale trapianto cardiaco e, nella migliore delle ipotesi, evitare l'intervento chirurgico.

ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE

U.O. 1 – Laboratorio di Biologia Vascolare e Terapia Genica, Centro Cardiologico IRCCS - Milano

U.O. 2 – Unità di Citofluorimetria, Fondazione Santa Lucia IRCCS – Roma

U.O. 3 – Istituto di Cardiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

U.O. 4 – Laboratorio di Dinamica della Cromatina, Fondazione Centro S. Raffaele del Monte Tabor – Milano

U.O. 5 – Laboratorio di Biofisica, Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, Università di Roma La Sapienza

U.O. 6 – Laboratorio di Patologia Vascolare, Istituto Dermopatico dell'Immacolata – Roma

U.O. 7 – Dipartimento di Biopatologia e Diagnostica per Immagini, Università di Roma Tor Vergata

U.O. 8 – Dipartimento di Scienze Cliniche, Università di Roma La Sapienza

U.O. 9 – Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università di Roma La Sapienza

Si allega il programma dettagliato dell'Unità Operativa 2 facente capo alla Fondazione Santa Lucia IRCCS.

U.O. 2 - Unità di Citofluorimetria

Giovanna Borsellino

OBIETTIVO FINALE DEL CONTRIBUTO

Le cellule staminali sono state identificate in diversi tessuti, e recentemente anche nel tessuto cardiaco. Tali cellule esprimono, nel miocardio, l'antigene c-kit e sono clonogeniche, in grado di autorinnovarsi e di differenziare in cardiomiociti, cellule muscolari lisce e cellule endoteliali. Tuttavia l'origine di tali cellule non è stata caratterizzata. È noto che cellule c-kit positive sono presenti nel midollo osseo e possono essere reclutate nel tessuto danneggiato dove partecipano al processo di rigenerazione.

Recentemente è stata identificata nel muscolo scheletrico una popolazione di cellule staminali in grado di dare origine a cellule del sistema ematopoietico. Tali cellule possono essere individuate sulla base della loro capacità di escludere l'Hoechst 33342 attraverso il canale "multidrug resistance-MDR".

In questo progetto ci proponiamo di caratterizzare le cellule staminali cardiache mediante dettagliate analisi fenotipiche effettuate con citofluorimetria policromatica (9 colori), che ci permetterà di ottenere dati informativi anche partendo da piccole quantità di cellule. Queste cellule saranno infine "sortate" e utilizzate nei trapianti per valutarne la capacità rigenerativa.

Criteri e indicatori per la verifica dei risultati finali

- Pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.
- Identificazione di markers fenotipici o funzionali utili a identificare cellule staminali cardiache.

OBIETTIVI INTERMEDI

- Validazione delle tecniche di "sorting" ad alta velocità e di analisi fenotipica a 9 colori mediante citofluorimetria per gli obiettivi prefissati.
- Studio delle caratteristiche fenotipiche delle cellule staminali isolate da tessuto cardiaco normale e infartuato.

Criteri e indicatori per la verifica dei risultati intermedi

- Pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.
- Alla fine della prima fase del progetto il responsabile dell'U.O. dovrebbe scrivere una sintesi dei risultati ottenuti, descrivendo le priorità sperimentali nei successivi 12 mesi per portare a termine gli obiettivi proposti.

METODOLOGIA

Le cellule staminali cardiache fornite dalla U.O. 1, saranno isolate e caratterizzate utilizzando un citofluorimetro MoFlo (DakoCytomation) con tre laser, che permette di misurare 11 parametri in simultanea su ogni singola cellula. Lo stesso citofluorimetro è poi in grado di separare ad alta velocità le popolazioni cellulari di interesse. Il sorting ad alta velocità permette l'isolamento di popolazioni cellulari rare, come ad esempio le cellule staminali. Verrà effettuata un'analisi fenotipica citofluorimetrica multicolore che ci permetterà di ottenere un'elevata quantità di informazioni da campioni *ex vivo* isolati dal cuore di topi sani, infartuati, o trattati con la proteina HMGB-1.

Le cellule staminali saranno identificate mediante la marcatura con Hoechst33342, espressione di markers di superficie (Sca, cKit, CD45, CD3) e molecole di adesione necessarie per la migrazione all'interno del tessuto cardiaco (CD44, P-Selectin, LFA-1, CD31, L-Selectin). Saranno utilizzati anticorpi coniugati con i seguenti fluorocromi: fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), CyChrome™ (Cy5 PE), Allophycocyanin (APC), PE-Cy7, APC-Cy7 e PE-TxRed.

Verrà inoltre studiata l'espressione di recettori per le chemiochine, che permettono di dirigere il traffico all'interno di tessuti danneggiati.

L'analisi dei campioni verrà effettuata su citofluorimetro MoFlo (DakoCytomation, Fort Collins, CO) utilizzando il software Summit e FlowJo per la compensazione multiparametrica. Le cellule staminali verranno sortate ad alta velocità ed utilizzate per gli studi funzionali di rigenerazione cardiaca dalla U.O. 1 e per studi *in vitro* dalla U.O. 4.

*Partecipazione al progetto di ricerca finalizzata
IRCCS Fondazione Istituto Neurologico C. Mondino – Pavia*

**MALATTIA DI ALZHEIMER:
RICONOSCIMENTO DEI DEPOSITI
AMILOIDI PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA**

Responsabile: MAURO CERONI
IRCCS Fondazione Casimiro Mondino

U.O. 4: ALESSANDRO STEFANI
Università di Roma Tor Vergata – IRCCS S. Lucia

OBIETTIVO PRINCIPALE

Il progetto si prefigge lo scopo di sviluppare una nuova metodologia di imaging scintigrafico per l'individuazione dei depositi amiloidi nel sistema nervoso centrale. Lo studio di sonde peptidiche a basso peso molecolare, che abbinino la specificità per i depositi amiloidi ad una elevata diffusibilità tissutale, è da considerarsi l'obiettivo principale del progetto.

Sono definiti obiettivi intermedi lo studio della sensibilità e specificità del metodo nel modello animale e lo studio della tossicità del test in colture primarie di linfociti di pazienti affetti da malattia di Alzheimer.

L'individuazione di casistiche esaurientemente caratterizzate con gruppi omogenei per stadio di malattia permetterà di prospettare una futura iniziale applicazione ai pazienti delle metodiche scintigrafiche, messe a punto nel progetto. È da considerare anche come obiettivo intermedio lo sviluppo di un modello murino inducibile che permetta di correlare le varie fasi di sviluppo della malattia con le espressioni fenotipiche ad essa associate ed i depositi di amiloide.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre?

Il progetto si prefigge di individuare una nuova metodologia di diagnosi dei depositi amiloidi nel cervello utilizzando tecniche di imaging scintigrafico. Le sonde devono presentare caratteristiche di specificità e sensibilità per i depositi amiloidi ed essere altamente diffusibili nei tessuti per raggiungere il cervello. Le caratteristiche delle sonde saranno testate in sistemi *in vitro* e *in vivo* con l'utilizzo di modelli animali e colture primarie di linfociti. Il modello animale inducibile permetterà di verificare la possibilità e la sensibilità del metodo nella individuazione delle localizzazioni tissutali e cerebrali in particolare dei depositi amiloidi e anche la loro quantificazione. L'utilizzo di modelli murini inducibili permetterà di avere informazioni sulla sensibilità della metodologia di imaging utilizzata.

L'individuazione di casistiche esaurientemente caratterizzate di pazienti affetti da malattia di Alzheimer e la loro suddivisione in gruppi omogenei per stadio evolutivo della malattia e per marcatori biologici permetterà correlazioni con markers biologici di tipo cellulare e umorale, potenzialmente applicabili alla diagnosi precoce e da correlare con metodi scintigrafici di riconoscimento dei depositi amiloidi applicabili all'uomo.

METODOLOGIA

Il progetto prevede l'utilizzo di un'ampia gamma di tecniche finalizzata alla caratterizzazione di una nuova metodologia di imaging e della sua applicabilità al modello animale *in vivo* e al modello cellulare umano *in vitro*.

WP1: Sintesi e marcatura dei peptidi. Una tecnica di cromatografia e spettrometria quantitativa sarà utilizzata per calcolare la capacità di legame tra i peptidi apr e le fibrille. Verrà inoltre condotto uno studio di caratterizzazione delle transizioni conformazionali ed i cambiamenti dei chemical shift degli aminoacidi dei peptidi attraverso tecniche di proteolisi limitata.

WP2: Gli esperimenti scintigrafici prevedono la messa a punto del metodo di marcatura con l'utilizzo di un isotopo ad elevato flusso fotonico. Lo studio della biodistribuzione *in vivo* sarà effettuato utilizzando una gamma camera per l'imaging di piccoli animali. Saranno utilizzati due modelli murini: un modello trasgenico per il gene della APP ed un modello tetraciclina inducibile per il gene della P2. L'indagine scintigrafica sarà effettuata sia *in vivo* sull'animale sia sugli organi dopo espanto. In parallelo saranno effettuate le analisi di immunoistochimica per valutare la formazione dei depositi di sostanza amiloide.

WP3: I pazienti, affetti da malattia di Alzheimer di gravità da lieve a moderata, saranno reclutati applicando i criteri diagnostici per demenza NINCDS-ADRDA; per l'iter diagnostico verranno applicate le linee guida per la diagnosi della Società Italiana di Neurologia (2004). I pazienti e rispettivi controlli verranno sottoposti ad indagini radiologiche con RM volumetrica. Tecniche di western blotting e di citofluorimetria a flusso saranno utilizzate per l'identificazione di marcatori biologici della malattia su liquor ed estratti proteici derivanti da colture primarie di leucociti. Profili di espressione genica di pazienti e controlli saranno effettuati con tecniche di microarray e verranno correlati con i dati proteici. Le colture primarie di leucociti verranno utilizzate anche per lo studio *in vitro* della tossicità dei peptidi apr valutando il grado di vitalità cellulare a dosi differenti di peptide sia con metodi citofluorimetrici sia con metodi convenzionali (MTT).

TRASFERIBILITÀ DEI RISULTATI E DEI PRODOTTI

Nonostante la scoperta di alcuni geni (presenilina 1 e 2, APP, nicastrina) sicuramente implicati nelle forme familiari di malattia di Alzheimer e verosimilmente connessi anche con l'eziopatogenesi delle forme sporadiche, a tutt'oggi non conosciamo ancora il dettaglio molecolare del processo che conduce alla precoce e selettiva morte neuronale in questa malattia. Tuttavia la formazione di aggregati e depositi che spesso assumono la natura di amiloide, la loro correlazione stretta con la progressione di malattia, il riscontro sempre più comune a tutte le forme neurodegenerative di un problema di misfolding di proteine come meccanismo eziopatogenetico delle stesse, suggerisce che nuove metodologie di diagnosi possibilmente in grado di cogliere anche le fasi precliniche della malattia e trattamenti potenzialmente efficaci possono derivare dalla scoperta di composti e peptidi in grado di riconoscere e legare in modo altamente specifico i depositi e gli aggregati amiloidi.

I tentativi terapeutici, già sperimentati sull'uomo di una terapia immunologica di tipo vaccinale, se da una parte hanno prodotto encefaliti allergiche che hanno costretto ad arrestare i trials in corso, dall'altra hanno

dimostrato che è possibile arrestare la progressione ed anche ottenere una certa regressione della patologia operando sulle formazioni amiloidi.

È inoltre importante osservare che anche approcci terapeutici completamente diversi, come l'impiego di cellule staminali per riparare i danni cerebrali della neurodegenerazione, presuppongono per la loro efficacia e riuscita di essere combinati con terapie che arrestino il processo neuropatologico, pena la fugacità del loro potenziale terapeutico. Pertanto riteniamo che il progetto che proponiamo individui e cerchi di percorrere strade metodologiche che possono condurre alla scoperta e messa a punto di una strategia diagnostica in grado di riconoscere e legare proteine assemblate in forma amiloide o preamiloide. Del resto la trasferibilità di tali prodotti all'applicazione clinica è testimoniata dall'interesse di una compagnia di tipo biotecnologico al progetto stesso.

Passaggio essenziale per la trasferibilità dei prodotti per la diagnosi precoce nel paziente sono i saggi per indagare la tossicità e gli effetti di composti che debbano essere testati nell'uomo utilizzando colture primarie di leucociti di pazienti. I leucociti dei pazienti affetti da malattia di Alzheimer sono un campione biologico di facile reperibilità e in grado di riflettere condizioni metaboliche e di reazione ad eventi stressanti sorprendentemente correlati alla patologia neuronale cerebrale. Le colture primarie di leucociti appaiono, perciò, ottimali per studi sui meccanismi di produzione del danno neuronale e potenzialmente impiegabili per la diagnosi di una condizione metabolica favorente la patologia neurodegenerativa.

Verranno inoltre studiati marcatori liquorali e l'espressione di markers biologici caratteristici del processo neurodegenerativo (bcl2, tau) potenzialmente in grado di fornire supporti diagnostici e marcatori di stadio evolutivo della malattia. Tali dati potranno essere correlati con i profili di espressione genica effettuati tramite tecnica di microarray. L'utilizzo di tali metodologie su larga scala appare per ora futuribile, ma il progetto prospetta potenzialità nella definizione di gruppi omogenei di pazienti, correlando dati clinici, funzionali e biologici per individuare i criteri di applicabilità della nuova metodologia di imaging. Riguardo la trasferibilità dei prodotti alla ricerca clinica ed alla ricerca di base va considerato anche lo sviluppo, all'interno del progetto, di un modello murino inducibile per lo studio della malattia di Alzheimer. L'utilizzo di un modello inducibile favorisce la correlazione tra gli stadi della patologia e le espressioni fenotipiche ad essa associate aprendo la strada alla caratterizzazione delle fasi precliniche della malattia.

ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE

U.O. 1 - Laboratorio Neurobiologia Sperimentale, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico C. Mondino – Pavia

U.O. 2 - Laboratorio di Biotecnologie, IRCCS Policlinico San Matteo – Pavia

U.O. 3 - Clinica del Lavoro e della Riabilitazione-Servizio di Medicina nucleare, IRCCS Fondazione S. Maugeri – Pavia

U.O. 4 - Laboratorio di Fisiopatologia delle malattie extrapiramidali, Fondazione Santa Lucia IRCCS – Roma

U.O. 5 - Dipartimento di Medicina, San Raffaele Pisana Roma

U.O. 6 - Laboratorio Neurobiologia e Neurogenetica, IRCCS Centro S. Giovanni di Dio-Fatebenefratelli – Brescia

Si allega il programma dettagliato dell'Unità Operativa 4 facente capo alla Fondazione Santa Lucia IRCCS.

U.O. 4 – Fisiopatologia delle malattie extrapiramidali

Alessandro Stefani

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGRAMMA

La nostra Unità assicura l'acquisizione di dati clinico-strumentali e biochimici su una vasta popolazione di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer e sue varianti. L'impiego combinato e, ove necessario, ripetuto di test neuropsicologici, neuroimaging, proteomica liquorale e neurofisiologia permette abitualmente di discriminare tra forme di DAT ed altre demenze corticali primarie (forme focali tau-correlate, etc.) con elevato grado di sensibilità e specificità. Un aspetto non secondario, inoltre, è l'abilità di "pesare" la quota di patologia vascolare associata età-correlata che può procedere in parallelo ad una altrimenti chiara DAT. In tale contesto, trovano spazio sia neuroimaging dedicato (SPECT, MRI funzionale se necessario) che ecodoppler transcranico per la disamina della reattività vascolare. Ai fini del presente progetto saranno reclutati circa 100 pazienti DAT (dei quali almeno il 50% senza malattia cerebrovascolare -CVD).

L'aspetto qualificante del nostro contributo non sarà meramente diagnostico in termini di stato di malattia. La nostra ambizione è quella di identificare marcatori sia di stato che di progressione. Verranno confrontati quindi coorti ben differenti di malati DAT su due assi diversi: in primis, sottogruppi distinti in base alla durata dei sintomi ed alla durata di terapia colinergica assunta (ad esempio DAT incipient/lieve con nessuna terapia colinomimetica vs DAT moderato-severo con > 2 anni di agenti colinergici + eventuali antipsicotici); in secondo luogo si distingueranno anche pazienti in base alla evidenza di "cluster" sintomatologici pseudo-psichiatrici, ossia preminenza di sintomi depressivi o psicotici.

In pratica, per ciascun paziente dei predetti sottogruppi verrà raccolto uno o più campioni di liquor (a 12 mesi dal primo) allo scopo di misurare la concentrazione di peptidi standard (Beta-amiloide 1-42, tau totali e forme fosforilate, in particolare la 181) a confermare il pattern peculiare già noto. Nei predetti sottogruppi, peraltro, verranno anche investigati parametri biochimici correlati ai sistemi aminergici endogeni. In pratica andremo a dosare i metaboliti della dopamina, nell'ipotesi che, almeno in determinati casi di DAT, una precoce compromissione della trasmissione dopaminergica, noradrenergica e serotoninergica, sottenda all'evoluzione dei segni clinici o alla stessa patogenesi. Corollario innovativo dell'ultimo aspetto sarà altresì la possibile identificazione di alterazioni nei peptidi endogeni. È noto come in modelli animali (roditori transgenici per APP) sia posta in evidenza un aumento di galanina in correlazione con la progressione del danno degenerativo.

Punto di incontro non secondario con le altre unità del progetto sarà la possibilità di approntare colture primarie di linfociti dal siero dei predetti pazienti.

A pazienti con DAT, ma afferenti a coorti diverse (per gravità), e a pazienti con altra malattia neurologica ma cognitivamente indenni verranno effettuati prelievi di sangue periferico. Da questi verranno isolati i linfociti mediante gradiente di Ficoll, stimolati alla proliferazione con Fitoemoagglutinina e coltivati in terreno RPMI complementato con antibiotici e siero di vitello fetale per 72 ore. Andremo quindi a verificare se ed in che misura i linfociti dai pazienti DAT esprimono la proteina tau ed il suo grado di fosforilazione. Ne potrebbe derivare la possibilità, al momento solo speculativa, di acquisire un nuovo marker biologico per una diagnosi precoce della malattia.

In ogni caso, i dati raccolti dalle nostre colture cellulari saranno utilmente paragonati agli studi condotti dalle altre unità ed in particolare a quelli mirati all'analisi dell'espressione proteica di concomitante danno ossidativo e/o apoptotico.

METODOLOGIA

Clinica - Il Servizio di Diagnostica e Cura delle demenze prevede un iter diagnostico che comprende:

- Visite neurologiche.
- Test neuropsicologici, comprensivi di scale per la depressione, per l'apatia e per i disturbi del comportamento.
- Neuroimaging: RMN morfologica e funzionale, SPECT.
- Neurofisiologia clinica: mappe EEG, EEG-holter con studio delle fasi del sonno.
- MEP e TMS (con studio della inibizione e facilitazione intracorticale).

Biochimica clinica - Studio di biomarker liquorali - I saggi di liquido cerebrospinale sono raccolti con procedura standard, privi di contaminazione ematica, previa puntura lombare dallo spazio L3/L4 o L4/L5, abitualmente nelle prime ore del mattino. Il LCS viene raccolto in contenitori di polipropilene. Ogni campione di 2 cc viene diviso in porzioni diverse, 1 cc è aliquotato per immediata titolazione della beta amiloide e, altresì, congelamento a -80° C per successive analisi (tau). Il metodo impiegato per l'analisi della concentrazione di A 1-42, t-tau and p-tau 181 consiste in una tecnica immunoenzimatica su piastra sensibilizzata con anticorpo monoclonale e rilevazione mediante secondo anticorpo monoclonale coniugato con il sistema biotina/streptoavidina-HRP (Innogenetics).

L'analisi statistica permetterà di determinare sensibilità, specificità, valore soglia ed efficienza clinica dei dosaggi in oggetto.

Nei medesimi campioni di liquor, raccolti con aliquote di 200-1000 ml, vengono altresì indagati:

1. metaboliti della dopamina in assenza o in corso di trattamento farmacologico con inibitori dell'acetilcolinesterasi;

2. peptidi (in particolare galanina, CCK e neurotensina) con metodiche RIA, in condizioni di base e dopo trattamento farmacologico.

Colture cellulari - Come accennato, abbiamo approntato un modello di studio per verificare se nei linfociti da pazienti con DAT sia identificabile e quantificabile l'espressione di tau.

A tal fine a pazienti affetti dalla malattia (vs pazienti "periferici" - radiocolopatie di pari età) verranno effettuati prelievi di sangue periferico. Da questi verranno isolati i linfociti mediante gradiente di Ficoll, stimolati alla proliferazione con Fitoemoagglutinina e coltivati in terreno RPMI complementato con antibiotici e siero di vitello fetale per 72 ore. Ci ripromettiamo di:

1) Verificare la presenza/assenza della proteina nelle cellule di un ampio campione di individui. L'espressione di tau verrà rilevata mediante Western blotting, utilizzando l'anticorpo monoclonale TAU-2 (ICN), che reagisce esclusivamente con tau eterogeneo, nella forma fosforilata e non.

2) Studiare lo stato di fosforilazione di tau nei linfociti in cui la proteina è espressa mediante Western blotting, utilizzando anticorpi che riconoscano tau nel suo stato fosforilato. In particolare utilizzeremo anti-tau specifico per la fosforilazione dei siti Ser262, Ser214 e Ser409 (anti-Tau, phosho-specific Ser262, Ser214 e Ser409 Calbiochem). Il sito Ser262 è localizzato nel primo dominio di legame di tau ai microtubuli e potrebbe essere importante nella patogenesi di AD poichè questa fosforilazione causa il distacco dai microtubuli e l'impossibilità di promuoverne l'assemblaggio. Il secondo e il terzo sito sono altrettanto importanti poichè si ritrovano come fosfoepitopi nel tessuto cerebrale di pazienti AD, anche allo stadio precoce, ma non in quello di individui normali.

*Partecipazione al progetto di ricerca finalizzata
IRCCS Fondazione Istituto Neurologico C. Mondino - Pavia*

**PORTALE NEUROLOGICO
RETE DEI CENTRI DI ECCELLENZA
DELL'AREA NEUROLOGICA-RIABILITATIVA**

Responsabile: GIUSEPPE NAPPI
IRCCS Fondazione Casimiro Mondino

U.O. 6: STEFANO PAOLUCCI
IRCCS S. Lucia

OBIETTIVO PRINCIPALE

L'obiettivo principale del progetto consiste nella realizzazione di una rete dei centri di eccellenza dell'area neurologica-riabilitativa che attraverso lo strumento del "Portale Neurologico" consente di sperimentare modelli clinici per l'ottimizzazione della continuità assistenziale (Minimum data set, teleradiologia), nonché modelli di informazione e comunicazione per operatori sanitari del territorio, associazioni, giornalisti e pazienti (biblioteca multimediale, tools educazionali, formazione, approfondimenti).

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre?

Il progetto si prefigge di lavorare su due livelli inter-connessi tra loro:

1. Realizzazione di una rete di centri di eccellenza a livello nazionale (sperimentando il modello sulla Malattia di Parkinson e sulla patologia cefalalgica) che sia in grado di attivare esperienze di lavoro cooperativo tra specialisti per elaborare e condividere un Minimum data set. La raccolta condivisa di dati permetterà di migliorare i percorsi assistenziali e di ricerca. L'utilizzo di tecnologie web per lo sviluppo di tale Minimum data set e per attività di teleradiologia consentirà, inoltre, di ottimizzare e migliorare la continuità assistenziale in quanto sarà possibile mettere a disposizione del paziente, del Medico di medicina generale, delle associazioni, dei centri di riabilitazione (previa autorizzazione del paziente), informazioni utili al percorso di cura.

2. Costituzione di un network di competenze specialistiche consentirà, inoltre, di raccogliere, classificare, elaborare e diffondere documentazione validata (dai centri di eccellenza) direttamente fruibile da pazienti, familiari, giornalisti ed operatori sanitari.

Concretamente ci si prefigge di creare:

- una biblioteca multimediale (accessibile via web dal Portale) di documentazione divulgativa per l'area neurologica-riabilitativa;

- tools educazionali multimediali per migliorare gli stili di vita dei pazienti cronici e spazi di comunicazione per affrontare alcune specifiche tematiche dedicate a pazienti, associazioni, esperti della comunicazione (forum moderato);

- corsi di formazione a distanza per Medici di medicina generale, operatori sanitari.

METODOLOGIA

Project Management sperimentata ed utilizzata dall'IRCCS Istituto Neurologico C. Mondino, mediante la propria Unità funzionale per la ricerca e lo sviluppo in rete per le patologie neurologiche (NEURIS), che nasce da

una pluriennale collaborazione tra l'IRCCS Mondino e il CBIM (Consorzio di Bioingegneria e Informatica Medica).

Tale metodologia è già stata utilizzata nell'ambito di progetti analoghi, relativi ai Sistemi Informativi sanitari e Telemedicina, gestiti per conto della Comunità Europea (VI Programma Quadro UE 2002-2006), del Ministero della Salute, del Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca Scientifica e di altri organi di rilevanza internazionale. Allo scopo di monitorare costantemente lo stato di avanzamento dei lavori, il progetto verrà suddiviso in più fasi ciascuna delle quali sarà da ritenersi conclusa alla produzione di un output definito nell'apposita sezione di questo documento.

La metodologia adottata, inoltre, si basa su una frequente interazione tra i diversi soggetti interessati (gli enti aderenti al progetto e il Ministero) al fine di procedere in modo adattativo ed impedire che tutte le criticità emergano alla conclusione del progetto con un'inevitabile allungamento dei tempi. Una maggiore interazione consente, inoltre, di migliorare la qualità del progetto in quanto aumentano le possibilità di comunicare tra chi conosce in dettaglio la realtà su cui si intende agire e chi è esperto nella progettazione di sistemi complessi.

Il progetto prevede, inoltre, il coinvolgimento delle regioni dove insistono le U.O. (Lombardia, Molise, Piemonte, Lazio) e dell'Istituto Superiore di Sanità, che potrà mettere a disposizione del progetto dati provenienti dai suoi Registri Nazionali, al fine di integrare informazioni sui bisogni assistenziali e per contribuire alla pianificazione di interventi sanitari mirati in tutte le Regioni italiane.

Operativamente si costituiranno dei gruppi di lavoro responsabili del conseguimento dei diversi obiettivi (che saranno concretizzati nella sezione output del programma). In dettaglio, i gruppi di lavoro saranno:

- Minimum data Set per la Malattia di Parkinson.
- Minimum data Set per la patologia cefalalgica.
- Teleradiologia e tecnologie avanzate.
- Biblioteca multimediale.
- Tools educazionali e comunicazione.
- Formazione a distanza.

I principali driver dei servizi erogati dal portale sono: Informazione e Formazione.

La metodologia di Formazione si avvale di competenze di progettazione, di tecnologie sperimentate in precedenza e di sistemi innovativi a questa integrati.

La realizzazione del portale e, soprattutto, la continuità dal progetto non può prescindere dalla definizione di un modello organizzativo che prevede l'istituzione di una redazione del portale Neurologico (gruppo di coordinamento) che consenta di gestire opportunamente le diverse sezioni del portale.

La redazione del portale sarà coordinata dall'IRCCS Mondino e composta da un rappresentante di tutte le Unità Operative. Per la realizzazione di particolari sezioni informative o specifici eventi formativi è necessario

prevedere il coinvolgimento di competenze specifiche esterne (es: esperti di comunicazione, web designer, formatori) che consentirà di completare la struttura di back-office del portale.

TRASFERIBILITÀ DEI RISULTATI E DEI PRODOTTI

Il progetto si prefigge di creare una rete di competenze sulla Malattia di Parkinson e sulla patologia cefalalgica orientata a trasferire i modelli clinici e di comunicazione sperimentati verso due direzioni:

- Altri centri di eccellenza, sia a livello nazionale che internazionale (ad esempio, Tunisia), che curano la Malattia di Parkinson e le Cefalee, al fine di coinvolgerli nella rete con le proprie competenze specifiche.

- Altre aree dell'attività neurologica-riabilitativa di interesse per altre patologie neurodegenerative (Alzheimer, SLA, ecc.).

Ci si prefigge di coinvolgere, oltre alle 8 Unità Operative del presente progetto ed i 25 centri specialistici per la Malattia di Parkinson/Cefalee già operativi nei progetti regionali:

- 30 Centri Parkinson accreditati LIMPE presenti su tutto il territorio nazionale;

- 17 Centri Cefalee accreditati come Centro Interuniversitario Cefalee e Disordini Adattativi (UCADH) presenti in 11 Università italiane (Pavia, Modena, Parma, Novara, Pisa, Roma La Sapienza, Roma Tor Vergata, Cosenza, Firenze, Varese e Padova);

- le associazioni pazienti AIP (Associazione Italiana Parkinson), Parkinson Italia, Alleanza Cefalalgici.

La realizzazione del “Portale Neurologico” consente, inoltre, di trasferire facilmente modelli clinici per l’ottimizzazione della continuità assistenziale (Minimum data set), nonché modelli di informazione e comunicazione per operatori sanitari del territorio, associazioni, giornalisti e pazienti (biblioteca multimediale, tools educazionali, formazione, approfondimenti).

ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE

U.O. 1 – Direzione scientifica, IRCCS Istituto Neurologico C. Mondino (NEURIS) – Pavia

U.O. 2 – Dipartimento di fisiopatologia circolatoria e del metabolismo cerebrale, IRCCS Neuromed – Pozzilli (CB)

U.O. 3 – IRCCS Fondazione S. Maugeri - Istituto Scientifico Maugeri Umberto di Veruno - Sede distaccata Casa di Cura Major – Torino

U.O. 4 – U.O. Disturbi del movimento, IRCCS Neurologico C. Besta – Milano

U.O. 5 – Segreteria scientifica, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi ONLUS – Milano

U.O. 6 – U.O. di Riabilitazione Neurologica, Fondazione Santa Lucia IRCCS – Roma

U.O. 7 – Dipartimento di Neuroscienze, Istituti Clinici di Perfezionamento CTO – Milano

U.O. 8 - Dipartimento di Riabilitazione Neuromotoria, Casa di Cura San Raffaele Pisana – Roma

Si allega il programma dettagliato dell'Unità Operativa 6 facente capo alla Fondazione Santa Lucia IRCCS.

U.O. 6 – U.O. di Riabilitazione Neurologica

Stefano Paolucci

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGRAMMA

La Fondazione si propone di partecipare ad una rete di eccellenza a livello nazionale nell'ambito delle patologie neurologiche di interesse riabilitativo, in modo da condividere esperienze e dati in grado di migliorare da una parte i percorsi assistenziali e dall'altra di stimolare la ricerca. In particolare si propone di partecipare a banche dati riservate allo studio della malattia di Parkinson e alle cefalee, tramite la condivisione di informazioni inviate per via telematica di carattere clinico e demografico, consultabili in modo collegiale per obiettivi definiti e condivisi di ricerca.

Si propone altresì di partecipare alla costituzione di una biblioteca virtuale di materiale divulgativo nelle aree sopra riportate, aperta a pazienti, familiari ed Associazioni.

Infine, si propone di fornire teleconsulenze sulle neuroimaging agli altri Istituti partecipanti al progetto.

METODOLOGIA

Si programma la costituzione di due data bases riguardanti la Malattia di Parkinson e le cefalee, contenenti informazioni di carattere clinico e demografico consultabili in via telematica attraverso il portale, protetti secondo le norme di legge e con differenti livelli di accesso ed autorizzazione.

Riguardo, invece, alla biblioteca on-line, tale servizio è costituito ed implementato dai contributi dei ricercatori-clinici degli Istituti partecipanti al portale ed è consultabile dall'utenza registrata.

*Partecipazione al progetto di ricerca finalizzata
Regione Lazio*

**STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI
DI MORTE CELLULARE
IN MODELLI ANIMALI
DI MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

Responsabile: GENNARO MELINO
European Brain Research Institute (EBRI)

U.O. 2: CLAUDIA BAGNI
IRCCS S. Lucia

MOTIVAZIONI E OBIETTIVO FINALE

Obiettivo di questo progetto è quello di studiare i meccanismi molecolari di morte cellulare *in vivo* utilizzando modelli animali di transgenici e KO in cui alcuni geni chiave del processo apoptotico neuronale siano stati alterati. In particolare, studieremo in questi modelli il ruolo di alterazioni di fattori di trascrizione pro-apoptotici (p53, p63, p73), il ruolo delle alterazioni della funzionalità mitocondriale, il ruolo delle alterazioni dello stato redox della cellula, il ruolo dell'apoptosoma ed infine il ruolo degli aggregati proteici tipici di queste malattie nell'induzione dell'apoptosi. La conoscenza precisa degli eventi molecolari che portano alla morte dei neuroni *in vivo* e la possibilità di utilizzare i modelli da noi generati per individuare molecole in grado di interrompere la cascata apoptotica a qualsiasi livello indipendentemente dai meccanismi patologici che la hanno innescata è di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuove terapie.

Gli obiettivi principali del progetto possono essere così schematizzati:

- Identificazione degli eventi molecolari coinvolti nella morte per apoptosi in modelli di malattie neurodegenerative.
- Generazione di nuovi modelli animali di malattie neurodegenerative.
- Individuazione di nuovi target terapeutici per arrestare o rallentare la morte cellulare tipica delle malattie neurodegenerative.
- Miglioramento delle conoscenze sui precursori neuronali.

Criteri e indicatori per la verifica dei risultati finali

- Pubblicazione di articoli su riviste scientifiche internazionali.
- Partecipazione a congressi nazionali ed internazionali con presentazione di abstracts e comunicazioni orali.
- Formazione e istruzione di giovani ricercatori.
- Descrizione dei diversi modelli animali generati.

OBIETTIVI INTERMEDI

- Messa a punto delle metodiche di studio.
- Generazione delle varie colonie di animali necessari allo studio.
- Messa in coltura delle cellule primarie derivate dai vari modelli animali.

Criteri e indicatori per la verifica dei risultati intermedi

- Valutazione dell'avanzamento del progetto da parte dei responsabili dell'Unità mediante riunioni semestrali.
- Pubblicazione di articoli su riviste scientifiche internazionali.

METODOLOGIA

WP 1 - Ruolo della via mitocondriale e di Apaf1 in alcune malattie neurodegenerative (U.O. 2, 3, 5)

1 - Generazione del mutante Apaf1 condizionalmente inattivato. Studi con neuroni in coltura per valutare il coinvolgimento di Apaf1 e dell'apoptosoma nei processi patogenetici di AD, HD e ALS.

2 - Analisi della resistenza alla neurodegenerazione delle cellule Apaf1-/- con i seguenti stimoli: esposizione all'Abeta-amiloide, transfezione con SOD1 mutante e con tratti di poliglutammine.

3 - Analisi *in vivo* dei mutanti incrociati con modelli animali di AD, HD e ALS, studio del ruolo di Apaf1. Inoltre, vista la presenza di inclusioni nucleari positive all'ubiquitina nei topi modello per la TAS, verranno studiati i meccanismi di morte cellulare che potrebbero derivare dalla presenza delle inclusioni.

WP 2 - Ruolo delle alterazioni dello stato redox della cellula nell'induzione della via mitocondriale e nella formazione di aggregati (U.O. 2, 3, 5)

1 - Utilizzo di modelli di ALS per lo studio del ruolo delle alterazioni della funzione mitocondriale dovute all'azione pro-ossidante della SOD nell'apoptosi. Inoltre studio della relazione tra la proteina mutata e la formazione di aggregati. Studio del ruolo patogenetico degli aggregati cellulari. Utilizzeremo: (a) topi transgenici che esprimono mutanti dell'enzima antiossidante SOD1 tipiche della ALS familiare; (b) diversi sistemi cellulari (cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y o ibridi motoneurone-neuroblastoma murino NSC-34) in cui esprimeremo un pannello di SOD1 mutate fra le oltre 100 varianti descritte nei pazienti.

2 - Utilizzo di topi transgenici modello di TAS per lo studio del ruolo delle alterazioni della funzione mitocondriale. Caratterizzazione biochimica degli aggregati tipici di questa malattia e studio del loro ruolo nella patogenesi.

WP 3 - Studio del ruolo di p53 e p73 nella morte e nel differenziamento di cellule neuronali (U.O. 1, 4)

Utilizzeremo modelli animali già disponibili e nuovi modelli animali. Inoltre effettueremo una serie di esperimenti *in vitro* essenziali per comprendere pienamente il fenotipo degli animali e le vie biochimiche coinvolte nella apoptosi neuronale.

1 - Utilizzo di cellule primarie di ratto per definire l'espressione delle isoforme di p73 durante il differenziamento dei precursori O2A ottenuti dal nervo ottico.

2 - Individuare geni bersaglio di p73 mediante la tecnica di micro array sia su neuroni di ratto infettati con costrutti virali sia su cellule umane in cui p73 è inducibile.

3 - Studio del fenotipo neurale del topo Knock Out per p73 e delle alterazioni della apoptosi indotta (simulando la situazione patologica - ad esempio mediante B-amiloide) in questi animali o in cellule da essi derivate.

TRASFERIBILITÀ DEI RISULTATI E DEI PRODOTTI

La generazione di nuovi modelli animali come modello di malattie umane è di fondamentale importanza per la comprensione della patogenesi di tali malattie e per lo sviluppo di nuove terapie. Tali modelli sono ideali per sperimentare nuovi approcci terapeutici. Il nostro progetto prevede di aprire nuove strade per la terapie di una serie di malattie neurodegenerative per le quali esistono attualmente limitati sussidi terapeutici. Qualora una particolare via metabolica di morte venisse identificata grazie a questi studi, come responsabile della perdita neuronale associata allo sviluppo del sistema nervoso ed in particolare al differenziamento dei precursori neuronali, sarebbe fondamentale per consentire la coltura e la manipolazione di cellule utili a trapianti e terapie genetiche cellulo-mediate. Inoltre, mutazioni nei vari geni analizzati in questo progetto potrebbero essere indicativi di una predisposizione genetica alla progressione delle malattie e quindi rappresentare un bersaglio anche per una diagnosi precoce.

ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE

U.O. 1 - Laboratorio di Biologia Molecolare, European Brain Research Institute (EBRI) – Roma

U.O. 2 - Laboratorio di Neuroscienze Molecolari, Fondazione Santa Lucia IRCCS – Roma

U.O. 3 - Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, European Brain Research Institute (EBRI) – Roma

U.O. 4 - Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma Tor Vergata

U.O. 5 - Istituto di Neuroscienze, Centro Nazionale delle Ricerche (CNR) – Roma

Si allega il programma dettagliato dell'Unità Operativa 2 facente capo alla Fondazione Santa Lucia IRCCS.

U.O. 2 - Laboratorio di Neuroscienze Molecolari

Claudia Bagni

OBIETTIVO FINALE DEL CONTRIBUTO

Ci proponiamo di studiare la componente molecolare delle inclusioni nucleari probabilmente responsabili della Sindrome Fragile X Tremor Ataxia utilizzando approcci molecolari e cellulari. In particolare la caratterizzazione delle inclusioni permetterà di comprendere meglio lo sviluppo della malattia neurodegenerativa ed i meccanismi fisiopatologici alla base del danno neuronale.

Criteri e indicatori per la verifica dei risultati finali

La valutazione globale del progetto dovrà tener conto dei seguenti parametri:

- 1) Pubblicazioni dei risultati su riviste scientifiche internazionali.
- 2) Partecipazione a congressi nazionali ed internazionali con presentazione di abstracts e comunicazioni orali.
- 3) Formazione e istruzione di giovani ricercatori (dottorandi).

OBIETTIVI INTERMEDI

Verranno studiati i meccanismi di morte cellulare che potrebbe derivare dalla presenza delle inclusioni nelle cellule neuronali in questo modello sperimentale utilizzando una serie di marcatori di morte cellulare (tunel, attivazione di caspase 3 e di caspase 9, rilascio del citocromo c).

Criteri ed indicatori per la verifica dei risultati intermedi

Valutazione dell'avanzamento del progetto da parte dei responsabili dell'Unità mediante riunioni semestrali.

METODOLOGIA

Il sistema modello murino per la FXTAS (Fragile X Tremor Ataxia Syndrome) sarà fornito dai nostri collaboratori Prof. Ben Oostra e dr. Rob Willemsen (Erasmus Medical Center, Rotterdam, Olanda).

L'ipotesi di studio è che la presenza delle inclusioni sia responsabile della neurodegenerazione osservata in questi pazienti. Colture di neuroni primari (ippocampali e corticali) verranno preparate a partire da topi WT e topi con fenotipo FXTAS. Le cellule neuronali verranno mantenute in coltura per 1, 2 e 3 settimane successivamente alla quali si analizzerà la presenza delle

inclusioni e/o si indurrà morte neuronale. Si cercherà di studiare la componente proteica delle inclusioni verificandone la presenza di marcatori apoptotici.

Per tutto ciò che riguarda lo studio della morte neuronale (marcatori ed expertise) ci avvarremo della collaborazione con il dr. Cecconi ed il dr. Melino (U.O. 3 e 1).