



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca scientifica e Tecnologica

Fondi 5 per mille ANNO 2018 - Enti della Ricerca Sanitaria
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

ENTE¹: FONDAZIONE DON CARLO GNOCCHI - ONLUS

Titolo del progetto: Caratterizzazione genetica ed epigenetica del complesso SNARE in pazienti con patologie Neurodegenerative (I anno)

Abstract dei risultati ottenuti:

La malattia di Alzheimer (AD) è un disordine neurodegenerativo cronico caratterizzato da un progressivo deterioramento nelle abilità intellettuali, comportamentali e cognitive che interferisce con le usuali esecuzioni comportamentali, sociali ed occupazionali.

Tra i cambiamenti cognitivi relativi ad un normale invecchiamento e quelli associati alla demenza vi è uno stadio intermedio chiamato Mild Cognitive Impairment (MCI), che è caratterizzato da deficit mnemonici che non inficiano le funzioni cognitive globali o le attività e lo stile di vita quotidiano dei soggetti affetti.

Inoltre, queste patologie neurodegenerative sono caratterizzate da una elevatissima variabilità interindividuale di manifestazione e di decorso clinico oltre che di declino sia cognitivo che funzionale e comportamentale. La progressione di malattia dipende fortemente dalla modulazione della plasticità neuronale dei tessuti residui. Tale plasticità è mediata, in parte, dal complesso proteico SNARE che svolge un ruolo fondamentale nel rilascio dei neurotrasmettitori a livello presinaptico (Sudhof TC et al 1991) e in parte da polimorfismi di geni noti come fattori di rischio per l'insorgenza di tali patologie, come ad esempio il gene codificante per Apolipoproteina E (ApoE) (Roses AD 1998). Il complesso SNARE è costituito da diverse proteine coinvolte in deficit cognitivi e comportamentali oltre che in disturbi neuropsicologici; in particolare la proteina Sinaptosomiale di 25kDa (SNAP-25), la proteina Sintaxina 1a (STX1a) e la proteina di membrana associata alle vescicole (VAMP2).

Lo scopo di questo studio è di valutare i marcatori biomolecolari dei geni coinvolti nella neurotrasmissione e la loro influenza nel decorso clinico e nel decadimento cognitivo in soggetti AD, MCI e controlli sani (HC).

Per tale scopo sono stati arruolati, previo accettazione del consenso informato approvato dal comitato etico, 192 pazienti AD, 187 soggetti MCI e 196 controlli sani afferenti presso il Centro Santa Maria Nascente IRCCS della Fondazione Don Carlo Gnocchi, Milano.

I polimorfismi di *SNAP-25* (rs363039, rs363043 e rs363950), *STX1a* (rs4717806 e rs2293489), l'inserzione/delezione di 26 bp del gene *VAMP2* e la presenza dell'allele E4 del gene ApoE sono stati analizzati nella popolazione in studio. I risultati della distribuzione genotipica e allelica di *SNAP-25* rs363050 hanno mostrato che il genotipo AA (AD vs. HC: $p=1.3 \times 10^{-5}$; MCI vs. HC: $p=1.2 \times 10^{-3}$), così come l'allele A (AD vs.

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

HC: $p=4.2 \times 10^{-4}$; MCI vs. HC: $p=4.2 \times 10^{-3}$) sono significativamente più frequenti nei soggetti AD ed MCI rispetto i soggetti HC.

Inoltre, la distribuzione dei genotipi degli SNPs di *STX1a* è risultata essere significativamente differente tra AD e HC ($p=0.015$ per rs4717806 e $p=0.024$ per rs2293489).

L'analisi della distribuzione allelica di *STX1a* rs4717806 in soggetti portatori del genotipo *SNAP-25* rs363050 AA, ha mostrato differenze statisticamente significative tra soggetti MCI e HC ($p=0.018$), con l'allele minore A che è risultato essere più frequentemente espresso nei soggetti MCI.

Dato che è stata individuata un'associazione tra gli SNPs dello SNARE complex e la patologia, abbiamo verificato la possibile correlazione tra questi genotipi e i parametri clinici in una sottopopolazione di 74 AD e 62 MCI a cui è stata sottoposta una valutazione neuropsicologica completa.

I risultati hanno evidenziato una correlazione tra i genotipi degli SNPs rs4717806 e rs2293489 ($p=0.003$ per entrambi) di *STX1a* con i punteggi patologici del test dell'attenzione visiva selettiva nei soggetti MCI.

Successivamente, mediante un'analisi di regressione logistica multinomiale corretta per età, sesso, livello scolastico, valori di MMSE e genotipo ApoE è stata valutata la distribuzione dei genotipi di *STX1a* in relazione ai punteggi del test dell'attenzione visiva selettiva.

I risultati hanno mostrato che i soggetti MCI portatori del genotipo rs4717806 AA sono caratterizzati da punteggi dell'attenzione visiva selettiva significativamente più bassi comparati con i soggetti portatori del genotipo rs4717806 AT ($p_c=0.028$) e TT ($p_c=0.027$). Similmente, soggetti MCI portatori del genotipo rs2293489 TT sono risultati essere caratterizzati da valori del test dell'attenzione visiva selettiva più bassi rispetto i portatori del genotipo rs2293489 CT ($p_c=0.023$) e CC ($p_c=0.032$).

Infine, la distribuzione dei genotipi di *STX1a* in relazione ai punteggi del test dell'attenzione visiva selettiva è stata valutata nei soggetti MCI portatori del genotipo rs363050 AA di *SNAP-25* mediante analisi di regressione logistica multinomiale corretta per età sesso, livello scolastico, valori di MMSE e genotipo ApoE.

I risultati hanno mostrato che, nella sottopopolazione di soggetti MCI portatori del genotipo rs363050 AA di *SNAP-25*, i soggetti portatori del genotipo rs4717806 AA di *STX1a* sono caratterizzati da punteggi del test dell'attenzione visiva selettiva più bassi rispetto i portatori dei genotipi rs4717806 AT (sebbene non raggiunga la significatività statistica) e TT ($p_c=0.022$).

I risultati ottenuti suggeriscono dunque che la combinazione degli SNPs di *SNAP-25/STX1a* rs363050/rs4717806 è associata ad AD ed MCI e correla con l'attenzione visiva selettiva in soggetti MCI.

Questi risultati suggeriscono che la combinazione degli SNPs di *SNAP-25/STX1a* potrebbe interferire e/o modulare l'attività del complesso SNARE risultando in una compromissione della neurotrasmissione sinaptica che coinvolge aree cerebrali deputate all'attenzione.

È da notare che non è stata trovata nessuna correlazione tra i punteggi del test dell'attenzione visiva selettiva e gli SNPs di *SNAP-25* o *STX1a*, da soli o in combinazione, in pazienti AD; questo potrebbe essere dovuto all'avanzato stato di neurodegenerazione che caratterizza i pazienti AD analizzati. Nei soggetti MCI, caratterizzati da uno stadio iniziale di neurodegenerazione che non ha intaccato le performance cognitive globali, la correlazione tra i polimorfismi del complesso SNARE e l'alterazione dell'attenzione visiva selettiva può essere individuata.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

- Oral and poster presentation at "Fourth NeuroMi International Meeting - Brain Stimulation and Brain Plasticity: From Basic Research to Clinical Practice" 21-23 Novembre 2018, Milano.

- Costa AS, Guerini FR, Arosio B, Galimberti D, Zanzottera M, Bianchi A, Nemni R, Clerici M. SNARE Complex Polymorphisms Associate with Alterations of Visual Selective Attention in Alzheimer's Disease. Journal of Alzheimer's Disease. 2018. *Under revision*.

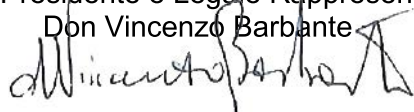
Data 16 gennaio 2019

Il Responsabile del Progetto
Dott. Andrea Saul Costa

Il Presidente e Legale Rappresentante
Don Vincenzo Barbante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Presidente e Legale Rappresentante
Don Vincenzo Barbante





Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca Scientifica e Tecnologica

Rendiconto di spesa Fondi 5 per mille ANNO 2015.
Enti della Ricerca Sanitaria

ENTE¹: FONDAZIONE DON CARLO GNOCCHI - ONLUS

Titolo del progetto: Caratterizzazione genetica ed epigenetica del complesso SNARE in pazienti con patologie Neurodegenerative (1 anno)

Data di inizio progetto: 01/01/2018	Data di fine progetto: 31/12/2018
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 74.090,78	Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): € 74.090,78

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	€ 57.918,00	€ 57.918,00
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)		
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		
Elaborazione dati		

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

Spese amministrative	€ 9.664,03	€ 9.664,03
Altro (manutenzione apparecchiature)	€ 6.508,76	€ 6.508,76
TOTALE	€ 74.090,78	€ 74.090,78

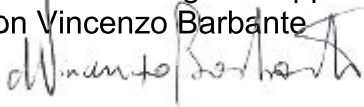
Data 8 gennaio 2019

Il Responsabile del Progetto
Dott. Andrea Costa Saul

Il Presidente e Legale Rappresentante
Don Vincenzo Barbante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Presidente e Legale Rappresentante
Don Vincenzo Barbante





Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca scientifica e Tecnologica

Fondi 5 per mille ANNO 2015 - Enti della Ricerca Sanitaria
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

ENTE¹: FONDAZIONE DON CARLO GNOCCHI - ONLUS

Titolo del progetto: Studio di MicroRNA regolatori di neuro
infiammazione in diverse patologie neurodegenerative (I anno)

Abstract dei risultati ottenuti:

Numerose evidenze indicano che la neuroinfiammazione è alla base di molte malattie del sistema nervoso centrale (SNC), tra cui la malattia di Alzheimer (AD) e di Parkinson (PD). Un ruolo primario nella neuroinfiammazione spetta all'inflammasoma, un complesso multiproteico citoplasmatico che si attiva in risposta a segnali di "pericolo" extra- o intra-cellulari con produzione di citochine infiammatorie come IL-1beta e IL-18. E' noto che l'accumulo di aggregati proteici come l'amiloide e la alfa-sinucleina, tipicamente presenti nel tessuto cerebrale di soggetti affetti da AD e PD, possono indurre l'attivazione dell'inflammasoma, creando infiammazione cronica che può contribuire alla progressione della neurodegenerazione. I complessi meccanismi molecolari che controllano tale processo non sono ancora del tutto noti, e negli ultimi anni l'attenzione di molti ricercatori si è focalizzata su tale argomento, nel tentativo di individuare trattamenti terapeutici che inibendo l'attivazione dell'inflammasoma possano rallentare la progressione di tali patologie.

L'obiettivo di questo progetto è stato di studiare il microRNA-223-3p (miR-223-3p), una piccola molecola di RNA non codificante indicata come regolatore negativo dell'inflammasoma; infatti è noto che tale miRNA all'interno delle cellule inibisce l'espressione di NLPR3, una proteina chiave per l'attivazione di tale processo.

I microRNA sono prodotti all'interno delle cellule, dove modulano numerosi processi biologici, ma vengono rilasciati anche nei fluidi biologici, per lo più in vescicole extracellulari che possono fungere da segnali intercellulari. E' possibile quindi rilevare la presenza e la loro concentrazione in campioni di sangue, e per questo motivo sono ampiamente studiati come possibili biomarcatori non invasivi per diverse patologie neurologiche.

Allo scopo di verificare un possibile utilizzo di miR-223-3p come biomarcatore circolatorio, il nostro studio ha analizzato la concentrazione di miR-223-3p in campioni di siero di soggetti con malattie di Alzheimer (n=40), di Parkinson (n=28), o con lieve decadimento cognitivo (MCI, n=35) e da un gruppo di soggetti sani (n= 40) comparabili per età e sesso ma senza decadimento cognitivo. Per tutti i soggetti sono stati raccolti dati clinici ed anamnestici ed è stata effettuata la valutazione del declino cognitivo tramite indice MMSE (Mini-mental state examination). Da ogni campione di siero è stato estratto RNA ed, in seguito a retro-trascrizione, è stata effettuata la misurazione dell'espressione di miR-223-3p tramite la tradizionale tecnica di real-time-PCR (q-PCR). L'analisi dei dati mostra che rispetto ai soggetti sani l'espressione di miR-223-3p è significativamente ridotta nei soggetti MCI e con AD ($p < 0.0001$), ma risulta essere significativamente aumentata nei soggetti con PD ($p < 0.0001$). Considerando la possibile relazione con la severità del declino cognitivo dei soggetti MCI e AD, e suddividendo i soggetti in gruppi in base ai valori dell'indice MMSE, abbiamo osservato che l'espressione di miR-223-3p diminuiva progressivamente dai soggetti con lieve decadimento cognitivo (MCI) a quelli con malattia di Alzheimer moderata e ancor più in quelli andamento severo.

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

L'analisi statistica tramite curva di ROC ha inoltre evidenziato che tale parametro potrebbe essere un biomarker che discrimina con elevata accuratezza tra i soggetti con AD o con PD e i soggetti sani.

Per comprendere meglio il meccanismo che causa la up- o down-regolazione di miR-223-3p osservata nel siero, abbiamo considerato un indicatore di attivazione dell'inflamma-soma, la caspasi-1, misurandone la concentrazione tramite test immunoenzimatico. Tale citochina risultava essere maggiormente espressa nei sieri di AD, PD, ed MCI rispetto ai soggetti sani di controllo, ad indicare che in tutti i gruppi studiati l'inflammasoma è significativamente più attivato che nei sani.

Pertanto non possiamo per ora dare una possibile spiegazione del meccanismo alla base della deregolazione nel siero di questo miRNA e saranno necessari ulteriori studi per approfondire altri possibili aspetti.

Nel corso di questo primo anno di progetto inoltre ci siamo dedicati all'ottimizzazione della nuova tecnica di digital droplet PCR (ddPCR), valutandone precisione e ripetibilità, e confrontando i dati ottenuti mediante ddPCR e con rt-PCR. Utilizzando oligonucleotidi sintetici come "standard" a concentrazione nota, sono state settate le temperature e le concentrazioni dei primer ottimali per le reazioni. Abbiamo osservato che la performance della ddPCR è comparabile a quanto ottenuto con la qPCR, con valori medi del coefficiente di variazione (CV%) inferiori al 10% sia per la precisione che per la ripetibilità. Il limite di detezione è risultato essere invece più basso per la ddPCR (6 copie/ul) rispetto a quanto evidenziato in qPCR (10 copie/ul). Misurata poi la concentrazione assoluta di miR-223-3p nei sieri di 15 soggetti sani, sia con q-PCR mediante curva standard con miRNA sintetici, che con ddPCR, abbiamo osservato che i dati ottenuti con le due metodiche sono significativamente correlati ($r^2=0.985$).

Pertanto complessivamente il nuovo metodo ddPCR per la misurazione di mir-223-3p ci permette la quantificazione assoluta senza l'utilizzo di curva standard e risulta essere robusto, preciso e con una miglior sensibilità rispetto alla tradizionale q-PCR. La misurazione di miR-223-3p mediante ddPCR, effettuata finora su 20 soggetti con AD, 20 con MCI, 20 con PD e 20 soggetti sani di controllo, ha confermato che la sua espressione è significativamente aumentata nei soggetti con Parkinson, sia rispetto ai soggetti sani che rispetto a quelli con AD ed MCI ($p < 0.0001$). Tali dati, sebbene debbano essere validati in una più ampia casistica, confermano che miR-223-3p possa essere utile come indicatore diagnostico/prognostico per soggetti affetti da AD e PD.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

- Mancuso R., Hernis A, Agostini S, Nemni R, Clerici M. *Differential expression of circulating microRNA-223 in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease*. Abstract #: AAT18-049, "Advances in Alzheimer's and Parkinson's therapies: an AAT-AD/PDTM Focus Meeting", Torino, 15-18 marzo 2018.

Data 16 gennaio 2019

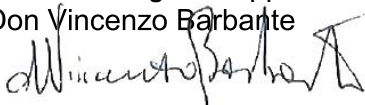
Il Responsabile del Progetto
Dott.ssa Roberta Mancuso

Il Presidente e Legale Rappresentante
Don Vincenzo Barbante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Presidente e Legale Rappresentante

Don Vincenzo Barbante





Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca Scientifica e Tecnologica

Rendiconto di spesa Fondi 5 per mille ANNO 2015.
Enti della Ricerca Sanitaria

ENTE¹: FONDAZIONE DON CARLO GNOCCHI - ONLUS

Titolo del progetto: Studio di MicroRNA regolatori di neuro infiammazione in diverse patologie neurodegenerative (I anno)

Data di inizio progetto: 01/01/2018	Data di fine progetto: 31/12/2018
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 80.090,78	Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): € 80.090,78

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	€ 63.132,51	€ 63.132,51
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)		
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		
Elaborazione dati		
Spese amministrative	€ 10.446,62	€ 10.446,42

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

Altro (manutenzione apparecchiature)	€ 6.511,65	€ 6.511,65
TOTALE	€ 80.090,78	€ 80.090,78

Data 8 gennaio 2019

Il Responsabile del Progetto
Dott.ssa Roberta Mancuso

Il Presidente e Legale Rappresentante
Don Vincenzo Barbante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Presidente e Legale Rappresentante
Don Vincenzo Barbante

