

INVIATI SPECIALI DELLA RICERCA

5 Giovani Ricercatori al Meeting Internazionale SPATAX per AIVIPS

Note a cura dei Dottori:

Serena M. Caldarazzo (Milano), Chiara Criscuolo (Napoli), Luca Leonardi (Roma), Cecilia Mancini (Torino) e Viviana Pensato (Milano)

Editing a cura di Marina Zapparoli Manzoni, Vice Presidente AI ViPS Onlus e Dottor Filippo M. Santorelli, neurologo IRCCS Fondazione Stella Maris, Calambrone-Pisa

Dal 11 al 13 Giugno u.s. si è tenuto a Parigi nel "Brain and Spine Institute", nel prestigioso complesso ospedaliero parigino "Pitié-Salpêtrière" il Convegno internazionale sulle malattie neurodegenerative spinocerebellari, promosso dal network internazionale delle forme ereditare di paraparesi spastiche ed atassie cerebellari (SPATAX), in associazione con il gruppo di studio europeo sulle atassia (ASG) il consorzio per gli studi traslazionali sull' atassia di Friedreich (EFACTS).

Si tratta di network internazionali composti da medici e ricercatori dediti allo studio di questo complesso gruppo di patologie ereditarie. Obiettivo comune è la ricerca per conoscere "cosa non funziona" ed ipotizzare nuove terapie per correggere il danno.

A distanza di soli quattro anni dall'ultimo meeting molte cose sono cambiate: ad oggi fanno parte dello SPATAX oltre 40 gruppi di ricerca provenienti da diverse parti del mondo, e i partecipanti al meeting sono stati più di 200. Tra tutti, i team italiani rappresentavano una larga fetta dei ricercatori, circa il 10%.

I contributi sono stati circa 50 suddivisi tra sessioni plenarie e brevi comunicazioni orali selezionate da un comitato internazionale di ricercatori e sono stati presentati più di 100 poster.

Ad aprire il congresso è stato Huda Zoghbi, direttore del centro di neurogenetica e neurobiologa del Baylor College di Houston, Texas, che ci ha regalato un'overview sull'Atassia Spinocerebellare di tipo 1 (SCA1). Nel lavoro pubblicato sull'importante rivista scientifica *Nature*, il gruppo della Zoghbi ha individuato una via di segnale in grado di ridurre la tossicità dell'atassina 1, il gene mutato nella malattia. L'approccio è molto interessante, innovativo e potrebbe essere replicato anche in altre malattie neurodegenerative.

Dopo l'introduzione della Zoghbi, il convegno è entrato nel vivo articolandosi in 2 giornate, la prima dedicata alle **atassie spinocerebellari** (per lo più le SCA, forme dominanti e recessive), la seconda incentrata sulle **paraparesi eredofamiliari** e le forme di **atassia spastica**.

I temi affrontati nella giornata dedicata alle **atassie spinocerebellari** hanno compreso l'applicabilità delle metodiche più attuali per la ricerca di nuovi geni candidati responsabili delle malattie (metodologie di nuova generazione o "next

generation sequencing, NGS”). Piuttosto che utilizzare i tradizionali test genetici in cui ogni gene è analizzato singolarmente, spesso con risultati negativi e a fronte di costi molto alti, l’approccio di NGS invece si basa sull’analisi massiccia di più geni allo stesso tempo, o di tutta la porzione codificante del DNA umano (sequenziamento **esomico**).

Dimostrandosi più rapido, globale e significativamente più economico, la metodologia NGS rappresenta il futuro della diagnostica e della ricerca scientifica nel campo della biologia molecolare. Grazie anche alla costante riduzione dei costi, oggi è possibile analizzare un gran numero di geni contemporaneamente (per esempio definire un “pannello” di geni per una specifica malattia) rendendo sempre più obsoleta la strategia di analizzare il singolo gene-malattia.

Di NGS ha discusso ampiamente nella **PRIMA GIORNATA** Peter Bauer (Germania), introducendo l’analisi tramite “pannelli genici” nelle atassie spinocerebellari.

Tra le prime relazioni si è distinta quella del Dott. van Roon-Mom (Olanda) che ha proposto per le atassie spinocerebellari (SCA) da espansione di sequenze geniche CAG una terapia genica molto promettente basata sull’*exon skipping* (letteralmente, “salto dell’esone”) una tecnica innovativa che agisce direttamente a livello dell’RNA messaggero. Come ha spiegato van Roon-Mom, utilizzando piccole sequenze di acidi nucleici in grado di riconoscere trascritti specifici e abbassarne la loro espressione genica (AON) è possibile ridurre l’espressione delle proteine malate. A dimostrazione di ciò, il ricercatore ha presentato il modello murino di SCA3 sottoposto a una sola iniezione intraventricolare di AON. Si è dimostrata una riduzione della proteina mutata atassina 3 in maniera stabile e visibile per oltre 9 mesi dal trattamento. Con la metodica AON si fa in modo da “far saltare” l’espansione patologica CAG che si osserva nella malattia e la produzione di una proteina magari più corta ma comunque funzionante, senza l’effetto tossico e senza modificare la quantità e le proprietà della proteina normale residua. Quest’approccio sperimentale è di particolare interesse poiché applicabile a tutte le malattie dovute da un’espansione di triplette, quindi a moltissime malattie neurodegenerative ereditarie.

Nella stessa giornata, la Dott. Di Gregorio (Torino) ha riferito sull’identificazione del gene responsabile di una nuova SCA in tre famiglie italiane, la Dott. Raskind ha identificato il gene responsabile di una nuova SCA associata ad anomalie ematiche, ed il Dott. Mallaret ha riportato l’identificazione del gene *WWOX* responsabile di una nuova forma con epilessia generalizzata tonico-clonica e ritardo mentale.

Altre comunicazioni orali invece hanno riguardato “modelli animali” per lo studio funzionale dei geni coinvolti nelle diverse forme di SCA. Tra queste segnaliamo lo sviluppo di un modello di topo transgenico per SCA14 utile per l’indagine della patogenesi della malattia e le potenziali terapie, un modello di nematode *C. elegans* (un piccolo verme) per lo studio del gene della SCA6 (Università di Porto) e un modello di pesciolino (zebrafish) per lo studio del

gene ABHD12 (causa di una particolare forma di atassia cerebellare chiamata PHARC) (Università di Bordeaux).

Sono stati presentati ampiamente anche studi clinici riguardanti sia forme di atassia dominante in soggetti a rischio SCA (Dott. Jacobi, Germania); che forme di atassia recessiva in una larga corte di pazienti nord-africani (Dott. Ali-Pacha, Algeria). Tali studi rappresentano utili strumenti per affinare le capacità cliniche e diagnostiche, capire al meglio la storia naturale della malattia, e indirizzare le scoperte genetiche.

Sul finire della giornata, è emerso inoltre un interesse per la ricerca di nuovi marcatori biochimici di malattia, in grado di caratterizzare patologie diverse che non possiedono un quadro clinico che ne consenta la distinzione, così da facilitare la scelta del più idoneo e corretto approccio terapeutico. A tale proposito, è da segnalare la relazione del Dott. Casari (Milano) sul meccanismo patogenetico causativo della SCA28. AFG3L2, la proteina codificata dal gene omonimo mutato in quest'atassia, sembra formare un complesso che distrugge le proteine non funzionanti ed è localizzata nei mitocondri, le centrali energetiche essenziali della cellula. Caratterizzando il modello murino della SCA28, ove AFG3L2 è assente, Casari ed i suoi collaboratori hanno dimostrato che la patologia è dovuta ad un difetto nella capacità della cellula di rispondere alle variazioni degli ioni calcio, un elemento fondamentale specialmente nel cervelletto, organo maggiormente interessato nell'atassia. In conformità a queste conoscenze, il gruppo ha ipotizzato una terapia farmacologica in grado di sopperire all'incapacità delle cellule di tollerare variazioni nella concentrazione degli ioni calcio intracellulari, e presto inizieranno i trial clinici. Il meccanismo, comune anche ad altre SCA, potrebbe essere un nuovo importante target terapeutico nella cura delle malattie spinocerebellari.

Infine, nuovi approcci neuroriabilitativi sono stati illustrati dal Dott. Synofzik (Germania) che ha parlato dell'importanza dei videogiochi nella riabilitazione delle atassie.

Dieci bambini affetti da atassia sono stati allenati a giocare a due videogiochi alla X-box Kinect volti al coordinamento degli arti inferiori (gioco del "ballo con spostamento dell'arto sulla piattaforma di gioco sul colore indicato") e degli arti superiori (gioco del "tappare i buchi di un vasca da bagno") per 8 settimane con un netto miglioramento della coordinazione e dell'equilibrio. In tal modo i bambini possono svolgere la loro attività di fisioterapia, comodamente da casa, senza l'obbligo di recarsi ogni giorno in ospedale e, soprattutto, giocando. Questa tipologia di "gioco-riabilitazione" rappresenta un esercizio semplice ed economico che si può compiere comodamente a casa e nel tempo a disposizione e che è certamente più divertente degli esercizi di riabilitazione tradizionale in palestra riducendo notevolmente anche l'impatto psicologico sul paziente giovane..

La **SECONDA GIORNATA**, dedicata per lo più alle **paraparesi spastiche ereditarie**, è stata percorsa da quattro motivi fondamentali: (1) il ruolo delle tecniche di sequenziamento di "nuova generazione" nell'iter diagnostico delle

paraparesi ereditarie e nell'identificazione di nuovi geni-malattia, (2) il ruolo delle alterazioni del metabolismo lipidico nello studio dei meccanismi di malattia, (3) gli studi più recenti sulle alterazioni del traffico intracellulare, e (4) della struttura e funzione mitocondriale nella genesi di alcune forme di malattia.

Il primo tema è stato sviluppato dal Dott. Züchner, dell'Università di Miami, che ha parlato di come l'analisi dell'**esoma** sia oggi la base dell'identificazione di nuovi geni-malattia. La Dott. Sobrido (Spagna) ha realizzato nel suo laboratorio un protocollo diagnostico per lo studio contemporaneo di 30 geni associati alle paraparesi e alle atassie spastiche, in quanto questi due gruppi di patologie sono caratterizzati da eterogeneità clinica e genetica che normalmente richiederebbero un'analisi gene per gene molto più indagativa e costosa. Com'è emerso dagli interventi, tuttavia, la gestione e l'interpretazione dell'enorme mole di dati continuamente prodotta da questa tecnologia rappresentano il suo principale limite, oltre alla presenza di falsi positivi e negativi, all'altissima (99%) ma non totale copertura dei geni d'interesse e all'incapacità di identificare mutazioni causate da sequenze ripetute del DNA.

Il secondo tema è stato discusso dalla Dott. Mochel di Parigi in un intervento sulle caratteristiche cliniche di alcune sindromi neurologiche ereditarie, comprendenti tra le proprie manifestazioni la paraparesi spastica, e tutte causate da difetti del metabolismo lipidico, come l'adreno-mielo-neuropatia, la xantomatosi cerebrotendinea e la forma SPG5, fornendo inoltre alcuni spunti sugli approcci terapeutici da sperimentare sistematicamente su questi pazienti. Anche il Dott. Blackstone, americano, ha focalizzato la propria attenzione sul metabolismo dei lipidi e degli steroli come motivo comune in differenti tipi di mutazioni in geni SPG, tra cui gli ultimi arrivati nel gruppo (DDHD1 causa di SPG28, CYP2U1 causa di SPG49, e GBA2 causa di SPG46). Il metabolismo dei lipidi è stato anche molto dibattuto per il suo potenziale uso come target terapeutico. Infatti, gli acidi grassi sono importanti nel mantenimento dell'integrità delle membrane cellulari, specialmente a livello cerebrale dove la comunicazione cellula-cellula è fondamentale. Esistono già in commercio diversi farmaci per correggere difetti del metabolismo degli acidi grassi. Pertanto, studi di laboratorio o sui pazienti potrebbero indicarci nuovi possibili terapie.

Il terzo tema è stato sviluppato esaurientemente dai Dott. Robinson e Reid, entrambi dell'università di Cambridge in Inghilterra. La prima ha discusso del ruolo di due proteine, AP-4 e AP-5, fondamentali nel processo classicamente definito come "endocitosi mediata da recettore", il secondo ha mostrato come la *spastina*, la proteina mutata nella forma SPG4, abbia un ruolo nel processo definito "riciclaggio endosomiale". Entrambi gli interventi hanno mostrando ancora una volta come le malattie ereditarie possano rappresentare degli autentici modelli per lo studio della biologia cellulare, sino ai livelli più profondi del funzionamento della cellula nervosa, e come la ricerca di base sia intimamente legata alla realtà clinica per fornire spunti per nuovi e mirati approcci terapeutici sperimentali.

Il quarto tema è stato affrontato inizialmente con uno studio dell'Università di Bordeaux che ha mostrato come mutazioni del gene REEP1 (causa della SPG31) conduca ad alterazioni significative dell'efficacia della funzione energetica mitocondriale oltre che della loro struttura a rete. In seguito, tali dati sono stati rinforzati dai risultati ottenuti in un modello sperimentale (il moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster*) da parte del Dott. Cahir. Nella stessa sessione, la Dott. Wedding (Norvegia) ha presentato evidenze che mutazioni nel gene SPG7/paraplegina possa condurre ad una forma di paraparesi spastica con caratteristiche cliniche (oftalmoplegia) e morfologiche nel muscolo (fibre ragged-red, delezioni del DNA mitocondriale) tipiche delle malattie mitocondriali. L'ultima presentazione della Dott. Di Bella (Milano) ha offerto i dati di un'ampia casistica di pazienti italiani con paraparesi spastica e nuove mutazioni nel gene FA2H codificante per un enzima che produce acidi grassi presenti nella mielina.

Nella sessione pomeridiana, dedicata alle Atassie Spastiche, a dominare le discussioni è stata la presentazione delle ultime novità sulla sindrome ARSACS (*Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay*), una malattia "ponte" tra le atassie cerebellari e le paraparesi spastiche.

Di particolare rilievo l'intervento del gruppo dell'Università di Tubingen incentrato sull'analisi delle caratteristiche cliniche e di neuroimaging e di ricercatori canadesi che hanno presentato lo studio del modello murino della patologia.

L'ultima presentazione della Dott. Coutelier (Parigi) ha riguardato l'identificazione, tramite le nuove tecniche di sequenziamento, del gene GSN (gelsolina) che potrebbe essere associato a una forma di atassia cerebellare autosomica dominante. Questo lavoro le è valso il **premio** come migliore presentazione orale di un giovane under 30. Invece a vincere il **premio** per il miglior poster è stata la Dott. Magri (Milano) che ha presentato un lavoro sulle mutazioni concomitanti in paraplegina (SPG7) ed in AFG3L2 (SCA28), un'ulteriore conferma di come la funzionalità mitocondriale e l'interazione tra i prodotti dei vari geni mutati in atassie e paraparesi spastiche siano motivi cardine che guidano il mondo della ricerca in questo campo.

In conclusione, il meeting ha permesso ai partecipanti di essere aggiornati su tutte le novità nel campo delle malattie spinocerebellari e delle paraparesi, ma soprattutto ha dato la possibilità ai ricercatori di condividere idee e risultati e creare una rete di contatti con specialisti e con le associazioni dei malati, incoraggiando collaborazioni anche tra paesi diversi che possano favorire l'avanzamento della ricerca.

Il premio a una giovane ricercatrice italiana è la chiosa ad un evento che ha visto una massiccia ed attiva presenza di medici e ricercatori italiani.

Ci piace terminare con le parole di una di loro, tra le più giovani, la Dott. Caldarazzo di Milano:

I congressi sono sempre occasione d'incontro e scambio per i giovani ricercatori, rappresentano una fonte di spunti e di valorizzazione dell'attività scientifica. Si rientra da un congresso con un carico di emozioni, pieni della gratificazione per aver presentato i propri risultati duramente ottenuti, la consapevolezza di far parte di un mondo di persone impegnate in obiettivi comuni, il piacere di aver conosciuto tanti con cui poter stringere nuove collaborazioni, e la voglia di applicare subito ciò che si è appreso (nuove metodologie, nuove idee).

Ma soprattutto si rientra con la convinzione che si sta facendo qualcosa di bello e giusto, e con la forte motivazione a continuare il lavoro che ci sta a cuore... per noi e per i nostri pazienti.