

RELAZIONI SUI PROGETTI SCIENTIFICI FINANZIATI DALL'AST NEL 2018

L'Associazione Sclerosi Tuberosa ha richiesto una relazione di circa 10-15 righe ai ricercatori i cui progetti sono finanziati dall'AST.

Le relazioni ricevute ad oggi sono 5 su 6.

1) "Identificazione di microRNA presenti nel siero di pazienti affette da Linfangioleiomiomatosi (LAM)"

Dott.ssa Olga Torre, Dott.ssa Elisabetta Bulgheroni

Fondazione Istituto Nazionale Genetica Molecolare, Milano

I microRNA sono piccole molecole capaci di svolgere un ruolo cruciale nel regolare svariati processi nell'organismo.

Scopo della nostra ricerca è l'identificazione di specifici microRNA presenti nel siero di pazienti affette da LAM al fine, da una parte, di indagare in modo più approfondito le basi molecolari della patologia, e dall'altra, di individuare possibili marcatori sierici in grado di segnalare la presenza e/o la progressione della malattia e la risposta alla terapia.

Nella prima fase di "discovery" è stato individuato un pannello ristretto di microRNA differenzialmente espressi nelle pazienti con LAM (risultati presentati al congresso europeo ERS a sett 2017 e all'assemblea AST lo scorso ottobre)

Nella seconda fase, di "validazione", risultati preliminari ottenuti da 10 sieri di pazienti ed altrettanti sieri di donatrici, hanno messo in evidenza come 2 microRNA in particolare risultano maggiormente espressi nelle pazienti. Ad oggi è stata completata la raccolta dei campioni da 22 donatrici sane, come previsto dal protocollo, e da 20 pazienti. Mancano pertanto ancora 2 sieri di pazienti per completare la fase di validazione e confermare il dato preliminare. Una volta completata la raccolta dei campioni, l'analisi biostatistica permetterà di concludere la fase di validazione. Se il dato preliminare sarà confermato, il microRNA/ i microRNA identificati potranno essere studiati nelle pazienti sottoposte a terapia.

2) "Peculiarità funzionali dell'ADHD nei pazienti con sclerosi tuberosa: studio neurofisiologico"

Dott.ssa Romina Moavero, neuropsichiatra infantile

IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Obiettivo principale di questo studio è l'analisi dei meccanismi cerebrali alla base del disturbo da inattenzione e/o iperattività nei bambini con ST. Oltre ai test clinici convenzionali per lo studio dell'ADHD, stiamo eseguendo dei potenziali evocati. Questo test neurofisiologico non invasivo permette di valutare non se il soggetto riesce ad eseguire un compito (come avviene nei normali test neuropsicologici), ma COME il suo cervello funziona per arrivare al raggiungimento dell'obiettivo. Al momento abbiamo studiato 12 bambini con ADHD idiopatico (cioè senza una causa apparente) e 6 con ADHD secondario a ST. Abbiamo notato che ci sono delle differenze significative in alcuni parametri, che suggeriscono che i Bambini con ADHD e ST devono impiegare più risorse cerebrali per raggiungere lo stesso obiettivo dei bambini con ADHD idiopatico. Questo potrebbe essere alla base anche della minore efficacia di terapie farmacologiche nei bambini con ADHD secondario a ST. Ovviamente il campione studiato è ancora troppo esiguo, e a tal proposito si invitano tutti i soggetti interessati a contattarci nel caso volessero partecipare a questo studio.

3) "Analisi di fattori che influenzano il microambiente di cellule TSC"

Dott.ssa Elena Lesma, biologa

Dipartimento di Scienze della Salute - Università degli Studi di Milano

Lo scopo del nostro progetto è studiare il microambiente TSC per evidenziare i fattori che regolano la funzionalità delle cellule TSC. Le cellule TSC in vivo interagiscono con cellule con fenotipo diverso provvedendo a funzioni cellulari di vario tipo (es. nutrienti). Allo scopo di studiare i fattori coinvolti nel microambiente TSC abbiamo sviluppato co-culture con cellule TSC2/LAM (positive ad HMB45),

che non esprimono tuberina, e fibroblasti umani non-TSC (negativi a HMB45). Abbiamo osservato che il fenotipo (inteso come positività ad HMB45) dei fibroblasti non-TSC viene modificato, con un aumento della positività ad HMB45 (da 0,5% a 53,54%). In co-coltura anche l'attivazione di S6, solitamente iperfosforilato nelle cellule TSC, viene aumentata anche nei fibroblasti non-TSC. Si può quindi affermare che l'interazione in co-coltura tra cellule TSC e i fibroblasti non-TSC causa in questi ultimi l'acquisizione di caratteristiche fenotipiche e funzionali simil-“patologiche”. La rapamicina riduce queste alterazioni, così come l'anticorpo anti-EGFR (che inibisce il recettore dell'EGF). L'effetto della rapamicina sulla fosforilazione di S6 risulta però ridotto in co-coltura rispetto che in monocoltura di cellule TSC, mentre l'anticorpo anti-EGFR sembra avere un'azione maggiore in co-coltura. Al fine di comprendere quali possano essere i fattori coinvolti nell'interazione tra cellule TSC e fibroblasti non-TSC, abbiamo iniziato ad analizzare molteplici target quali interleuchine (-1 β , -, -6,10, 12), TNF α , TGF β , MCP1, MIP che dai primi esperimenti nelle monoculture di cellule TSC e fibroblasti, appaiono maggiormente secreti nelle cellule TSC. Questi dati indicano che l'effetto farmacologico sia della rapamicina che dell'anticorpo anti-EGFR dipende anche dall'ambiente nel quale le cellule TSC vivono e che un approccio mirato a controllare i fattori presenti nel microambiente potrebbe avere una buona efficacia nel trattamento delle lesioni TSC.

4) “Identificazione di nuovi bersagli terapeutici per il trattamento della Sclerosi Tuberosa tramite analisi trascrizionale di cellule staminali neurali e di lesioni simil-SEGA derivate da topi modello di malattia”

Dott.ssa Rossella Galli, Biologia delle Cellule Staminali Neurali
Fondazione Centro San Raffaele, Milano

Grazie alla nostra esperienza nello studio delle cellule staminali nervose (CSN) e al fondamentale supporto dell'AST, negli ultimi anni il nostro gruppo ha generato diversi modelli animali di ST tramite la sola mutazione del gene *Tsc1* o tramite mutazione di *Tsc1* e *Pten* in diversi tipi di CSN. Tali modelli animali rappresentano validi modelli preclinici di ST, dato che riproducono tre delle sue manifestazioni più critiche, ovvero le malformazioni corticali, i noduli subependimali e gli astrocitomi subventricolari a cellule giganti (SEGA). I risultati di questi studi sono stati pubblicati su diverse riviste scientifiche internazionali (Magri et al, *Cell Stem Cell*, 2011; Magri et al, *Dis Models Mech*, 2013; Zordan et al., *Journal of Clinical Investigation*, 2018).

Durante i primi 6 mesi del 2018, abbiamo isolato CSN dalle lesioni simil-SEN e simil-SEGA che si sono sviluppate in topi mutanti per *Tsc1* e *Pten*. Queste CSN sono state sottoposte ad analisi del profilo di espressione genica tramite RNA-seq.

Il risultato più promettente ottenuto a oggi consiste nell'osservazione che molti geni che sono risultati presenti nelle cellule dei SEN e dei SEGA nel topo sono presenti anche nelle corrispondenti lesioni dei pazienti (Fig.1), suggerendo che le nostre CSN riproducono fedelmente le caratteristiche molecolari delle lesioni patologiche ritrovate nei pazienti con ST.

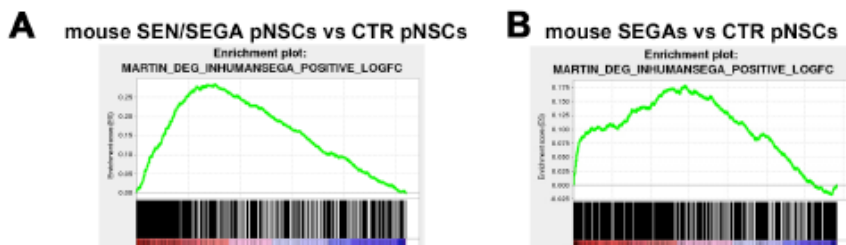


Fig. 1 I grafici GSEA indicano che i geni presenti nelle lesioni SEGA dei pazienti (linea verde nel grafico A) sono presenti anche nelle CSN di SEN e SEGA derivate dai topi modello di ST (quadratini rossi nel grafico A). Analogamente, i geni presenti nelle lesioni SEGA dei pazienti (linea verde nel grafico B) sono presenti anche nei tumori SEGA che si sviluppano nei topi modello di ST (quadratini rossi nel grafico B).

Attualmente, tramite analisi bioinformatica, stiamo selezionando quali di questi geni studiare nel dettaglio dal punto di vista funzionale (Fig. 2).

| GeneID | logFC | Pvalue | Pvalue_adj | significance |
|---------|----------|----------|-------------|--------------|
| GpnmB | 7,510743 | 5,21E-25 | 6,86874E-21 | 1 |
| Tacr1 | 6,635564 | 1,16E-11 | 7,62539E-08 | 1 |
| ErbB2 | -5,936 | 1,16E-10 | 5,0757E-07 | -1 |
| Renbp | 3,195988 | 8,51E-10 | 2,47787E-06 | 1 |
| Lqals3 | 5,341144 | 9,4E-10 | 2,47787E-06 | 1 |
| Fam134b | 5,698354 | 1,26E-08 | 2,76392E-05 | 1 |
| Fosl1 | 5,702017 | 1,66E-08 | 3,12504E-05 | 1 |
| Adamts4 | 2,579505 | 1,92E-08 | 3,16503E-05 | 1 |
| Cep170b | 2,828202 | 3,82E-08 | 5,01976E-05 | 1 |

Fig. 2 Lista dei primi 10 geni presenti (significance 1) sia nelle CSN di SEN/SEGA sia nei SEGA di paziente.

La nostra speranza è che l'identificazione di nuovi geni presenti nei modelli preclinici animali possa aiutarci non solo ad aumentare ulteriormente la conoscenza dei meccanismi molecolari coinvolti nella ST ma anche ad identificare nuovi bersagli molecolari da utilizzare nell'ambito di nuove strategie terapeutiche per la ST.

5) "Epilessia focale refrattaria in ST e multipli tubercoli: identificazione del focolaio epilettogeno prevalente per valutazione prechirurgica mediante analisi polisonnografica computerizzata dell'attività intercritica in sonno REM e studio RM in arterial spin labelling"

Prof.ssa Edvige Veneselli, neuropsichiatra infantile

Dip. di Neuroscienze, Riabilitazione e continuità delle cure – IRCCS Giannina Gaslini

- a) preparazione del Progetto e della documentazione relativa ed invio al Comitato Etico Regionale, seduta di presentazione e discussione dei dati, recepimento dell'approvazione
- b) avvio della richiesta di collaboratore al Progetto all'Università, effettuazione del bando, valutazione della Commissione, nomina del vincitore Dr.ssa Marcella Gherzi; sua presa di servizio il 25 giugno
- c) attività del Team dedicato
 - completato l'aggiornamento del database di pazienti affetti da ST valutati in questi anni presso la nostra U.O. di Neuropsichiatria Infantile: 65 soggetti, 32 femmine e 33 maschi, di età compresa tra i 4 ed i 33 anni. Di questi alcuni hanno nel frattempo proseguito il follow up presso altre sedi per l'età adulta o più vicine alla sede di residenza (in totale si tratta di 31/65 pazienti, 18 maschi e 13 femmine, età media 19 anni);
 - attualmente coloro che effettuano il follow up presso la nostra U.O. sono quindi 34 pazienti, 19 femmine e 15 maschi, di età media 12 anni, sia liguri (15/34) che extra-regione (19/34);
 - tra questi, finora 12 soggetti sono stati arruolati nel progetto di ricerca ed hanno già effettuato la registrazione EEG holter e la Risonanza Magnetica 3 Tesla con Arterial Spin Labeling.