

RENDICONTO INIZIALE 5XMILLE 2018 MINISTERO DELLA SALUTE - 01.01.2020-31.12.2021

PROGETTI	SPESE al 30.06.2021						impegnato al 31.12.2021			TOTALE SINGOLO PROGETTO
	PERSONALE	MATERIALE DI CONSUMO	PUBBLICAZIONI	TOTALE SPESE	OVERHEAD	TOTALE SPESO	VOCI DI SPESA	OVERHEAD	TOTALE IMPEGNATO	
L'Accesso alle nuove tecnologie in pazienti con Disabilità neurologiche nel contesto della riabilitazione: un progetto pilota. Fase 2	12.496,00	cancelleria 336,44	0,00							
	12.496,00	336,44	0,00	12.832,44	3.208,11	16.040,55	0,00	0,00	0	16.040,55
Studio multidimensionale della capacità di timing e del sense of agency nei pazienti affetti da schizofrenia e disturbo bipolare. - 4° annualità.	25.002,75	cancelleria 1.486,45	articolo scientifico 2.240,00							
	25.002,75	1.486,45	2.240,00	28.729,20	7.182,30	35.911,50	2.500,00	625,00	3.125,00	39.036,50
Studio dell'autofagia selettiva nei pazienti affetti da Sclerosi Multipla (SM).	17.118,70	cancelleria 637,94 materiale di consumo/manutenzioni 2020 8.960,25 materiale di consumo/manutenzioni 2021 2.926,88	0,00							
	17.118,70	12.525,07	0,00	29.643,77	7.410,94	37.054,71	0,00	0,00	0	37.054,71
Studio della resistenza al trattamento con Inibitori delle Istone Deacetilasi durante la progressione della Distrofia Muscolare di Duchenne.	9.990,94									
	9.990,94	0,00	0,00	9.990,94	2.497,74	12.488,68	9.998,19	2.499,55	12.497,74	24.986,41
Studio sui meccanismi di neurodegenerazione e anti-invecchiamento in pazienti con malattia di Parkinson	15.285,44									
	15.285,44	0,00	0,00	15.285,44	3.821,36	19.106,80	24.675,00	6.168,75	30.843,75	49.950,55
Analisi genomica su larga scala per l'identificazione di biomarcatori di suscettibilità e progressione associati alle malattie neurodegenerative.	5.006,00									
	5.006,00	0,00	0,00	5.006,00	1.251,50	6.257,50	0,00	0,00	0	6.257,50
Analisi proteomica di campioni biologici convenzionali ed innovativi per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base delle patologie del sistema nervoso.	16.699,53	cancelleria 181,91	0,00							
	16.699,53	181,91	0,00	16.881,44	4.220,36	21.101,80	7.972,04	1.993,00	9.965,04	31.066,84
	101.599,36	14.529,87	2.240,00	118.369,23	29.592,31	147.961,54	45.145,23	11.286,30	56.431,53	204.393,07

L'accesso alle nuove tecnologie in pazienti con Disabilità neurologiche nel contesto della riabilitazione: un progetto pilota. Fase 2

Gli obiettivi del progetto che si vogliono perseguire mediante incontri di gruppo sono i seguenti:

- fornire conoscenze tecniche sull'uso dei SN e piattaforme multimediali di telemedicina;
- educare ad un uso consapevole dei SN (con particolare riferimento ai rischi ad essi connessi: cyberbullismo, truffe, fake news, privacy etc.);
- favorire la socializzazione mediante l'apprendimento e la messa in pratica delle regole sociali, sperimentazione dell'uso dei SN;
- stimolare le abilità sociali e favorire il corretto utilizzo delle regole di comunicazione;
- sostenere la profilazione personale negli ambienti multimediali;
- potenziare le abilità tecniche per l'accesso ai nuovi strumenti multimediali utili alla riabilitazione e all'uso degli strumenti di telemedicina;
- coltivare interessi, hobbies, mediante la partecipazione a gruppi nei SN su argomenti specifici (es. cucina, squadre sportive, arte, viaggi, personaggi etc...);
- aumentare le potenzialità, la conoscenza sulle possibilità, benefici e rischi dell'uso dei SN nell'ambito delle disabilità;
- incrementare le conoscenze e accedere ad aggiornamenti scientifici e innovazioni terapeutiche sulla propria disabilità; condividere esperienze e socio-sanitarie con altri utenti con le stesse problematiche neurologiche; promuovere un'attività fisica adattata (AFA) mirata al mantenimento o raggiungimento della maggiore autonomia possibile nelle attività della vita quotidiana (Rif. Progetto Life 2020 per la teleriabilitazione e telemedicina);
- individuare gli ausili necessari per facilitare l'uso dei social network, compatibilmente alla disabilità motoria (es. griglia per la tastiera o tastiera facilitata per pazienti con tremore e deficit di coordinazione, eye tracker per pazienti con gravi deficit motori agli arti superiori, schermi adattati per pazienti con ipovisione etc...);
- valutare mediante questionari e scale standardizzate l'esperienza e la soddisfazione (User Experience) all'uso delle tecnologie web nel contesto della disabilità.

Studio multidimensionale della capacità di timing e del sense of agency nei pazienti affetti da schizofrenia e disturbo bipolare. 4° annualità.

Piano delle attività

L'attività progettuale è organizzata in differenti workpackages (WP).

Workpackage 1. Valutazione della capacità di stima di durate e timing predittivo in pazienti affetti da schizofrenia –

Workpackage 2. Valutazione della capacità di stima di durate e timing predittivo in pazienti affetti da disturbo bipolare –

Workpackage 3a. Studio della connettività funzionale responsabile della capacità di attribuzione di una azione come causa di un effetto e loro modificazione a seguito di un training di agency metacognitivo –

Workpackage 4. Valutazione della capacità di attribuzione di una azione come causa di un effetto in pazienti psichiatrici e loro modificazione a seguito di un training di agency metacognitivo

Alla luce dei risultati ottenuti in WP3, i pazienti affetti da schizofrenia e disturbo bipolare reclutati in WP1 e WP2 saranno ricontattati al fine di sottoporsi ai compiti di JoA e al trattamento con training intensivo di agency metacognitivo secondo le modalità descritte in WP3a. Le mappe di connettività funzionale e strutturale ed i dati comportamentali dei pazienti saranno poi confrontati con quelli del gruppo di soggetti sani analizzati in WP3, al fine di indagare possibili alterazioni dei parametri neuroradiologici e cognitivi, nonché eventuali pattern disfunzionali specifici per i due disturbi.

Risultati attesi

Lo studio multidimensionale della capacità di timing e agency nei pazienti affetti da schizofrenia e disturbo bipolare ci permetterà di approfondire la conoscenza della psicopatologia dei due disturbi, e di investigare la natura della relazione tra alterazioni del processamento dell'informazione temporale, schemi di azione e sintomatologia clinica. L'utilizzo di un training innovativo, specificatamente rivolto a rafforzare la capacità di cogliere il rapporto causale tra gli eventi, potrà gettare le basi per la validazione di protocolli di trattamento non invasivi per i disturbi dello spettro psicotico-affettivo, con il fine ultimo di ottimizzare la risposta terapeutica individuale.

Studio dell'autofagia selettiva nei pazienti affetti da Sclerosi Multipla (SM) - FASE 2.

Obiettivo1: Poiché è stato supposto che l'autofagia/mitofagia possa svolgere un ruolo nella SM, valuteremo l'espressione dell'mRNA dei tre indispensabili geni mitofagici coinvolti nella mitofagia PINK1-dipendente nei PBMC isolati da pazienti con SM recidivante-remittente (RR-MS, n = 35) e donatori sani (HD, n = 24). In particolare, analizzeremo i geni PINK1, OPTN e NDP52. Successivamente valuteremo i livelli proteici di questi geni attraverso l'analisi di westernblotting.

Obiettivo 2: Analisi dei livelli dei mitocondri nei pazienti affetti di SM. Poiché l'induzione della mitofagia è tipicamente caratterizzata da una ridotta massa mitocondriale favorendo il turnover mitocondriale, valuteremo la clearance mitocondriale nei PBMC dei pazienti con RR-MS. A tal fine esamineremo il contenuto mitocondriale nei PBMC mediante analisi Western-blot verificando i livelli di due proteine mitocondriali, la subunità II del citocromo c ossidasi (COXII) e la subunità 4 del citocromo c ossidasi (COXIV) come marcatori di membrana mitocondriale interna.

Per rafforzare quest'analisi, misureremo i livelli del DNA mitocondriale (mtDNA), poiché il mtDNA è un altro indicatore del difetto di clearance mitocondriale.

Risultati aspettati: Dato che lo stato infiammatorio dei pazienti affetti da SM è noto per danneggiare lo stato dei mitocondri (infiammazione=stress mitocondriale), i nostri dati potrebbero indicare che i geni "mitofagici" sono up-regolati (al livello mRNA e proteine) nei pazienti RR-MS rispetto ai controlli, suggerendo che la mitofagia mediata da PINK1 potrebbe essere specificamente attivata nella fase iniziale della SM.

Questo lavoro potrebbe aprire la strada a studi futuri volti a comprendere meglio come la stimolazione mitofagica potrebbe contrastare l'infiammazione nella SM.

Studio della resistenza al trattamento con Inibitori delle Istone Deacetilasi durante la progressione della Distrofia Muscolare di Duchenne.

Lo scopo del presente progetto di ricerca è quello di comprendere le alterazioni che durante la progressione della DMD conferiscono la resistenza dei FAPs al trattamento con HDACi. A tal fine esploreremo nel dettaglio i meccanismi con cui questi farmaci svolgono i loro effetti biologici. Gli HDACi sono farmaci epigenetici che inibiscono l'attività di una classe di enzimi "Istone Deacetilasi (HDAC)" che regolano l'espressione genica. La deposizione di gruppi acetilici sugli aminoacidi (lisine) degli istoni, determina il rilassamento della struttura intorno al DNA, favorendo la trascrizione dei geni in prossimità degli istoni. Questo processo, chiamato di acetilazione istonica viene regolato negativamente dalle HDAC. Pertanto l'uso degli inibitori delle HDAC (HDACi) promuove l'acetilazione istonica e l'espressione di geni altrimenti inibiti da HDAC. Questi farmaci trovano pertanto un'applicazione diretta in condizioni patologiche in cui sia stata identificata un'attivazione incontrollata delle HDAC, come nel caso della DMD (Colussi et al. 2008). In questo studio utilizzeremo la tecnologia di Next Generation Sequencing per esplorare tramite ChIPseq l'attività enzimatica delle HDAC e il profilo dell'acetilazione istonica dell'intero genoma dei FAPs isolati da muscoli del modello murino di DMD (i topi mdx) a stadi iniziali e tardivi della patologia, ed esposti o meno a trattamento con HDACi. In parallelo, monitoreremo l'espressione genica globale da parte delle stesse cellule attraverso la tecnologia di RNAseq, al fine di identificare i geni regolati durante la progressione della patologia e in risposta al trattamento con HDACi.

Studio sui meccanismi di neurodegenerazione e anti-invecchiamento in pazienti con malattia di Parkinson.

La malattia di Parkinson (PD, Parkinson Disease) è una malattia neurodegenerativa comune in età senile, multifattoriale, causata dall'accumulo di α -sinucleina nei cosiddetti corpi di Lewy e dalla perdita di cellule dopaminergiche nella Substantia Nigra pars compacta (SNpc) (Kalia et Lang, 2015). Clinicamente, il PD causa una sindrome progressiva irreversibile e disabilitante, comprendente disturbi motori e non motori, che compromettono gravemente la qualità della vita dei pazienti. Inoltre, in alcuni pazienti con una durata di malattia superiore ai 10-15 anni, si manifesta anche un progressivo deterioramento cognitivo fino alla demenza.

I processi neurodegenerativi che si verificano a livello cerebrale, si riflettono nel liquido cerebrospinale (CSF) dei pazienti con cambiamenti nei livelli di alcuni marcatori biochimici. Data la sua vicinanza al sistema nervoso centrale (SNC) e all'interazione con il parenchima cerebrale, il CSF contiene proteine e metaboliti specifici del cervello stesso, rappresentando uno specchio della fisiopatologia e quindi un materiale prezioso per lo studio di numerose malattie neurologiche.

La determinazione dei livelli di α -sinucleina, il cui accumulo è associato allo sviluppo della patogenesi del PD, nel CSF, è infatti un biomarcatore utile per la diagnosi della patologia stessa e di altre sinucleinopatie, tra cui la demenza a corpi di Lewy (Hong et al., 2010). Recentemente è stato mostrato che i livelli di Tau, proteina associata ai microtubuli coinvolta in molte malattie neurodegenerative, nella sua forma totale (t-tau) e fosforilata (p-tau), sono utili per distinguere i pazienti nella sua forma ad esordio precoce (<50)

(Schirinzi et al., 2020). La sua forma fosforilata è, infatti, associata ad una ridotta capacità di legame ai microtubuli riducendone la stabilità e ostacolandone la funzione. Inoltre, il dosaggio della beta amiloide-42 (AB42), un peptide derivato dalla proteina precursore dell'amiloide, può essere utile per identificare i pazienti a rischio di sviluppare un Parkinson con demenza (PDD); infatti, i livelli di AB42 nel CSF sono inversamente correlati con la perdita di sinapsi (Martorana et al., 2015; Schirinzi et al., 2017). Nuovi marcatori, come la proteina a-Klotho, una beta-glucosidasi coinvolta nell'invecchiamento, e i neurofilamenti leggeri (NF-L), i principali costituenti del citoscheletro nelle cellule neuronali, rappresentano promettenti candidati per indagare i meccanismi della patologia.

Descrizione ed obiettivi del progetto

L'identificazione dei biomarcatori è quindi essenziale per ottenere una diagnosi precoce, una stratificazione dei pazienti negli studi clinici e per lo sviluppo di nuovi trattamenti. Lo scopo del progetto è valutare l'utilità di nuovi biomarcatori, nel CSF e nel siero di pazienti con PD. Il prelievo di sangue è una pratica meno invasiva rispetto alla puntura lombare per la raccolta del CSF. Quindi i risultati potrebbero far emergere dei vantaggi rispetto la modalità di acquisizione del campione da utilizzare per la determinazione dei livelli dei biomarcatori e quindi della diagnosi di malattia.

Verranno esaminati i livelli dei marcatori classici di neurodegenerazione, l' α -sinucleina, t-tau, p-tau, AB42 e AB40 nel CSF e nel siero. Inoltre, verranno indagati i livelli di nuovi marcatori, come a-Klotho, coinvolta nei meccanismi dell'invecchiamento, e NF-L, e confrontati con una popolazione di controllo, in associazione con i dati clinici.

Reclutamento dei pazienti

La popolazione dello studio include una coorte di 20 pazienti con PD reclutati presso la Biobanca afferente alla Fondazione Santa Lucia (FSL), e 20 controlli affetti da altre patologie neurologiche, che si sottopongono a puntura lombare per accertamenti diagnostici.

Tutti i pazienti forniranno il consenso informato per l'uso dei materiali biologici residuo e dei dati ad essi associati per scopi di ricerca.

Analisi genomica su larga scala per l'identificazione di biomarcatori di suscettibilità e progressione associati alle malattie neurodegenerative.

Il presente progetto si propone di studiare approfonditamente la componente genetica alla base della suscettibilità, eziopatogenesi e progressione delle malattie neurodegenerative. Lo scopo principale di tale progetto è di identificare biomarcatori utili a valutare il rischio individuale di sviluppare patologie neurodegenerative nonché a implementare nuove strategie terapeutiche o di monitoraggio finalizzate a migliorare la qualità della vita del paziente, rallentare la progressione della malattia e l'insorgenza di complicanze neurologiche permanenti.

Metodi

Il progetto sarà condotto su una coorte di pazienti affetti da malattie neurodegenerative quali malattia di Alzheimer (AD), malattia di Parkinson (PD), Declino cognitivo (MCI) e Sclerosi Multipla (SM). Specifici criteri clinici di inclusione/esclusione verranno utilizzati per il reclutamento dei pazienti.

Le analisi genetico-molecolari saranno effettuate presso il Laboratorio di Medicina Genomica-UILDLM della Fondazione Santa Lucia e consentiranno l'analisi di campioni di DNA estratti in maniera automatizzata da sangue periferico prelevato dai pazienti reclutati, previa firma del consenso informato per la partecipazione allo studio di ricerca.

Il presente progetto si propone di condurre un'analisi genetica massiva di un cospicuo numero di varianti localizzate in diversi geni potenzialmente coinvolti nell'eziopatogenesi di malattie neurodegenerative quali AD, PD, MCI, SM. La selezione dei geni verrà effettuata considerando anche varianti localizzate in miRNAs e/o nei relativi geni target coinvolti nell'eziopatogenesi delle malattie neurodegenerative.

Il progetto sarà condotto mediante tecnologie di nuova generazione ad alta processività, in grado di analizzare simultaneamente un elevato numero di SNPs in un elevato numero di campioni. In particolare, lo studio verrà condotto tramite la tecnologia Axiom (ThermoFisher), che permette di effettuare studi di genotipizzazione su larga scala, ad elevata affidabilità e a costi contenuti. La tecnologia Axiom sfrutta il concetto alla base della tecnologia dei microarray, che consiste nell'utilizzo di un supporto (array) sul quale vengono collocate delle sonde in grado di ibridarsi in maniera specifica a delle regioni genomiche bersaglio. Le sonde da includere sugli arrays possono essere selezionate dal catalogo disponibile online (Axiom Genomic Database) oppure disegnate de novo. In generale, le sonde vengono disegnate in maniera da genotipizzare varianti specifiche (SNPs e indels solitamente) situate in geni bersaglio. Nel presente progetto, le sonde verranno selezionate secondo i seguenti criteri: frequenza degli SNPs d'interesse (MAF<1% per varianti rare

e MAF>5% per le varianti comuni) nella popolazione europea, possibile associazione alla suscettibilità a malattie neurodegenerative (AD, PD, MCI, SM) e relativi pathways biologici, impatto sulla biogenesi di miRNAs potenzialmente coinvolti in tali patologie.

Analisi proteomica di campioni biologici convenzionali ed innovativi per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base delle patologie del sistema nervoso.

Il progetto si dedica alla caratterizzazione del corredo proteico (proteoma) e della sue modulazioni in campioni biologici convenzionali ed innovativi a fini di ricerca clinica e di base, utilizzando tecnologie di analisi all'avanguardia nel settore, basate sulla spettrometria di massa.

Grazie alle molteplici collaborazioni in essere con gruppi di ricerca della Fondazione Santa Lucia e di altre strutture accademiche e di ricerca, Il progetto si propone di valutare con varie piattaforme sperimentali, denominate bottom-up e top-down [1], il proteoma di liquidi biologici (i.e. plasma, liquor, saliva), micro vescicole (i.e. esosomi) e tessuti, per la caratterizzazione fenotipica di malattie neurodegenerative. Gli obiettivi primari sono sia l'individuazione di nuovi biomarcatori precoci diagnostici e prognostici di malattie neurologiche, sia una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza e lo sviluppo delle patologie. Per quest'ultima opzione alcune ricerche verranno effettuate anche in modelli animali. A seguito degli accordi con l'Organizzazione mondiale di Proteomica Umana (HuPO) che prevedeva la partecipazione dell'Italia al progetto cromosoma-centrico dedicato alla caratterizzazione del proteoma umano [2, 3], una parte rilevante del progetto sarà dedicata allo studio del subproteoma mitocondriale per la caratterizzazione del "dark proteome" che è costituito dalle proteine mitocondriali poco rappresentate e di funzione sconosciuta [4]. Molte disfunzioni mitocondriali sono infatti determinanti per l'insorgenze e la progressione di patologie neurologiche (ad esempio SLA, morbo di Parkinson ed Alzheimer). La caratterizzazione del proteoma mitocondriale in modelli sperimentali o campioni clinici di tali patologie può essere quindi determinante per definire il suo ruolo e per studiare le sue interazioni con l'ambiente intracellulare, con lo scopo di chiarire le componenti responsabili delle disfunzioni patologiche e per definire potenziali marcatori funzionali mitocondriali.

Riferimenti

[1] Messina I, Cabras T, Iavarone F, Vincenzoni F, Urbani A, Castagnola M. Unraveling the different proteomic platforms. *J Sep Sci.* 36 (2013) 128-139.

[2] Urbani A, De Canio M, Palmieri F, Sechi S, Bini L, Castagnola M, Fasano M, Modesti A, Roncada P, Timperio AM, Bonizzi L, Brunori M, Cutruzzolà F, De Pinto V, Di Ilio C, Federici G, Folli F, Foti S, Gelfi C, Lauro D, Lucacchini A, Magni F, Messina I, Pandolfi PP, Papa S, Pucci P, Sacchetta P. The mitochondrial Italian Human Proteome Project initiative (mt-HPP). *Mol Biosyst.* 9(8) (2013) 1984-1992.

[3] Alberio T, Pieroni L, Ronci M, et al. Toward the Standardization of Mitochondrial Proteomics: The Italian Mitochondrial Human Proteome Project Initiative. *J Proteome Res.* 2017;16 (12):4319-4329.

[4] Paik YK, Overall CM, Corrales F, Deutsch EW, Lane L, Omenn GS. Toward completion of the human proteome parts list: progress uncovering proteins that are missing or have unknown function and developing analytical methods. *J Proteome Res.* 17 (12), 4023-4030.