



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA  
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

## IL CONSIGLIO DI AMMINISTRAZIONE

**DELIBERAZIONE CONSILIARE N. 179**

**SEDUTA DEL 27-02-2015**

Presidente Giancarlo Cesana

Consiglieri Stefano Cecchin (assente)  
Marco Giachetti  
Adelmo Grimaldi  
Tiziana Maiolo  
Gabriele Perossi  
Paola Pessina  
Roberto Satolli

Con l'assistenza del Segretario Massimo Aliberti

Oggetto: CENTRO DI GENOMICA FUNZIONALE

Il Direttore Scientifico: Pier Mannuccio Mannucci

L'atto si compone di n. 38 pagine di cui n. 35 pagine di allegati parte integrante

**Il presente provvedimento è soggetto a pubblicazione in base alle linee guida del Direttore Generale.**

[ Atti n. .... / ..... all. ... ]



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004  
via Francesco Sforza, 28 - 20122 Milano - Telefono 02 5503.1 - Fax 02 58304350  
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968





## IL CONSIGLIO DI AMMINISTRAZIONE

### PREMESSO

- che la diffusione delle nuove tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici (NGS) ha ricadute rilevanti nella ricerca e importanti risvolti traslazionali, quali l'espansione dell'uso di test genetici, la possibilità di stratificare su base molecolare molte malattie, offrire nuovi e importanti strumenti per la diagnosi, prognosi e valutazione della risposta al trattamento. Non ultima, la possibilità di identificare marker (signatures) e pathway molecolari che possono rappresentare il bersaglio terapeutico per approcci farmacologici innovativi e personalizzati;
- che nel loro insieme, questi sviluppi, attengono alla genomica funzionale, branca della biologia molecolare mirata a utilizzare la grande ricchezza dei dati prodotti dai progetti di genomica per descrivere funzioni e interazioni dei prodotti genici. In contrasto con la staticità delle informazioni genomiche, la genomica funzionale si concentra su fenomeni dinamici come la trascrizione genica, la traduzione e le interazioni proteina-proteina;
- che dal punto di vista pratico, i laboratori di Genomica Funzionale forniscono strutture per l'assistenza ai progetti di genomica, dal disegno dell'esperimento all'analisi bioinformatica dei dati, e per affrontare gli studi "omici", necessari per conoscere la base biologica di fenotipi associati a alterazioni geniche/genomiche e/o a difetti epigenetici;

### RILEVATO

- che l'importanza di istituire un Centro di Genomica Funzionale nella nostra Fondazione IRCCS si basa sulla necessità stringente di diversi gruppi di ricerca di sviluppare molte delle conoscenze che lo studio della genomica ha comportato nell'ambito di diverse malattie d'interesse;
- che questa necessità è ancora più importante poiché è stato condotto uno sforzo rilevante per la costituzione di una piattaforma genomica integrata che non solo fornisce un notevole impulso alla diagnostica molecolare, ma che può certamente rappresentare il punto di partenza per gli studi di genomica high-throughput;

### PRESO ATTO

- che l'iniziativa di questo progetto si basa essenzialmente sulla volontà di condividere risorse, strumentazioni, know-how, spazi e interessi scientifici per dare l'avvio a una struttura scientifica innovativa per rafforzare, rinnovare, espandere e rilanciare nella nostra Fondazione una ricerca biomedica sempre più competitiva nel panorama nazionale e internazionale.
- che la proposta di progetto contiene l'invito a INGM di rafforzare, in un contesto di cooperazione e interscambio, la già stabile attività di cooperazione scientifica tra le due Istituzioni, valorizzando le opportunità di condivisione di strutture scientifiche e know how e contribuendo così a rafforzare la posizione delle due Istituzioni come polo scientifico di spicco nel panorama nazionale ed internazionale.

**ATTESO** l'interesse della Fondazione IRCCS a rafforzare la collaborazione scientifica per sviluppare la propria attività scientifica e considerata la particolare significatività del progetto "Centro di Genomica Funzionale";





FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA  
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

## IL CONSIGLIO DI AMMINISTRAZIONE

PREVIA VOTAZIONE resa ai sensi di legge, da cui risultano n. 7 voti favorevoli su n. 7 votanti;

### DELIBERA

per le motivazioni richiamate in premessa:

1. si approvare il progetto "Centro di Genomica Funzionale" allegato al presente provvedimento di cui è parte integrante e sostanziale;
2. di demandare al Direttore Scientifico, prof. Pier Mannuccio Mannucci, gli interventi e gli approfondimenti necessari per l'attuazione del suddetto progetto.

Il Segretario

Massimo Aliberti

Il Presidente

Giancarlo Cesana

REGISTRO REGIONALE DELLE DELIBERAZIONI  
IN DATA 27 FEB. 2015 AL N. 179



ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA D.M. 29-12-2004  
via Francesco Sforza, 28 - 20122 Milano - Telefono 02 5503.1 - Fax 02 58304350  
Codice Fiscale e Part. IVA 04724150968

3

Sistema Sanitario



Regione  
Lombardia

**Centro di Genomica Funzionale, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore  
Policlinico/Istituto Nazionale di Genetica Molecolare-INGM**

**Proponenti**

**Antonino Neri** (UOC Ematologia)

**Flora Peyvandi** (Centro Emofilia e Trombosi "Angelo Bianchi Bonomi")

**Luisa Ottobrini** (Centro IMAGO)

**Laura Riboni** (Unità di Metabolomica)

**Giovanni Marfia** (Unità di Neurochirurgia Sperimentale e Terapia Cellulare/Aeronautica Militare)

**Monica Miozzo** (US Coordinamento Laboratori di Ricerca; Direzione Scientifica)

## Premessa

### Utilità della Genomica Funzionale

La diffusione delle nuove tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici (NGS) ha ricadute rilevanti nella ricerca (e.g.: abbattimento dei costi, incremento di velocità di analisi e ampliamento delle conoscenze delle basi genomiche di malattie genetiche e complesse) e importanti risvolti traslazionali, quali l'espansione dell'uso di test genetici, la possibilità di stratificare su base molecolare molte malattie, offrire nuovi e importanti strumenti per la diagnosi, prognosi e valutazione della risposta al trattamento. Non ultima, la possibilità di identificare marker (signatures) e pathway molecolari che possono rappresentare il bersaglio terapeutico per approcci farmacologici innovativi e personalizzati. Nel loro insieme, questi sviluppi, attengono alla **genomica funzionale**, branca della biologia molecolare mirata a utilizzare la grande ricchezza dei dati prodotti dai progetti di genomica per descrivere funzioni e interazioni dei prodotti genici. In contrasto con la staticità delle informazioni genomiche, la genomica funzionale si concentra su fenomeni dinamici come la trascrizione genica, la traduzione e le interazioni proteina-proteina. Gli studi di genomica funzionale in genere includono metodi high-throughput con piattaforme integrate, piuttosto che seguire approcci più tradizionali del tipo "gene - by - gene".

Dal punto di vista pratico, i **laboratori di Genomica Funzionale** forniscono strutture per l'assistenza ai progetti di genomica, dal disegno dell'esperimento all'analisi bioinformatica dei dati, e per affrontare gli studi "omici", necessari per conoscere la base biologica di fenotipi associati a alterazioni geniche/genomiche e/o a difetti epigenetici.

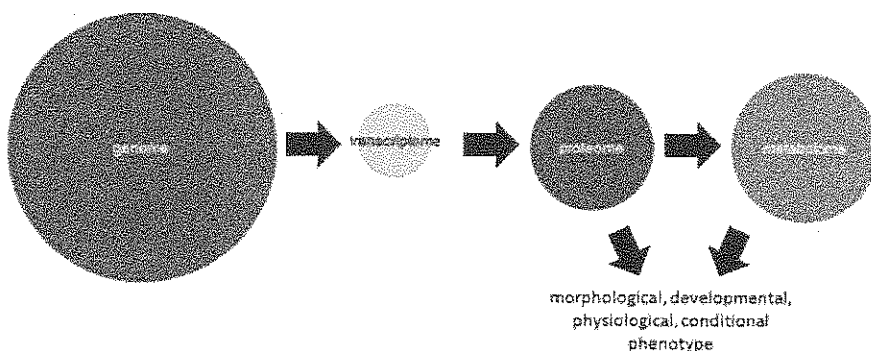


Fig. 1: Il principale obiettivo della genomica funzionale è approfondire il legame tra genotipo e fenotipo.

## **Centro di Genomica Funzionale, Fondazione Policlinico/INGM**

L'importanza di istituire un **Centro di Genomica Funzionale** nella nostra Fondazione si basa sulla necessità stringente di diversi gruppi di ricerca di sviluppare molte delle conoscenze che lo studio della genomica ha comportato nell'ambito di diverse malattie d'interesse.

Nella nostra Istituzione questa necessità è ancora più importante poiché è stato condotto uno sforzo rilevante per la costituzione di una **piattaforma genomica integrata** che non solo fornisce un notevole impulso alla diagnostica molecolare, ma che può certamente rappresentare il punto di partenza per gli studi di genomica high-throughput.

E' evidente che per sviluppare **programmi di ricerca competitivi**, mirati alla comprensione del significato funzionale e del ruolo biologico di geni che sono stati identificati come alterati o deregolati, è fondamentale dimostrare di avere le strutture per affrontare studi che comprendono approcci di tipo post-genomico. Inoltre, già oggi è molto difficile per noi ricercatori poter pubblicare su riviste di alto livello articoli che, benché notevoli per l'approccio genomico usato e per le casistiche di cui disponiamo, non forniscono contenuti e modelli funzionali.

L'iniziativa di questo progetto si basa essenzialmente sulla volontà di condividere risorse, strumentazioni, know-how, spazi e interessi scientifici per dare l'avvio a una struttura scientifica innovativa per rafforzare, rinnovare, espandere e rilanciare nella nostra Fondazione una ricerca biomedica sempre più competitiva nel panorama nazionale e internazionale.

La proposta di progetto contiene l'invito a **INGM** di rafforzare, in un contesto di cooperazione e interscambio, la già stabile attività di cooperazione scientifica tra le due Istituzioni, valorizzando le opportunità di condivisione di strutture scientifiche e know how e contribuendo così a rafforzare la posizione delle due Istituzioni come polo scientifico di spicco nel panorama nazionale ed internazionale. In accordo con la Convenzione Quadro per l'attività di collaborazione scientifica stipulata tra le Parti (Maggio 2012), la collaborazione scientifica in settori di attività comuni e in generale afferenti alla medicina molecolare, può prevedere l'accesso reciproco a spazi e attrezzature disponibili.

Dal punto di vista del **sostegno economico**, i gruppi proponenti hanno a disposizione grant, donazioni o fondi da attività conto terzi. I vantaggi economici della presenza del Centro di Genomica Funzionale all'interno di INGM potrebbero consistere in:

- condivisione delle spese di funzionamento di INGM;
- partecipazione all'acquisto di apparecchiature condivisibili e mantenimento/manutenzione di quelle già esistenti in INGM;

- cofinanziamento di personale condiviso, sia dedicato alla ricerca sia all'amministrazione;

Come illustrato di seguito, diversi gruppi di ricerca contribuiranno a dare l'avvio al Centro di Genomica Funzionale. I gruppi proponenti si caratterizzano per l'elevata produzione e competitività scientifica comprovata a livello internazionale.

Per realizzare il progetto è necessario poter disporre di:

- **spazi di laboratori** adeguati (300-400 mq) dove collocare i ricercatori e le strumentazioni già in uso dei diversi gruppi proponenti e dove altre si acquisiranno;
- **spazi** sia fisici sia virtuali per le attività di **bioinformatica**, per lo "storage" di dati con possibilità di scalabilità flessibile di spazi di archiviazione;
- **biobanca**, poiché tutte le attività di ricerca del Centro di Genomica Funzionale si basano sulla raccolta e conservazione di grandi quantità di campioni biologici (plasma, DNA/RNA, cellule) che richiedono una conservazione in apparecchiature adeguate con sistemi di allarme, siano esse camere fredde, freezer -20/-80°C e contenitori di azoto liquido. Necessitiamo dunque di poter usufruire dei servizi offerti dalla Biobanca della Fondazione Ca' Granda.

Un altro punto fondamentale è la **rete di formazione** dei giovani ricercatori.

Storicamente, la ricerca nella Fondazione Ca' Granda è intrecciata con le attività accademiche e didattiche dei ricercatori, privilegio che ci permette di avvicinare e formare giovani ricercatori nella ricerca biomedica e clinica. La formazione per essere competitiva deve offrire ai ricercatori la possibilità di migliorare le loro capacità di ricerca, unirsi a gruppi esistenti e accrescere le prospettive di carriera. In questo progetto ci proponiamo di continuare e rafforzare l'attività formativa e didattica per i giovani ricercatori che afferiscono nella nostra Fondazione affinché possano acquisire nuove conoscenze "sul campo": sia in ambiti di biologia molecolare, genetica medica, epidemiologia e clinica ma anche di bioinformatica, nuova e irrinunciabile risorsa scientifica per l'implementazione degli obiettivi di ricerca del Centro.

Di seguito sono descritti i principali approcci e fasi di lavoro per gli studi di Genomica Funzionale e le principali attività di ricerca delle Unità proponenti il Centro di Genomica Funzionale della Fondazione Ca' Granda.

## Principali fasi e approcci di Genomica Funzionale

Nelle sue linee generali, un laboratorio di genomica funzionale fornisce gli strumenti per analizzare la funzione di geni di interesse, sia essi codificanti o non, come i miRNA o i LNCRNA, che possono avere delle alterazioni che riducono o amplificano la loro funzione.

1) In una prima fase è necessario usare delle tecniche di **trasfezione cellulare** che, tramite trasferimento di materiale genico in cellule in vitro (utilizzando oligonucleotidi antisenso o i vettori lentivirali), danno una prima informazione di come il gene target funziona nella cellula. Per svolgere queste attività sono necessari spazi dedicati per colture cellulari con cappe a flusso, ambienti P2 per lavorare con vettori lentivirali e ambienti separati per la costruzione, crescita e purificazioni di vettori plasmidici che contengono le sequenze geniche d'interesse. Una volta che si hanno le cellule trasfettate in vitro, è necessario studiarne gli effetti sul fenotipo cellulare, tra cui valutazione della vitalità/apoptosi, proliferazione e squilibrio del ciclo cellulare. Per queste valutazioni si utilizzano principalmente citofluorimetri.

2) Un aspetto importante è lo **studio dei prodotti genici** (RNA e/o della proteina) d'interesse trasfettato e dei geni e pathway molecolari con cui esso interagisce. Infatti, una volta che si dispone delle cellule trasfettate in vitro, è necessario procedere alla analisi degli effetti che la deregolazione del gene in esame comporta nel sistema cellulare. Come primo approccio, si utilizzano geni reporter che permettono di monitorare l'espressione del gene d'interesse o una sua attività specifica nella cellula. Tra i geni reporter più utilizzati e con maggiore potenziale di trasferimento anche in studi in vivo su piccoli animali, la Luciferasi e geni fluorescenti soprattutto rossi (mCherry, RFP) ma anche verdi (GFP) necessitano dell'utilizzo di un Luminometro/fluorimetro per la valutazione in vitro della loro attività in maniera quantitativa. La loro espressione può inoltre essere valutata con sistemi che sfruttano la microscopia come microscopi a fluorescenza, confocale, o ancor meglio, microscopia con CCD raffreddata come nel LV-200 Olympus. Quindi si valutano gli effetti sulla cellula di tale deregolazione che potranno incidere sulla vitalità, sul ciclo cellulare, sull'apoptosi e sull'attivazione di altri pathway molecolari. Queste analisi possono essere condotte in massima parte con l'uso di citofluorimetri dedicati. Inoltre un aspetto importante è l'analisi nel modello cellulare trasfettato con il gene d'interesse, dei livelli del suo specifico mRNA/ncRNA o della sua proteina di cui si dovrà valutare eventualmente accumulo, localizzazione, attivazione e pathway di degradazione. Per questi scopi nei laboratori saranno necessari degli strumenti per la PCR quantitativa e per i Western blot con stazioni dedicate per la lettura digitale degli stessi, sistema per ELISA automatizzato con spettrofotometro dedicato e microscopio confocale con time-lapse. In seguito, per comprendere quali effetti molecolari produce il gene

alterato nelle cellule trasfettate è possibile sfruttare la PCR quantitativa ed i Western blot qualora si abbia conoscenza o suggerimenti circa i geni ed i pathway molecolari con cui esso interagisce, ma anche costrutti contenenti geni reporter la cui espressione sia correlata all'attività della proteina codificata dal gene deregolato. In caso contrario è possibile sfruttare le tecnologie di microarray o di PCR-quantitativa su larga scala, già disponibili nella nostra Fondazione, per valutare le alterazioni nei profili di espressione genica sia di geni codificanti per proteine o di geni e sequenze non codificanti (quali in particolare miRNA e lncRNA). Sulla base dei risultati ottenuti sarà possibile costruire sistemi reporter che ne permettano la validazione in colture cellulari. L'analisi di questi profili di espressione è in genere condotta con strumenti bioinformatici. Questa attività necessita di un collegamento in rete in grado di poter dialogare con le banche dati pubbliche e per l'aggiornamento dei software.

3) Lo studio funzionale comprende lo studio degli **effetti epigenetici**, in modo particolare la metilazione/demetilazione di DNA, attraverso sistemi di sequenziamento (e.g.: pirosequenziamento) dopo trattamento con bisolfito di sodio e mediante anticorpi anti-idrossimetilcitosina. Nell'ambito delle signature epigenetiche si valuta anche il rimodellamento della cromatina, mediante esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP-on-Chip) o di studio conformazionale del genoma (e.g.: 3C, Chromosome Conformation Capture).

4) Lo sviluppo logico di tutte queste attività è poter valutare gli effetti del gene d'interesse sull'animale, in modo particolare su **modelli murini**. Per questo sarà necessario il coinvolgimento di unità di ricerca impegnate nello sviluppo di tali modelli che abbiano strumentazione per la valutazione, anche non invasiva, degli effetti della deregolazione analizzata. In uno dei gruppi proponenti sono già in uso tecniche che permettono per esempio la valutazione non-invasiva dell'espressione di geni reporter (Luciferasi ed mCherry per es.) ma anche di alcuni processi molecolari, tramite la somministrazione al modello animale in vivo di sonde fluorescenti o chemiluminescenti commercialmente disponibili e rilevabili mediante imaging ottico. Tali strumenti (CCD camera per imaging su piccoli animali) seppur già disponibili, richiedono una costosa e necessariamente continua manutenzione nonché la presenza di personale altamente qualificato al fine di una ottimizzazione degli esperimenti, minimizzazione del numero di animali necessari allo studio, degli errori e di possibili danni allo strumento. Nell'ambito di un programma di ricerca così accurato va ricordato la necessità di monitorare in vivo nel modello animale il processo in esame anche a livello cellulare oltre che sull'intero organismo. Per far ciò sarebbe necessario avere a disposizione strumenti che permettano la visualizzazione non-invasiva della localizzazione e dell'attività di molecole fluorescenti su singole cellule (microscopia a due-fotoni

intravitale). Tali metodiche permettono di monitorare nel tempo l'effetto della deregolazione genica; in tal modo sarà possibile mimare situazioni patologiche su cui applicare trattamenti di diverso genere avendo la possibilità di monitorarne in tempo reale gli effetti al fine di un'ottimizzazione del trattamento stesso. Tali tecniche permetteranno inoltre di individuare specifici punti di controllo di tali trattamenti che potrebbero essere poi trasferiti in studi clinici con procedure già disponibili per la visualizzazione di processi molecolari in modo non invasivo nell'uomo come Risonanza Magnetica (RM) o tecniche nucleari (PET/SPET). A tal fine potrebbe essere utile la collaborazione con gruppi che si occupano di imaging non invasivo su piccoli animali con RM o PET/SPET.

5) Infine, il Centro di Genomica Funzionale comprende studi di **metabolomica**. Il metaboloma rappresenta l'insieme di tutti i metaboliti (Fig. 2), in altre parole i prodotti finali dell'espressione genica e delle reazioni che avvengono negli organismi. E' chiaro che, partendo da un'alterazione genetica/epigenetica, solo il **profilo metabolico** può fornire un'istantanea della fisiologia di quella cellula in cui vi è l'alterazione. In altre parole, il metaboloma è l'espressione del fenotipo, l'end-point della cascata di eventi innescati dalla mutazione e/o dall'azione dell'ambiente. Infine, sono metaboliti i marcatori di malattia più frequentemente rilevati in tessuti biologici a significato clinico.

Una delle sfide della **Systems Biology** è quella integrare la proteomica, la trascrittomica e le informazioni metabolomiche per avere una visione d'insieme più completa degli organismi viventi.

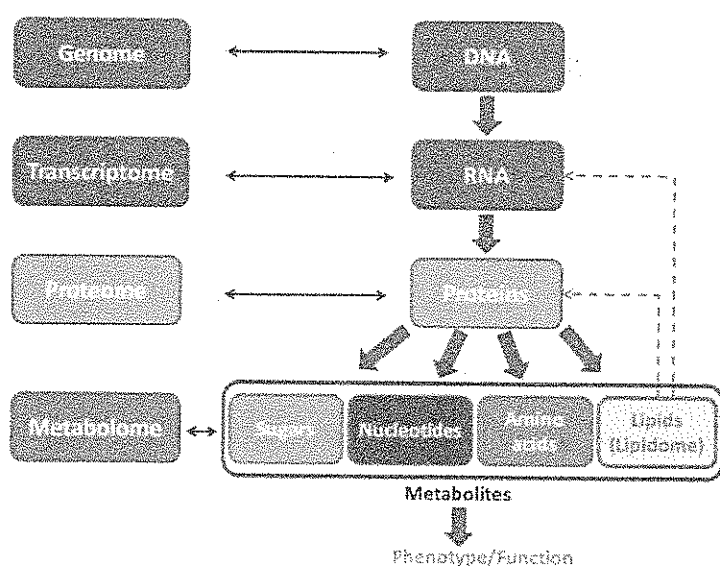


Fig. 2: Cascata di informazioni necessarie per gli studi di genomica funzionale.

6) Denominatore comune dei diversi approcci di studio di genomica funzionale e condizione irrinunciabile è l'analisi **bioinformatica** (Fig. 3). E', infatti, evidente che la potenza degli studi di NGS comporta la produzione di "big data" che devono essere gestiti con approcci bioinformatici avanzati.

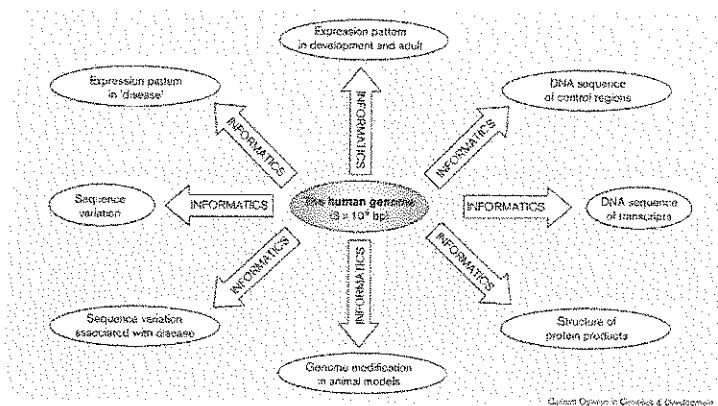


Fig. 3: L'analisi bioinformatica è essenziale per validare e interpretare i dati ottenuti dai diversi approcci che, nel loro insieme, rappresentano l'approccio di genomica funzionale.

## Proponenti del Centro di Genomica Funzionale presso la Fondazione

### UO Ematologia (Antonino Neri)

Il gruppo di ricerca di Neri ha come tema e interesse principale nel corso degli ultimi 20 anni, il Mieloma Multiplo (MM). Il MM è una neoplasia incurabile dovuta alla proliferazione clonale della plasmacellula (PC) nel midollo osseo. Il MM rappresenta il 10% dei tumori ematologici ed è caratterizzato da una marcata eterogeneità clinica: può infatti presentarsi come una gammopatia monoclonale di significato incerto (MGUS, una condizione pre-maligna che può evolvere in MM conclamato nel 1% dei casi), mieloma asintomatico (sMM), mieloma conclamato e sintomatico, o forma extra-midollare (leucemia plasma cellulare, PCL); la comparsa di PC nel sangue periferico si verifica come evento evolutivo in circa il 2% dei casi (PCL secondarie)

Il MM si associa ad una marcata instabilità cariotipica con aberrazioni cromosomiche sia strutturali che numeriche. Circa il 50% dei casi presenta iperdiploidia mentre i casi non-iperdiploidi presentano una maggiore frequenza di traslocazioni cromosomiche coinvolgenti i loci di diversi

putativi oncogeni. I recenti sviluppi tecnologici hanno consentito di affiancare alla citogenetica convenzionale e FISH altre metodologie. Lo studio dei profili di espressione genica globale (GEP) su microarray ad oligonucleotidi (molti condotti nel nostro laboratorio) hanno identificato patterns trascrizionali caratteristici, quali quelli associati alla deregolazione dei geni target delle traslocazioni cromosomiche. L'identificazione dei microRNA (miRNA), brevi sequenze di RNA non-codificanti (ncRNA) e regolatorie dell'attività genica, ha aggiunto un ulteriore livello di complessità. Nel nostro lavoro è stata individuata la presenza di distinti pattern di miRNA deregolamentati in specifici sottotipi molecolare di pazienti affetti da MM, principalmente associati alle maggiori traslocazioni IGH o a distinte regioni cromosomiche delete o amplificate. Nel complesso i dati disponibili suggeriscono che specifici miRNA possano essere implicati nella trasformazione neoplastica e nella progressione della malattia, così come nella stratificazione prognostica in gruppo di rischio.

Il gruppo di lavoro del Prof Neri coinvolto nella ricerca comprende circa **12 persone**. In particolare, il **team** di lavoro dedicato ad aspetti di genomica funzionale è formato al momento da un assegnista universitario, 2 dottorandi, un borsista ospedaliero ed un tecnico universitario supportati da una unità di personale bioinformatico. Relativamente alla genomica funzionale il laboratorio dispone di cappe a flusso laminare (3), incubatori CO<sub>2</sub> (3), incubatore/agitatore per batteri (2), sistemi di trasfezione NEON ed AMAXA, PCR-quantitativa (2), sistemi per Western blot, Piattaforma microarray Affymetrix, Strumento NGS Roche 454.

L'**interesse** attuale di genomica funzionale del laboratorio è principalmente concentrato sulla conoscenza delle basi biologiche e su spunti traslazionali del mieloma multiplo (MM).

#### 1) non coding RNA nel mieloma multiplo (MM)

Sono stati caratterizzati gruppi rappresentativi dei pazienti tramite l'uso di microarray di espressione e NGS-RNA seq, identificando una serie di geni, miRNA e lncRNA che rappresentano dei notevoli candidati per lo studio funzionale. In collaborazione con altri gruppi di ricerca, sono stati già pubblicati lavori sul ruolo funzionale di miRNA nel mieloma. Nel prossimo futuro ci si propone di indagare in modo specifico il ruolo di alcuni lncRNA deregolati in forme distinte della malattia. Ciascun lncRNA sarà over-espresso o inibito in linee cellulari di mieloma umano mediante metodiche di trasfezione, e le linee cellulari trasfettate saranno sottoposte a vari test funzionali per indagare gli effetti biologici correlati alla deregolazione dei miRNA. Nello specifico, i vari saggi funzionali valuteranno ogni variazione che influenzi: il tasso di crescita cellulare, il profilo del ciclo cellulare, l'induzione dell'apoptosi, la dipendenza per la crescita cellulare dal microambiente.

Studio dei meccanismi di mantenimento e progressione del MM: valutazione delle proprietà delle cellule staminali del mieloma (MMSC) ed il ruolo del gene Notch

Il progetto si basa sul fatto che dati recenti prodotti da noi e da altri gruppi hanno dimostrato la deregolazione della via di trasduzione del segnale di Notch nel MM e il suo ruolo nel tumore nel favorire il mantenimento delle MMSC, nonché nelle interazioni con la nicchia midollare. L'attivazione e alterazioni note della via di segnalazione di Notch nella cellula di mieloma sono principalmente dovute all'espressione aberrante ed all'aumentata funzionalità dei due ligandi Jag1 e Jag2. Al fine di indagare l'effetto dell'attivazione di Notch nell'ambito della popolazione tumorale e nel mantenimento delle MMSC, ci proponiamo di silenziare i due ligandi Jag1 e Jag2 con un vettore lentivirale inducibile. Tale approccio permetterà di valutare se l'inibizione di Jag1-2 influenzi l'attivazione di Notch da parte di cellule di MM nelle cellule non tumorali adiacenti, in quanto riteniamo possa rappresentare parte del meccanismo alla base del circolo vizioso tra MM e BM. Saranno utilizzati sistemi di co-cultura per indagare la reciproca interazione tra cellule di MM o quella potenziale tra MMSC e le diverse cellule del BM rilevanti nel MM, incluse BMSC, osteoclasti ed elementi della nicchia vascolare, quali cellule endoteliali e macrofagi. L'analisi biologica sarà correlata al profilo di espressione genica di ciascun tipo cellulare. L'effetto dell'inibizione di Jag sarà confermato in topi NOD/SCID trapiantati con cellule tumorali che sviluppino una malattia simile a quella di pazienti in stadio avanzato, comprese la localizzazione midollare e l'osteolisi. Ci aspettiamo che questo approccio possa portare ad una diminuzione di massa tumorale, lesioni ossee, formazione di microvasi, rilascio di fattori di crescita solubili e capacità di auto-rinnovamento. Per questo progetto è stata richiesta la collaborazione di altri tre gruppi italiani; Raffaella Chiaramonte, Università di Milano; Nicola Giuliani Università di Parma; Roberto Piva, Università di Torino.

*Progetti in corso finanziati*

Ricerca Finalizzata Giovani ricercatori Ministero della Salute (CUP Project no.E66110000230001), 2013-15

Progetto AIRC 5X1000 2011-2015 "A Research Platform for miRNA-based treatment for multiple myeloma and Chronic lymphocytic leukemia"

*Progetti sottomessi*

Ricerca Finalizzata Ministero della Salute: "Molecular Targeting of Notch signaling as a novel therapeutics: strategy for multiple myeloma treatment"

## U.O.C DI EMATOLOGIA NON TUMORALE E COAGULOPATIE (Flora Peyvandi)

L'accesso di un grande numero di pazienti presso gli ambulatori di malattie emorragiche e trombotiche e la possibilità di ricoverare in ambito internistico pazienti affetti da coagulopatie rappresenta un valore aggiunto sia per la gestione clinica del paziente sia per raccogliere una casistica funzionale allo sviluppo di progetti di ricerca e studi clinici. Le linee di ricerca che scaturiscono dalla possibilità di accedere ad ampie casistiche di pazienti con malattie sia comuni che rare, associata alla disponibilità di tecnologie avanzate e competenze specifiche, sono rivolte allo studio di basi molecolari e meccanismi fisiopatologici, fattori di rischio, ottimizzazione della terapia medica e complicanze di coagulopatie sia di tipo emorragico che trombotico.

Presso la UOC coordinata da Flora Peyvandi, laboratori e ambulatori conducono in concerto ricerche nell'ambito fenotipico e genetico, così come epidemiologico e clinico mediante l'applicazione di diverse metodologie.

Le competenze scientifiche offerte nell'ambito della presente proposta progettuale riguardano: (i) l'analisi genomica di ampie coorti di soggetti con patologie dell'emostasi rare e comuni; (ii) l'analisi funzionale delle alterazioni genetiche individuate nei pazienti mediante espressione e caratterizzazione delle stesse in modelli cellulari; (iii) l'ottimizzazione di analisi genetiche avanzate per la diagnosi prenatale non invasiva; (iv) la ricerca immunologica legata allo sviluppo e alla terapia di allo- o auto-anticorpi in patologie dell'emostasi; (v) la creazione di registri sulle malattie rare e la ricerca epidemiologica.

Tale attività di ricerca viene attualmente svolta sia nei laboratori siti in via Pace 9 presso la Fondazione IRCCS Ca' Granda – Ospedale Maggiore Policlinico, sia in collaborazione con strutture esterne nazionali o internazionali (*e.g.*, Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA; Leiden University Medical Center, Leiden, Olanda). Lo staff della UOC coinvolto negli studi qui descritti comprende sette medici strutturati, cinque medici contrattisti, un biologo strutturato, tre biologi assegnisti universitari, sette biotecnologi/biologi borsisti, un tecnico universitario, due tecnici borsisti, un data manager contrattista, un epidemiologo e uno statistico borsista.

### Genomica

Gli studi condotti in quest'ambito sono volti all'individuazione di nuovi fattori di rischio genetici e quindi di nuovi pathway molecolari coinvolti nell'eziologia di patologie dell'emostasi multifattoriali a componente ereditaria parzialmente sconosciuta. I risultati ottenuti potrebbero inoltre avere un forte impatto traslazionale, portando all'identificazione di marcatori di malattia con valore

prognostico che consentano una miglior stratificazione dei pazienti secondo classi di rischio, nonché di nuovi potenziali bersagli per terapie sempre più mirate, efficaci e sicure.

I progetti, parte dei quali finanziati e attualmente in fase di analisi dei dati e parte sottomessi a finanziamento, si basano sulle tecniche di sequenziamento (in particolare di pannelli di geni candidati e dell'esoma) e genotipizzazione (mediante SNP-array) di nuova generazione e trovano applicazione nelle ampie casistiche di pazienti raccolte presso la UOC. Le casistiche più importanti suddivise per patologie emorragiche (A) e trombotiche (B) sono le seguenti:

A. Patologie emorragiche:

1. Emofilia A: coorte di 300 pazienti raccolta nell'ambito dello studio prospettico randomizzato internazionale SIPPET sullo sviluppo dell'inibitore in pazienti con emofilia A.
2. Malattia di von Willebrand: coorte di 141 pazienti (21 italiani e 120 iraniani) con malattia di von Willebrand di tipo III raccolta nell'ambito dello studio internazionale 3WINTERS-IPS.

B. Patologie trombotiche:

1. Trombosi arteriosa:

- Infarto del miocardio giovanile: 1210 pazienti italiani di età minore ai 45 anni sopravvissuti ad infarto del miocardio e sottoposti a coronarografia e 1210 controlli appaiati.
- Coronaropatie: 4000 pazienti iraniani con dolore toracico sottoposti a coronarografia, di cui 2000 con coronaropatia e 2000 senza, e 2000 controlli sani appaiati. Dei pazienti con coronaropatia, 700 sono stati seguiti per 5 anni in uno studio di follow-up.
- Ictus cerebrale ischemico: circa 500 pazienti italiani con ictus cerebrale ischemico riferiti alla UOC per lo studio della trombofilia.

2. Trombosi venosa:

- Trombosi venosa profonda: più di 2000 pazienti con trombosi venosa profonda e controlli sani appaiati.
- Trombosi venosa cerebrale: circa di 200 pazienti.
- Trombosi splancniche: circa 100 pazienti.

3. Microangiopatie trombotiche:

- Porpora trombotica trombocitopenica (PTT): più di 400 pazienti arruolati nel "Milan TTP Registry".

Per ciascuna di queste casistiche sono disponibili database digitali contenenti informazioni demografiche, cliniche e legate a fattori di rischio ambientali per lo studio dell'associazione tra queste variabili ed i fattori di rischio genetici individuati.

I progetti attualmente in corso e/o sottomessi a finanziamento sono i seguenti:

- Studio sistematico dell'esoma mediante NGS con l'obiettivo di chiarire il ruolo delle varianti genetiche rare nello sviluppo di inibitore in pazienti con emofilia A grave. Quaranta varianti sono state individuate; uno studio di replicazione mediante saggi TaqMan e PCR quantitativa è attualmente in corso.
- Determinazione del difetto molecolare tramite metodica NGS e sequenziamento tradizionale in pazienti con malattia di von Willebrand di tipo III (progetto internazionale 3WINTERS-IPS).
- Individuazione di nuovi fattori di rischio genetici in pazienti con trombosi venosa profonda idiopatica ricorrente e trombosi dei seni venosi cerebrali mediante sequenziamento di un pannello costituito da 737 geni emostatici/infiammatori (studio MILES). L'analisi dei dati di sequenziamento è attualmente in corso.
- Studi sistematici dell'esoma mediante NGS per l'individuazione di nuovi fattori di rischio genetici in pazienti con trombosi dei seni venosi cerebrali ed in pazienti con trombosi venose splancniche.
- Individuazione di nuovi fattori di rischio genetici in pazienti affetti da PTT mediante genotipizzazione su piattaforma Illumina Immunochip. Otto varianti sono state individuate; uno studio di replicazione mediante saggi TaqMan e PCR quantitativa è attualmente in corso.

Nel futuro si prevede di sviluppare nuovi studi comprendenti analisi basate su NGS dei miRNA per l'individuazione di nuovi biomarcatori molecolari in pazienti con trombosi venosa profonda idiopatica e PTT idiopatica. Inoltre, si prevedono studi dell'esoma con l'obiettivo di identificare i geni causali di patologie emorragiche rare e piastrinopatie ad eziologia sconosciuta.

Gli strumenti utilizzati/necessari in questo ambito di ricerca sono:

- StepOnePlus Real-Time PCR System, Life Technologies (già disponibile)
- Sequenziatore ABI PRISM 3130™ Genetic Analyzer (già disponibile)
- Infrastruttura informatica per lo storage e l'analisi di dati NGS (parzialmente disponibile)
- Sequenziatori Illumina MiSeq e HiSeq (non disponibile)
- Piattaforma Affymetrix per microarray (disponibile presso Unità Neri)

## Genomica Funzionale

Per tutte le malattie della coagulazione a trasmissione mendeliana in esame presso la UOC, dopo aver effettuato la caratterizzazione molecolare e trovato la mutazione nel gene responsabile della patologia, vengono effettuati degli studi *in vitro* per stabilire come lo specifico difetto genetico individuato possa determinare un'alterazione a livello dei suoi prodotti genici, sia a livello di RNA che di proteina. Tali studi prevedono la trasfezione del vettore contenente la sequenza mutata di interesse in linee cellulari, l'analisi dell'espressione e/o dei pathway di secrezione delle proteine codificate e la purificazione e caratterizzazione biochimica e funzionale di quest'ultime. In questi studi inoltre, vengono valutati gli effetti che i difetti genetici individuati hanno sul fenotipo cellulare, in termini ad esempio di attivazione di specifici pathway molecolari.

In passato, presso la nostra UOC, queste metodologie sono state applicate principalmente a patologie dell'emostasi ereditarie a trasmissione mendeliana in cui il gene responsabile è noto (e.g., malattia di von Willebrand, malattie rare della coagulazione, PTT congenita). Nel prossimo futuro studi di genomica funzionale saranno effettuati per verificare che i geni candidati (siano essi codificanti o non, come miRNA o lncRNA) e pathway molecolari emersi da studi di associazione genetica *genome-wide*, abbiano un ruolo causale nelle patologie della coagulazione multifattoriali a cui risultano essere associati.

Gli strumenti utilizzati/necessari in questo ambito di ricerca sono:

- Stanza sterile allestita con più cappe a flusso laminare per le colture eucariotiche primarie/immortalizzate (cappe già disponibili, ma attualmente posizionate in ambienti diversi)
- Incubatori a CO<sub>2</sub> (già disponibili, parzialmente obsoleti)
- Agitatore termostato ed incubatori per colture batteriche (già disponibile)
- Ultracentrifuga RC513, Sorvall (già disponibile)
- Microscopio confocale con sistema di live-cell imaging ed apparecchiature per lo studio di colture cellulari in condizioni di flusso (camera a flusso, pompa peristaltica) (non disponibile)
- Citofluorimetro a flusso (Becton Dickinson a 4 canali, già disponibile) e cell sorter (non disponibile)
- Luminometro (non disponibile)
- StepOnePlus Real-Time PCR System, Life Technologies (già disponibile)
- FPLC, AKTA Purifier UPC10, GE Healthcare (già disponibile)
- Biosensore SPR, Biacore X100, GE Healthcare (già disponibile)

- Spettrofluorimetro Infinite F200 PRO, Tecan (già disponibile)
- Sistema di acquisizione e analisi di immagini per DNA, proteine, G:BOX, Syngene (già disponibile)
- Spettrometro di massa (non disponibile)

#### Diagnosi prenatale non invasiva

Un'area di ricerca della UOC è rivolta alla diagnosi genetica prenatale non invasiva di patologie gravi monogeniche a trasmissione mendeliana, quali l'emofilia. Tale approccio diagnostico sta infatti evolvendo molto rapidamente negli ultimi anni grazie alla scoperta della presenza di cellule fetali e di DNA fetale libero nel circolo materno ed allo sviluppo di tecnologie sempre più sensibili per il loro isolamento e caratterizzazione molecolare.

Gli strumenti utilizzati/necessari in questo ambito di ricerca sono:

- StepOnePlus Real-Time PCR System, Life Technologies (già disponibile)
- Sequenziatore ABI PRISM 3130™ Genetic Analyzer (già disponibile)
- Citofluorimetro a flusso e cell sorter (non disponibile)
- Droplet Digital PCR (non disponibile)

#### Immunologia

Lo sviluppo di alloanticorpi in seguito al trattamento con concentrati di fattore VIII nell'emofilia A e di autoanticorpi nella PTT autoimmune sono oggetto di numerosi studi condotti presso la nostra UOC. Parallelamente agli studi di associazione genetica *genome-wide* descritti in precedenza, vengono sviluppati ed utilizzati test biochimici per lo studio dell'immunogenicità di concentrati di fattore VIII utilizzati nella terapia dell'emofilia e per la caratterizzazione della risposta anticorpale in pazienti con PTT autoimmune.

Questi studi sono basati sull'applicazione di diverse metodologie (metodi immunoenzimatici in stato solido e soluzione, saggi FRET, metodi basati su spettrometria di massa) e prevedono:

- Caratterizzazione funzionale e quantitativa di allo-/auto-anticorpi: misurazione della capacità inibente (o meno) l'attività biologica dell'antigene verso cui sono diretti mediante saggi di inattivazione.
- Valutazione quantitativa e caratterizzazione biochimica della classe immunoglobulinica (IgG, IgA, IgM) e sottoclasse delle IgG (IgG 1, 2, 3, 4) mediante test immunoenzimatici in stato solido (ELISA) ed in soluzione (piattaforme multiplex Luminex).

- Caratterizzazione della specificità anticorpale (epitope mapping) avvalendosi di metodi quali Western blot, ELISA, spettrometria di massa e l'utilizzo di peptidi ricombinanti.

Gli strumenti utilizzati/necessari in questo ambito di ricerca sono:

- Coagulometro (già disponibile)
- Spettrofotometri a cuvetta (NanoDrop 2000C Thermo Scientific (già disponibile) e a piastre (Multiskan Ascent Thermo Scientific, già disponibile)
- Spettrofluorimetro Infinite F200 PRO, Tecan (già disponibile)
- FPLC, AKTA Purifier UPC10, GE Healthcare (già disponibile)
- Sistema di acquisizione e analisi di immagini, G:BOX, Syngene (già disponibile)
- Piattaforma Luminex 100, Luminex Corporation (già disponibile)
- Stanza e strumentazione per il clonaggio
- Camera cellulare per la produzione di proteine ricombinanti
- Spettrometro di massa per la caratterizzazione degli epitopi (NON disponibile)

Per il raggiungimento di risultati più completi e competitivi, auspichiamo la possibilità di avvalerci della strumentazione e del personale esperto nella spettrometria di massa già presente in Policlinico.

#### Malattie rare

Da più di 15 anni la nostra UOC è impegnata nella raccolta di dati clinici, di laboratorio e sul trattamento di pazienti affetti da malattie rare della coagulazione per rispondere a quesiti clinici ancora irrisolti. Abbiamo avuto il merito di sviluppare il primo registro europeo retrospettivo per le malattie rare della coagulazione (EN-RBD, <http://www.rbdd.eu/>), ora trasformato a livello mondiale nel registro prospettico PRO-RBDD (<http://eu.rbdd.org>). Attualmente i database sono ospitati in un server della Fondazione Luigi Villa. Data la sempre maggiore richiesta di adesione ai registri da parte di diversi centri nel mondo, si rende necessario l'ampliamento della capacità del server e dei relativi sistemi di sicurezza e protezione, sistemi informatici di cui il laboratorio di post-genomica che si intende costituire potrà essere fornito. L'esperienza nella gestione di grandi quantità di dati, nonché le competenze epidemiologiche e statistiche acquisite nel disegno degli studi e nell'analisi dei risultati sono un sicuro valore aggiunto nella costituzione del laboratorio di ricerca auspicata nel presente documento.

#### *Finanziamenti in corso*

- Ricerca finalizzata 2012, progetti ordinari, Ministero della Salute: "GENome-wide association study to Evaluate genetic risk factors for cerebral sinus-venous thromboSIS (GENESIS Study)".
- Ricerca finalizzata 2012, progetti giovani ricercatori, Ministero della Salute: "Genetic mutations in the encoding gene and plasmatic activity of the hemostatic metalloprotease ADAMTS13 in deep vein thrombosis".
- Progetto a concorso 2014-2015 Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico: "Mutazioni genetiche ed attività plasmatica della metalloproteasi emostatica ADAMTS13 nella trombosi venosa profonda".
- Bayer Hemophilia Award 2014: "Natural history of non-neutralizing antibodies".
- EUHANET project "PRO-RBDD database", supported by European Commission via its Executive Agency for Health and Consumers (EAHC).

#### *Progetti sottomessi*

- Ricerca finalizzata 2013, progetti ordinari, Ministero della Salute: "A study designed to replicate the whole-exome sequencing-mediated identification of novel variants involved in inhibitor development in severe Italian Hemophilia A patients".
- Ricerca finalizzata 2013, progetti ordinari, Ministero della Salute: Genome-wide Association study to evaluate genetic risk factors for Splanchnic-venous thrombosis (GASP Study)".
- Ricerca finalizzata 2013, progetti giovani ricercatori, Ministero della Salute: "Genetic predisposition in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura".
- Bayer Hemophilia Award 2015: "Replication study to validate risk factors involved in Inhibitor development in severe Hemophilia A".

#### Selezione bibliografica

Menegatti M, Vangone A, Palla R, Milano G, Cavallo L, Oliva R, De Cristofaro R, **Peyvandi F**. A recurrent Gly43Asp substitution in coagulation Factor X rigidifies its catalytic pocket and impairs catalytic activity and intracellular trafficking. *Thromb Res*. 2014;133:481-7.

Lotta LA, Valsecchi C, Pontiggia S, Mancini I, Cannavò A, Artoni A, Mikovic D, Meloni G, **Peyvandi F**. Measurement and prevalence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2014;12:329-36.

**Peyvandi F**, Kunicki T, Lillicrap D. Genetic sequence analysis of inherited bleeding diseases. *Blood* 2013;122:3423-31

Lotta LA, Tuana G, Yu J, Martinelli I, Wang M, Yu F, Passamonti SM, Pappalardo E, Valsecchi C, Scherer SE, Hale W 4th, Muzny DM, Randi G, Rosendaal FR, Gibbs RA, **Peyvandi F**. Next-generation sequencing study finds an excess of rare, coding single nucleotide variants of ADAMTS13 in patients with deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2013;11:1228-39.

Pagliari MT, Baronciani L, García Oya I, Solimando M, La Marca S, Cozzi G, Stufano F, Canciani MT, Peyvandi F. A synonymous (c.3390C>T) or a splice-site (c.3380-2A>G) mutation cause exon 26 skipping in four patients with von Willebrand disease (2A/IIIE). J Thromb Haemost 2013;11:1251-9

#### **Unità di Ricerca gruppo IMAGO (Luisa Ottobriani)**

Il gruppo di ricerca IMAGO si occupa da anni dello sviluppo di modelli cellulari e animali per lo studio in vivo di processi molecolari e popolazioni cellulari specifiche mediante diverse tecniche di imaging non invasivo (Bioluminescenza/fluorescenza, tecniche nucleari, risonanza magnetica).

Il gruppo è costituito da un Ricercatore confermato (Luisa Ottobriani), un tecnico D1 a tempo determinato (Cristina Martelli), un dottorando (Cecilia Diceglie), un professore di prima fascia (Giovanni Lucignani).

Il gruppo si occupa di produrre costrutti reporter con promotori costitutivi o inducibili che regolano l'espressione di geni reporter rilevabili in vivo come la Luciferasi e mCherry, di trasferire tali costrutti in linee cellulari specifiche (tumorali o staminali) e di valutarne l'espressione e gli effetti nel tempo in colture cellulari. Per quanto riguarda i modelli animali, il gruppo IMAGO è in grado di produrre modelli oncologici ortotopici e sottocutanei, e alcuni semplici modelli di danno (per esempio muscolare o vascolare). Tali modelli vengono poi valutati mediante tecniche di imaging non invasivo per quanto riguarda specifici processi molecolari (infiammazione, apoptosi, vascolarizzazione e angiogenesi, ipossia etc), e per quanto riguarda l'espressione del gene reporter mediante imaging ottico (Bioluminescenza/Fluorescenza).

Nell'ambito della proposta progettuale tale gruppo potrebbe contribuire nello sviluppo di costrutti contenenti geni target e geni reporter da utilizzare nelle diverse fasi dell'analisi, dalla costituzione del modello cellulare presentante la deregolazione, alla validazione dei risultati ottenuti da studi in silico. Le attrezzature a cui si fa riferimento sono quelle necessarie per il clonaggio, il trasferimento genico nella linea cellulare di interesse, lo studio quantitativo dell'espressione dei reporter fluorescenti e bioluminescenti in cellule vitali (luminometro/fluorimetro).

In questo ambito nel laboratorio già a disposizione sono disponibili le strumentazioni necessarie per clonaggio e trasfezione. Al contrario, lo studio dell'espressione di reporter e di target cellulari specifici dovrà essere svolto nell'ambito degli spazi richiesti utilizzando tecniche di microscopia a fluorescenza, confocale, o ancor meglio, microscopia con CCD raffreddata come nel LV-200

Olympus. Allo stesso tempo tecniche che permettano valutazioni molecolari come western blot, Realtime PCR, ELISA, analisi citofluorimetriche e colorazioni immunoistochimiche dovranno essere disponibili nell'ambito dello stesso piano sperimentale al fine di ottenere dati quantitativi.

Per quanto riguarda i modelli animali, la strumentazione disponibile non può essere trasferita (abbiamo necessità di stanze dedicate in stabulario per il mantenimento degli animali da esperimento e per gli strumenti e devono essere nella stessa sede di produzione delle cellule da somministrare) ma potrà essere utilizzata nell'ambito di collaborazioni scientifiche. In dettaglio è disponibile un sistema di iniezione stereotassica per topo, e due strumenti per imaging ottico: l'IVIS LUMINA e l'IVIS SPECTRUM/CT. Mentre il primo fornisce solo immagini 2D di bioluminescenza e fluorescenza, il secondo strumento, molto più sensibile, permette ricostruzioni 3D delle immagini e sovrapposizione dei segnali luminosi con l'immagine TAC per la localizzazione anatomica dei segnali. Abbiamo inoltre sviluppato da anni collaborazioni con importanti centri di ricerca di imaging in piccoli animali con cui applichiamo procedure di imaging multimodale (risonanza magnetica e PET/SPECT).

Attualmente, il gruppo di ricerca è coinvolto nel seguente progetto riguardante lo studio del glioblastoma

Identificazione e studio di biomarcatori per la valutazione non-invasiva della risposta al trattamento in modelli murini di Glioblastoma Multiforme.

Il Glioblastoma Multiforme (GBM) è una delle forme tumorali più difficili da rimuovere chirurgicamente e meno responsive ai trattamenti basati su chemio e radioterapia. Per questa ragione, ad oggi si sente la necessità di nuove strategie terapeutiche e di individuare biomarcatori che permettano di stimarne precocemente l'efficacia, anche in vista di un'ottimizzazione personalizzata del trattamento. Biomarcatori rilevabili con tecniche di imaging non-invasivo (chiamati Biomarcatori visualizzabili) sono stati proposti con un ruolo teragnostico volto all'identificazione e alla caratterizzazione precoce della malattia, alla scelta del protocollo terapeutico migliore e allo studio precoce della risposta al trattamento. L'ipossia è una caratteristica tipica del GBM e principale causa di resistenza alla radio e chemio terapia; l'attività di HIF-1 $\alpha$  è la principale modalità con cui la cellula risponde ad uno stato ipossico inducendo l'espressione di geni coinvolti nella progressione tumorale.

Risultati preliminari ottenuti dal gruppo di ricerca in modelli murini ortotopici di glioblastoma umano, hanno permesso di identificare potenziali biomarcatori di efficacia del trattamento (attività di fattori di trascrizione, espressione di molecole di superficie e stimolo di specifiche



attività enzimatiche). Dal momento che il meccanismo con cui tali modificazioni avvengono e il significato della modulazione non sono ancora del tutto chiariti, l'obiettivo del lavoro è quello di studiare i meccanismi molecolari che sono alla base delle modulazioni osservate e di valutarne l'importanza anche come nuovi potenziali target terapeutici.

Lo scopo di questo progetto è l'identificazione e lo studio (in colture cellulari, in modelli animali e in campioni tissutali umani) di possibili nuovi biomarcatori di risposta a trattamento nel GBM e la loro valutazione come potenziali nuovi bersagli farmacologici. In questo progetto, utilizzando biomarcatori non invasivi, verranno valutate diverse opzioni di trattamento con l'obiettivo di migliorare la risposta anti-neoplastica anche in condizioni di resistenza alla TMZ, nel contesto di un protocollo terapeutico personalizzato. L'utilizzo di tecniche di imaging potenzialmente trasferibili alla clinica assicura un più semplice trasferimento clinico dei risultati ottenuti.

Due diverse linee cellulari di glioma umano (U251 e T98, rispettivamente responsive e non responsive alla TMZ) saranno geneticamente modificate per esprimere il reporter fluorescente mCherry in maniera costitutiva, e il reporter Luciferasi sotto controllo di specifici fattori di trascrizione o processi molecolari. La crescita dei tumori verrà studiata sia in colture cellulari, utilizzando saggi biochimici, che in modelli murini ortotopici, mediante imaging ottico, dopo trattamenti con diversi farmaci. Oltre alla vitalità cellulare, saranno studiate diverse caratteristiche tumorali come l'ipossia, la perfusione, l'angiogenesi e l'infiltrato infiammatorio utilizzando sonde fluorescenti disponibili in commercio e specifiche per i diversi processi presi in esame. I modelli murini verranno inoltre studiati in modo non-invasivo sia mediante imaging ottico che con tecniche di imaging già utilizzabili in clinica, analizzando biomarcatori visualizzabili potenzialmente correlati alla risposta a trattamento e trasferibili alla clinica. In particolare, verrà valutata l'ipossia intra-tumorale, il tasso di proliferazione cellulare, l'angiogenesi e l'apoptosi. Campioni derivanti da gliomi umani verranno infine utilizzati per definire in vitro una procedura per la valutazione personalizzata della responsività del tumore ai diversi trattamenti.

La validità dei marcatori identificati e il meccanismo molecolare del loro coinvolgimento verranno studiati in vitro, al fine di identificare anche potenziali nuovi target terapeutici o ipotizzare combinazioni farmacologiche mirate all'ottimizzazione della risposta.

I risultati attesi coinvolgono diversi aspetti della terapia del glioma, come la stima precoce della risposta del tumore al trattamento, la creazione di una procedura non invasiva per l'ottimizzazione dello schema terapeutico e l'identificazione di un nuovo potenziale bersaglio farmacologico. Un approccio di studio non-invasivo multimodale verrà utilizzato per convalidare il valore dei

biomarcatori identificati per un futuro utilizzo nella pianificazione di un trattamento personalizzato.

#### *Progetti in corso finanziati*

- 7PQ collaborative project titled "Development of an integrated SPECT/MRI system for enhanced stratification of brain tumour patients prior to patient-specific radio-chemotherapy and early assessment of treatment efficacy" 2013-2017 nel quale Luisa Ottobrine è responsabile di unità per l'Università degli studi di Milano.
- AIRC IG2014: "Multimodal imaging approach for identification of new potential biomarker for treatment response in glioma models" in cui la Luisa Ottobrine è collaboratore. (PI: Rosamaria Moresco, Fondazione Tecnomed);
- CARIPLO Giovani Ricercatori 2014: "The functional importance of V-ATPase upregulation in human gliomas" in cui Luisa Ottobrine è collaboratore. (PI: Valentina Vaira, Fondazione INGM).

**Ottobrine L**, Carelli S, Diceglie C, Lui R, Merli D, Giallongo T, Degrassi A, Russo M, **Marfia G**, Gianelli U, Bosari S, Clerici M, Di Giulio A. M, Lucignani G, Gorio A. Magnetic Resonance Imaging of Stem Cell Transplantation in Injured Mouse Spinal Cord. *CellR4* 2014; 2 (3): e963.

Cianciaruso C, Pagani A, Martelli C, Bacigaluppi M, Squadrito ML, Lo Dico A, De Palma M, Furlan R, Lucignani G, Falini A, Biffi A, **Ottobrine L**, Politi LS. Cellular magnetic resonance with iron oxide nanoparticles: long-term persistence of SPIO signal in the CNS after transplanted cell death. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(10):1457-74.

Diana V, Libani IV, Armentero MT, Blandini F, Lucignani G, Silani V, Cova L, **Ottobrine L**. A reliable indirect cell-labelling protocol for optical imaging allows ex vivo visualisation of mesenchymal stem cells after transplantation. *Arch Ital Biol*. 2013 Sep;151(3):114-25.

Lo Dico A, Valtorta S, Martelli C, Belloli S, Gianelli U, Tosi D, Bosari S, Degrassi A, Russo M, Raccagni I, Lucignani G, Moresco RM, **Ottobrine L**. Validation of an engineered cell model for in vitro and in vivo HIF-1 $\alpha$  evaluation by different imaging modalities. *Mol Imaging Biol*. 2014 Apr;16(2):210-23.

Libani IV, Lucignani G, Gianelli U, Degrassi A, Russo M, Bosari S, Clerici M, **Ottobrine L**. Labeling protocols for in vivo tracking of human skeletal muscle cells (HskMCs) by magnetic resonance and bioluminescence imaging. *Mol Imaging Biol*. 2012 Feb;14(1):47-59.

#### **Unità di Neurochirurgia Sperimentale e Terapia Cellulare/Aeronautica Militare (Giovanni Marfia)**

In linea con i notevoli progressi compiuti negli ultimi anni nell'ambito della biologia cellulare e molecolare, il Laboratorio di Neurochirurgia Sperimentale e Terapia Cellulare, afferente

all'Unità Operativa di Neurochirurgia, si propone di sviluppare terapie personalizzate per approcci mirati alla cura delle patologie neoplastiche e degenerative del sistema nervoso.

In ambito oncologico, lo studio del potenziale proliferativo, delle caratteristiche di autorinnovamento delle cellule staminali, come la capacità della sopravvivenza e di resistenza alle terapie farmacologiche, radio e chemioterapiche delle cellule staminali tumorali isolate da biopsie cerebrali di pazienti affetti da glioblastoma, offre la possibilità di investigare il fenotipo tumorale di una cellula staminale per offrire possibilità di sviluppo di terapie mirate alla eradicazione del tumore.

Al contempo si stanno sviluppando terapie alternative, quali la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale, mirate alla rigenerazione delle cellule danneggiate dal danno ed alla reidratazione del tessuto per il recupero funzionale del deficit causato dalle sintomatologie patologiche.

#### ***Competenze scientifiche offerte dal Laboratorio di Neurochirurgia Sperimentale e Terapia Cellulare per le finalità scientifiche della Fondazione***

Competenza specifica del Laboratorio di Neurochirurgia Sperimentale e Terapia Cellulare è l'estrazione di stipti cellulari da tessuti umani, biopsie operatorie, prelievi ematici e citologici con caratteristiche staminali potenzialmente utilizzabili per un impiego terapeutico nell'approccio restorativo di patologie di tipo degenerativo o cronico infiammatorie.

Altresì l'attività del gruppo del dr. Marfia si basa sull'allestimento di piattaforme cellulari paziente-specifiche a valore diagnostico-prognostico-terapeutico per la personalizzazione delle terapie farmacologiche complesse in relazione ai diversi fenotipi patologici, mediante l'integrazione col genoma-epigenoma-metaboloma del singolo paziente nelle malattie rare e neoplastiche. Quest'ultima peculiarità rende conto delle numerose evidenze scientifiche, dell'esperienza maturata nel corso degli anni su studi clinico-epidemiologici da un versante, e da riscontri legati alla ricerca di base che forniscono, a parità di diagnosi clinica, diversi pattern molecolari di malattia, come nel caso dei tumori cerebrali. Da tali presupposti si evince, pertanto, la necessità di una integrazione sistematica tra la clinica e la diagnosi avanzata, per l'allestimento di percorsi terapeutici efficaci basati sull'effettiva individuazione dei bersagli molecolari e funzionali di malattia sia nelle terapie di primo livello, che nelle fasi successive. Da osservazioni scientifiche, infatti, stanno emergendo nuove considerazioni sul fatto che nelle malattie neoplastiche, per

esempio, i protocolli terapeutici modificano essi stessi l'epigenetica della malattia, rendendo la recidiva, una malattia a volte del tutto diversa dalla malattia primitiva.

Il banking e la caratterizzazione delle cellule staminali sane e patologiche dai diversi tessuti di interesse e per ciascun paziente nelle diverse fasi della malattia, rappresentano un potente strumento diagnostico, prognostico e terapeutico a servizio della gestione clinica del paziente da utilizzare in sinergia con le moderne tecniche diagnostiche e da condividere tra le diverse UU.OO. della Fondazione al fine di garantire un approccio integrato multidisciplinare ad elevato impatto clinico-assistenziale, consentendo una allocazione mirata delle risorse e riducendo gli oneri a carico del SSN.

Negli ultimi anni, il gruppo di ricerca ha messo a punto protocolli specifici per l'isolamento e la purificazione della componente endoteliale da tessuti umani adulti sani e patologici, che consente di riprodurre *in vitro* per un numero di passaggi indefiniti il compartimento vascolare specifico per il tessuto di origine partendo da un micro frammento *ex vivo*. Si tratta di un sistema innovativo, che supera le difficoltà legate al fatto che le cellule dei vasi sanguigni sani e in particolare del tumore potevano essere tenute in coltura solo per un tempo insufficiente e in numero troppo ristretto per individuare la terapia personalizzata più adatta a ogni singolo paziente. Tale tecnica ha portato al deposito di un brevetto internazionale e consente, in ambito oncologico, di individuare in laboratorio i farmaci più efficaci per ogni paziente quasi fosse un "antibiogramma" per uno screening efficace e clinicamente proponibile per lo sviluppo di un approccio medico personalizzato in neuro-oncologia. Le colture di cellule endoteliali cerebrali per esempio, rappresentano un modello unico e insostituibile per lo studio *in vitro* delle caratteristiche di questo "sistema" coinvolto in numerosi processi, quali l'infiammazione, la rigenerazione e l'angiogenesi aberrante coinvolta in numerose patologie. Con questa tecnica è quindi possibile conoscere non solo le peculiarità del sistema vascolare tessuto-specifico umano in termini di meccanismi fisiologici di sviluppo, conservazione e invecchiamento ma anche ottenere informazioni sugli aspetti patologici delle malattie genetiche e acquisite dei vasi quali le malformazioni artero-venose, gli aneurismi, studiare il contributo del comparto vascolare nella manifestazione dei diversi fenotipi di malattie ereditarie.

A completare l'elenco degli interessi scientifici del Laboratorio di Neurochirurgia Sperimentale e Terapia Cellulare, meritano particolare menzione lo studio di tutti quei meccanismi che potenziano l'azione delle cellule staminali, come l'ipossia, le variazioni metaboliche e le stimolazioni fisiche costituite da applicazioni di ultrasuoni o di campi elettromagnetici e i riarrangiamenti cellulari indotti da questi ultimi.

### ***Convenzione Fondazione Ca' Granda-Aeronautica Militare***

Nel corso di un recente incontro con i rappresentanti del Corpo Sanitario Aeronautico, si è discusso delle linee di ricerca, soprattutto nel campo delle patologie neurologiche, affrontate presso il Laboratorio di Neurochirurgia Sperimentale e Terapia Cellulare della Fondazione, e dell'interesse dell'Aeronautica Militare per le possibili positive ricadute che queste ricerche potrebbero avere a tutela della salute anche del personale militare. E' in fase di approvazione definitiva, dopo aver ricevuto parere favorevole dallo Stato Maggiore della Difesa, l'accordo di convenzione tra l'Aeronautica Militare e l'IRCCS. Tale convenzione si rende possibile data anche la circostanza favorevole costituita dal fatto che Marfia, responsabile del Laboratorio di Neurochirurgia Sperimentale e Terapia Cellulare è tenente del Corpo Sanitario dell'Aeronautica Militare. Risulta pertanto di interesse strategico la collaborazione tra le suddette istituzioni che si ritiene possa essere foriera di importanti sviluppi nella tutela della salute del personale militare, in particolare di quello navigante, soprattutto per le problematiche relative a patologie della colonna vertebrale che interessano il personale di volo; senza tralasciare le enormi potenzialità che queste nuove linee di ricerca possono offrire sia nel prosieguo dell'attività umana spaziale che nella possibilità di cura delle lesioni croniche causate al sistema osteoarticolare dalla attività di volo oppure dei traumi o ustioni acute, tra le maggiori emergenze possibili in ambiente operativo. A questo proposito è possibile prospettare l'ipotesi che la collaborazione con l'Aeronautica Militare si estenda successivamente anche al campo clinico e assistenziale.

### ***Composizione del team del Laboratorio di Neurochirurgia Sperimentale e Terapia Cellulare***

Attualmente il gruppo è costituito da 8 unità di cui 5 completamente dedicate: un Ricercatore della Fondazione (medico e biologo), un senior investigator (biologo), 2 specializzandi e 1 ricercatore volontario senior (medico).

### ***Progetti attualmente in corso:***

- Validazione del potenziale trofico e rigenerativo di cellule mesenchimali da tessuto adiposo nella patologia degenerativa del disco intervertebrale e nella neuroinfiammazione

Lo studio della sicurezza ed efficacia della terapia restorativa basata sull'utilizzo di cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo (ADSCs) apre nuove prospettive nell'ambito della medicina transazionale. Questo approccio risulta infatti non solo applicabile alla degenerazione discale, ma estendibile alla lesione midollare acuta e cronica, sfruttando il potere immunomodulante delle cellule trapiantate nelle prime fasi e successivamente l'azione neurotrofica e rigenerativa a lungo termine. Recenti studi hanno dimostrato che la elettromagnetoterapia, ovvero la terapia basata sull'utilizzo di campi elettromagnetici (CEM), può essere considerata come terapia alternativa ai trattamenti farmacologici nella radiculopatia lombare causata da degenerazione discale. Tale terapia, infatti, agendo sui radicali liberi, sugli oligoelementi e sulle sostanze ferromagnetiche dell'ambiente intracellulare, risulta essere di importanza fondamentale per l'equilibrio omeostatico della cellula. Essa promuove un'accelerazione di tutti i fenomeni riparatori con netta azione biorigenerante, antinfiammatoria, antiedemigena e antalgica senza effetti collaterali. Tuttavia, una eventuale esposizione ad un campo alterato può comportare ripercussioni di incalcolabile entità per la cellula stessa. Ad oggi i meccanismi di azione dei CEM su ADSCs non sono ancora stati definiti. Da tali premesse, questo progetto di ricerca si prefigge di identificare e chiarire l'azione e il ruolo dei CEM sulle ADSCs in termini di sopravvivenza, proliferazione cellulare, sintesi delle proteine coinvolte nel differenziamento condrogenico e nella deposizione della ECM discale. Verranno applicati CEM pulsati a bassa frequenza per tempi diversi e verrà eseguita analisi dell'espressione genica e proteica sulle cellule controllo e trattate. Altresì verrà allestito un modello traumatico di degenerazione discale, riprodotto nel ratto. Le cellule controllo e trattate con CEM verranno trapiantate nei dischi degenerati e in quelli adiacenti e monitorate per 3 mesi fino al termine del follow up clinico. In quest'ottica questo progetto di ricerca mira a definire i tempi e le frequenze delle onde elettromagnetiche da impiegare sulle ADSCs, valutando gli effetti sulla citotossicità, il riarrangiamento cellulare, e il differenziamento verso fenotipo della ECM discale.

- **Identificazione di biomarcatori sierici e nuovi target cellulari nei pazienti affetti da glioblastoma multiforme**

in collaborazione con l'Unità di Metabolomica (Laura Riboni) e Unità Coordinamento Laboratori di Ricerca (Monica Miozzo)

La crescita e la progressione dei gliomi sono dipendenti da una sottopopolazione specializzata di cellule tumorali chiamate "cancer stem cells" (CSCs). Le CSCs sono chemio e radio resistenti, sono responsabili delle recidive e pertanto dovrebbero costituire un importante bersaglio della target

therapy, ma i meccanismi che sottendono alla loro biologia sono ancora poco noti. L'ipossia, attraverso la via dell'Hypoxia-inducible factor (HIF) e degli sfingolipidi, gioca un ruolo chiave per il controllo della crescita tumorale e dell'angiogenesi e rappresenta, forse, il meccanismo di adattamento più efficace del tumore stesso. In questo studio viene favorita l'evidenza che il microambiente ipossico regoli lo stato delle CSCs, influenzando la risposta ai trattamenti farmacologici.

Obiettivo del progetto è quello di caratterizzare i meccanismi coinvolti nel metabolismo sfingolipidico, in grado di conferire resistenza ai farmaci nel glioblastoma multiforme. In particolare questo progetto si focalizzerà sullo studio delle CSCs e delle cellule endoteliali derivate e coltivate in ambiente ipossico, riproducendo così il microambiente tumorale *in vivo*, allo scopo di individuare possibili strategie terapeutiche alternative a quelle attuali. La realizzazione di tale obiettivo prevede le seguenti fasi:

task 1: identificazione di nuovi markers del metabolismo sfingolipidico tra le seguenti molecole: S1P, Sfingosina chinasi 1 e 2 (SphK 1 e 2), trasportatori e recettori di S1P.

task 2: studio del metabolismo sfingoide e sfingolipidico e del signaling con l'identificazione di inibitori di S1P e SphK1 e 2.

task 3: preparazione di nanoparticelle (liposomi) veicolanti molecole inibitorie dei markers di resistenza ai farmaci identificati nella Task 1 del progetto e "funzionalizzate" sulla superficie con ligandi specifici per il targeting delle CSCs, anch'essi individuati nella Task 1 del progetto. Verranno condotti studi di caratterizzazione in termini di proprietà chimico-fisiche (quali dimensioni, carica superficiale, stabilità in fluidi biologici), biocompatibilità (mediante valutazione di apoptosi/necrosi, rilascio di ossido nitrico, markers di infiammazione), efficienza di targeting. Verranno eseguite prove di superamento della barriera ematoencefalica per valutare il meccanismo di transitosi di farmaci incorporati in nanoparticelle attraverso modelli in vitro di barriera ematoencefalica.

### ***Progetti Finanziati***

- Ministero della Salute (2015 - 2016): "Validazione del potenziale trofico e rigenerativo di cellule mesenchimali da tessuto adiposo nella patologia degenerativa del disco intervertebrale"

- Ministero della Salute 5x1000 (2015): "Identificazione di nuovi target coinvolti nella sopravvivenza e chemioresistenza delle cellule staminali tumorali isolate da pazienti affetti da glioblastoma multiforme".
- BD Bioscience - Stem Cell Research (2015): "Human Glioblastoma Stem Cells and Endothelial Cells-derived: Identification of Novel Markers".
- Associazione degli Amici della Clinica Neurochirurgica (2015 - 2016) contributo per il progetto: "isolamento e caratterizzazione delle cellule staminali tumorali da pazienti affetti da Glioblastoma Multiforme".

### ***Progetti sottomessi***

- Ricerca Finalizzata Giovani Ricercatori Ministero della Salute: "The role of cytomegalovirus and sphingosine-1-phosphate cross-talk on stemness and aggressiveness of glioblastoma multiforme: an integrated molecular and bioinformatic approach to derive molecular mechanisms and therapeutic implications"
- Ricerca Finalizzata Giovani Ricercatori Ministero della Salute: "Identification of potential glioblastoma-associated autoantibodies: definition of new circulating biomarkers and development of anti-angiogenic multitarget therapies"

### ***Strumenti utilizzati/necessari per lo svolgimento dell'attività di ricerca***

- Sistema per l'allestimento e mantenimento di colture cellulare a tensione di ossigeno modulabile 1-21% (disponibile)
- Sistema di stimolazione con campi elettromagnetici per campioni tissutali/cellulari/modelli animali (disponibile)
- Microscopio ottico (disponibile)
- Camera sterile per colture cellulari (non disponibile)
- Sistema per western blotting (disponibile)
- Spettrofotometro/lettore piastra elisa (non disponibile)
- Citofluorimetro/cell sorter (non disponibile)
- Infrastruttura informatica per l'analisi dei dati sperimentali (disponibile)

- Postazioni computers (disponibile)
- Agitatore termostato (disponibile)
- Sistema di incubazione termostato per immunoistochimica/immunofluorescenza (disponibile)
- Microscopio fluorescenza e confocale (non disponibile)
- Sistema per PCR quantitativa e semiquantitativa (non disponibile)

#### Selezione bibliografica

**Marfia G**, Campanella R, Navone SE, Zucca I, Scotti A, Figini M, Di Vito C, Alessandri G, **Riboni L**, Parati E. Potential use of human adipose mesenchymal stromal cells for intervertebral disc regeneration: a preliminary study on biglycan-deficient murine model of chronic disc degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2014 Oct 8;16:457-9.

**Marfia G**, Navone SE, Di Vito C, Tabano S, Giammattei L, Di Cristofori A, Gualtierotti R, Tremolada C, Zavanone M, Caroli M, Torchia F, **Miozzo M**, Rampini P, **Riboni L**, Campanella R. Gene expression profile analysis of human mesenchymal stem cells from herniated and degenerated intervertebral discs reveals different expression of osteopontin. *Stem Cells Dev*. 2014 Oct 29.

**Marfia G**, Campanella R, Navone SE, Di Vito C, Riccitelli E, Giussani P, Abdelhadi L, Bornati A, de Rezende G, Viani P, Rampini P, Alessandri G, Parati EA, **Riboni L**. Autocrine/paracrine sphingosine-1-phosphate fuels proliferative and stemness qualities of glioblastoma stem-like cells. *Glia*. 2014 Dec;62(12):1968-81.

**Marfia G**, Carelli S, Giallongo T, Merli D, Ottobrini L, Degraffi A, Basso DM, Giulio AM, Gorio A. Exogenous Adult Post Mortem Neural Precursors attenuate secondary degeneration, and promote myelin sparing and functional recovery following experimental spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2014 Oct 8. E-pub.

Dossena M, Bedini G, Rusmini P, Canazza A, Giorgetti E, Tosetti V, Salsano E, Sagnelli A, Navone SE, **Marfia G**, Alessandri G, Corsi F, Parati EA, Pareyson D, Poletti A. Human Adipose-derived mesenchymal stem cells as a new model of spinal and bulbar muscular atrophy. *PlosOne*. 2014 Nov 13;9(11):e112746

#### **Unità di Metabolomica (Laura Riboni)**

L'unità di metabolomica si propone la caratterizzazione biochimica di campioni biologici mediante lo sviluppo e l'integrazione di piattaforme metabolomiche. E' applicabile a tessuti, cellule e fluidi biologici (siero, plasma, urine, liquor, saliva,...). I campi di applicazione sono in ambito clinico e diagnostico (identificazione di nuovi biomarcatori, acquisizione di profili quali-quantitativi di biomarcatori, stratificazione di pazienti con diverse patologie, prognosi, e terapie personalizzate). L'unità di metabolomica, anche se con ampie potenzialità di campi d'applicazione, ad oggi è orientata ai seguenti ambiti di ricerca e clinici: neuroscienze, oncologia, ematologia, malattie neurodegenerative.

Il gruppo di ricerca è composto da 2 assegnisti, 2 specializzandi e 1 unità di personale tecnico.

**L'attrezzatura/strumentazione** dell'Unità di Metabolomica comprende:

- Colture cellulari: unità completa per culture in vitro, incubatore termostato, contenitore criogenico per azoto liquido (disponibili).
- Microscopia: microscopio a contrasto di fase (disponibile), a fluorescenza e confocale (non disponibili).
- Attrezzatura di base per biologia molecolare e biochimica (disponibile).
- Analisi qualitative: Unità completa per Western Blotting (disponibile).
- Analisi quantitative: spettrofotofluorimetro, lettore di micropiastre multi-rivelatore (disponibile), unità RT-PCR (disponibile), cromatografo planare (HPTLC-MS) (non disponibile).
- Spettrometria: spettrometro di massa accoppiato a gas cromatografo/cromatografo liquido (GC-MS, UPLC-MS) per analisi metabolica di campioni biologici tissutali, cellulari e fluidi, spettrometro MALDI per imaging di sezioni di tessuti (non disponibili).
- Metabolomica dinamica (sezione di radiochimica): contatore a scintillazione, autoradiografo digitale (non disponibili).

### **Progetti in corso**

Da anni la principale linea di ricerca è indirizzata allo studio del metabolismo, proprietà funzionali e ruolo in processi patologici dei lipidi cellulari, con particolare interesse alla classe degli sfingolipidi. Tali molecole, da tempo identificate quali componenti strutturali delle membrane cellulari, sono più di recente emerse come molecole biomodulatorie, in grado di esercitare potenti effetti regolatori. In particolare, due intermedi del metabolismo degli sfingolipidi, denominati rispettivamente ceramide e sfingosina-1-fosfato (S1P), sono emersi quali molecole cruciali nel controllo di proprietà funzionali strettamente correlate con differenti processi fisio-patologici, compresi processi infiammatori, immunitari, degenerativi e neoplastici. Il bilancio tra ceramide e S1P, denominato reostato sfingolipidico gioca un ruolo chiave nel controllo di proliferazione, differenziamento, angiogenesi, apoptosi, tumorigenesi e resistenza a farmaci. Infatti, ceramide e S1P, strettamente interconnessi metabolicamente, esercitano effetti antagonisti. Infatti ceramide agisce quale messaggero intracellulare di stimoli anti-proliferativi, differenzianti e pro-apoptotici, mentre S1P, sintetizzata in sede intracellulare ed in parte secreta, funge da ligando di una famiglia di specifici recettori (S1P1-5), espressi in modo differenziale in diversi tipi cellulari, e stimola crescita, migrazione, invasività, angiogenesi, staminalità, rigenerazione e sopravvivenza.

Attualmente sono in corso i seguenti progetti:

1. Coinvolgimento del reostato sfingolipidico nella staminalità, angiogenesi, e chemio-resistenza del glioblastoma multiforme (GBM), il più frequente e maligno tumore intracranico dell'adulto. In recenti pubblicazioni, si è dimostrato che cellule staminali isolate da campioni di GBM sono in grado di secernere S1P nell'ambiente extracellulare, processo stimolato da fattori di crescita arricchiti nel microambiente tumorale. La S1P extracellulare, dopo interazione con specifici recettori, è in grado di agire da fattore autocrino e paracrino promuovente proliferazione, invasività, autorinnovamento e chemioresistenza delle cellule staminali tumorali. Risultati più recenti suggeriscono anche che la S1P extracellulare è inoltre coinvolta nella modulazione dell'angiogenesi tumorale e nella modificazione delle proprietà piastriniche. Il progetto, in collaborazione con le unità dirette da Monica Miozzo e dal Giovanni Marfia (Fondazione IRCCS Ca' Granda), prevede lo studio del coinvolgimento di ceramide e S1P nel cross-talk tra differenti popolazioni cellulari, comprendenti cellule staminali, cellule endoteliali tumorali e piastrine ottenute da pazienti portatori di GBM. Il progetto si propone di caratterizzare a livello genomico, proteomico e lipidomico i meccanismi coinvolti nelle alterazioni di S1P nel GBM, con lo scopo di individuare possibili strategie terapeutiche alternative a quelle attuali e mirate alla completa eradicazione del tumore.

2. Studio del pattern sfingolipidico e del ruolo di S1P nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e come marker diagnostico e prognostico nei melanomi. EMT è un processo chiave nello sviluppo embrionale e, recentemente, è stato coinvolto nello sviluppo e nella progressione di differenti tipi di tumori. Diverse evidenze implicano EMT come un fattore chiave della motilità e invasività dei melanomi, coinvolto nella progressione del tumore, in particolare durante la fase iniziale del processo metastatico. Infatti, le capacità invasive delle cellule durante la progressione del melanoma è strettamente dipendente dall'acquisizione di un fenotipo EMT. Obiettivo del progetto è quello di valutare alterazioni dello sfingolipidoma e i meccanismi molecolari alla base dell'acquisizione del fenotipo metastatico nei melanomi, con lo scopo d'identificare markers diagnostici/prognostici e di consentire lo sviluppo di terapie anti-metastatiche efficaci. Lo studio (in collaborazione con il gruppo di Cristina Tringali (UniMI e l'Istituto dei Tumori), è focalizzato sul ruolo molecolare degli sfingolipidi, di ceramide e S1P nella transizione sperimentalmente indotta da TGF $\beta$ .

3. Origine e ruolo della sfingosina-1-fosfato nei progenitori endoteliali di pazienti con sarcoma di Kaposi (KS), malattia linfo-angioproliferativa strettamente associata ad infezione da human herpes virus-8 (HHV8). La ricerca prevede lo studio del metabolismo e della secrezione di S1P nelle cellule progenitrici endoteliali (CPE) da sangue periferico di pazienti. Tali cellule, di origine midollare, svolgono un ruolo importante nell'omeostasi endoteliale in quanto, reclutate nelle sedi di ipossia o danno vascolare, contribuiscono con molteplici meccanismi ai processi di angiogenesi e vasculogenesi. Lo studio delle CPE da pazienti rappresenta una strategia innovativa che permette una valutazione del compartimento endoteliale con un approccio non invasivo. La ricerca ha evidenziato che le CPE da pazienti di SK sono caratterizzate da una maggior attività proliferativa e vasculogenica rispetto alle cellule controllo. Esse sono inoltre infettate da HHV8, suggerendo che rappresentino i precursori delle tipiche *spindle cells* che costituiscono le lesioni sarcomatose stesse. Poichè il recettore S1P1 della S1P è espresso nelle lesioni di KS, e la sua down-regolazione induce la regressione di altri tumori HHV8-associati, è verosimile che alterazioni a carico di S1P e dei suoi recettori possano svolgere un ruolo chiave nella patogenesi del KS, sostenendo proliferazione e attività angiogenica delle *spindle cells*. Nel progetto in corso, in collaborazione con Silvia Della Bella (UniMI), le CPE sono utilizzate per indagini metabolomiche dinamiche, e studiate nei loro aspetti morfologici, fenotipici e funzionali dopo trattamento con inibitori del metabolismo e dei recettori della S1P.

4. Valutazione del ruolo di sfingolipidi sull'effetto restorativo di cellule staminali mesenchimali (derivate da tessuto adiposo) sulla rigenerazione di dischi intervertebrali degenerati o erniati. Risultati preliminari sinora ottenuti hanno permesso di dimostrare come specifici sfingolipidi giochino un ruolo cruciale nel potenziale rigenerativo delle cellule mesenchimali non solo nel ripristinare l'integrità e funzione del tessuto originario, ma anche di stimolare la processi di plasticità adattativa in situ in grado di sostituire funzionalmente il tessuto danneggiato. La ricerca, in collaborazione con il gruppo di Marfia, è focalizzata all'identificazione di biomodulatori sfingoidi secreti da cellule mesenchimali mediante trasportatori proteici e/o meccanismi vescicolo-mediati e allo studio del ruolo svolto da tali molecole sulla rigenerazione dei dischi danneggiati.

#### Finanziamenti in corso

- Progetto AIRC – AC5 (2012-2015) “Association of sphingolipid cell profiles with melanoma progression and prognosis”

- Progetto Biometra (2014-2015) “Origine e ruolo della sfingosina-1-fosfato nei progenitori endoteliali di pazienti con sarcoma di Kaposi”
- Contratto di consulenza (2015) con ONO Pharma (Londra, UK) su “Sphingolipids research on glioblastoma multiforme”.

Giussani P., Tringali C., **Riboni L.**, Viani P., Venerando B. Sphingolipids: key regulators of apoptosis and pivotal players in cancer drug resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15, 4356-92.

Riccitelli E, Giussani P, Di Vito C, Condomitti G, Tringali C, M. Caroli, R. Galli, P. Viani, **L. Riboni** Extracellular sphingosine-1-phosphate: a novel actor in human glioblastoma stem cell survival. *PLoS ONE* 2013; 8(6): e68229. doi:10.1371/journal.pone.0068229

Giussani P, Bassi R, Anelli V, Brioschi L, De Zen F, Riccitelli E, Caroli M, Campanella R, Gaini SM, Viani P, **Riboni L.** Glucosylceramide synthase protects glioblastoma cells against autophagic and apoptotic death induced by temozolomide and paclitaxel. *Cancer Invest.* 2012; 30:27-37

Marfia G, Navone SE, Di Vito C, Giammattei L, Egidi M, Zavanone M, Rampini P, **Riboni L**, Campanella R. Human adipose mesenchymal stromal cells transplantation promotes intervertebral disc regeneration in Biglycan-deficient murine model of chronic and progressive disc degeneration, 2014 eCM XV: Cartilage & Disc: Repair and Regeneration. *European Cells and Materials.* ISSN 1473-2262.

Marfia G, Navone SE, Di Vito C, Tabano S, Giammattei L, Di Cristofori A, Gualtierotti R, Tremolada C, Zavanone M, Caroli M, Torchia F, Miozzo M, Rampini P, **Riboni L**, Campanella R. Gene expression profile analysis of human mesenchymal stem cells from herniated and degenerated intervertebral discs reveals different expression of osteopontin. *Stem Cells Dev.* 2014 Oct 29.

**Coordinamento Laboratori di Ricerca; Patologia Molecolare-UOC Anatomia Patologica; Unità di Epigenetica; direzione Scuola di specializzazione in Genetica Medica (Monica Miozzo)**

Il gruppo coordinato da Miozzo ha come tema di ricerca principale lo studio delle modificazioni epigenetiche della cromatina e del DNA in patologie congenite (i.e.: difetti costituzionali dell'imprinting genomico, sindrome dell'X-fragile) e in malattie acquisite (i.e.: cancro).

Sono svolte ricerche applicate, traslazionali, mirate a identificare e mettere appunto soluzioni innovative per evidenziare marcatori epigenetici e genetici utili nella diagnosi/prognosi e l'identificazione di marker di risposta terapeutica (farmacogenetica).

L'attività si svolge nei laboratori dell'UOC Anatomia Patologica presso il pad Bosisio e in un laboratorio al 3° piano di INGM, accreditato ASL, in condivisione con INGM. L'accreditamento è stato necessario perché Miozzo è responsabile delle attività di diagnostica di patologia molecolare dell'UOC Anatomia Patologica. Nel 2014 sono state eseguite circa 1500 prestazioni per test genetici/epigenetici.

Il gruppo è composto di due ricercatori di Genetica Medica, un tecnico borsista, quattro borsisti specializzandi della Scuola di specializzazione in Genetica Medica, scuola di cui Miozzo è il direttore sino al 2017. Nel gruppo sono inoltre presenti medici specializzandi che svolgono attività di tirocinio e studenti in medicina (tesisti/frequentatori).

Il gruppo di epigenetica mette a disposizione dei ricercatori della Fondazione/INGM apparecchiature per l'analisi della metilazione del DNA (Pyrosequencer Qiagen; spettrometro di massa per gli acidi nucleici equipaggiato con software per l'analisi di metilazione) già presenti in INGM dove sono anche collocate strumentazioni già in condivisione con l'attività diagnostica del servizio di genetica molecolare (Manuela Seia).

Per quanto riguarda gli studi in ambito epigenetico, il gruppo è pronto a collaborare offrendo il proprio know-how in tema di chromatin remodelling e valutazione della metilazione e idrossimetilazione del DNA.

E' importante poter accedere alla piattaforma di genomica funzionale per realizzare studi di post-genomici di geni coinvolti in malattie rare in cui, mediante NGS, sono state identificate nuove mutazioni patogenetiche con significato patogenetico sconosciuto. In particolare, il progetto per il quale è necessario utilizzare risorse di genomica funzionale è:

#### Base molecolare e patogenesi della sindrome BROOKS-WISNIEWSKI-BROWN SYNDROME

La sindrome di Brooks-Wisniewski-Brown (BWBS, OMIM: 300612) è una forma rara X-linked recessiva di ritardo mentale (XLMR) di cui il gene responsabile è sconosciuto. Le principali caratteristiche cliniche sono: ritardo di crescita e psicomotorio e una forma grave di miopia. Studi di linkage hanno mappato il locus responsabile in Xq26, regione associata anche a una forma X-Linked di miopia grave.

E' stata eseguita un'indagine NGS (Illumina HiSeq1500, service esterno) X-linked una famiglia in cura presso la pediatria della Fondazione (Donatella Milani) in cui 3 figli maschi su 4 sono affetti. I dati ottenuti sono stati da noi filtrati utilizzando il software "Enlis Genome Research" che ha individuato una variante a singolo nucleotide (c.916G>C) nell'esone 3 del gene *HS6ST2* (heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2), di seguito confermata tramite sequenziamento Sanger. Tale variante, non descritta in letteratura, era presente in eterozigosi nella madre, in emizigosi nei due fratelli affetti, ma non nel maschio sano, pertanto soddisfa i criteri di ereditarietà X-linked recessiva. Inoltre, considerando che la miopia grave è una caratteristica della BWBS, è interessante notare che il gene *HS6ST2* ha un ruolo fondamentale della morfogenesi dell'occhio del topo e che la regione dove è localizzato (Xq26.2) segrega con casi di miopia X-linked. Da una valutazione preliminare bioinformatica, eseguita mediante il sistema PolyPhen-2, è plausibile che la variante

causi un cambiamento strutturale e funzionale della proteina. Tra i nostri obiettivi, prioritario è lo studio dell'effetto della variante sulla funzione della proteina. A tal fine, sono in corso trasfezioni cellulari allo scopo di esprimere in quantità adeguate la proteina *HS6ST2* mutata e la forma wild type (L'enzima ricombinante così ottenuto sarà sottoposto a un saggio biochimico tramite cui legherà Zolfo radiomarcato ad opportuni accettori. Verrà quindi valutata, se presente, la differenza di radioattività tra la proteina wild type e quella mutata. Non avendo, al momento laboratori adeguati dove svolgere questi approcci di studio, stiamo utilizzando le risorse presenti al dip di Scienze della salute, San Paolo).

### **Finanziamenti in corso**

**Ricerca Finalizzata**, Ministero della Salute 2014-2016, Progetto ordinario, PI (MM): "Development of high throughput, integrated and cost-effective molecular diagnostic tests for the detection of genetic and epigenetic defects involved in human disease".

**Progetto a Concorso, Fondazione Policlinico PI (MM):** "Genetic and epigenetic bases of Beckwith-Wiedemann syndrome" (2013-2015).

**Ricerca Corrente 2015 PI (MM):** Diagnosi genetica precoce della sindrome di Beckwith-Wiedemann utile per identificare bambini a rischio di tumori embrionali.

**Progetto Cluster Alisei CTN01\_00177\_817708 "DNA on Disk"** (MM gruppo di ricerca, Unità unimedisilvano Bosari).

### Selezione bibliografica

Augello C, Gianelli U, Falcone R, Tabano S, Savi F, Bonaparte E, Ciboddo M, Paganini L, Parafroniti A, Ricca D, Lonati S, Cattaneo D, Fracchiolla NS, Iurlo A, Cortelezzi A, Bosari S, **Miozzo M**, Sirchia SM. PDGFB hypomethylation is a favourable prognostic biomarker in primary myelofibrosis. *Leuk Res.* 2015 Feb;39(2):236-41

Pansa A, Sirchia SM, Melis S, Giacchetta D, Castiglioni M, Colapietro P, Fiori S, Falcone R, Paganini L, Bonaparte E, Colpi G, **Miozzo M**, Tabano S. ESX1 mRNA expression in seminal fluid is an indicator of residual spermatogenesis in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod.* 2014 Dec;29(12):2620-7.

Milani D, Pezzani L, Tabano S, **Miozzo M**. Beckwith-Wiedemann and IMAGE syndromes: two very different diseases caused by mutations on the same gene. *Appl Clin Genet.* 2014 Sep 16;7:169-75.

Calvello M, Tabano S, Colapietro P, Maitz S, Pansa A, Augello C, Lalatta F, Gentilin B, Spreafico F, Calzari L, Perotti D, Larizza L, Russo S, Selicorni A, Sirchia SM, **Miozzo M**. Quantitative DNA methylation analysis improves epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Epigenetics.* 2013 Oct 1;8(10):1053-60.

Manoukian S, Verderio P, Tabano S, Colapietro P, Pizzamiglio S, Grati FR, Calvello M, Peissel B, Burn J, Pensotti V, Allemani C, Sirchia SM, Radice P, **Miozzo M**. X chromosome inactivation pattern in BRCA gene mutation carriers. *Eur J Cancer.* 2013 Mar;49(5):1136-41.

*M*