



FONDAZIONE ITALIANA DI RICERCA PER LA SLA
SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA
ENTE DEL TERZO SETTORE

Convegno **AriSLA** 2024

Ricerca, sviluppo e innovazione nella SLA

ABSTRACT BOOK

Milano

Hotel Meliá Milano

22 - 23 novembre 2024

www.arisla.org

FACULTY

 LECTIO MAGISTRALIS - HOW DO WE FIND NEW TREATMENTS FOR ALS?

A. Al-Chalabi

King's College London, London, UK

The 160-year history of ALS is littered with failed attempts at therapy. We have a single, internationally approved therapy, Riluzole, which improves survival about 30%. Despite this apparently poor record, we are at a crucial stage in our understanding of the disease and what can be done to stop progression. Advances in genetics mean that for many of the 2% of people with an SOD1 variant causing their ALS, an effective therapy is available, and our understanding of disease mechanism more widely is opening up new drug targets. Coupled with this improved knowledge, advances in clinical trial design, biomarker discovery and clinical endpoints mean that drugs can be tested more rapidly than ever before. Finally, our understanding of disease heterogeneity is improving and will allow directly targeted therapies.

 LECTIO MAGISTRALIS - COME TROVARE NUOVI TRATTAMENTI PER LA SLA?

I 160 anni di storia della SLA sono ricchi di tentativi di terapia che purtroppo non hanno portato ad una cura per la SLA. Esiste un'unica terapia approvata a livello internazionale, il Riluzolo, che migliora la sopravvivenza di circa il 30%. Nonostante questo bilancio apparentemente negativo, ci troviamo in una fase cruciale della comprensione della malattia e di ciò che si può fare per arrestarne la progressione. Grazie ai progressi della genetica, per il 2% delle persone con una variante della SOD1 che causa la SLA è disponibile una terapia efficace e la comprensione del meccanismo della malattia sta aprendo nuovi bersagli farmacologici. Insieme a queste migliori conoscenze, i progressi nella progettazione di studi clinici, nella scoperta di biomarcatori e di endpoint clinici fanno sì che i farmaci possano essere testati più rapidamente che mai. Inoltre, la nostra comprensione dell'eterogeneità della malattia sta migliorando e consentirà terapie direttamente mirate.

FACULTY



CALL 2020 – FG – AZYGOS 2.0 – AUTOZYGOSITY MAPPING FOLLOWED BY NEXT GENERATION SEQUENCING IN UNRELATED CONSANGUINEOUS INDIVIDUALS TO IDENTIFY NOVEL ALS-ASSOCIATED GENES

A. Brusati¹, M. Grassano², A. Manini³, S. Peverelli³, G. Scacciatella⁴, S. Santangelo³, V. Casiraghi³, S. Inverinizzi³, M. Brunetti², S. Gallone², V. Salini³, A. Chiò², A. Ratti³, A. Calvo², **N. Ticozzi**³

¹IRCCS Istituto Auxologico Italiano, University of Pavia

²AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, University of Turin

³IRCCS Italian Auxological Institute, University of Milan

⁴University of Milan

Amotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease affecting motor neurons, leading to muscle atrophy and paralysis. While genetic factors play a significant role, the exact causes of ALS remain largely unclear. Approximately 30 genes are associated with the disease, primarily through dominant inheritance, explaining about 65% of familial and 10% of sporadic cases. Much of the unexplained heritability may result from under-recognition of recessive cases in studies focused on outbred cohorts. The AZYGOS project aimed to identify potential recessive gene candidates in consanguineous ALS patients using autozygosity mapping and loss of heterozygosity (LOH) analysis. We screened genotyping arrays from roughly 4,300 ALS patients and 2,500 healthy controls, successfully identifying 115 inbred Italian ALS patients. Whole genome sequencing (WGS) was performed on this subgroup, filtering variants based on stringent criteria. We found 115 candidate homozygous variants. About 70% were classified as “Benign/Likely benign,” 27% as “VUS”, while 4 variants (3%) were designated as “Likely pathogenic/Pathogenic.” Notably, we identified a stop-gain mutation in OPTN, associated with ALS12, and a missense variant in GNE, linked to recessive inclusion body myopathy. These results validate our methodologies as a proof of concept.

An additional variant in the MGAM2 pseudogene was excluded from further analysis due to its lack of expression in the CNS. Lastly, a promising candidate variant was found in the CNTN6 gene, crucial for postnatal synapse formation. This gene has been associated with neurodevelopmental disorders, including autism and schizophrenia. Studies indicate that CNTN6 knockout mice exhibit reduced glutamatergic synapses and impaired motor coordination.

In conclusion, the AZYGOS project identified a novel candidate ALS-associated gene that is highly expressed in the CNS and related to neurodevelopmental disorders.



BANDO 2020 – FG – AZYGOS 2.0 – IDENTIFICAZIONE DI NUOVE MUTAZIONI AUTOSOMICHE RECESSIVE ASSOCIATE ALLA SLA TRAMITE “MAPPATURA DI AUTOZIGOSI” IN INDIVIDUI CONSANGUINEI

Sebbene i fattori genetici giochino un ruolo significativo, le cause esatte della sclerosi laterale amiotrofica (SLA) rimangono per lo più sconosciute. Mutazioni in circa 30 geni, soprattutto con ereditarietà dominante, sono responsabili di circa il 65% dei casi familiari e il 10% di quelli sporadici. Gran parte dell'ereditabilità mancante può derivare da una sottovalutazione dei casi di SLA recessivi. Il progetto AZYGOS mira a identificare geni candidati a trasmissione recessiva in pazienti SLA consanguinei utilizzando la mappatura di autozigosi. Sono stati analizzati dati di genotipizzazione di circa 4.300 pazienti SLA e 2.500 controlli sani, identificando con successo 115 pazienti SLA italiani figli di consanguinei, che sono stati sottoposti a sequenziamento del genoma (WGS). Al termine della procedura di filtraggio, sono state identificate 115 varianti candidate in omozigosi. Circa il 70% di esse sono state classificate come “Benigne/Probabilmente benigne”, il 27% come “VUS”, mentre 4 varianti (3%) sono state designate come “Probabilmente patogene/Patogene”.

In particolare, abbiamo identificato una mutazione nonsenso nel gene OPTN, associata alla SLA12, e una variante missenso nel gene GNE, collegata a miopatia a corpi inclusi. Questi risultati rappresentano una prova concettuale a sostegno del nostro approccio metodologico. Una variante aggiuntiva nello pseudogene MGAM2 è stata esclusa da ulteriori analisi, in quanto non espresso nel SNC. Infine, è stata trovata una variante candidata promettente nel gene CNTN6, fondamentale per la formazione delle sinapsi nel periodo post-natale. Questo gene è stato associato a disturbi del neurosviluppo, tra cui autismo e schizofrenia. Topi knockout per CNTN6 mostrano una riduzione delle sinapsi glutamatergiche e un'alterata coordinazione motoria. In conclusione, il progetto AZYGOS ha identificato un nuovo gene candidato associato alla SLA, altamente espresso nel SNC e legato a disturbi del neurosviluppo.

FACULTY



CALL 2021 – FG – SWITCHALS – THERAPEUTIC CORRECTION OF ALTERNATIVE SPLICING DEFECTS IN HNRNP A2/B1 AS A WAY TO COUNTERACT AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS ASSOCIATED TO FUS

S. Rossi¹, M. Milani², I. Della Valle², S. Bisegna¹, V. Durante¹, M. Addesse¹, E. D'Avolio¹, A. Serafino¹, S. Apolloni², N. D'Ambrosi², **M. Cozzolino¹**

¹*Institute of Translational Pharmacology, National Research Council, Rome*

²*Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Rome*

Disrupted nucleocytoplasmic localization of RNA-binding proteins (RBPs) is a key factor in the development of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). In a recent study, we uncovered a functional connection between FUS and hnRNP A2/B1-two ALS-associated RBPs that play essential roles in various RNA metabolic processes, including alternative splicing regulation. In transgenic mice overexpressing human wild-type FUS (hFUS), a condition that induces ALS-like phenotypes, disease progression is associated with the accumulation of hnRNP A2/B1 splicing isoforms lacking exon 9 (hnRNP A2b/B1b), which are predominantly localized in the cytoplasm of degenerating motor neurons. In vitro studies showed that the hnRNP A2b/B1b variants are more prone to relocate to the cytoplasm, and that their mislocalization alone is sufficient to trigger stress granule formation and cellular toxicity. This suggests that alterations of nucleocytoplasmic distribution of hnRNP A2/B1, driven by FUS-induced splicing changes, might contribute to motor neuron degeneration in FUS-ALS.

On these grounds, in this project we set out to develop splicing-switching oligonucleotides (SSOs) to modify the splicing of hnRNP A2/B1 and assess their impact on disease phenotypes in vivo. Using bioinformatics predictions and molecular biology approaches, we designed and validated in vitro SSOs that can either promote or inhibit exon 9 skipping in hnRNP A2/B1. Intracerebroventricular (ICV) injection of these SSOs in hFUS mice demonstrated that they effectively modify hnRNP A2/B1 splicing, with persistent effects throughout disease progression. Notably, enhanced exon 9 skipping induced by SSO treatment is associated with increased motor neuron degeneration and neuroinflammation. This indicates that the accumulation of hnRNP A2b/B1b isoforms contributes to FUS-related toxicity, and that SSOs inhibiting this process, currently under investigation, might contrast neurodegeneration in FUS-ALS mice.



BANDO 2021 – FG – SWITCHALS – CORREZIONE TERAPEUTICA DI SPECIFICI DIFETTI DI SPLICING ALTERNATIVO COME METODO PER CONTRASTARE LA SLA ASSOCIATA A MUTAZIONI DEL GENE FUS

L'alterata localizzazione nucleocitoplasmatica delle proteine leganti l'RNA (RBP) è un meccanismo patologico rilevante nello sviluppo della Sclerosi Laterale Amiotrofica. In un recente studio, abbiamo messo in luce una connessione funzionale tra FUS e hnRNP A2/B1, due RBP associate alla SLA che svolgono ruoli importanti nella regolazione dello splicing alternativo dell'RNA. In topi transgenici che sovraesprimono FUS umano wild-type (hFUS), una condizione che induce fenotipi assimilabili a quelli osservati nella SLA, la progressione della malattia è associata all'accumulo di isoforme di splicing di hnRNP A2/B1 prive dell'esone 9 (A2b/B1b), che si localizzano prevalentemente nel citoplasma dei motoneuroni. Studi in vitro mostrano che le varianti A2b/B1b traslocano nel citoplasma ed inducono la formazione di granuli di stress e tossicità cellulare. Questo indica che le alterazioni della distribuzione nucleocitoplasmatica di hnRNP A2/B1, causate dai cambiamenti nello splicing indotti da FUS, potrebbero contribuire alla degenerazione dei motoneuroni. In questo progetto ci siamo quindi proposti di sviluppare oligonucleotidi antisenso (SSOs) per modificare lo splicing di hnRNP A2/B1 e valutare il loro impatto sui fenotipi della malattia. A questo scopo, abbiamo progettato e validato in vitro SSOs in grado di promuovere l'esclusione e l'inclusione dell'esone 9. L'iniezione ICV di questi SSOs nei topi hFUS ha dimostrato che essi modificano efficacemente lo splicing di hnRNP A2/B1, con effetti persistenti nel corso della progressione della malattia. In particolare, l'aumento dell'esclusione dell'esone 9 indotto dal trattamento con SSOs si associa ad un incremento della degenerazione dei motoneuroni e della neuroinfiammazione. Ciò indica che l'accumulo delle isoforme A2b/B1b contribuisce alla tossicità legata a FUS e che SSOs in grado di inibire questo evento, attualmente in corso di studio, potrebbero contrastare la neurodegenerazione nei topi con SLA associata a FUS.

FACULTY



CALL 2022 – PG – MotorTBK1 – CELL-AUTONOMOUS MECHANISMS OF NEURODEGENERATION IN TBK1-ALS

F. Manganelli¹, O. Carletta², C. Perfetto¹, **V. Gerbino³**

¹Santa Lucia IRCCS Foundation, European Center for Brain Research (CERC), Rome

²Santa Lucia IRCCS Foundation, European Center for Brain Research (CERC), Rome, Italy University of Roma Tre, Rome, Italy

³Santa Lucia IRCCS Foundation, European Center for Brain Research (CERC), Rome, Italy Zuckerman Institute of Mind Brain and Behavior, Columbia University, New York, NY

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is characterized by neuroinflammation and the accumulation of protein aggregates in motor neurons. TANK-binding kinase 1 (TBK1), a key regulator of autophagy and the innate immune response, has emerged as an important player in ALS, with loss-of-function mutations identified in ALS patients. Notably, TBK1 mutations often co-occur with other ALS-associated gene mutations, such as TARDBP and C9ORF72, suggesting TBK1 may function as a disease-modifying gene. We will present the first results of our AriSLA funded Pilot Grant (PG23), which aims to investigate the role of TBK1 in ALS pathogenesis using induced motor neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). Specifically, we have used CRISPR technology to generate TBK1 knock-out iPSCs and differentiated them into motor neurons to examine the effects of TBK1 loss on motor neuron health, protein aggregation and neurodegeneration.



BANDO 2022 – PG – MotorTBK1 – MECCANISMI CELLULARI DI NEURODEGENERAZIONE NELLA SLA LEGATA A MUTAZIONI DI TBK1

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è caratterizzata da neuroinfiammazione e accumulo di aggregati proteici nei neuroni motori. La chinasi TANK-binding 1 (TBK1), un regolatore chiave dell'autofagia e della risposta immunitaria innata, è emersa come un attore importante nella SLA, con mutazioni a perdita di funzione identificate nei pazienti affetti da SLA. È significativo notare che le mutazioni di TBK1 si verificano spesso insieme ad altre mutazioni associate alla SLA, come TARDBP e C9ORF72, suggerendo che TBK1 possa funzionare come un gene modificatore della malattia. Presenteremo i primi risultati del nostro AriSLA Pilot Grant (PG22), che mira a indagare il ruolo di TBK1 nella patogenesi della SLA utilizzando neuroni motori indotti differenziati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (iPSCs). In particolare, abbiamo utilizzato la tecnologia CRISPR per generare iPSCs knock-out per TBK1 e le abbiamo differenziate in neuroni motori per esaminare gli effetti della perdita di TBK1 sulla salute dei neuroni motori, sull'aggregazione proteica e sulla neurodegenerazione.

FACULTY



CALL 2021 – PG – mitoALS – INVESTIGATING BASAL MITOPHAGY IN ALS: FROM FLIES TO HUMAN NEURONS

M. Favaro¹, S. Mauri¹, A. Whitworth², D. Finley³, **E. Ziviani¹**

¹Department of Biological Sciences, University of Padova, Padova, Italy

²MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge Biomedical Campus, University of Cambridge, Cambridge CB2 0XY, UK

³Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, USA

Pathogenic ALS proteins cause multifactorial dysregulation of basic cellular processes that leads to altered RNA metabolism, protein misfolding and aggregation, impaired autophagy and mitophagy, oxidative stress, and neuroinflammation. Understanding the contribution of each of these pathways is essential to identify therapeutic targets for ALS. Importantly, ALS-associated protein TDP-43 is taken up by mitochondria, causing cytosolic release of damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are sensed by the innate immune system to produce neuroinflammation and neurodegeneration. Thus, approaches that boost mitochondrial autophagy (mitophagy) are expected to clear damaged mitochondria, and prevent neuroinflammation and cell death. We discovered that basal mitophagy can be enhanced in vivo in flies (*Drosophila Melanogaster*) and in cells by reducing the levels or the activity of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme (DUB) USP14. Knocking down USP14 in two established fly models of mitochondrial dysfunction restored mitochondrial ultrastructure and activity. At the systemic level, USP14 inhibition extended the lifespan of flies and rescued climbing behaviour. An orally bioavailable small-molecule inhibitor of USP14 had similarly beneficial effects on these mutant flies. We extended these findings, discovering that USP14 down-regulation almost completely restored the climbing ability of a loss-of-function fly model of ALS. The protective effect of USP14 inhibition appears to derive from its mitophagic effect, which we demonstrated in vivo in the fly brain, and in vitro in primary neurons differentiated from hESC.



BANDO 2021 – PG – mitoALS – STUDIO DELLA MITOFAGIA BASALE IN MODELLI SLA: DAL MOSCERINO AI NEURONI DI DERIVAZIONE UMANA

Le proteine patogene correlate all'insorgenza della SLA causano un'alterata regolazione a livello multifattoriale di processi cellulari di base che porta ad un metabolismo alterato dell'RNA, ad un errato ripiegamento e aggregazione delle proteine, ad una autofagia/mitofagia difettosa, e a stress ossidativo e neuroinfiammazione. Comprendere il contributo di ciascuna di queste pathway molecolari è essenziale per identificare possibili bersagli terapeutici per la SLA.

La proteina TDP-43 associata alla SLA si accumula nei mitocondri, causando il rilascio nel citosol di molecole infiammatorie chiamate DAMPs. Queste sono rilevate dal sistema immunitario e inducono neuroinfiammazione e neurodegenerazione. Approcci che eliminano tramite mitofagia i mitocondri che rilasciano DAMPs dovrebbero quindi prevenire la neuroinfiammazione e la morte cellulare. Abbiamo scoperto che la mitofagia può essere attivata in vivo nel moscerino (*D. Melanogaster*) e nelle cellule riducendo i livelli o l'attività dell'enzima USP14. La riduzione dell'espressione di USP14 (o la sua inibizione farmacologica) in due modelli di moscerino che accumulano mitocondri difettosi ha ripristinato l'ultrastruttura e l'attività mitocondriale, ha prolungato la durata della vita del moscerino e migliorato le performance di arrampicata dello stesso. Un inibitore specifico di USP14 ha avuto effetti benefici simili su questi modelli. Abbiamo esteso questi risultati, scoprendo che la riduzione dell'espressione di USP14 ha ripristinato quasi completamente la capacità di arrampicata di un modello SLA di moscerino che sviluppa deficit motori. L'effetto protettivo dell'inibizione dell'USP14 è correlato al suo effetto mitofagico, che abbiamo evidenziato nel cervello del moscerino e in neuroni primari differenziati da cellule embrionali staminali di derivazione umana.

FACULTY



CALL 2021 – PG – SENALS – PREMATURE GLIAL SENESENCE IN ALS: UNTANGLING THE PUZZLE

P. V. Fioretti¹, A. Barbieri¹, A. Migazzi¹, D. Bressan¹, M. Grassano², M. C. Torrieri³, L. Donini¹, E. Ferracci¹, S. Invernizzi⁴, F. Verde⁵, S. Cappelli⁶, V. Mugoni¹, M. Ganesello¹, K. M. Bowden⁷, F. Bacchetti⁸, L. Pasetto⁹, C. Nardella¹, L. Tiberi¹, F. Demichelis¹, V. Bonetto⁹, M. Milanese⁸, E. Buratti⁶, N. Ticozzi⁵, A. Calvo², A. Ratti⁴, P. J. Shaw⁷, M. Terenzio¹⁰, M. Pennuto¹¹, F. Chiacchiera¹, **M. Basso¹**

¹Department of Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Trento, Italy

² ALS Centre, “Rita Levi Montalcini” Department of Neuroscience, University of Turin, Turin, Italy; Azienda Ospedaliero-Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino, SC Neurologia 1U, Turin, Italy

³ALS Centre, “Rita Levi Montalcini” Department of Neuroscience, University of Turin, Turin, Italy

⁴ Department Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy; Department of Neurology and Laboratory of Neuroscience, IRCCS Italian Auxological Institute, Milan, Italy

⁵ Department of Neurology and Laboratory of Neuroscience, IRCCS Italian Auxological Institute, Milan, Italy; Department of Pathophysiology and Transplantation (DEPT), Dino Ferrari Center, University of Milan, Milan, Italy

⁶ Molecular Pathology, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italy.

⁷Sheffield Institute for Translational Neuroscience, Faculty of Medicine, Dentistry and Health, University of Sheffield, Sheffield, UK

⁸Department of Pharmacy, University of Genoa, Genoa, Italy

⁹Research Center for ALS, Mario Negri Pharmacological Research Institute IRCCS, Italy

¹⁰ Molecular Neuroscience Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, Kunigami-gun, Okinawa, Japan

¹¹ Department of Biomedical Sciences (DBS), University of Padova, Padova, Italy; Veneto Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padova, Italy

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a non-cell-autonomous disease. In early 2000, seminal and concordant studies demonstrated that glia modulates disease progression in a mouse model expressing a mutant form of SOD1. This effect was not validated in mouse models expressing other ALS-causative mutant genes. We took advantage of a transgenic mouse expressing low levels of TDP-43 with Q331K mutation and selectively deleted the transgenic TDP-43 in astrocytes at two months of age. We observed a significant delay of 4 months in the onset of motor symptoms by measuring the locomotor activity and the grip strength and complete rescue of the cognitive impairment assessed by the elevated plus maze test. We performed RNA sequencing of astrocytes purified from this mouse model at different stages of the disease, and we observed an increased expression of genes related to proliferation and de-differentiation, specifically at the early symptomatic stage. Additionally, we confirmed a relative increase in glial cell proliferation by BrdU and Ki67 staining. By interrogating the genomes of 23.475 ALS patients versus 12.577 healthy controls, we revealed the enrichment of SNPs in the responsive elements of transcription factors linked to proliferation with a hub around c-myc. Phosphorylated c-myc is increased in primary astrocytes expressing TDP-43 Q331K. C-myc plays many functions in the cell, enhancing the release of extracellular vesicles (EVs), shown to impact non-cell-autonomous degeneration in vitro. We observed that WT glia-derived EVs play a trophic effect on receiving neurons; this effect was lost when neurons were treated with glia-derived EVs from TDP-43 Q331K cultures or WT cultures overexpressing c-myc. Finally, we performed a cytofluorimetric analysis on ALS patients' cerebrospinal fluid. We measured a decrease in two pro-survival proteins, suggesting that the expression and function of membrane proteins in EVs and neurons should be further investigated in ALS.

FACULTY



BANDO 2021 - PG - SENALS - COMPRENDERE IL RUOLO DELL'INVECCHIAMENTO PREMATURO DELLE CELLULE GLIALI NELLA PROGRESSIONE DELLA SLA

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia in cui non solo i neuroni ma anche le cellule circostanti contribuiscono alla malattia. All'inizio del 2000, numerosi studi hanno dimostrato che la glia modula la progressione della malattia in un modello murino che esprime una forma mutante di SOD1. Questo effetto non è stato convalidato in modelli murini che esprimono altri geni mutanti causativi della SLA. Abbiamo sfruttato un topo transgenico che esprimeva bassi livelli di TDP-43 con mutazione Q331K e abbiamo eliminato selettivamente il TDP-43 transgenico negli astrociti a due mesi di età. Abbiamo osservato un ritardo significativo di 4 mesi nell'insorgenza dei sintomi motori misurando l'attività locomotoria e la forza muscolare e un completo recupero del deterioramento cognitivo. Abbiamo eseguito il sequenziamento dell'RNA di astrociti purificati da questo modello murino in diversi stadi della malattia e abbiamo osservato un aumento dell'espressione di geni correlati alla proliferazione e alla de-differenziazione, in particolare nella fase sintomatica precoce. Inoltre, abbiamo confermato un aumento relativo della proliferazione delle cellule gliali mediante colorazione con BrdU e Ki67. Interrogando i genomi di 23.475 pazienti affetti da SLA rispetto a 12.577 controlli sani, abbiamo rivelato l'arricchimento degli SNP negli elementi responsivi dei fattori di trascrizione legati alla proliferazione con un hub attorno a c-myc. C-myc svolge molte funzioni nella cellula, tra cui migliora il rilascio di vescicole extracellulari (EV), strutture nanolipidiche che hanno dimostrato di influenzare la degenerazione neuronale in vitro. Abbiamo osservato che le EV derivate dalla glia WT svolgono un effetto trofico sulla ricezione dei neuroni; questo effetto è andato perso quando i neuroni sono stati trattati con EV derivate dalla glia da colture TDP-43 Q331K o colture WT che sovraesprimono c-myc.

FACULTY



CALL 2021 – PG – Breath – BOOSTING REGENERATION IN ALS MOTOR NEURONS BY TARGETING THE PERIPHERY

G. D'Este¹, S. Negro², C. Baggio¹, F. Fabris¹, R. Schellino³, M. Boido³, M. Basso⁴, V. Bonetto⁵, C. Corona⁶, G. Sorarù¹, A. Megighian⁷, C. Montecucco⁷, M. Pirazzini¹, **M. Rigoni¹**

¹Department of Biomedical Sciences, University of Padua

²U.O.C. Clinica Neurologica, Azienda Ospedale-University of Padua

³Department of Neuroscience Rita Levi-Montalcini, University of Turin; Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi, University of Turin

⁴Department of Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO), University of Trento

⁵Research Center for ALS, Mario Negri Pharmacological Research Institute IRCCS, Milan

⁶Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV), Turin

⁷Department of Biomedical Sciences, University of Padua; CNR Institute of Neuroscience, Padua

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative condition affecting upper and lower motor neurons (MN), eventually leading to progressive paralysis and death. Denervation of the neuromuscular junction (NMJ) occurs before onset of symptoms and MN death both in patients and in the many animal models of the disease, and it is preceded by cycles of denervation/re-innervation, a sign of plasticity that is unfortunately overwhelmed by degeneration in the late stages. We hypothesize that stimulation of the intrinsic regenerative competence of the periphery, by stabilizing the NMJ and slowing down denervation, may be a therapeutic strategy to counteract disease course and preserve MN viability.

We recently identified the CXCR4 receptor as a pharmacological target to promote neurotransmission recovery of injured peripheral nerves. Our general objective is to support/prolong synaptic remodeling and regeneration capabilities of SOD1G93A MN by stimulating CXCR4 with the agonist NUCC-390, and determine whether CXCR4 may be a common, unifying target for different ALS forms. We have: i) assessed the impact of CXCR4 chronic stimulation in SOD1G93A mice on NMJ functionality, MN survival and the respiratory function; ii) established whether CXCR4 is broadly expressed in mouse and pig models of ALS, and in human samples.

Results. NUCC-390 treatment of a cohort of SOD1G93A mice starting at an early symptomatic stage leads to an amelioration of motor performance, a preservation of NMJ innervation, a reduced MN loss, and a slower decline in the respiratory function. We detected CXCR4 at the NMJ of both slow and aggressive mouse models of the disease at early stages, confirming that CXCR4 expression is an early marker of NMJ dysfunction. Noticeably, CXCR4 signal was also found at the NMJ of a swine model of ALS, and in human biopsies. Collectively, these data point to CXCR4 as a unifying candidate target to counteract disease progression in the many ALS forms.



BANDO 2021 – PG – Breath – PROMUOVERE LA RIGENERAZIONE DEI MOTONEURONI NELLA SLA PARTENDO DALLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una patologia neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni superiori e inferiori (MN), portando a paralisi progressiva e a morte. La denervazione della giunzione neuromuscolare (NMJ) si verifica prima dell'insorgenza dei sintomi e della morte dei MN sia nei pazienti che nei numerosi modelli animali di malattia, ed è preceduta da cicli di denervazione/reinnervazione, segni di una certa plasticità che purtroppo viene sopraffatta dalla degenerazione negli ultimi stadi. Ipotizziamo che la stimolazione della capacità rigenerativa intrinseca della periferia, stabilizzando la NMJ e rallentando la denervazione, possa essere una strategia terapeutica per rallentare il decorso della malattia e preservare la vitalità dei MN.

Abbiamo recentemente identificato il recettore CXCR4 come bersaglio farmacologico per promuovere il recupero della neurotrasmissione periferica. Il nostro obiettivo è supportare le capacità di rimodellamento sinaptico e di rigenerazione dei MN SOD1G93A stimolando CXCR4 con l'agonista NUCC-390 e determinare se CXCR4 possa essere un bersaglio comune per le diverse forme di SLA. Abbiamo: i) valutato in topi SOD1G93A l'impatto della stimolazione cronica di CXCR4 sulla funzionalità della NMJ, sulla sopravvivenza dei MN e sulla funzione respiratoria; ii) determinato l'espressione di CXCR4 in diversi modelli animali di SLA ed in biopsie umane.

Risultati. Il trattamento precoce con NUCC-390 di una coorte di topi SOD1G93A comporta un miglioramento delle prestazioni motorie, del grado di innervazione, una ridotta perdita di MN ed un rallentato declino della funzione respiratoria.

CXCR4 è espresso alle giunzioni di modelli murini di malattia a decorso lento ed aggressivo già nelle fasi iniziali, in un modello suino di SLA e in biopsie umane di pazienti. Questi dati supportano il ruolo di CXCR4 come marcatore precoce di stress del MN, e lo identificano come un bersaglio terapeutico comune per le diverse forme di SLA.

FACULTY



CALL 2022 – PG – SRXinALS - THE ROLE OF ENERGY CONSUMPTION OF RESTING SKELETAL MUSCLE ON HYPERMETABOLISM IN ALS PATIENTS

L. Cussonneau¹, C. De Napoli¹, M. Kruger², G. Soraru³, L. Nogara³, **B. Blaauw**¹

¹ *Veneto Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padova*

² *University of Cologne, Germany*

³ *University of Padua*

An important aspect in disease progression in ALS is the increased energy consumption in patients. When patients consume more energy than they take in, they can quickly lose body weight, generally leading to a quicker progression of the pathology. It is estimated that about 50% of patients show this hypermetabolism. About 40% of our body weight is made up of skeletal muscle, which is therefore an important organ in determining whole body energy consumption. The most abundant protein in skeletal muscle is the motor protein myosin, which is responsible for force generation. However, also when we do not use our muscles, myosin consumes some energy which is not used for force generation. The amount of energy resting muscle can consume depends in part on this futile energy consumption of myosin. In this project we have determined how much myosin contributes to the increased metabolism observed in ALS patients. Interestingly, we observe that there is a correlation between disease progression, as determined by ALSFRS score, and force production and ATPase activity. While force is reduced in both fast and slow muscle fibers, increased ATPase activity with quicker disease progression seems limited to fast type 2A fibers. In depth analysis of fiber type specific proteomes will help understanding of the underlying mechanisms responsible for these alterations.



BANDO 2022 – PG – SRXinALS - IL RUOLO DEL CONSUMO ENERGETICO DEL MUSCOLO SCHELETRICO A RIPOSO SULL'IPERMETABOLISMO NEI PAZIENTI CON SLA

Un aspetto importante nella progressione della malattia nella SLA è l'aumento del consumo energetico nei pazienti. Quando i pazienti consumano più energia di quella che assorbono, possono perdere rapidamente peso corporeo, portando generalmente a una progressione più rapida della patologia. Si stima che circa il 50% dei pazienti presenti questo ipermetabolismo. Circa il 40% del nostro peso corporeo è costituito da muscolo scheletrico, che è quindi un organo importante nel determinare il consumo energetico dell'intero organismo. La proteina più abbondante nel muscolo scheletrico è la proteina motrice miosina, responsabile della generazione della forza. Tuttavia, anche quando non usiamo i muscoli, la miosina consuma energia che non viene utilizzata per la generazione della forza. La quantità di energia che i muscoli a riposo possono consumare dipende in parte da questo inutile consumo energetico di miosina. In questo progetto abbiamo determinato quanto la miosina contribuisce all'aumento del metabolismo osservato nei pazienti affetti da SLA. È interessante notare che osserviamo che esiste una correlazione tra la progressione della malattia, determinata dal punteggio ALSFRS, e la produzione di forza e l'attività dell'ATPasi. Mentre la forza è ridotta sia nelle fibre muscolari veloci che in quelle lente, l'aumento dell'attività dell'ATPasi con una progressione più rapida della malattia sembra limitato alle fibre veloci di tipo 2A. L'analisi approfondita dei proteomi specifici del tipo di fibra aiuterà a comprendere i meccanismi sottostanti responsabili di queste alterazioni.

FACULTY



CALL 2019 – FG – GPR17ALS-1 – NEW STRATEGIES TO ENHANCE THE TROPHIC FUNCTIONS AND REMYELINATING ABILITIES OF OLIGODENDROCYTES IN ALS VIA THE GPR17 RECEPTOR

S. Raffaele¹, N. Nguyen², F. C. Mannella¹, M. Milanese², G. Frumento², G. Bonanno², M. P. Abbracchio³, T. Bonifacino², **M. Fumagalli¹**

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences “Rodolfo Paoletti”, University of Milan, Milan, Italy

²Department of Pharmacy, Unit of Pharmacology and Toxicology, University of Genoa, Genoa, Italy

³Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Milan, Italy

New insights on ALS come from the demonstration that motor neuron (MN) degeneration is intimately linked to dysfunction of oligodendrocytes (OLs), the myelin forming cells that enwrap neuronal axons. Thus, an innovative approach may consist in improving the spontaneous reparative capabilities of OL precursor cells (OPCs), the cells able to differentiate into new myelinating OLs. A key regulator of OPC differentiation is the membrane receptor GPR17, that is specifically expressed on a subpopulation of OPCs, but not in mature cells. Our data showed a pathological accumulation of GPR17+OPCs in spinal cord of SOD1G93A mice associated to decreased levels of mature OL markers. Of note, OPCs isolated from spinal cord of SOD1G93A mice exhibited a defect to differentiate compared to controls and GPR17 ligands counteracted this cellular dysfunction. With this project, we proposed to test the therapeutic activity of GPR17 ligands in SOD1G93A mice.

Data indicate that female SOD1G93A mice treated with the GPR17 antagonist montelukast, starting from symptoms onset, show improved survival and motor function compared with vehicle-treated littermates. Histological analysis confirmed the efficacy of this approach in counteracting OL dysfunction, glial reactivity, and MN degeneration. Similarly, a therapeutic effect was observed in female mice using a novel selective GPR17 ligand. In parallel, we generated a new inducible reporter mouse line to label GPR17-expressing OPCs thanks to the fluorescent protein GFP, that we are using to follow these cells during disease progression and drug treatment. Finally, we demonstrated a significant increase in GPR17 expression in spinal cord samples from human ALS cases versus controls, highlighting the relevance of this receptor as a potential drug target in human pathology. The generation of patients' iPSC-derived models enriched in OLs is in progress and will be instrumental to the clinical translation of GPR17-targeted therapies for ALS.



BANDO 2019 – FG – GPR17ALS-1 – NUOVE STRATEGIE PER MIGLIORARE LE FUNZIONI TROFICHE E LE CAPACITÀ RIMIELINIZZANTI DEGLI OLIGODENDROCITI NELLA SLA AGENDO SUL RECETTORE GPR17

La degenerazione dei motoneuroni nella SLA è strettamente associata a disfunzione degli oligodendrociti (OL), le cellule che con la guaina mielinica avvolgono i processi neuronali. Aumentare le capacità rigenerative dei loro precursori (OPC) potrebbe dunque rappresentare un nuovo approccio terapeutico. Un regolatore chiave della maturazione degli OPC è il recettore GPR17, espresso da una sottopopolazione di OPC, ma assente nelle cellule mature. Nostri dati hanno dimostrato un aumento aberrante dell'espressione di GPR17 nel midollo spinale di topi SOD1G93A, in parallelo ad una riduzione di marcatori di OL maturi. Inoltre, OPC isolati dagli stessi tessuti presentano difetti di maturazione e ligandi di GPR17 sono in grado di ripristinare questo difetto. In questo progetto, abbiamo proposto di analizzare l'attività terapeutica di ligandi di GPR17 nel modello SOD1G93A. I dati indicano che topi femmina SOD1G93A trattati con l'antagonista di GPR17 montelukast, a partire dai primi sintomi clinici, mostrano un miglioramento della sopravvivenza e delle funzioni motorie rispetto ad animali controllo. Analisi immunostochimiche hanno confermato l'efficacia di questo approccio nel contrastare la disfunzione degli OL, la reattività gliale e la neurodegenerazione. Similmente, è stato osservato un effetto terapeutico in topi femmina dopo trattamento con un nuovo ligando selettivo di GPR17. Inoltre, abbiamo generato una linea murina reporter inducibile che stiamo utilizzando per seguire gli OPC esprimenti GPR17, grazie alla proteina fluorescente GFP, durante la malattia e dopo trattamento farmacologico. Infine, abbiamo dimostrato un aumento significativo dell'espressione di GPR17 in tessuti post-mortem di midollo spinale di pazienti con SLA rispetto a controlli, evidenziando la rilevanza del recettore nella patologia umana. La generazione di modelli arricchiti in OLs derivati da iPSC di pazienti è in corso e sarà fondamentale per la traslazione clinica di terapie mirate a GPR17.

FACULTY



CALL 2019 – FG – TRAILER – THERAPEUTIC EFFECTS OF RETROMER STABILIZATION IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

L. Muzio¹, L. Alvarado¹, E. Colombo¹, P. Seneci², L. Marinelli³, D. Brancaccio³, M. Milani⁴, E. Mastrangelo⁴, G. Martino⁵

¹Neuroimmunology Unit, IRCCS San Raffaele Hospital, Milan

²University of Milan

³University of Naples “Federico II

⁴CNR-Biophysics Institute, Milan

⁵Vita & Salute San Raffaele University, Milan

Retromer is a multi-proteins complex involved in the endosomal sorting system, driving proteins from endosomes to the trans-Golgi network or to plasma membrane. It comprises of a Cargo Recognition Complex (CRC), containing VPS35, VPS29, and VPS26, and a Sorting Nexins (SNX) dimer, namely containing SNX1/2 and SNX5/6. Retromer coordinates the trafficking of hundreds of cargo proteins in neurons. Dysregulations of the endolysosomal network affects neurons in several neurodegenerative diseases, including motor neurons (MNs) in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). To study the retromer and to develop new therapeutic strategies based on this target we exploited: iPSCs-derived MNs from fibroblast biopsies that we obtained from familiar ALS patients and ALS animal models. The failure of retromer complex we found in such models prompted our multidisciplinary team to develop strategies to restore the complex's integrity and functionality. On one side, we developed new compounds that working as molecular chaperones increased the stability of the retromer complex in vitro and in vivo. On the other, we used AAV9 vectors to restore VPS35 levels in ALS mice. For both approaches, it was crucial to optimize the strategy and therefore we optimised our molecules to avoid off-target interactions. We developed new validation tools using N2A cells as well as VPS29 knockout cells. We optimized our compounds obtaining a family of leads that provides that ground for clinical applications. Some of these molecules successfully counteracted protein aggregation and toxicity of mutant forms of TDP43. In G93A mice we observed that that either our new molecular chaperons or AAV9 vector encoding for VPS35 can foster MNs survival. All in all, this project identifies the retromer complex as valuable target for a therapeutic intervention in ALS.



BANDO 2019 – FG – TRAILER – EFFETTI TERAPEUTICI DERIVANTI DALLA STABILIZZAZIONE DEL COMPLESSO DEL RETROMER NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

Il Retromer è un complesso multiproteico coinvolto nel sistema endosomiale, che guida le proteine dagli endosomi al trans-Golgi o alla membrana plasmatica. Comprende un Cargo Recognition Complex (CRC), contenente VPS35, VPS29 e VPS26, e un dimero Sorting Nexins (SNX), contenente SNX1/2 e SNX5/6. Il Retromer coordina il traffico di centinaia di proteine cargo nei neuroni. Le disregolazioni del sistema endolisosomiale colpiscono i neuroni in diverse malattie neurodegenerative, inclusi i motoneuroni (MN) nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Per studiare il retromero e sviluppare nuove strategie terapeutiche basate su questo target abbiamo sfruttato: MN derivati da iPSC di fibroblasti ottenuti da pazienti affetti da SLA familiari e modelli animali di SLA. La riduzione della funzionalità del retromero riscontrata in tali modelli ha spinto il nostro team multidisciplinare a sviluppare strategie per ripristinare l'integrità e la funzionalità del complesso. Da un lato, abbiamo sviluppato nuovi composti che lavorando come “chaperon” molecolari aumentano la stabilità del complesso in vitro e in vivo. Dall'altro, abbiamo utilizzato i vettori AAV9 per ripristinare i livelli di VPS35 nei topi SLA. Per entrambi gli approcci, era fondamentale ottimizzare la strategia e quindi abbiamo ottimizzato le nostre molecole per evitare interazioni off target. Abbiamo sviluppato nuovi strumenti di validazione utilizzando cellule N2A e cellule knockout per VPS29. Abbiamo ottimizzato i nostri composti ottenendo una famiglia di lead che volgiamo traslare in applicazioni cliniche. Alcune di queste molecole hanno contrastato con successo l'aggregazione proteica e la tossicità delle forme mutanti di TDP43. Nei topi G93A abbiamo osservato che i nostri nuovi chaperon molecolari o il vettore AAV9 che codifica per VPS35 possono favorire la sopravvivenza dei MN. Nel complesso, questo progetto identifica il complesso retromero come obiettivo prezioso per un intervento terapeutico nella SLA.

FACULTY



CALL 2020 – FG – DDR&ALS – DNA DAMAGE RESPONSE DEFECTS INDUCED BY THE FORMATION OF TDP-43 AND MUTANT FUS CYTOPLASMIC INCLUSIONS AND THEIR PHARMACOLOGICAL RESCUE

F. d'Adda di Fagnana

IFOM ETS -The AIRC Institute of Molecular Oncology, Milan

Formation of cytoplasmic inclusions (CIs) of TDP-43 and FUS, along with DNA damage accumulation, is a hallmark of affected motor neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). However, the impact of CIs on DNA damage response (DDR) and repair in this pathology remains unprobed. Here, we show that CIs of TDP-43 and FUSP525L, co-localizing with stress granules, lead to a dysfunctional DDR activation associated with physical DNA breakage. Inhibition of the activity of the DDR kinase ATM, but not of ATR, abolishes DDR signaling, indicating that DNA double-strand breaks (DSBs) are the primary source of DDR activation. In addition, cells with TDP-43 and FUSP525L CIs exhibit reduced DNA damage-induced RNA synthesis at DSBs. We previously showed that the two endoribonucleases DROSHA and DICER, also known to interact with TDP-43 and FUS during small RNA processing, contribute to DDR signaling at DSBs. Treatment with enoxacin, which stimulates DDR and repair by boosting the enzymatic activity of DICER, restores a proficient DDR and reduces DNA damage accumulation in cultured cells with CIs and in vivo in a murine model of ALS. In *Drosophila melanogaster*, Dicer-2 overexpression rescues TDP-43-mediated retinal degeneration.

In summary, our results indicate that the harmful effects caused by TDP-43 and FUS proteinopathies include genotoxic stress and that the pharmacological stimulation of the DNA damage signaling and repair counteracts it.



BANDO 2020 – FG – DDR&ALS – DIFETTI DELLA RISPOSTA AL DANNO DEL DNA INDOTTI DALLA FORMAZIONE DI INCLUSIONI CITOPLASMATICHE TDP-43 E FUS MUTANTI E LORO TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

La formazione di inclusioni citoplasmatiche (IC) di TDP-43 e FUS, insieme all'accumulo di danni al DNA, è un segno distintivo dei motoneuroni colpiti nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Tuttavia, l'impatto degli IC sulla risposta al danno del DNA (DDR) e sulla riparazione in questa patologia rimane non indagato. Qui, mostriamo che gli IC di TDP-43 e FUSP525L, co-localizzandosi con i granuli di stress, portano a un'attivazione DDR disfunzionale associata alla rottura fisica del DNA. L'inibizione dell'attività di ATM chinasi DDR, ma non di ATR, abolisce la segnalazione DDR, indicando che le rotture del doppio filamento del DNA (DSB) sono la fonte primaria di attivazione della DDR. Inoltre, le cellule con IC TDP-43 e FUSP525L mostrano una ridotta sintesi di RNA indotta dal danno al DNA nei DSB. Abbiamo precedentemente dimostrato che le due endoribonucleasi DROSHA e DICER, note anche per interagire con TDP-43 e FUS durante la maturazione di piccoli RNA, contribuiscono alla segnalazione DDR ai DSB. Il trattamento con enoxacina, che stimola la DDR e la riparazione potenziando l'attività enzimatica di DICER, ripristina una DDR efficiente e riduce l'accumulo di danni al DNA nelle cellule in coltura con IC e in vivo in un modello murino di SLA. Nella *Drosophila melanogaster*, la sovraespressione di Dicer-2 riduce la degenerazione retinica mediata da TDP-43.

In sintesi, i nostri risultati indicano che gli effetti dannosi causati dalle proteine TDP-43 e FUS includono lo stress genotossico e che la stimolazione farmacologica della segnalazione e della riparazione del danno al DNA lo contrasta.

FACULTY

CALL 2021 – PG – ReNicALS - REPURPOSING NICLOSAMIDE IN ALS

M. Milani¹, I. Della Valle¹, S. Rossi², P. Fabbrizio³, C. Margotta³, G. Nardo³, M. Cozzolino², N. D'Ambrosi⁴, **S. Apolloni⁴**

¹Department of Biology, University of Rome Tor Vergata

²Institute of Translational Pharmacology, CNR

³Department of Neuroscience, Mario Negri Pharmacological Research Institute IRCCS

⁴Department of Biology, University of Rome Tor Vergata

ALS is a multifaceted neurodegenerative disease influenced by genetic, epigenetic, and environmental factors, leading to widespread dysfunction in cellular and molecular pathways. Current treatments provide limited benefits, underscoring the urgent need for multi-targeted therapeutic strategies. Niclosamide, an anthelmintic drug and essential medicine, has gained attention for its anti-inflammatory and anti-fibrotic properties and has been repurposed for various clinical applications. Notably, it can inhibit dysregulated pathways, such as STAT3 and mTOR, implicated in ALS pathogenesis. In this study, we investigated the therapeutic potential of niclosamide in two transgenic ALS murine models: SOD1-G93A and FUS. Niclosamide was administered intraperitoneally at symptom onset, and its effects on disease progression were evaluated using neurological scoring, rotarod and wire tests, as well as survival analysis. Additionally, we explored its impact on cellular and molecular mechanisms in the spinal cord and muscle tissues.

Our results show that niclosamide treatment significantly slowed disease progression, improved survival rates, and ameliorated key pathological features, including gliosis, motor neuron loss, muscle atrophy, and inflammatory responses. These findings suggest that niclosamide multi-targeted approach could provide therapeutic benefits in ALS by modulating various dysregulated pathways. Given its favourable safety profile and broad mechanism of action, niclosamide holds promise as a candidate for repurposing in ALS treatment.

BANDO 2021 – PG – ReNicALS - LA NICLOSAMIDE COME POSSIBILE TERAPIA PER LA SLA

La SLA è una malattia neurodegenerativa complessa, influenzata da fattori genetici, epigenetici e ambientali, che porta a disfunzioni in numerosi processi cellulari e molecolari. Le terapie attuali hanno un'efficacia limitata, pertanto, lo studio di strategie terapeutiche alternative, basate su un approccio multi-target, appare prioritario. La niclosamide, un farmaco antelmintico inserito nella lista dei medicinali essenziali, ha attirato attenzione per le sue proprietà antinfiammatorie e antifibrotiche, consentendone il riposizionamento per diverse applicazioni cliniche. Nel caso della SLA, il farmaco si rivela interessante in quanto è in grado di bersagliare alcune vie molecolari deregolate e rilevanti per la patologia, come quelle di STAT3 e mTOR.

In questo studio, abbiamo valutato il potenziale terapeutico della niclosamide in due modelli murini transgenici di SLA: SOD1-G93A e FUS. La niclosamide è stata somministrata per via intraperitoneale all'insorgenza dei sintomi, e i suoi effetti sulla progressione della malattia sono stati valutati attraverso punteggi neurologici, test muscolari e analisi della sopravvivenza. Inoltre, abbiamo indagato i meccanismi cellulari e molecolari influenzati dalla niclosamide nel midollo spinale e nei muscoli dei topi affetti da SLA.

I nostri risultati dimostrano che il trattamento con niclosamide ha rallentato significativamente la progressione della malattia, migliorato i tassi di sopravvivenza e attenuato le principali caratteristiche patologiche, tra cui gliosi, perdita dei motoneuroni, atrofia muscolare e risposte infiammatorie. Questi risultati suggeriscono che l'approccio multi-target della niclosamide potrebbe fornire benefici terapeutici nella SLA. Considerando il suo profilo di sicurezza favorevole e il meccanismo d'azione ampio, la niclosamide rappresenta un candidato promettente per essere riposizionato nel trattamento della SLA.

FACULTY

LECTIO MAGISTRALIS - DRUG REPURPOSING IN ALS

G. Lauria

IRCCS Carlo Besta Neurological Institute, University of Milan, Milan

Drug repurposing, a widely used strategy in medicine, offers a promising approach to treating Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) by potentially providing faster and more cost-effective therapeutic solutions compared to traditional drug development. This strategy leverages existing drugs with established safety profiles and regulatory approval for other conditions, significantly reducing the time and resources required to deliver new treatments to ALS patients.

This lecture will explore the fundamental concepts of drug repurposing, including the scientific rationale behind identifying candidate drugs through methods such as computational screening, phenotypic screening, and pathway mapping. In the context of ALS, drug repurposing efforts have targeted multiple pathological mechanisms, including protein aggregation, oxidative stress, neuroinflammation, and excitotoxicity.

Among the promising repurposed drug candidates are guanabenz and its synthetic derivative icerguastat. Guanabenz, originally approved as an antihypertensive medication, has shown potential therapeutic efficacy for bulbar-onset ALS due to its ability to modulate the unfolded protein response and reduce endoplasmic reticulum stress, both of which are key pathological features of ALS. The efficacy of icerguastat is currently being evaluated in a phase 2 randomized clinical trial involving patients with bulbar-onset ALS.

The lecture will also cover recent molecular discoveries in bulbar ALS, offering insights into why this phenotype might be considered unique among the different presentations of the disease.

LECTIO MAGISTRALIS - IL REPURPOSING NELLA SLA

Il riposizionamento dei farmaci, una strategia ampiamente utilizzata in medicina, offre un approccio promettente per il trattamento della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), fornendo potenziali soluzioni terapeutiche più rapide e convenienti rispetto al tradizionale sviluppo di nuovi farmaci. Questa strategia sfrutta farmaci già esistenti con profili di sicurezza consolidati e approvazione regolatoria per altre patologie, riducendo significativamente il tempo e le risorse necessari per portare nuovi trattamenti ai pazienti affetti da SLA.

Verranno esplorati i concetti fondamentali del riposizionamento dei farmaci, incluso il razionale scientifico per identificare candidati farmacologici attraverso metodi come lo screening computazionale, lo screening fenotipico e il mappaggio dei percorsi molecolari. Nel contesto della SLA, le strategie per il riposizionamento dei farmaci si sono focalizzate su diversi meccanismi patologici, tra cui l'aggregazione proteica, lo stress ossidativo, la neuroinfiammazione e l'eccitotossicità.

Tra i farmaci candidati promettenti ci sono guanabenz e il suo derivato sintetico icerguastat. Il guanabenz, originariamente approvato come farmaco antipertensivo, ha mostrato una potenziale efficacia terapeutica per la SLA a esordio bulbare grazie alla sua capacità di modulare la risposta delle proteine mal ripiegate e ridurre lo stress del reticolo endoplasmatico, entrambi elementi patologici chiave della SLA. L'efficacia di icerguastat è attualmente in fase di valutazione in uno studio clinico randomizzato di fase 2 che coinvolge pazienti con SLA a esordio bulbare.

Saranno affrontate anche le recenti scoperte molecolari nella SLA bulbare, offrendo spunti su perché questo fenotipo possa essere considerato unico rispetto alle diverse manifestazioni della malattia.

FACULTY

THE INTERNATIONAL LANDSCAPE OF RARE DISEASES

L. Monaco

Fondazione AriSLA, Milan

The more than six thousand rare diseases that affect over three hundred million people worldwide share common challenges: difficulty in obtaining a diagnosis, lack or scarcity of effective therapies, barriers to accessing available care and treatments, and the isolation of patients and their families. Tackling these issues at international level enables the sharing of knowledge and experiences, increasing the effectiveness of national and regional interventions. Notably, the International Rare Diseases Research Consortium (IRDiRC) and Rare Diseases International (RDI) operate globally to address these challenges.

Founded in 2011 to address rare diseases through research, IRDiRC's vision is to ensure that all individuals with a rare disease receive a diagnosis, care, and available treatments within one year of coming to medical attention. Public and private organizations, as well as companies that fund and/or invest in rare disease research, work alongside patient advocacy groups to align research efforts on a global scale. With 60 members from all continents and over 100 scientific experts, IRDiRC addresses critical gaps and key issues in rare disease research through task forces that produce guidelines, recommendations, and resources available to the entire rare disease community.

RDI is the global alliance for people with rare diseases, with a mission to be their strong, common voice and to promote rare diseases as an international public health priority. RDI represents over 100 organizations globally and collaborates with the World Health Organization to increase the visibility of rare diseases within healthcare systems, encourage member states to adopt dedicated strategies, and improve access to treatments and care.

Initiatives such as IRDiRC and RDI contribute to raising awareness about rare diseases and promoting effective actions to improve the lives of those affected.

IL PANORAMA INTERNAZIONALE DELLE MALATTIE RARE

Le oltre seimila malattie rare che interessano più di trecento milioni di persone al mondo condividono la difficoltà di ottenere una diagnosi, la mancanza o scarsità di terapie efficaci, gli ostacoli all'accesso a cure e terapie disponibili e l'isolamento dei pazienti e delle loro famiglie.

Affrontare questi problemi a livello internazionale consente di condividere conoscenze ed esperienze e di aumentare l'efficacia degli interventi a livello nazionale e regionale. In particolare, l'International Rare Diseases Research Consortium (IRDiRC) e Rare Diseases International (RDI) agiscono a livello globale.

La visione di IRDiRC, nata nel 2011 per affrontare le malattie rare attraverso la ricerca, è consentire a tutte le persone con una malattia rara di ricevere una diagnosi, la cura e le terapie disponibili entro un anno dall'arrivo all'attenzione medica. Organizzazioni pubbliche e private e aziende che finanziano e/o investono in ricerca sulle malattie rare lavorano insieme a gruppi di difesa dei pazienti per allineare gli sforzi di ricerca a livello globale. Con 60 membri da tutti i continenti e oltre 100 esperti scientifici, IRDiRC affronta lacune e problemi chiave nella ricerca sulle malattie rare attraverso task force che producono linee guida, raccomandazioni e risorse disponibili all'intera comunità delle malattie rare.

RDI è l'alleanza globale delle persone con malattie rare, con la missione di esserne la voce forte e comune e di sostenere le malattie rare come priorità sanitaria pubblica internazionale. RDI rappresenta più di 100 organizzazioni globalmente e collabora con l'Organizzazione Mondiale della Sanità per aumentare la visibilità delle malattie rare nei sistemi sanitari, incoraggiare gli Stati membri ad adottare strategie dedicate e migliorare l'accesso a trattamenti e cure.

Iniziative come IRDiRC e RDI contribuiscono ad aumentare la consapevolezza sulle malattie rare e a promuovere azioni efficaci per migliorare la vita delle persone che ne sono affette.

FROM GENETICS TO MECHANISMS



P01 **CHARACTERIZATION OF HUMAN I3 MOTOR NEURONS EXPOSED TO CSF FROM ALS PATIENTS STRATIFIED BY C9ORF72 AND UNC13A GENOTYPE**

V. Casiraghi¹, E. Pellegrini², A. Brusati³, S. Peverelli², S. Invernizzi¹, S. Santangelo¹, C. Colombrita², V. Silani², A. Ratti²

¹ Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

² Department of Neurology - Laboratory of Neuroscience, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy

³ Department of Brain and Behavioral Sciences, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy

It has been hypothesized that in ALS the cerebral spinal fluid (CSF) might contribute to disease spreading, triggering a degenerative cascade in not-yet-degenerating motor neurons.

We investigated the possible effects of CSF from ALS patients on healthy integrated, inducible and isogenic lower motor neurons (i3LMNs) differentiated from induced pluripotent stem cells. CSFs were obtained from 5 ALS patients with the UNC13A rs12608932 risk genotype (CC) (a known ALS genetic risk factor), 5 ALS patients with the corresponding low-risk genotype (AA) and 5 patients with an hexanucleotide repeat expansion in the C9ORF72 gene. Treatment of i3LMNs with mild chronic sodium arsenite (ARS) was used as positive control of oxidative stress, while CSF from 5 individuals with non-degenerative conditions was used as negative control.

After 48h-treatment with 10% CSF, none of the tested CSF triggered significant alterations in viability, autophagy, neurite degeneration, DNA damage and Golgi apparatus integrity. Only UNC13A CC-CSF induced a significant increase in generalized protein aggregation. On the other hand, chronic ARS altered all the analyzed parameters. Accordingly, differential gene expression analyses by RNA-seq revealed that chronic ARS altered the expression of thousands of genes, while ALS-CSF treatments only exerted a mild effect. Curiously, few genes were found to be commonly upregulated upon treatments with each of the different CSFs.

We have demonstrated that ALS-CSF treatment, independently on patients' CSF genotype, was not sufficient to induce ALS-like pathological features in human i3LMNs in our experimental settings and only had a mild effect in triggering gene expression changes. Conversely, chronic oxidative stress by ARS is a powerful stressor for healthy motor neurons, triggering pathological features and massive gene expression deregulation.



P01 **CARATTERIZZAZIONE DI MOTONEURONI UMANI I3 ESPOSTI A CSF DA PAZIENTI SLA STRATIFICATI PER GENOTIPO DI C9ORF72 E UNC13A**

È stato ipotizzato che nella SLA il liquido cerebrospinale (CSF) possa contribuire alla diffusione della malattia, scatenando una cascata degenerativa nei motoneuroni.

Abbiamo investigato i possibili effetti del CSF di pazienti SLA su motoneuroni integrati, indotti e isogenici (i3LMN) differenziati da iPSC di un controllo sano. I CSF sono stati ottenuti da 5 pazienti SLA con il genotipo di rischio UNC13A rs12608932 (CC) (un noto fattore di rischio genetico per la SLA), 5 pazienti SLA con il genotipo corrispondente a basso rischio (AA) e 5 pazienti con un'espansione nel gene C9ORF72. Il trattamento cronico degli i3LMN con arsenite di sodio (ARS) è stato utilizzato come controllo positivo di stress, mentre il CSF di 5 individui con condizioni non degenerative è stato usato come controllo negativo. Dopo 48 ore di trattamento con 10% di CSF, nessuno dei CSF ha provocato alterazioni significative in vitalità, autofagia, degenerazione neuritica, danno al DNA e integrità dell'apparato di Golgi. Solo il CSF UNC13A CC ha indotto un aumento significativo dell'aggregazione proteica generalizzata. Al contrario, l'ARS cronica ha alterato tutti i parametri. Analisi dell'espressione genica tramite RNA-seq hanno rivelato che l'ARS cronica ha alterato l'espressione di migliaia di geni, mentre i trattamenti con CSF SLA hanno esercitato solo un effetto lieve. Un ridotto numero di geni è risultato over-espresso dopo i trattamenti con tutti i CSF.

Abbiamo dimostrato che il trattamento con CSF SLA, indipendentemente dal genotipo del CSF dei pazienti, non è stato sufficiente a indurre caratteristiche patologiche simili alla SLA negli i3LMN umani nelle nostre condizioni sperimentali e ha avuto un effetto lieve nel provocare cambiamenti nell'espressione genica. Al contrario, lo stress ossidativo cronico da ARS è un potente agente di stress per i motoneuroni, in grado di indurre caratteristiche patologiche e deregolazione massiva dell'espressione genica.

FROM GENETICS TO MECHANISMS



P02

DIG-ALS - GENOME WIDE INVESTIGATION OF OLIGOGENIC INHERITANCE IN ALS: SEARCHING FOR DIGENIC DISEASE GENES WITH MACHINE LEARNING IN A POPULATION-BASED COHORT

F. Caushi¹, B. Bartilomo¹, M. Grassano², A. Bottrighi³, N. Pomella¹, D. Cerotti³, M. Pennisi³, A. Sapienza³, M. Lai³, S. Vilella³, F. De Marchi⁴, S. Zucca⁵, F. De Paoli⁵, A. Calvo², R. Vasta², U. Manera², C. Moglia², M. Brunetti², A. Follenzi¹, P. Bossolasco⁶, L. Corrado¹, L. Mazzin⁴, A. Ratti⁶, A. Chiò², S. D'Alfonso¹

¹ Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italy

² CRESLA, Dipartimento di Neuroscienze, "Rita Levi Montalcini", Università di Torino, Italy

³ Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Università del Piemonte Orientale, Alessandria, Italy

⁴ Dipartimento di Medicina Traslazionale, Università del Piemonte Orientale, Clinica Neurologica AOU Maggiore della Carità, Novara, Italy

⁵ Engenome s.r.l., Pavia, Italy

⁶ IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italy

In 85% of ALS cases the genetic cause is unknown. Some studies suggest oligogenic/digenic inheritance, since 1-13% of cases carrying two variants in ALS genes.

This study investigates the role of oligogenic/digenic inheritance in ALS using machine learning (ML) tools on WGS (Whole Genome Sequencing) available data from 4,090 ALS patients and 775 controls, and to functionally validate candidate digenic disease gene pairs in human motoneurons derived from iPSC.

In the first-year project we:

- Evaluated the combined effect of rare variants in a panel of 24 ALS genes, from WGS of 1,043 patients from the Piemonte and Valle Aosta Register for ALS (PARALS) and 750 healthy controls. The rate of oligogenic ALS cases ranged from 1.2% to 12.7% and only high-penetrance variants showed a significant association with ALS cases ($P < 0.001$).
- Conducted a pilot study on WGS of 60 ALS cases using DIVAs to predict digenic gene pairs with an unbiased genome-wide investigation. DIVAs (Engenome s.r.l.) is a ML tool, which identifies digenic variant combinations based on phenotype, pathogenicity, and gene interactions, assigning a score 0-1. Pairs including variants with scores > 0.7 and pathogenic, likely pathogenic or VUS classification were prioritized. The comparison with another ML tool (ORVAL) revealed that only a subset of digenic pairs identified by DIVAs have been confirmed by ORVAL.
- Developed a semi-automatic pipeline for digenic data analysis with ML tools and evaluated several software (ORVAL, DiGePred, DIEP, HOP, OligoPVP).

Our initial results highlights that the frequency of potential oligogenic ALS cases is contingent on the criteria used to define oligogenicity, and propose a major role of highly penetrant genetic variants. We demonstrate that DIVAs ML tool effectively detects digenic pairs in ALS and underscore the need for different ML tools to enhance the effectiveness of ALS digenic pairs identification in the whole cohort.

FROM GENETICS TO MECHANISMS

 **P02**

DIG-ALS - INDAGINE SU LARGA SCALA DELL'EREDITARIETÀ OLIGOGENICA NELLA SLA: RICERCA DI COPPIE DI GENI PATOGENETICHE TRAMITE STRUMENTI DI MACHINE LEARNING IN UNA COORTE POPULATION-BASED

Nell'85% dei casi di SLA la causa genetica è sconosciuta. Alcuni studi suggeriscono un'eredità oligogenica/digenica, poiché tra l'1 e il 13% dei casi presenta due varianti nei geni associati alla SLA.

Questo studio esplora il ruolo dell'ereditarietà oligogenica/digenica nella SLA utilizzando strumenti di machine learning (ML) sui dati di sequenziamento dell'intero genoma (WGS) di 4.090 pazienti affetti da SLA e 775 controlli e a validare funzionalmente coppie di geni candidati in motoneuroni umani derivati da iPSC.

Durante il primo anno è stato:

- Valutato l'effetto combinato di varianti rare in un pannello di 24 geni SLA su dati WGS di 1.043 pazienti del Registro Piemonte e Valle d'Aosta per la SLA (PARALS) e di 750 controlli. Il tasso di casi SLA oligogenici variava tra 1,2%-12,7% e solo le varianti ad alta penetranza mostravano un'associazione significativa con i casi ($P < 0,001$).
- Condotta uno studio pilota su WGS di 60 casi SLA usando DIVAs per prevedere coppie di geni. DIVAs (Engenome s.r.l.) è uno strumento ML che identifica coppie digeniche basate su fenotipo, patogenicità e interazioni geniche, assegnando uno score da 0 a 1. Le coppie con score $> 0,7$ e classificate come Pathogenic, Likely Pathogenic o VUS sono state prioritzate. Il confronto con un altro ML tool (ORVAL) ha confermato solo un sottoinsieme di coppie identificate da DIVAs.
- Sviluppato una pipeline semi-automatica per l'analisi dei dati digenici con strumenti ML, valutando diversi software (ORVAL, DiGePred, DIEP, HOP, OligoPVP).

I risultati iniziali evidenziano che la frequenza dei casi SLA potenzialmente oligogenici dipende dai criteri usati per definire l'oligogenicità e suggeriscono un ruolo predominante delle varianti genetiche ad alta penetranza. Abbiamo dimostrato che DIVAs rileva efficacemente coppie digeniche, sottolineando il bisogno di diversi strumenti ML per migliorare l'efficacia nell'identificazione di coppie digeniche nell'intera coorte.

FROM GENETICS TO MECHANISMS



P03

ONE GENE, MANY PHENOTYPES: ALTERED MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS IN KIF5A-ASSOCIATED NEURODEGENERATIVE AND NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS

M. Cozzi¹, S. Magri², B. Tedesco³, G. Patelli³, V. Ferrari¹, E. Casarotto¹, M. Chierichetti¹, P. Pramaggiore¹, L. Cornaggia¹, M. Piccolella¹, M. Galbiati¹, P. Rusmini¹, V. Crippa¹, J. Mandrioli⁴, D. Pareyson⁵, C. Pesciotta⁵, S. D'Arrigo⁵, A. Ratti⁶, L. Nanetti⁵, C. Mariotti⁵, E. Sarto⁵, V. Pensato⁵, C. Gellera⁵, D. Di Bella⁵, R. Cristofani¹, F. Taroni⁵, A. Poletti¹

¹ Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti", Università degli Studi di Milano

² Unità di Genetica Medica e Neurogenetica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta

³ Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti", Università degli Studi di Milano; Unità di Genetica Medica e Neurogenetica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta

⁴ Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Centro Interdipartimentale di Neuroscienze e Neurotecnologie, Università di Modena e Reggio Emilia; Dipartimento di Neuroscienze, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena

⁵ Unità di Malattie Neurodegenerative e Neurologiche Rare, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta

⁶ Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslationale, Università degli Studi di Milano; Dipartimento di Neuroscienze – Laboratorio di Neuroscienze, IRCCS Istituto Auxologico Italiano

Mutations targeting different domains of the neuron-specific kinesin KIF5A are linked to distinct neurodegenerative or neurodevelopmental disorders, but the molecular bases of this clinical heterogeneity are still unknown. We characterised and compared in a homogeneous experimental setting five key mutants covering the whole spectrum of KIF5A-related phenotypes: R17Q and R280C KIF5A, linked to spastic paraplegia (SPG); R864* KIF5A, linked to Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease; N999Vfs*40 KIF5A, linked to amyotrophic lateral sclerosis (ALS); and C975Vfs*73 KIF5A, linked to neonatal intractable myoclonus (NEIMY).

Based on our analyses, the CMT-related R864* and ALS-related N999Vfs*40 KIF5A mutants showed defective autoinhibition and peripheral localisation accompanied by altered mitochondrial distribution, suggesting a disruption of their transport competence. N999Vfs*40 KIF5A also formed SQSTM1/p62-positive inclusions sequestering wild-type KIF5A, indicating a gain of toxic function and a dominant-negative behaviour.

Our data also indicate that the ubiquitin-proteasome system plays a central role in mutant KIF5A degradation. Indeed, the SPG-related R17Q KIF5A mutant and N999Vfs*40 KIF5A both displayed a faster turnover compared to the wild-type protein and accumulated into detergent-insoluble aggregates upon proteasomal blockage. Moreover, the SPG-related R280C KIF5A mutant and N999Vfs*40-KIF5A both competed for degradation with proteasome-specific substrates.

Finally, the NEIMY-related C975Vfs*73 KIF5A mutant was characterised by a similar, but more severe aberrant behaviour compared to N999Vfs*40 KIF5A. Interestingly, these mutants share an abnormal tail but cause disorders on the opposite end of KIF5A-linked phenotypic spectrum.

Altogether, our observations support the pathogenicity of newly identified KIF5A mutants, highlight previously unknown defects of recurrent variants, and demonstrate that both shared and unique mechanisms underpin KIF5A-related diseases.

FROM GENETICS TO MECHANISMS

 **P03**

UN GENE, PIÙ MALATTIE: MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE E DEL NEUROSVILUPPO ASSOCIATE A MUTAZIONI DI KIF5A

Le mutazioni della chinesina KIF5A sono associate a malattie neurodegenerative o del neurosviluppo diverse a seconda del dominio proteico colpito, ma i meccanismi molecolari alla base di questa eterogeneità clinica sono ancora ignoti. In questo lavoro, abbiamo messo a confronto cinque forme mutate di KIF5A al fine di coprire l'intero spettro fenotipico ad essa associato: KIF5A R17Q e R280C legate a paraparesi spastica, KIF5A R864* legate alla malattia di Charcot-Marie-Tooth, KIF5A N999Vfs*40 legata alla SLA e KIF5A C975Vfs*73 legata al mioclono neonatale intrattabile.

In primo luogo, abbiamo osservato l'incapacità di KIF5A R864* e N999Vfs*40 di andare incontro ad autoinibizione: queste due forme mutate mostrano infatti una localizzazione intracellulare periferica. A ciò si accompagna un'alterata distribuzione dei mitocondri, a suggerire un difetto nella capacità di trasporto di KIF5A R864* e N999Vfs*40. Inoltre, KIF5A N999Vfs*40 forma inclusioni positive per SQSTM1/p62 e capaci di sequestrare la proteina wild-type.

I nostri dati suggeriscono anche che il proteasoma gioca un ruolo chiave nella degradazione delle forme mutate di KIF5A. Infatti, KIF5A R17Q e N999Vfs*40 mostrano entrambe un'emivita ridotta rispetto alla proteina wild-type e vanno incontro ad aggregazione quando il proteasoma viene inibito. In più, sia KIF5A R280C che KIF5A N999Vfs*40 competono con substrati specifici del proteasoma per la degradazione.

Da ultimo, abbiamo osservato che KIF5A C975Vfs*73 è caratterizzata da difetti simili a quelli mostrati da KIF5A N999Vfs*40, ma dagli effetti cellulari più gravi. Curiosamente, queste due varianti condividono la coda mutata, ma causano malattie agli estremi opposti dello spettro fenotipico legato a KIF5A.

Nel complesso, i dati raccolti supportano la patogenicità di nuove forme mutate di KIF5A, mettono in luce difetti di varianti ricorrenti e dimostrano che le basi molecolari delle malattie associate a KIF5A sono in parte condivise e in parte univoche.

FROM GENETICS TO MECHANISMS



PO4

INVESTIGATING NEURODEVELOPMENTAL ORIGINS AND RNA-BASED THERAPEUTIC INTERVENTIONS IN C9ORF72 ALS PATIENT-DERIVED 3D CORTICAL ORGANOIDS

D. Franzone¹, G. Damaggio¹, M. Paulis², L. Ottoboni³, S. Corti³, S. Lodato³

¹ Department of Biomedical Sciences, Humanitas University, Pieve Emanuele, Milan, Italy

² IRCCS Humanitas Research Hospital, Rozzano, Milan, Italy, UOS Milan Unit, Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB), CNR, Milan, Italy

³ Foundation IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, UOC Neurology; Milan, Italy

Amotrophic lateral sclerosis (ALS) onset typically occurs in late adulthood, with no direct link to early-life CNS disorders. However, emerging evidence suggests a developmental component in neurodegenerative diseases (NDDs) as seen in Huntington's disease and Spinal Muscular Atrophy. Several ALS-related genes play key roles in neurodevelopment, including in iPSC-derived neuronal progenitors, where C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion impairs proliferation and accelerates neural differentiation. Early electrophysiological impairments in embryonic cortical neurons from SOD1G93A mice, resolved by P26, suggest early compensated neuronal dysfunction. Our project investigates neurodevelopmental aberrations hypothesized as the foundation of cortical hyperexcitability impairments, potentially triggering degeneration through corticofugal projection neurons (CFuPNs). We have cultured long-term 3D cortical organoids from C9ORF72 patient iPSC lines and their isogenic controls. To enhance cellular diversity, we employ a novel protocol incorporating vascular components to improve circuit maturation. We will conduct longitudinal analyses of histological, cellular, and molecular characteristics, along with calcium imaging for functional circuit assessment. Finally, we aim to test an antisense oligonucleotide "MorB" (developed in Prof. Corti's lab) targeting G4C2 expansions in C9ORF72, to address neurodevelopmental alterations and explore therapeutic potential in ALS. Transcriptional and functional profiling at single-cell resolution will identify MorB-responsive cell types and molecular pathways linked to neurodevelopmental changes corrected by MorB.



PO4

ESPLORAZIONE DELLE ORIGINI A LIVELLO DEL NEUROSVILUPPO DELLA SLA CAUSATA DA C9ORF72 IN ORGANOIDI CORTICALI DERIVATI DA PAZIENTI E INTERVENTI TERAPEUTICI A BASE DI RNA

L'insorgenza della sclerosi laterale amiotrofica (SLA) si verifica tipicamente in età avanzata, senza un collegamento diretto con disturbi del SNC insorti in età precoce. Tuttavia, nuove evidenze suggeriscono una componente dello sviluppo in alcune malattie neurodegenerative (NDD), come dimostrato per la malattia di Huntington e l'atrofia muscolare spinale. Diversi geni associati alla SLA svolgono ruoli chiave nello sviluppo neurologico, incluso nei progenitori neuronali derivati da iPSC, in cui l'espansione ripetitiva esanucleotidica di C9ORF72 compromette la proliferazione e accelera il differenziamento neurale. Le compromissioni elettrofisiologiche precoci nei neuroni corticali embrionali dei topi SOD1G93A, risolte entro P26, suggeriscono una disfunzione neuronale che inizialmente viene compensata. Il nostro progetto indaga su aberrazioni del neurosviluppo ipotizzate come base dei difetti di ipereccitabilità corticale, potenzialmente responsabili della degenerazione dei neuroni proiettivi corticofugali (CFuPN). Abbiamo ottenuto colture a lungo termine di organoidi corticali 3D da linee di iPSC di pazienti con C9ORF72 mutato e dai loro controlli isogenici. Per aumentare la diversità cellulare, utilizziamo un protocollo innovativo che incorpora componenti vascolari per migliorare la maturazione dei circuiti. Condurremo analisi longitudinali delle caratteristiche istologiche, cellulari e molecolari, accompagnate da analisi elettrofisiologiche per valutare la dinamica dei circuiti. Infine, intendiamo testare un oligonucleotide antisense "MorB" (sviluppato nel laboratorio della Prof.ssa Corti) mirato alle espansioni G4C2 in C9ORF72, per eliminare le alterazioni ed esplorarne il potenziale terapeutico nella SLA. La profilazione trascrizionale e funzionale a singola cellula permetterà di identificare i tipi cellulari responsivi al MorB e i pathways molecolari collegate ai cambiamenti potenzialmente corretti dal trattamento con MorB.

FROM GENETICS TO MECHANISMS



P05

DEFECTIVE PRIMARY CILIA IN NEK1 AND C9ORF72 IPSC-DERIVED MOTONEURONS AND BRAIN ORGANOIDS

S. Invernizzi¹, S. Santangelo¹, V. Casiraghi¹, S. Peverelli², P. Podini³, A. Quattrini³, V. Silani², P. Bossolasco², A. Ratti¹

¹ Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy

² Department of Neuroscience, IRCCS Italian Auxological Institute, Milan

³ IRCCS Ospedale San Raffaele, Experimental Neuropathology Unit, Institute of Experimental Neurology, Milan

Dysfunctions in primary cilia, non-motile cytoplasmatic organelles acting as a sensory-hub in post-mitotic cells, are recently emerging as a possible pathomechanism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). SOD1-G93A transgenic mice show decreased cilia number in the spinal cord, while C9ORF72 gene knock-out in multiple mice tissues causes longer cilia formation. The two genes NEK1 and C21ORF2 are involved in ciliogenesis and, while heterozygous variants are associated to ALS, recessive mutations cause some forms of human ciliopathies.

Aim of this work was to investigate the role of primary cilia in the pathogenesis of ALS, in particular related to mutations in NEK1 and C9ORF72 genes, using motoneurons differentiated from human induced-pluripotent stem cells (iPSC-MNs) and iPSC-brain organoids.

From two mutant ALS patients we generated an iPSC line carrying the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion (HRE) and a line carrying both a non-sense mutation in NEK1 and a concurrent C9ORF72 HRE. By CRISPR/Cas9 genome editing we introduced a heterozygous NEK1 loss-of-function (LOF) mutation in a wild-type (WT) healthy control line. Image analysis of primary cilia by immunofluorescence staining for the adenylate cyclase III marker showed a significant decrease both in the percentage of cilia-positive cells and in the cilium length in the NEK1 LOF, C9ORF72 single mutant and C9ORF72/NEK1 double mutant iPSC-MNs compared to the WT controls, with no differences among the three distinct mutant lines. Moreover, NEK1 LOF iPSC-brain organoids at day 60 showed thinner cilia compared to the WT control analyzed by transmission electron microscopy.

The mechanistic link between NEK1 haploinsufficiency, C9ORF72 HRE and alterations in primary cilia formation remains to be further elucidated in order to define the role of these organelles in ALS pathogenesis.



P05

DIFETTI NEL CIGLIO PRIMARIO IN MOTONEURONI E ORGANOIDI CEREBRALI DERIVATI DA iPSC CON MUTAZIONI NEI GENI NEK1 E C9ORF72

Disfunzioni del ciglio primario, organello citoplasmatico non mobile che funge da antenna sensoriale nelle cellule post-mitotiche, stanno emergendo come un possibile patomeccanismo nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA). I topi transgenici SOD1-G93A mostrano un numero ridotto di cigli nel midollo spinale, mentre il knock-out del gene C9ORF72 in diversi tessuti murini provoca la formazione di cigli più lunghi. I due NEK1 e C21ORF2 sono coinvolti nella cigliogenesi e, mentre varianti in eterozigosi sono associate alla SLA, mutazioni recessive causano cigliopatie umane.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di investigare il ruolo del ciglio primario nella patogenesi della SLA, in particolare associato alle mutazioni nei geni NEK1 e C9ORF72, utilizzando motoneuroni e organoidi cerebrali differenziati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (iPSC).

Da due pazienti SLA mutanti, abbiamo generato una linea di iPSC contenente una mutazione nel gene C9ORF72 e una linea che presenta una mutazione non-senso in NEK1 in concomitanza con C9ORF72. Attraverso editing genomico mediante CRISPR/Cas9, abbiamo poi introdotto in una linea di controllo sana una mutazione con perdita di funzione in eterozigosi nel gene NEK1. L'analisi del ciglio primario mediante immunofluorescenza per il marcatore cigliare adenilato ciclasi III ha mostrato una riduzione significativa sia della percentuale di cellule positive per il ciglio, che della lunghezza del ciglio nei motoneuroni singoli mutanti per NEK1 e C9ORF72 e doppio mutanti C9ORF72/NEK1 rispetto al controllo sano. Inoltre, gli organoidi cerebrali mutanti per NEK1 al giorno 60 mostrano ciglia più sottili rispetto al controllo, analizzati mediante microscopia elettronica a trasmissione.

Il legame meccanicistico tra l'aploinsufficienza di NEK1, la mutazione C9ORF72 e le alterazioni nella formazione del ciglio primario deve essere ulteriormente chiarito per definire il ruolo di questa struttura nella patogenesi della SLA.

FROM GENETICS TO MECHANISMS

P06 **ELECTRICAL SYNAPSES AND HEMICHANNELS IN ALS MODELS**

C. Marullo¹, S. Zuffetti², L. Croci², S. Taverna², F. Codazzi³, G. G. Consalez³

¹ San Raffaele Scientific Institute, Division of Neuroscience, Neuropathophysiology. University of Parma, Italy

² San Raffaele Scientific Institute, Division of Neuroscience, Neuropathophysiology

³ San Raffaele Scientific Institute, Division of Neuroscience, Neuropathophysiology. Vita-Salute San Raffaele University, Division of Neuroscience

Gap junctions (GJs) are electrical synapses that play a crucial role in cell-cell communication, allowing the passage of ionic current and small molecules between adjacent cells. GJs channels are formed by two docked hexameric connexons (composed of 6 connexins), also called hemichannels. Additionally, hemichannels can function independently on the plasma membrane, for the release of paracrine molecules.

Recent studies have proposed a role for GJs in several neurodegenerative disorders, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a progressive disorder affecting both upper and lower motor neurons. For instance, altered expression of connexin36 (Cx36), a key component of neuronal GJs, has been reported in several ALS models.

Electrophysiological studies, carried out on a mouse neuronal model of ALS-related TDP-43 proteinopathy generated in our laboratory (Pisciottani et al., 2023), have revealed an increase of electrical connectivity. Parallel biochemical and immunofluorescence analyses performed on these same cultures of cortical neurons expressing either human wild-type or ALS mutant TDP-43, showed increased levels of Cx36.

We validated these in vitro results in two ALS mouse models: Prp-TDP-43 and Prp-TDP-43(Q331K), which exhibit different rates of disease progression. Western blot analysis on lysates from cerebral cortices showed an increased expression of Cx36 peaking at 4 months in Prp-TDP-43 and 2 months in Prp-TDP-43Q331K mice, respectively.

We are currently conducting functional and optogenetic studies, to investigate how the increased levels of Cx36 affect the neurotoxic pathways and to address the central question: do the increased gap junction and hemichannel expression act as a compensatory mechanism to restore the impaired chemical connectivity and clear toxic metabolites, or do they represent a maladaptive change contributing to the spread of neurotoxic factors, thereby exacerbating the severity of neurodegeneration?

P06 **SINAPSI ELETTRICHE ED EMICANALI IN MODELLI DI SLA**

Le gap junctions (GJs) sono sinapsi elettriche che svolgono un ruolo cruciale nella comunicazione cellula-cellula, permettendo il passaggio di correnti ioniche e piccole molecole tra cellule adiacenti. I canali delle GJs sono formati da due connessioni esamERICI (composti da 6 connessioni), noti anche come emicanali. Gli emicanali possono trovarsi anche sulla membrana plasmatica, rilasciando molecole paracrine.

Studi recenti hanno dimostrato un ruolo delle GJs in diversi disturbi neurodegenerativi, come sclerosi laterale amiotrofica (SLA), malattia che colpisce i motoneuroni superiori e inferiori. Ad esempio, un'espressione alterata della connessina36 (Cx36), componente delle GJs neuronali, è stata riportata in vari modelli di SLA. Studi elettrofisiologici, condotti su un modello murino neuronale di proteinopatia TDP-43 correlata a SLA, generato nel nostro laboratorio (Pisciottani et al., 2023), hanno rivelato un aumento della connettività elettrica. Analisi biochimiche e di immunofluorescenza parallele, eseguite su queste stesse colture di neuroni corticali che esprimono TDP-43 umano wild-type o mutato, hanno mostrato livelli aumentati di Cx36. Abbiamo validato questi risultati in vitro in due modelli murini di SLA: Prp-TDP-43 e Prp-TDP-43Q331K, che presentano diverse velocità di progressione della malattia. L'analisi tramite Western blot su lisati di cortecce cerebrali ha mostrato un'espressione aumentata di Cx36, con un picco a 4 mesi nei topi Prp-TDP-43 e a 2 mesi nei topi Prp-TDP-43Q331K.

Attualmente stiamo conducendo studi funzionali e optogenetici per investigare come i livelli aumentati di Cx36 influenzino le vie neurotossiche e per rispondere alla domanda chiave: l'aumento dell'espressione di GJs ed emicanali agisce come un meccanismo compensatorio per ripristinare la connettività chimica compromessa e eliminare i metaboliti tossici, o contribuisce alla diffusione di fattori neurotossici, aggravando così la progressione della neurodegenerazione?

FROM GENETICS TO MECHANISMS



P07

UNRAVELING THE ROLE OF SUMO2/3 AS A MODIFIER OF TDP-43 SOLUBILITY: A NEW THERAPEUTIC AVENUE FOR ALS

E.M. Verde¹, L. Mediani¹, F. Antoniani¹, S. Crotti¹, **V. Secco¹**, M. C. Ferrara¹, A. Rosa², E. Buratti³, T. M. Franzmann⁴, S. Alberti⁴, S. Carra¹

¹ Unimore – University of Modena and Reggio Emilia, Modena

² Sapienza University of Rome

³ ICGEB – International Centre For Genetic Engineering And Biotechnology, Trieste

⁴ BIOTEC, TU Dresden, Germany

Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) is a nuclear RNA binding protein (RBP) involved in RNA metabolism. Cytosolic inclusions of TDP-43 are a pathological hallmark of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal dementia (FTD). TDP-43 has a high propensity to aggregate because of its low solubility in cells and in vitro. TDP-43 aggregation propensity is further increased by ALS/FTD-linked mutations and upon exposure to stress. Because TDP-43 aggregation is central to ALS and FTD, approaches aimed at preventing TDP-43 aggregation hold promise for novel therapeutic treatments. How cells prevent TDP-43 aggregation is poorly understood. Molecular chaperones and post-translational modifications (PTMs) have been shown to modify TDP-43 aggregation. Acting in concert with chaperones, ubiquitination is a key PTM required to clear aggregation-prone proteins. Phosphorylation of TDP-43 was initially associated with increased aggregation; instead, recent data indicate that phosphorylation is a protective response to counteract TDP-43 misfolding. TDP-43 can also be SUMOylated. SUMOylation involves the conjugation of a substrate protein with either SUMO1 (SUMO1-ylation) or SUMO2/3 (SUMO2/3-ylation), via mono-, multi-mono or poly-SUMOylation. Although mass spectrometry studies identified several SUMO2 sites in TDP-43, the role of TDP-43 SUMO2/3-ylation is currently unknown.

Here we report that upon oxidative stress TDP-43 is modified with SUMO2/3 chains. Using experiments in cells, we show that conjugation of TDP-43 with SUMO2/3 coincides with the assembly of stress granules (SGs), which are dynamic RNA-containing condensates. Pharmacological inhibition of TDP-43 SUMO2/3-ylation triggers TDP-43 aggregation inside SGs. We conclude that modification with SUMO2/3 chains is a mechanism to maintain the solubility of TDP-43 during stress.



P07

SUMO2/3 COME MODIFICATORE DELLA SOLUBILITÀ DI TDP-43: UN NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO PER LA SLA

La proteina TDP-43 è il principale componente delle inclusioni citosoliche che si accumulano nei soggetti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e demenza frontotemporale (FTD). La propensione ad aggregare di TDP-43 è ulteriormente aumentata dalle mutazioni legate a SLA/FTD e dall'esposizione a stress. Poiché l'aggregazione di TDP-43 è centrale nella patologia, approcci volti a prevenirla possono offrire una speranza per lo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici.

I meccanismi molecolari adottati dalle cellule per rallentare l'aggregazione di TDP-43 non sono ancora del tutto noti. Chaperoni molecolari e modifiche post-traduzionali (PTM) possono ridurre l'aggregazione di TDP-43. Ad esempio, l'ubiquitinazione favorisce l'eliminazione delle proteine danneggiate. La fosforilazione di TDP-43, inizialmente associata ad una maggiore aggregazione, sembra essere attivata per contrastarne l'aggregazione.

TDP-43 può anche essere SUMOilata. La SUMOilazione prevede la coniugazione di una proteina substrato con SUMO1 (SUMO1-ilazione) o SUMO2/3 (SUMO2/3-ilazione), tramite mono-, multi-mono o poli-SUMOilazione. Studi di spettrometria di massa hanno identificato diversi siti SUMO2 in TDP-43; tuttavia, se e come la coniugazione di SUMO2/3 a TDP-43 ne influenzano la funzione e stabilità è poco chiaro.

I nostri risultati dimostrano che in seguito a stress ossidativo TDP-43 viene modificata con catene SUMO2/3. La coniugazione di TDP-43 con SUMO2/3 coincide con l'assemblaggio dei granuli di stress, condensati dinamici contenenti RNA ed il cui accumulo sembra promuovere l'aggregazione citoplasmatica di TDP-43. I nostri risultati dimostrano altresì che l'inibizione farmacologica della SUMO2/3-ilazione di TDP-43 innesca la sua aggregazione all'interno dei granuli da stress. Pertanto, la modifica con catene SUMO2/3 è un meccanismo che la cellula attiva in condizioni di stress per mantenere la solubilità di TDP-43.

FROM GENETICS TO MECHANISMS



P08 **C9orf72 HRE NUMBER CAUSES DIFFERENT R-LOOP DISTRIBUTION AND DNA DAMAGE SIGNATURE IN ALS PATIENTS**

D. Sproviero¹, W. Sproviero², A. Iacoangeli³, A. Jones³, A. Al Khleifat³, S. Gagliardi⁴, O. Pansarasa⁵, C. Cereda⁶, A. Al-Chalabi³

¹IFOM, IFOM-The FIRC Institute of Molecular Oncology, Milan, Italy

²Department of Psychiatry, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

³Maurice Wohl Clinical Neuroscience Institute, Department of Basic and Clinical Neuroscience, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, King's College London, London, United Kingdom

⁴Molecular Biology and Transcriptomics Unit IRCCS Mondino Foundation Pavia (Italy)

⁵Cellular Models and Neuroepigenetics Unit IRCCS Mondino Foundation Pavia (Italy)

⁶Center of Functional Genomics and Rare diseases - Buzzi Children's Hospital, Milan, Italy

During transcription, nascent RNA is prone to hybridize with DNA, displacing and forming a three-stranded nucleic acid structure called R-loop. R-loop structure is physiologically produced, but excessive R-loop formation can cause genome instability and is implicated in the pathogenesis of cancer and neurological diseases. G (Guanine) clusters are important to nucleate RNA for R-loop initiation, and the elongation of R-loops is primarily determined by the density of G on the nontemplate DNA strand. Without both a favourable R-loop initiation zone and elongation zone, R-loop formation is inefficient. There is increasing evidence for the pathological role of R-loops in ALS. An expanded hexanucleotide repeat in C9orf72 is the most common genetic mutation in ALS and it can form R-loops.

The C9orf72 expansion may control the formation and stability of RNA-DNA hybrids, but there are no studies describing how C9orf72 expansions change R-loop distribution for genes involved in ALS. We performed an R-loop study using a computational algorithm to map R-loop forming sequences in the British cohort of the international whole genome sequencing study, Project MinE, comprising 2000 cases and 300 controls. We showed a significant increase of RLFS in the C9orf72 gene in people with ALS carrying a hexanucleotide repeat expansion in this gene compared to controls ($p = 0.0001$). Cluster distribution revealed that C9orf72 expanded patients can cluster in two groups with different ages of onset (median of 58 and 60 years old). We found that people with C9orf72-mediated ALS have R-loops with different R-loop initiation and expansion zones depending on the length of the expansion. R-loop immunoprecipitation (DRIP-seq) on spinal cord samples from C9orf72 expanded patients confirmed the in-silico data and revealed how the expansion can determine different R-loop genomic localization. R-loop formation can be considered an epigenetic modification in C9orf72 pathogenesis of ALS.



P08 **IL NUMERO DI ESPANSIONI IN C9orf72 CAUSA UNA DIVERSA DISTRIBUZIONE DI R-LOOPS E DANNO AL DNA NEI PAZIENTI CON SLA**

Durante la trascrizione, l'RNA nascente tende a ibridarsi con il DNA, spostando e formando una struttura di acido nucleico a tre filamenti chiamata R-loop. La struttura dell'R loop è prodotta fisiologicamente, ma un'eccessiva formazione può causare instabilità del genoma ed è implicata nella patogenesi del cancro e delle malattie neurologiche. I cluster di guanina sono importanti per iniziare la trascrizione RNA e per gli R-loops e sono determinati principalmente dalla densità di G sul filamento di DNA. Senza una zona di inizio e una zona di allungamento favorevoli al R-loop la sua formazione è inefficiente.

Vi sono prove crescenti del ruolo patologico degli R-loop nella SLA. Una espansione di esanucleotidi nel gene C9orf72 è la mutazione genetica più comune nella SLA. L'espansione C9orf72 può controllare la formazione e la stabilità degli R-loops, ma non ci sono studi che descrivano come avvenga. Abbiamo eseguito uno studio utilizzando un algoritmo computazionale per mappare le sequenze che formano l'R-loop nella coorte britannica dello studio internazionale, Project MinE, comprendente 2000 casi e 300 controlli. Abbiamo mostrato un aumento significativo di RLFS nel gene C9orf72 nelle persone con SLA portatrici di un'espansione in questo gene rispetto ai controlli ($p = 0.0001$). La distribuzione dei cluster ha rivelato che i pazienti con C9orf72 espanso possono raggrupparsi in due gruppi con diverse età di esordio (mediana di 58 e 60 anni).

Abbiamo scoperto che le persone con SLA mediata da C9orf72 hanno R-loops con diverse zone di inizio e fine a seconda della lunghezza dell'espansione. L'immunoprecipitazione degli R-loops (DRIP-seq) su campioni di midollo spinale di pazienti espansi con C9orf72 ha confermato i dati in silico e ha rivelato come l'espansione può determinare una diversa localizzazione genomica degli R-loops. La formazione dell'R-loop può essere considerata una modifica epigenetica nella patogenesi della SLA C9orf72.

FROM GENETICS TO MECHANISMS



P09

NOSRESCUEALS - UNRAVELING THE PROTECTIVE EFFECTS OF NOS1AP IN THE RESCUE OF TDP-43 LOSS OF FUNCTION PATHOLOGICAL MECHANISMS

L. Zangrando¹, S. Cappelli², A. Spalloni³, F. Feiguin⁴, P. Longone⁵, E. Buratti¹

¹International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste; Università di Trieste

²International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste

³Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma

⁴Università di Cagliari, Cagliari

⁵Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma

Amotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease that affects neurons in the brain and spinal cord, leading to muscle weakness and atrophy. ALS incidence ranges from 2 to 3 cases per 100000 individuals each year and currently there are no disease-modifying drugs available. Numerous studies have identified heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), especially TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43), as key players in ALS. By looking at transcripts that are co-regulated by TDP-43 and several other hnRNPs involved in ALS, nitric oxide synthase 1 adaptor protein (NOS1AP) has emerged. NOS1AP is a crucial interactor and modulator of neuronal NOS (NOS1), and it has already been associated to schizophrenia, depressive and bipolar disorders. Notably, through the formation of a ternary complex that involves NOS1 and Post-Synaptic Density Protein 95 (PSD-95), NOS1AP is linked to the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) signaling cascade. Since the NMDAR pathway deregulation is central in the glutamate excitotoxicity model of ALS pathogenesis, NOS1AP could represent a promising target to establish an effective therapeutic strategy against ALS.

Indeed, NOS1AP was demonstrated to rescue TDP-43 pathological effects in neuronal cells, such as the downregulation of NMDAR-associated genes. By studying NOS1AP functional domains, only the deletion mutant lacking the PTB domain (Δ PTB) has the same rescue pattern as the full-length protein, suggesting that the PTB domain is the only domain not involved in this activity. Moreover, the NOS1AP Δ PTB mutant appears to localize prevalently in the cytoplasm, suggesting that the rescue activity is happening in the cytoplasm rather than in the nucleus. At the moment our aim is the identification of molecules that can modulate NOS1AP expression and in order to do so a cellular line carrying an EGFP-tagged endogenous NOS1AP gene is being developed.



P09

NOSRESCUEALS - INDAGINE SUGLI EFFETTI PROTETTIVI DI NOS1AP NEL CONTRASTARE I MECCANISMI PATOLOGICI DERIVANTI DALLA PERDITA DI FUNZIONE DI TDP-43

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa progressiva che colpisce i neuroni del cervello e midollo spinale, portando a debolezza muscolare e atrofia. L'incidenza varia da 2 a 3 casi per 100.000 individui ogni anno e attualmente non esistono farmaci in grado di modificare il decorso della malattia. Numerosi studi hanno identificato le ribonucleoproteine eterogenee nucleari (hnRNP), in particolare la proteina legante il DNA TAR-43 (TDP-43), come attori chiave nella SLA. Analizzando i trascritti co-regolati da TDP-43 e altre hnRNP coinvolte nella SLA, è stata identificata la proteina adattatrice della sintasi dell'ossido nitrico 1 (NOS1AP), ovvero l'interattore e modulatore cruciale della NOS neuronale (NOS1) e già associato a schizofrenia, disturbi depressivi e bipolari. Attraverso un complesso ternario che coinvolge NOS1 e la proteina della densità post-sinaptica 95 (PSD-95), NOS1AP è collegato alla cascata di segnalazione del recettore N-metil-D-aspartato (NMDAR). Poiché la deregolazione della via del NMDAR è il fulcro del modello di eccitotossicità da glutammato della patogenesi della SLA, NOS1AP potrebbe rappresentare un target promettente per stabilire una strategia terapeutica efficace contro la SLA. Infatti, è stato dimostrato che NOS1AP può contrastare gli effetti patologici di TDP-43 in cellule neuronali, come il calo dell'espressione dei geni associati al NMDAR. Studiando i domini di NOS1AP, solo il mutante di delezione privo del dominio PTB (Δ PTB) ha mostrato lo stesso pattern di recupero della proteina intera, suggerendo che il dominio PTB è l'unico non coinvolto in questa attività. Inoltre, il mutante Δ PTB sembra localizzarsi prevalentemente nel citoplasma, suggerendo che l'attività di recupero avvenga nel citoplasma piuttosto che nel nucleo. Al momento, l'obiettivo è identificare molecole in grado di modulare l'espressione di NOS1AP e perciò stiamo sviluppando una linea cellulare con il NOS1AP endogeno fuso ad EGFP.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS

P10 **ENDOTHELIAL ACTIVATION IN MOTOR NEURON DISEASE**

G. P. Bhat¹, S. Diprima², C. Beccaria³, P. Podini⁴, A. Motta¹, I. Brambilla¹, A. Badaloni¹, L. Martins¹, C. Malpighi¹, G. Nardo⁵, C. Bendotti⁵, N. Riva⁶, A. Quattrini⁴, D. Bonanomi¹

¹ San Raffaele Scientific Institute, Division of Neuroscience, Molecular Neurobiology

² Center for Omics Sciences (COSR), San Raffaele Scientific Institute

³ Division of Immunology, Dynamics of Immune Responses, San Raffaele Scientific Institute

⁴ Division of Neuroscience and INSPE, Experimental Neuropathology, San Raffaele Scientific Institute

⁵ Laboratory of Molecular Neurobiology, Department of Neuroscience, Mario Negri Pharmacological Research Institute IRCCS, Milan

⁶ IRCCS Carlo Besta Neurological Institute, Milan

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal motor neuron disease (MND) characterized by degeneration of motor neurons in the brain and spinal cord. The reasons for selective vulnerability are unknown. There is an immediate need to identify early disease markers and common pathogenetic processes to develop targeted therapies that are currently unavailable. Although motor neurons are the final disease target, there has been growing interest in non-cell autonomous mechanisms of toxicity derived from glial and immune cells. Less studied but equally tantalizing are evidences of neurovascular abnormalities in ALS patients and disease models. Building on previous reports of loss of blood-spinal cord-barrier integrity, we are investigating whether and how vascular damage contributes to ALS pathogenesis. Unexpectedly, we detected molecular and functional signatures of early endothelial cell dysfunction in blood vessels that supply peripheral nerves containing the axonal projections of motor neurons, rather than in the spinal cord in which their motor neuron cell bodies are clustered. These findings are in line with the emerging concept of “dying-back” pathology, whereby ALS disease signals spread from the periphery to the central nervous system and is supported by clinical evidence in diagnostic biopsies from patients. We found that endothelial activation is accompanied by increase in vascular permeability and infiltration of inflammatory monocytes and neutrophils. Depletion of neutrophils corrects vascular defects and improves motor symptoms in ALS mouse models. Our work points to endothelial activation as an early trigger in ALS and provide a framework for therapies targeting endothelial-immune crosstalk.

P10 **ATTIVAZIONE ENDOTELIALE NELLA MALATTIA DI SLA**

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia fatale dei motoneuroni (MND) caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni nel cervello e nel midollo spinale. Le ragioni della vulnerabilità selettiva sono sconosciute. Esiste la necessità immediata di identificare i marcatori precoci della malattia e i processi patogenetici comuni per sviluppare terapie mirate che attualmente non sono disponibili. Sebbene i motoneuroni siano il bersaglio finale della malattia, vi è stato un crescente interesse per i meccanismi autonomi di tossicità non cellulari derivati dalle cellule gliali e immunitarie. Meno studiate ma altrettanto allettanti sono le prove di anomalie neurovascolari nei pazienti affetti da SLA e nei modelli di malattia. Basandosi su precedenti segnalazioni di perdita dell'integrità della barriera emato-midollare, stiamo studiando se e come il danno vascolare contribuisce alla patogenesi della SLA. Inaspettatamente, abbiamo rilevato segni molecolari e funzionali di disfunzione precoce delle cellule endoteliali nei vasi sanguigni che forniscono i nervi periferici contenenti le proiezioni assionali dei motoneuroni, piuttosto che nel midollo spinale in cui sono raggruppati i loro corpi cellulari dei motoneuroni. Questi risultati sono in linea con il concetto emergente di patologia “dying-back”, in base alla quale i segnali della malattia della SLA si diffondono dalla periferia al sistema nervoso centrale ed sono supportati da prove cliniche nelle biopsie diagnostiche dei pazienti. Abbiamo scoperto che l'attivazione endoteliale è accompagnata da un aumento della permeabilità vascolare e dall'infiltrazione di monociti e neutrofili infiammatori. La deplezione dei neutrofili corregge i difetti vascolari e migliora i sintomi motori nei modelli murini di SLA. Il nostro lavoro punta all'attivazione endoteliale come fattore scatenante precoce della SLA e fornisce un quadro per terapie mirate alla diafonia endoteliale-immunitaria.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P11

HDAC6 AND TDP-43 PROMOTE AUTOPHAGY IMPAIRMENT IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

M. Bordonì¹, E. Scarian¹, C. Viola¹, L. Diamanti¹, F. Dragoni¹, R. Di Gerlando¹, B. Rizzo¹, S. Gagliardi¹, O. Pansarasa¹

¹IRCCS Mondino Foundation, Pavia

TDP-43 is known to bind to the mRNA of histone deacetylase 6 (HDAC6), influencing its translation. Additionally, several studies suggest that HDAC6 is involved in regulating the autophagy pathway, which we have found to be impaired in sporadic ALS (sALS) patients. The aim of this study is to evaluate the interaction between TDP-43 and HDAC6 mRNA and to investigate how HDAC6 overexpression and downregulation affects the autophagy pathway in SH-SY5Y cells.

We first measured HDAC6 protein levels by western blot, while the binding between TDP-43 and HDAC6 mRNA was assessed by RNA immunoprecipitation and in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from sALS patients. The second part of the study was carried out in SH-SY5Y cells, in which the binding by TDP-43 and HDAC6 mRNA was confirmed by RNA-scope. Finally, autophagy was analyzed through western blot and immunofluorescence following HDAC6 overexpression and downregulation.

Our findings reveal an increased HDAC6 protein level and enhanced binding of its mRNA to TDP-43 in sALS PBMCs. We also demonstrated that TDP-43 transfection and aggregation in SH-SY5Y cells lead to HDAC6 overexpression. Moreover, both a significant reduction in acetylated α -tubulin levels, due to HDAC6 overexpression, and a marked increase in acetylated α -tubulin levels, resulting from HDAC6 downregulation, impair the autophagy pathway.

This study provides solid evidence that HDAC6 dysregulation is a key factor in the disruption of the autophagy pathway observed in sALS PBMCs. For the first time, we show that TDP-43 influences autophagy by binding to and modulating HDAC6 mRNA. These findings may represent a promising therapeutic target.



P11

HDAC6 E TDP-43 PROMUOVONO LA COMPROMISSIONE DELL'AUTOFAGIA NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

TDP-43 è noto per legarsi all'mRNA dell'istone deacetilasi 6 (HDAC6), influenzandone la traduzione. Diversi studi suggeriscono inoltre che HDAC6 partecipi alla regolazione dell'autofagia, che abbiamo trovato alterata in pazienti con SLA sporadica (sALS). L'obiettivo di questo lavoro è valutare l'interazione tra TDP-43 e l'mRNA di HDAC6 e studiare gli effetti di over-espressione e down-regolazione di HDAC6 sul pathway autofagico in cellule SH-SY5Y.

Abbiamo inizialmente valutato l'espressione proteica di HDAC6 tramite western blot, mentre il legame tra TDP-43 e l'mRNA di HDAC6 è stato analizzato tramite immunoprecipitazione dell'RNA in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) di pazienti con sALS. La seconda parte dello studio è stata condotta su cellule SH-SY5Y, in cui abbiamo confermato il legame tra TDP-43 e l'mRNA di HDAC6 tramite RNA-scope. Infine, abbiamo investigato il pathway autofagico tramite western blot e immunofluorescenza, dopo over-espressione e down-regolazione di HDAC6.

I nostri risultati mostrano un aumento dell'espressione proteica di HDAC6 e un incremento del legame tra il suo mRNA e TDP-43 nei PBMCs di pazienti con sALS. Abbiamo inoltre dimostrato che la trasfezione e l'aggregazione di TDP-43 nelle cellule SH-SY5Y inducono una over-espressione di HDAC6. Inoltre, abbiamo riscontrato che sia una riduzione eccessiva dei livelli di α -tubulina acetilata, dovuta alla over-espressione di HDAC6, sia un loro aumento, dovuto alla down-regolazione di HDAC6, portano a un'alterazione del pathway autofagico.

Questo lavoro fornisce evidenze solide a supporto dell'ipotesi che la disregolazione di HDAC6 sia un fattore chiave nella compromissione del pathway autofagico che è stato osservato nei pazienti sALS. Per la prima volta, dimostriamo che TDP-43 influenza l'autofagia legandosi e modulando l'mRNA di HDAC6. Questi risultati potrebbero quindi rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P12

TRANSLATOME PROFILING REVEALS DEREGULATED NEUROVASCULAR CROSSTALK IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

I. Brambilla¹, S. De Pretis², A. Badaloni¹, C. Malpighi¹, G. Bhat¹, D. Bonanomi¹

¹ Division of Neuroscience, San Raffaele Hospital, Milan, Italy

² Center for Omics Sciences, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

The pathogenic mechanisms responsible for selective loss of motor neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) are largely unknown, but it has been shown that both cell autonomous and non-cell autonomous factors are involved. Of the many cellular components in the microenvironment surrounding motor neurons, we became interested in the possible contribution of neurovascular unit dysfunction to ALS pathogenesis, since vascular abnormalities have been detected in ALS patients and animal models.

To unravel the crosstalk between vasculature and motor neurons, we employed Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP) technology to profile actively translated mRNAs (collectively termed as translome) in vascular endothelial cadherin (Cdh5)-expressing cells from the spinal cord of mice carrying the ALS-linked SOD1-G93A mutation during disease progression. A bioinformatic pipeline was developed to isolate vascular transcripts and remove parenchymal contaminants. Deconvolution of TRAP-Seq data revealed that the majority of translating mRNAs derived from Cdh5⁺ endothelial cells and perivascular fibroblasts, in both wild type and mutant mice. Discrete changes in vascular translome were detected in SOD1-G93A mutants before the onset of motor defects. The number of differentially expressed transcripts increased markedly after symptoms onset, revealing a significant association with pathways related to immune response activation. Among vascular genes induced at disease onset, we focused on the chemokine eotaxin-1/CCL11, an immune cell chemoattractant that might initiate neuroinflammation contributing to motor neuron pathology.

Altogether, TRAP-mediated translome profiling unmasks dysfunctional vascular pathways in motor neuron disease, and indicates that aberrant endothelial/perivascular signaling is an early event in ALS pathogenesis.



P12

IDENTIFICAZIONE DI ALTERAZIONI NEURO-VASCOLARI NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA TRAMITE PROFILAZIONE DEL TRASLATOMA

I meccanismi patogenetici responsabili della morte selettiva dei motoneuroni nella Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) sono tuttora ignoti, ma è stato dimostrato il coinvolgimento di meccanismi sia cellulo-autonomi che non cellulo-autonomi. Dei diversi tipi cellulari che costituiscono il microambiente del midollo spinale, siamo interessati al potenziale contributo dell'unità neuro-vascolare, dal momento che alterazioni vascolari sono state identificate in pazienti e modelli animali di SLA.

Al fine di investigare le interazioni tra comparto vascolare e motoneuroni, abbiamo utilizzato la tecnologia TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification) per purificare le molecole di mRNA in attiva traduzione (nel loro insieme definite traslatoma) nelle cellule esprimenti la caderina endoteliale Cdh5 derivate dal midollo spinale di topi con mutazione SOD1-G93A correlata a SLA. La selezione dei trascritti vascolari e la concomitante rimozione di contaminanti parenchimali è stata effettuata tramite un apposito protocollo bioinformatico di deconvoluzione. Dall'analisi del dataset deconvoluto è emerso un arricchimento di mRNA in attiva traduzione derivanti da cellule endoteliali e fibroblasti perivascolari esprimenti Cdh5. È stato possibile identificare alterazioni discrete del traslatoma vascolare in topi SOD1-G93A prima dell'esordio della sintomatologia motoria. Il numero di trascritti differenzialmente espressi aumenta in stadi post-sintomatici, con un significativo arricchimento di processi legati all'attivazione immunitaria. Tra i geni vascolari attivati in fasi pre-sintomatiche, abbiamo approfondito il ruolo della chemochina CCL11, un chemo-attrattore di cellule immunitarie responsabile dello stato neuro-infiammatorio che contribuisce alla patologia del motoneurone.

Nel complesso, l'analisi del traslatoma purificato tramite TRAP ha svelato alterazioni endoteliali e perivascolari che rappresentano un evento precoce nella patogenesi della SLA.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P13

THE LNCRNA ZEB1-AS1 IS RELATED TO PROTEIN FUS AND IMPACTS ON THE DEREGLATION OF GLUTAMATERGIC SYNAPSE TARGETS: POSSIBLE IMPLICATION IN SPORADIC AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

F. Rey¹, E. Maghraby², A. Girau¹, C. Cereda², **S. Carelli²**

¹*Pediatric Clinical Research Center "Romeo ed Enrica Invernizzi", Department of Biomedical and Clinical Science, University of Milan, Milan, Italy*

²*Center of Functional Genomics and Rare Diseases, Department of Pediatrics, Buzzi Children's Hospital, Milan, Italy*

ZEB1-AS1 is a long non-coding RNA localized on the strand opposite to the ZEB1 gene, which was recently found to be down-regulated in sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (sALS) peripheral tissue. We previously investigated its mechanism of action and we identified a specific pathway linking ZEB1-AS1 down-regulation to the over-expression of hsa-miR-200c and hsa-miR-139, ultimately resulting in an altered expression of b-Catenin and an aberrant neural morphology. Interestingly, the link between the ALS-causing protein FUS and both ZEB1 and miR-200c has reported recently. This study explores the connection between ZEB1-AS1, ZEB1, and FUS. We performed molecular and functional studies in a neuroblastoma in vitro cell model (SK-NBE) differentiated for 7 days towards a neural phenotype in presence of retinoic acid (10 μ M). By RIP analysis we highlight that both ZEB1 mRNA and ZEB1-AS1 physically interact with FUS, as opposed to GAPDH used as non-related control gene. By RNA interference approach (RNAi) we were able to decrease FUS expression leading to ZEB1 increase without impacting on ZEB1-AS1 expression. Concordantly, when decreasing ZEB1-AS1 expression by RNAi we do not see an impact on ZEB1 and FUS expression. However, in this condition, we show a different localization of FUS, as this appears to shuttle from the nucleus to the cytoplasm. We exposed cells to Sodium Arsenite (0.5 mM) to induce the formation of Stress Granules. Interestingly, following this treatment, ZEB1-AS1 expression results down-regulated, whilst ZEB1 is unchanged, as is the case in sALS patients. Finally, we investigated the molecular consequences of ZEB1-AS1 downregulation at the synaptic level, highlighting a dysregulation of genes such as VGLUT1, VGLUT2, PPP3R1, GNG3, and GRM7, implying a potential impact on glutamate transport and signaling. In conclusion, this investigation underscores the intricate involvement of ZEB1-AS1 and FUS in multiple molecular pathways associated with ALS.



P13

ZEB1-AS1 È CORRELATO A FUS E HA UN IMPATTO SULLA DEREGLAZIONE DEI BERSAGLI DELLA SINAPSI GLUTAMATERGICA: POSSIBILE IMPLICAZIONE NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA SPORADICA

ZEB1-AS1 è un RNA non-codificante a catena lunga localizzato sul filamento opposto al gene ZEB1, che è stato identificato essere down-regolato nella SLA sporadica (sALS). Abbiamo precedentemente studiato il suo meccanismo d'azione identificando un pathway specifico che collega la down-regulation di ZEB1-AS1 alla sovra-espressione di hsa-miR-200c e hsa-miR-139, risultando infine in un'espressione alterata di b-catenina e una morfologia neurale aberrante. È interessante notare che il collegamento tra FUS e sia ZEB1 che miR-200c è stato riportato di recente. Questo studio esplora la connessione tra ZEB1-AS1, ZEB1 e FUS. Abbiamo eseguito studi molecolari e funzionali in cellule SK-NBE differenziate per 7 giorni verso un fenotipo neurale in presenza di acido retinoico (10 μ M). Mediante RIP evidenziamo che sia l'mRNA di ZEB1 che ZEB1-AS1 interagiscono fisicamente con FUS, al contrario di GAPDH utilizzato come gene di controllo non correlato. Mediante l'approccio RNAinterfering (RNAi) abbiamo ridotto l'espressione di FUS portando ad un aumento di ZEB1 senza alterare ZEB1-AS1. Quando si riduce l'espressione di ZEB1-AS1 con RNAi non vediamo un impatto sull'espressione di ZEB1 e FUS. Tuttavia, in questa condizione, mostriamo una diversa localizzazione del FUS, poiché sembra migrare dal nucleo al citoplasma. Abbiamo esposto le cellule alla sodio arsenite (0,5 mM) per indurre la formazione di granuli di stress. È interessante notare che, a seguito di questo trattamento, l'espressione di ZEB1-AS1 risulta ridotta, mentre ZEB1 rimane invariato, come nel caso dei pazienti affetti da sALS. Infine, abbiamo studiato le conseguenze molecolari della down-regulation di ZEB1-AS1 a livello sinaptico, evidenziando una disregolazione di geni come VGLUT1, VGLUT2, PPP3R1, GNG3 e GRM7, implicando un potenziale impatto sul trasporto e sulla segnalazione del glutammato. In conclusione, questo studio evidenzia il coinvolgimento di ZEB1-AS1 e FUS in pathway molecolari associati alla SLA.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P14

GENOTYPICALLY DISTINCT INTERFERON RESPONSE SIGNATURES IN ALS BRAINS CORRELATE WITH DISEASE SEVERITY

O. Carletta¹, O. M. Rifai², C. Perfetto¹, F. Manganelli¹, F. Waldron³, T. Maniatis⁴, J. Gregory³, V. Gerbino⁵

¹ IRCSS Fondazione Santa Lucia, European Center for Brain Research (CERC), Rome, Italy & University of Roma Tre, Rome, Italy

² Centre for Discovery Brain Sciences, University of Edinburgh, UK. Department of Neurology, Center for Motor Neuron Biology and Disease, Columbia

³ Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, UK

⁴ Zuckerman Institute of Mind Brain and Behavior, Columbia University, New York, NY, USA & New York Genome Center, New York, NY, USA

⁵ IRCSS Fondazione Santa Lucia, European Center for Brain Research (CERC), Rome, & Italy Zuckerman Institute of Mind Brain and Behavior, Columbia University, New York, NY, USA

Innate immune signaling pathways are hyperactivated in the central nervous system (CNS) of patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), as well as in preclinical models with diverse causative backgrounds including TDP-43, SOD1, and C9orf72 mutations. This raises an important question of whether these pathways are key pathogenic features of the disease, and whether therapeutic amelioration could be beneficial. Here, we systematically profile Type-I interferon-stimulated gene (ISG) expression signatures in CNS tissue from a cohort of 36 individuals with ALS, including sporadic ALS (sALS; n=18), genetic ALS caused by (i) a C9orf72 hexanucleotide repeat expansion (C9-ALS; n=11), and (ii) a SOD1 mutation (SOD1-ALS; n=5), alongside age- and sex-matched individuals who died of a non-neurological cause (n=12). Using this cohort we have implemented targeted transcriptomic analysis and immunohistochemistry to interrogate the nature and extent of the activation of the Type-I IFN response in patients. We determined disease and genotype specific IFN signatures that correlate with clinical phenotype. Correlation analysis linked six ISGs with aggressive disease progression, as indicated by negative correlation with age at death in ALS patients. Notably, significant upregulation of ISGs was observed in C9-ALS patients, with higher ISG expression correlating with shorter disease duration. Noting that our genotype and disease specific signatures correlated with metrics of disease progression, we explored the therapeutic potential of targeting this pathway in a mouse model of ALS. Treatment with an IFN pathway inhibitor reduced IFN response markers, delayed disease progression, including weight loss and motor decline, and extended survival in ALS mice. We conclude that upregulation of gene expression in the Type-I IFN pathway represents a key pathological feature of ALS and that inhibiting this pathway may provide a promising therapeutic approach for treating ALS.



P14

L'ATTIVAZIONE DELLA RISPOSTA "INTERFERONE DI TIPO I" NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE DI PAZIENTI SLA CORRELA CON LA GRAVITÀ DELLA PATOLOGIA

I meccanismi di segnalazione dell'immunità innata sono iperattivati nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) dei pazienti SLA, come osservato anche in modelli murini con mutazioni genetiche (TDP-43, SOD1, C9orf72). Da qui l'ipotesi che questi meccanismi siano cruciali per lo sviluppo della malattia e che possano rappresentare dei target terapeutici. In questo studio, abbiamo analizzato – mediante analisi di trascrittomica e di immunoistochimica - l'espressione dei geni stimolati dall'interferone di tipo I (IFN-I) (IFN Stimulated Genes, ISG), in tessuti del SNC prelevati da 36 pazienti deceduti per SLA, comprendente SLA sporadica (sSLA; n=18) e SLA genetica determinata da: i) espansione del repeat esanucleotidico nel gene C9orf72 (C9-SLA; n=11), ii) mutazione SOD1 (SOD1-SLA; n=5), insieme ad individui di pari età e sesso deceduti per cause non neurologiche (n=12). Abbiamo identificato specifiche "signatures" di IFN-I, che correlano con il genotipo e con fenotipo clinico. Analisi di correlazione dimostrano che sei ISGs sono associati ad una progressione aggressiva della patologia, suggerito dalla correlazione negativa tra livelli di espressione genica ed età alla morte nei pazienti SLA. In particolare, è stato osservato un aumento significativo dell'espressione degli ISG nei pazienti C9-SLA, in cui la maggiore espressione di questi correla con una durata minore della patologia. Osservando che l'espressione di ISGs correla con la rapidità di progressione della malattia, abbiamo esplorato questo meccanismo come potenziale target terapeutico in un modello murino di SLA. In particolare, il trattamento con un inibitore del pathway dell'IFN rallenta la progressione della patologia, compresa la perdita di peso e il declino motorio, ed estende la sopravvivenza dei topi SLA. Concludiamo che l'up-regolazione di ISGs rappresenta una caratteristica chiave nella patologia e che questo pathway potrebbe rappresentare un promettente target terapeutico per il trattamento della SLA.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P15 **THE TETRASPANIN CD63 FACILITATES THE REMOVAL OF TDP-43 INSOLUBLE SPECIES FROM IMMORTALIZED MOTONEURONAL CELLS VIA EXTRACELLULAR VESICLES**

E. Casarotto¹, P. Koshal¹, A. C. Conti², M. Brodnanovà¹, M. Chierichetti¹, L. Cornaggia¹, M. Cozzi¹, V. Ferrari¹, R. F. Magdalena Parra¹, A. Mohamed¹, M. Piccolella¹, P. Pramaggiore¹, B. Tedesco¹, R. Cristofani¹, M. Galbiati¹, P. Rusmini¹, R. Cascella², A. Poletti¹, V. Crippa¹

¹ Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti", Università degli Studi di Milano, Italia

² Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche 'Mario Serio', Università degli Studi di Firenze, Italia

The TDP-43 protein and its C-terminal fragments, TDP-35 and TDP-25, tend to form insoluble species in the cytosol of cells affected by amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a phenomenon also observed in other neurodegenerative diseases like frontotemporal dementia (FTD) and Alzheimer's disease. The protein quality control (PQC) system is the primary cellular mechanism that prevents the formation of these potentially toxic species and promotes their degradation. However, we and others demonstrated that TDP-43 and its C-terminal fragments are also secreted into extracellular vesicles (EVs), both large (LEVs) and small (SEVs), suggesting cooperation between the PQC system and EVs in maintaining TDP-43 proteostasis.

To further explore the secretion mechanism of TDP-43 and its C-terminal fragments into EVs, we transiently transfected immortalized mouse motoneuronal cells (NSC34) with plasmids encoding TDP-43, TDP-35, or TDP-25, tagged with the fluorescent protein Tomato. Additionally, we used a plasmid encoding CD63, a tetraspanin present on the membrane of SEVs and commonly used as an EVs marker, tagged with GFP. The TDP-Tomato plasmids were transfected either individually or together with the GFP-CD63 plasmid to analyze both the intracellular TDP-43 protein content and that of the EVs isolated from the cell culture medium.

Surprisingly, the results revealed that co-transfection of the different TDP-Tomato species with GFP-CD63 significantly decreased both the number of TDPs aggregates per cell and the levels of insoluble forms of TDP-43, TDP-35, and TDP-25 within the cells, while simultaneously enhancing the secretion of these insoluble forms into EVs, particularly LEVs.

These findings suggest that CD63 may facilitate the clearance of insoluble TDP-43 species by promoting their secretion through EVs.

GRANTS: PRIN2022 PNRR finanziato dall'Unione europea—Next Generation EU, M4 C1, CUP P20225R4Y5 (VC)



P15 **LA TETRASPANINA CD63 FACILITA LA RIMOZIONE DELLE SPECIE INSOLUBILI DI TDP-43 DA CELLULE IMMORTALIZZATE MOTONEURONALI ATTRAVERSO LE VESICOLE EXTRACELLULARI**

La proteina TDP-43 e i suoi frammenti C-terminali, TDP-35 e TDP-25, tendono a formare aggregati citotossici insolubili nel citosol delle cellule colpite da sclerosi laterale amiotrofica (SLA), così come in altre malattie neurodegenerative. Il sistema di controllo di qualità delle proteine (PQC) è il principale meccanismo cellulare che previene la formazione di questi aggregati e che ne promuove la degradazione. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che TDP-43 e i suoi frammenti C-terminali vengono anche secreti nelle vescicole extracellulari (EVs), sia grandi (LEVs) che piccole (SEVs), suggerendo una cooperazione tra PQC ed EVs per mantenere la proteostasi di TDP-43.

Per esplorare ulteriormente il meccanismo di secrezione delle specie di TDP-43 nelle EVs, abbiamo trasfettato in transiente delle cellule motoneuronali murine immortalizzate, le NSC34, con tre plasmidi codificanti per TDP-43, TDP-35 e TDP-25, etichettati con la proteina fluorescente Tomato, e con un plasmide codificante per CD63, una tetraspanina presente sulla membrana delle SEVs e frequentemente utilizzata come marker delle EVs, marcata con GFP. I plasmidi TDP-Tomato sono stati trasfettati nelle NSC34 sia singolarmente sia insieme al plasmide GFP-CD63 per poi analizzare il contenuto proteico intracellulare e quello delle EVs isolate dal terreno di coltura.

Sorprendentemente, i risultati ottenuti hanno mostrato che la co-trasfezione delle diverse specie di TDP-Tomato con GFP-CD63 riduce significativamente sia il numero di aggregati di TDP-43 per cellula sia le forme insolubili di TDP-43, TDP-35 e TDP-25 presenti all'interno delle cellule, aumentando al contempo la secrezione di queste forme insolubili nelle EVs, in particolare nelle LEVs.

Questi dati indicano che CD63 potrebbe facilitare la rimozione degli aggregati insolubili di TDP-43, promuovendo la loro secrezione nelle EVs.

GRANTS: PRIN2022 PNRR finanziato dall'Unione europea—Next Generation EU, M4 C1, CUP P20225R4Y5 (VC)

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P16

SHHIELD - TARGETING SMOOTHENED TO PROMOTE NEUROPROTECTION IN ALS

M. Ciuro¹, M. Sangiorgio¹, V. Caniglia¹, S. Mastrogiovanni¹, D. D'Arco¹, S. Giunta¹, R. Gulino¹

¹ University of Catania, Catania

Sonic Hedgehog (Shh) is a morphogen that regulates cell fate and neuronal functions. Recent evidence has highlighted a critical role for Shh neuroprotection and proteostasis, but its exact role in ALS pathogenesis remains unclear. In this pilot study, by challenging the Shh pathway, we aimed at clarifying these aspects by using SOD1-G93A ALS mouse model. Previous research using neurotoxic models of MN loss has linked Shh signaling to synaptic plasticity, neural progenitor cell activity and functional recovery. Therefore, we sought to assess the impact of either Shh pathway activation or inhibition, in SOD1 mice treated with i.p. injection of the smoothened (SMO) receptor agonist Clobetasol or the selective SMO inhibitor Vismodegib, or vehicle alone, once a week from 10 week, starting at 10 post-natal weeks. Age-matched wild-type mice were treated in the same conditions as controls. To evaluate motor performance, longitudinal behavioural tests, including rotarod and grid walk were performed weekly over the course of treatment.

Vismodegib-treated mice showed significant decline in motor performance compared to both vehicle and clobetasol-treated groups, suggesting that inhibition of Shh signaling has a detrimental impact on motor function, exacerbating neurodegeneration. In contrast, stimulation of the Shh-pathway with Clobetasol did not significantly influence the motor performance compared to the vehicle group. Ongoing tissue analysis and RNA-Seq (ongoing in the Buratti lab) will help elucidate the molecular mechanisms underlying the observed functional effects.

In conclusion, this pilot study highlights the potential role of Shh pathway modulation in ALS progression. The decline of motor performance observed with a SMO inhibitor would confirm the importance of Shh pathway in neuroprotection, providing a foundation for further studies to elucidate the therapeutic potential of targeting the Shh-SMO axis in ALS.



P16

EFFETTI FUNZIONALI DELLA MODULAZIONE DELLA PATHWAY DI SONIC HEDGEHOG IN UN MODELLO DI SLA

Sonic hedgehog (Shh) è un morfogeno coinvolto nel differenziamento cellulare e in diverse funzioni neuronali. Dati recenti hanno mostrato effetti importanti di Shh nella neuroprotezione, ma il suo ruolo nella SLA risulta ancora in gran parte sconosciuto. L'obiettivo di questo progetto era quello di indagare il ruolo di Shh tramite la modulazione farmacologica della sua pathway, usando il modello murino SOD1-G93A. Un nostro studio precedente ha mostrato che Shh è coinvolto nella plasticità sinaptica e nel recupero funzionale in un modello di rimozione neurotossica dei motoneuroni. In questo progetto, abbiamo testato l'effetto dell'attivazione o dell'inibizione della pathway nei topi SOD1, tramite iniezione i.p. di Clobetasol, un agonista dei recettori smoothened, o dell'inibitore Vismodegib, una volta a settimana per 10 settimane, a partire dall'età di 10 settimane. Altri topi SOD1 sono stati trattati con veicolo e animali wild-type sono stati inclusi come controlli. Per valutare l'attività motoria, gli animali sono stati testati tramite rotarod e grid walk test.

Il trattamento con Vismodegib ha causato un declino dell'attività motoria superiore a quello osservato nei trattati con veicolo, suggerendo che l'inibizione della pathway di Shh possa esacerbare gli eventi neurodegenerativi. Il trattamento con Clobetasol, invece, non ha mostrato effetti significativi. Gli studi ancora in corso sui campioni tissutali e le analisi di RNA-Seq (in corso nel laboratorio diretto da Emanuele Buratti) ci potranno dare indicazioni sui meccanismi responsabili degli effetti funzionali osservati.

In conclusione, questo studio pilota ci ha suggerito che la modulazione della pathway di Shh può avere un ruolo significativo nella progressione della SLA. Il declino dell'attività motoria osservato dopo trattamento con un inibitore di smoothened suggerisce l'importanza di questa pathway nella neuroprotezione, ponendo le basi per futuri studi sul suo potenziale terapeutico nella SLA.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P17

INVESTIGATING PLASMA AND BRAIN CHOLESTEROL ESTERIFICATION IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

C. Comi¹, L. Calabresi¹, C. Pavanello¹, M. Farè², L. Tremolizzo², F. Gerardi³, F. Cerri³

¹ Centro Grossi Paoletti, Università degli Studi Milano

² Clinica Neurologica, IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza

³ Centro Clinico Nemo, Ospedale Niguarda, Milano

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease, with metabolic alterations, abnormal cholesterol and lipid levels in the bloodstream and CNS reported in patients. Similar to plasma, cholesterol in the cerebrospinal fluid (CSF) is carried by lipoproteins known as "HDL-like particles," due to their close similarity in density and composition to plasma HDL. Lecithin cholesterol acyltransferase is a key enzyme in HDL metabolism. It catalyses the cholesterol esterification both in plasma and CSF, thus leading to HDL maturation. A recent study conducted in our laboratory demonstrated a hampered cholesterol esterification in the CSF of patients with Alzheimer disease (AD). For this reason, the purpose of this work was to investigate cholesterol esterification in plasma and CSF, and to characterize HDL subclass distribution in patients with ALS. The study included 20 ALS patients and 20 controls, in whom lipoprotein profile and cholesterol esterification were evaluated both in plasma and CSF. Plasma lipids are similar between patients and controls; however, the amount of discoidal pre β -HDL is significantly reduced in patients compared to controls ($8.5 \pm 4.9\%$ vs $13.6 \pm 4.1\%$, $p < 0.0001$). A significant increase in CSF unesterified cholesterol levels is observed in ALS patients compared to controls (0.22 ± 0.07 mg/dL vs 0.15 ± 0.04 mg/dL, $p < 0.01$), leading to an increased unesterified/total cholesterol ratio in ALS patients (0.52 ± 0.12 vs 0.40 ± 0.12 , respectively). ALS patients do not show alterations in plasma cholesterol esterification, but the cholesterol esterification rate is significantly reduced in the CSF of the patients (0.16 ± 0.10 vs 2.41 ± 1.98 , $p < 0.01$).

In conclusion, these results suggest an impairment of cholesterol esterification in the CSF of ALS patients and support the evidence that this is a common feature in neurodegenerative diseases.



P17

CARATTERIZZAZIONE DELL'ESTERIFICAZIONE DEL COLESTEROLO NEL PLASMA E NEL FLUIDO CEREBROSPINALE DI PAZIENTI CON SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

Alterazioni nell'omeostasi del colesterolo nel sistema nervoso centrale sono state osservate in diverse malattie neurodegenerative, compresa la sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Il colesterolo nel liquido cerebrospinale (CSF) è trasportato da lipoproteine, chiamate "HDL-like particles", perché molto simili per densità e dimensione alle HDL plasmatiche. Un passaggio cruciale nel metabolismo delle HDL è mediato dall'enzima Lecitina colesterolo aciltransferasi (LCAT), che catalizza l'esterificazione del colesterolo. Uno studio recentemente condotto nel nostro laboratorio, ha dimostrato che l'esterificazione del colesterolo è alterata nel CSF e nel plasma di pazienti con Alzheimer. Lo scopo di questo lavoro è stato quindi di valutare l'esterificazione del colesterolo nel plasma e CSF di pazienti affetti da SLA. Lo studio ha arruolato 20 pazienti e 20 controlli. Il profilo lipidico/lipoproteico e l'esterificazione del colesterolo sono stati valutati nel plasma e nel CSF, utilizzando per quest'ultimo metodiche opportunamente modificate. Il profilo lipidico e lipoproteico plasmatico è comparabile tra pazienti affetti da SLA e controlli. Al contrario, la concentrazione di colesterolo non esterificato nel CSF è significativamente aumentata in pazienti affetti da SLA rispetto ai controlli (0.22 ± 0.07 mg/dL vs 0.15 ± 0.04 mg/dL, $p < 0.01$) e come conseguenza il rapporto colesterolo non esterificato/colesterolo totale è aumentato nel CSF dei pazienti rispetto i controlli. La capacità di esterificazione del colesterolo nel CSF dei pazienti è significativamente ridotta (0.16 ± 0.10 vs 2.41 ± 1.98 , $p < 0.01$), mentre nel plasma non si notano alterazioni. Il profilo delle sottoclassi di HDL nel plasma dei pazienti è simile a quello dei controlli, ma il contenuto di particelle discoidali pre β HDL risulta ridotta ($8.5 \pm 4.9\%$ vs $13.6 \pm 4.1\%$, $p < 0.0001$). In conclusione, questi dati suggeriscono una possibile alterazione nell'esterificazione del colesterolo a livello del CSF dei pazienti affetti da SLA.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P18

CARDIAC INNERVATION IS COMPROMISED BY MUSCLE-DERIVED miR-206

V. Di Mauro¹, M. Ronfini¹, V. Prando¹, A. Franco-Romero¹, M. Albiero², L. Poli¹, L. Dokshokova², M. Capri³, S. Salvioli⁴, C. Franceschi⁵, M. Guescini⁶, M. Sandri⁷, M. Mongillo⁷, T. Zaglia⁷

¹ Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Padova, Italy - Veneto Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padova, Italy

² Department of Medicine, The University of Padova, Padova, Italy

³ DIMES-Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, University of Bologna, Bologna, Italy-CIG- Interdepartmental Centre "Galvani", University of Bologna, Bologna, Italy

⁴ CIG- Interdepartmental Centre "Galvani", University of Bologna, Bologna, Italy

⁵ IRCCS, Institute of Neurological Sciences of Bologna, Bologna, Italy

⁶ Department of Molecular Sciences, University of Urbino Carlo Bo, Urbino, Italy

⁷ Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Padova, Italy; Veneto Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padova, Italy - Interdepartmental Research Center of Myology (cirMYO), Padova, Italy

ALS is a fatal disorder with highly variable manifestations and biomarkers of disease subtype/stage are required to improve patient care. Among these, the muscle-specific microRNA, miR-206, is a promising candidate. Recently, ALS has been defined as a 'multicellular disorder', involving several cell types, including skeletal muscle cells. Muscle-restricted expression of the ALS mutation, SOD1G93A, causes NMJ dismantlement, muscle atrophy and paralysis. Alteration in the sympathetic nervous system occurs in ALS patients, who frequently display arrhythmias and stress-cardiomyopathy. However, direct involvement of sympathetic neurons (SNs), in ALS, is unknown. In the heart, SNs control heart function and structure, while, in skeletal muscle, sustain muscle homeostasis and NMJ stability. In both muscles, SNs impinge on 'muscle-to-neuron' neurotrophin signaling, to sustain neuronal trophism.

Muscle-specific block of autophagy, occurring in MLC1f/Atg7^{-/-} mice, leads to increased secretion, by muscle fibers, of extracellular-vesicles (EVs) enriched in miR-206, whose levels were found elevated in the bloodstream. Circulating miR-206 is taken up by cardiac SNs and cardiomyocytes. MiR-206 leads to sympathetic denervation, alterations in heart homeostasis and increased incidence of ectopic beats. In SNs, these effects are due to the downregulation of the NGF receptor p75, affecting the efficiency of NGF retrograde transport and increased cell death. In cardiomyocytes miR-206 impacts on Ca²⁺ dynamics and on proteostasis, leading to contractility dysfunction and cell atrophy. Notably, SOD1G93A mice, which display muscle autophagy impairment, show increased miR-206 levels in serum, heart and cervical ganglia. This is accompanied by degeneration of muscle- and heart- sympathetic innervation and cardiomyocytes dysfunction. We identified miR-206 as new mediator of "long-range" effects on cardiac neurons and cardiomyocytes, favoring cardiac dysfunction.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P18

IL miR-MUSCOLO SPECIFICO COMPROMETTE L'INNERVAZIONE CARDIACA

La SLA è una malattia mortale con manifestazioni altamente variabili e l'identificazione di biomarcatori del sottotipo/stadio è necessaria. Il microRNA muscolo-specifico miR-206, è un candidato promettente. La SLA è "malattia multicellulare", che coinvolge diversi tipi di cellule, come le cellule muscolari scheletriche. L'espressione nei muscoli della mutazione ALS, SOD1G93A, provoca lo smantellamento della NMJ, atrofia muscolare e paralisi. L'alterazione del sistema nervoso simpatico si verifica nei pazienti affetti da SLA, che presentano frequentemente aritmie e cardiomiopatia da stress. Tuttavia, il coinvolgimento diretto dei neuroni simpatici (SN), nella SLA, è sconosciuto. Nel cuore, i SN controllano la funzione e la struttura del cuore, nel muscolo scheletrico, sostengono l'omeostasi muscolare e la stabilità della NMJ. In entrambi i muscoli, i SN controllano la segnalazione delle neurotrofine "muscolo-neurone", per sostenere il trofismo neuronale. Il blocco muscolo-specifico dell'autofagia nei topi MLC1f/Atg7^{-/-}, porta ad un aumento della secrezione di vescicole extracellulari (EV) ricche in miR-206, i cui livelli sono stati trovati elevati nel flusso sanguigno. Il miR-206 viene captato dai SN cardiaci e dai cardiomiociti e causa denervazione simpatica, alterazioni dell'omeostasi cardiaca e aumento di battiti ectopici. Nei SN, causa la riduzione del recettore p75 dell'NGF, che influisce sull'efficienza del trasporto retrogrado dell'NGF e sull'aumento della morte cellulare. Nei cardiomiociti miR-206 influisce sulla dinamica del Ca²⁺ e sulla proteostasi, portando a disfunzione della contrattilità e atrofia. I topi SOD1G93A, che mostrano un deficit dell'autofagia muscolare, hanno livelli aumentati di miR-206 nel siero, nel cuore e nei gangli cervicali, degenerazione dell'innervazione simpatica muscolare e cardiaca. Il miR-206 risulta un nuovo mediatore degli effetti sui neuroni cardiaci e sui cardiomiociti, favorendo la disfunzione cardiaca.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P19 **UNVEILING MAP1B AS A NEW POSSIBLE PHENOTYPIC DETERMINANT FOR SPORADIC BULBAR ALS PATIENTS**

F. Dragoni¹, R. Di Gerlando¹, B. Rizzo¹, L. Diamanti¹, M. Bordoni¹, E. Scarian¹, C. Viola¹, O. Pansarasa¹, S. Gagliardi¹

¹IRCCS Mondino Foundation, Pavia

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a complex disease with strong variability. Bulbar ALS (bALS) is considered the most severe due to rapid deterioration, short survival time, and worse quality of life. Our aim was to perform two RNA-seq studies on total RNAs and miRNAs in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 40 spinal ALS patients (sALS), 10 bALS patients and 19 healthy controls (HC) for total RNA-seq and 19 sALS patients, 6 bALS patients and 11 HCs for miRNA-seq. From total RNA-seq we found 38 deregulated (DE) genes in sALS patients and 373 DE gene in bALS. From miRNA-seq we found 17 DE miRNAs in sALS patients and 10 DE miRNAs in bALS patients. We performed computational research for DE miRNAs' target and crossed results with DE genes from RNA-seq. While in sALS patients, we detected only 1 DE miRNA that had a DE gene as target; in bALS group we identified 3 DE miRNAs, downregulated, which had their target among the DE genes emerged. By cross-referencing targets of identified miRNAs to find shared genes, we evidenced a single target gene (MAP1B), upregulated in RNA-seq of bALS, common to the 3 miRNAs, largely involved in neuronal maturation, differentiation and survival. Only targets of mir-92a-3p revealed involvement in muscle contraction. The same miRNA targets TDP-43, largely involved in ALS pathogenesis for its tendency to aggregate in neurons. MAP1B is a component of Lewy Bodies, identified in bALS and capable of interacting with neurofibrillary tangles. Deregulation of mir-92a-3p and MAP1B may cause ectopic protein accumulation in motor neurons (MNs), leading to faster MNs degeneration in bALS phenotype. We validated our results by RT-qPCR in PBMCs and overexpressed mir-92a-3p in SH-SY5Y cells and neurons, and looked for MAP1B decrease. RT-qPCR demonstrated the downregulation of MAP1B following miRNA overexpression. MAP1B could represent a future therapeutic target for modulating and improving the poor prognosis of bALS patients.



P19 **MAP1B COME NUOVO POSSIBILE DETERMINANTE FENOTIPICO PER I PAZIENTI SPORADICI AFFETTI DA SLA BULBARE**

La SLA bulbare (bALS) è considerata la forma più grave a causa del rapido deterioramento, del breve tempo di sopravvivenza e della peggiore qualità della vita degli affetti. Il nostro obiettivo è stato eseguire due studi RNA-seq su RNA totali e miRNA in PBMC di pazienti SLA spinali, bulbari e controlli sani. Dall'RNA-seq abbiamo trovato 38 geni deregolamentati (DE) nei pazienti spinali e 373 geni DE nella bALS. Da miRNA-seq abbiamo trovato 17 miRNA DE nei pazienti con sALS e 10 miRNA DE nei bALS. Abbiamo eseguito una ricerca computazionale per i target dei miRNA DE e abbiamo incrociato i risultati con i geni DE di RNA-seq. Mentre nei pazienti affetti da sALS, abbiamo rilevato solo 1 miRNA DE che aveva un gene codificante DE come bersaglio; nel gruppo bALS abbiamo identificato 3 miRNA downregolati, che avevano il loro bersaglio emerso tra i geni DE. Incrociando i target dei miRNA identificati, per trovare geni condivisi, abbiamo evidenziato un singolo gene bersaglio (MAP1B), sovraregolato nell'RNA-seq di bALS, target comune ai 3 miRNA, largamente coinvolto nella maturazione, differenziazione e sopravvivenza neuronale. Solo i bersagli di mir-92a-3p hanno rivelato un coinvolgimento nella contrazione muscolare. Lo stesso miRNA prende di mira il TDP-43, largamente coinvolto nella patogenesi della SLA per la sua tendenza ad aggregarsi nei neuroni. MAP1B è un componente dei Corpi di Lewy, identificato nella bALS. La deregolamentazione di mir-92a-3p e MAP1B può causare un accumulo ectopico di proteine nei motoneuroni (MN), portando a una degenerazione più rapida dei MN nel fenotipo bALS. Abbiamo validato i nostri risultati mediante RT-qPCR nei PBMC e abbiamo sovraespresso (O/E) mir-92a-3p in SH-SY5Y e neuroni per valutare la diminuzione di MAP1B. Abbiamo dimostrato la downregulation di MAP1B in seguito alla O/E di miRNA. MAP1B potrebbe rappresentare un futuro bersaglio terapeutico per modulare e migliorare la prognosi sfavorevole dei pazienti affetti da bALS.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P20

ACETYLATION OF CYCLOPHILIN A REVERSES TDP-43 MISLOCALIZATION IN PBMCs OF ALS PATIENTS: POTENTIAL BIOMARKER AND THERAPEUTIC TARGET

M. Favagrossa¹, L. Pasetto¹, S. Scozzari¹, S. F. Columbro¹, G. De Marco², A. Calvo², V. Bonetto¹

¹ Research Center for ALS, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Milano, Italy

² "Rita Levi Montalcini" Dipartimento di Neuroscienze, Università di Torino, Torino, Italia

Cytoplasmic mislocalization and aggregation of TDP-43 is a neuropathological hallmark in most ALS patients. Previously, we discovered that cyclophilin A (PPIA), a foldase and molecular chaperone, interacts with TDP-43 to regulate its localization and function; this interaction is favoured by PPIA Lys-acetylation (AcPPIA). TDP-43 in patients is typically studied in post-mortem tissues, as there is still no reliable assay for this protein in biological fluids. We have previously shown that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients exhibit TDP-43 alterations. The aim of this study was to further investigate TDP-43 mislocalization in PBMCs of ALS patients in relation to PPIA and AcPPIA.

55 ALS patients and 54 healthy controls were recruited and phenotyped. TDP-43, PPIA and AcPPIA levels were analyzed in subcellular fractions of PBMCs by capillary electrophoresis. PBMCs from 9 ALS patients were cultured in vitro and treated with an HDAC inhibitor (HDACi).

The results show that TDP-43 accumulates in the nucleus of ALS patients, while TDP-35 accumulates in the cytoplasm, especially in patients with slow progression and long disease duration. PPIA levels decrease in ALS patients, whereas AcPPIA levels are elevated, particularly in patients with slow progression and long disease duration, likely as a compensatory mechanism due to PPIA deficiency. In fact, PBMCs treated with an HDACi show an increase in AcPPIA, a redistribution of PPIA between the nucleus and cytoplasm, and a reduction of TDP-43 in the cytoplasm.

In conclusion, we identified a slow-progression and long-disease-duration fingerprint in PBMCs of ALS patients. PPIA deficiency and the consequent TDP-43 mislocalization could be mitigated by increasing AcPPIA levels, a potential therapeutic strategy for TDP-43-related proteinopathies.



P20

L'ACETILAZIONE DI CICLOFILLINA A INVERTE LA MISLOCALIZZAZIONE DI TDP-43 NEI PBMC DI PAZIENTI SLA: POSSIBILE BIOMARCATORE E BERSAGLIO TERAPEUTICO

La mislocalizzazione citoplasmatica e l'aggregazione di TDP-43 sono un segno distintivo neuropatologico della SLA. In precedenza, abbiamo dimostrato che ciclofillina A (PPIA), una foldasi e chaperone molecolare, interagisce con TDP-43, regolandone la localizzazione e la funzione, in particolar modo quando è acetilata in lisina (AcPPIA). TDP-43 nei pazienti è studiata nei tessuti post-mortem, in quanto non c'è ancora un saggio affidabile per questa proteina nei fluidi biologici. Abbiamo anche dimostrato che le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) dei pazienti mostrano alterazioni in TDP-43. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare in particolare la mislocalizzazione di TDP-43 nei PBMC di pazienti SLA in relazione a PPIA e AcPPIA.

55 pazienti SLA e 54 controlli sani sono stati reclutati e fenotipizzati. La localizzazione di TDP-43, PPIA e AcPPIA è stata analizzata nei PBMC con elettroforesi capillare (Jess, Biotechne). Un sottogruppo di PBMC provenienti da 9 pazienti SLA sono stati trattati in vitro con un inibitore di HDAC (HDACi).

I risultati mostrano che TDP-43 accumula nel nucleo dei pazienti SLA, mentre TDP-35 accumula nel citoplasma, soprattutto nei pazienti con progressione lenta e lunga durata di malattia. I livelli di PPIA diminuiscono nei pazienti SLA, invece i livelli di AcPPIA risultano elevati, soprattutto nei pazienti con progressione lenta e lunga durata di malattia come probabile meccanismo compensatorio dovuto alla carenza di PPIA. Infatti, i PBMC trattati con un HDACi mostrano un aumento di AcPPIA, una ridistribuzione nucleo-citoplasma di PPIA e una riduzione di TDP-43 nel citoplasma.

In conclusione, abbiamo identificato un fingerprint di progressione lenta e lunga durata di malattia nei PBMC dei pazienti SLA. La carenza di PPIA e la conseguente mislocalizzazione di TDP-43 potrebbero essere attenuate aumentando i livelli di AcPPIA, potenziale strategia terapeutica per le proteinopatie legate a TDP-43.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P21

MULTI-OMICS APPROACHES TO CHARACTERIZE PATIENT-DERIVED SPINAL CORD ORGANOID AND ASSESS NOVEL GENES ASSOCIATED WITH C9ORF72-AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

N. Galli¹, M. Rizzuti¹, L. Ottoboni², J. Ongaro¹, M. Nizzardo², G. P. Comi¹, S. Corti¹

¹ *Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Neurology Unit, Milan, Italy*

² *Dino Ferrari Centre, Neuroscience Section, Department of Pathophysiology and Transplantation (DEPT), University of Milan, Milan, Italy*

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common motor neuron (MN) disease in adulthood and still represents a prominent health issue. ALS pathophysiology involves progressive MNs degeneration in brain and spinal cord (SC) that leads to irreversible muscle atrophy and death within few years. In the context of multifactorial diseases like ALS, 3D models are a promising tool that can recapitulate the complex architecture of tissues in a more accurate manner than 2D cultures. This work aims to characterize induced pluripotent stem cell-derived SC organoids (SCOs) with OMICs approaches, assessing novel ALS-associated genes/pathways. SCOs generated from 3 C9orf72 and 3 isogenic cell lines were collected at 30, 55, and 80 days in vitro (DIV) and evaluated for their developmental features by immunofluorescence and qPCR. Although both experimental groups displayed neural progenitors, post-mitotic neurons, MNs, and glial cells, C9orf72 SCOs showed a reduced level of maturity, a condition observed by many researchers, despite ALS being not considered a neurodevelopmental disorder. Mass spectrometry highlighted significant dysregulations in cytoskeleton, DNA damage response, ATP metabolic process, and RNA metabolism in C9orf72 cellular lines compared with their respective isogenic lines. Single-cell RNA sequencing followed by gene annotation disclosed the predominance of neuroectoderm and neural cell populations in the samples, remarking the potential of this disease model. Differential gene expression analysis performed on MNs and astrocyte cluster pointed out impairments in cholesterol and energy metabolism, RNA-binding proteins, oxidative stress and mitochondria, nonsense-mediated decay, and axon guidance – all biological processes that have been associated with ALS pathology. The modulation of genes identified by computational analysis might allow the assessment of novel candidates associated with C9orf72-ALS pathogenesis and their potential as therapeutic targets.



P21

APPROCCI MULTI-OMICI PER CARATTERIZZARE ORGANOIDI DI SPINAL CORD DERIVATI DA PAZIENTI E IDENTIFICARE NUOVI GENI ASSOCIATI ALLA SLA-C9orf72

La Sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è la più comune malattia del motoneurone (MN) nell'adulto e tutt'oggi rappresenta una grave questione di salute pubblica. La patologia si manifesta con una progressiva degenerazione dei MN nel cervello e nel midollo spinale che comporta un'irreversibile atrofia muscolare e il decesso in pochi anni. Trattandosi di una malattia multifattoriale, i modelli 3D sono uno strumento promettente in grado di ricapitolare meglio l'architettura tissutale rispetto alle tradizionali colture cellulari. In questo lavoro, abbiamo caratterizzato organoidi di midollo spinale (SCO) con un approccio di tipo omico, allo scopo di identificare nuovi geni associati alla SLA e nuove strategie terapeutiche. Gli organoidi generati da 3 linee C9orf72 e le rispettive linee isogeniche sono stati raccolti a 30, 55 e 80 giorni esaminandone lo sviluppo con immunofluorescenza e qPCR. Benché entrambi i gruppi sperimentali si componessero di progenitori neurali, neuroni post-mitotici, MN e glia, gli organoidi C9orf72 sono risultati più immaturi – una condizione osservata da diversi ricercatori, malgrado la SLA non venga considerata una malattia del neurosviluppo. Analisi di spettrometria di massa hanno evidenziato nei campioni C9 importanti disregolazioni a livello di citoscheletro, risposta al danno al DNA, metabolismo dell'ATP e dell'RNA. Il single-cell RNA sequencing e la successiva annotazione hanno rivelato una predominanza di neuroectoderma e popolazioni neurali, rimarcando l'affidabilità di questo modello. L'analisi differenziale condotta sul cluster dei MN e degli astrociti ha denotato che il metabolismo (specie del colesterolo), le proteine RNA-binding, i mitocondri e la crescita assonale sono compromessi negli organoidi C9 – tutti processi associati alla SLA. La modulazione di geni identificati con l'analisi computazionale potrebbe permetterci di validare nuovi candidati associati alla patologia della SLA-C9orf72 e la loro idoneità come target terapeutici.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P22

INTERFERING WITH FUS PROTEIN AGGREGATION WITH IN SILICO-DESIGNED RNA APTAMERS

M. Gilodi¹, A. Armaos¹, J. Rupert¹, E. Zacco¹, G. G. Tartaglia¹

¹ Istituto Italiano di Tecnologia, Genova

Aggregation of mislocalized Fused in sarcoma (FUS) into insoluble inclusion is a critical event in the onset and progression of several neurodegenerative diseases. FUS is a multitasking DNA/RNA-binding protein involved in several functions related to nucleic acid metabolism. Efforts to understand and mitigate FUS aggregation are paramount for developing potential therapies for these disorders. Here we exploit the use of RNA aptamers -short oligonucleotides with defined 3D structure- to interfere with aberrant FUS self-assembly. Our hypothesis posits that specific RNA molecules can be employed to stabilize the protein's native conformation, preventing pathological aggregation. The FUS-targeting RNA aptamers have been developed using an in-house algorithm called catRapid, which predicts protein-RNA pairs interaction strength. Using Biolayer Interferometry (BLI), we demonstrated that these aptamers display unprecedented affinity towards their target. Aggregation assays demonstrated that the strong interaction enables the proposed RNAs to completely abrogate the aberrant aggregation of FUS, keeping the protein in its soluble state. These RNA aptamers are currently being investigated for their ability to block the accumulation of insoluble, non-functional and toxic FUS in mammalian cell lines. This study provides compelling evidence that exploiting protein-RNA interactions can be a viable approach to preventing protein aggregation. These RNA sequences pave the way for the development of a strategy to increase protein solubility and could be adopted as an anti-aggregation rational therapeutic strategy for FUS.



P22

USO DI APTAMERI A RNA INGEGNERIZZATI IN SILICO PER INIBIRE L'AGGREGAZIONE DELLA PROTEINA FUS

L'aggregazione anomala della proteina Fused in sarcoma (FUS) in inclusioni insolubili rappresenta un fattore determinante nell'insorgenza e nella progressione di diverse malattie neurodegenerative. FUS è una proteina multifunzionale che si lega a DNA e RNA coinvolta in processi chiave del metabolismo degli acidi nucleici. Comprendere e ridurre l'aggregazione di FUS è essenziale per sviluppare terapie efficaci contro questi disturbi. In questo studio, abbiamo sviluppato aptameri a RNA, brevi oligonucleotidi con strutture tridimensionali definite, per impedire l'autoassemblaggio patologico di FUS. La nostra ipotesi è che particolari molecole di RNA possano stabilizzare la conformazione nativa della proteina, impedendo la sua aggregazione patologica. Utilizzando l'algoritmo catRapid, che predice l'interazione proteina-RNA, abbiamo selezionato aptameri con alta affinità per FUS, come confermato dalla Biolayer Interferometry (BLI). Gli esperimenti di aggregazione dimostrano che questi aptameri prevengono efficacemente l'aggregazione aberrante di FUS, mantenendo la proteina solubile. Attualmente in fase di sperimentazione su linee cellulari di mammifero, questi aptameri a RNA mostrano un potenziale promettente come strategia terapeutica per contrastare l'accumulo di FUS insolubile nelle malattie neurodegenerative.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P23

SUMOYLATION INFLUENCES TDP-43 AGGREGATION AND RE-LOCALIZATION

R. Marino¹, P. Cappelletti², R. Maccarone³, M. Corbo², M. Feligioni⁴

¹ European Brain Research Institute - Rita Levi Montalcini Foundation, Rome, Italy, Department of Biotechnological and Applied Clinical Sciences, University of L'Aquila, L'Aquila, Italy

² Department of Neurorehabilitation Sciences, Casa di Cura Igea, Milan, Italy

³ Department of Biotechnological and Applied Clinical Sciences, University of L'Aquila, L'Aquila, Italy

⁴ European Brain Research Institute - Rita Levi Montalcini Foundation, Rome, Italy, Department of Neurorehabilitation Sciences, Casa di Cura Igea, Milan, Italy

Amotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurological disease that causes progressive motor neurons degeneration. TDP-43, a highly conserved RNA/DNA-binding protein involved in RNA processing, is a major player in ALS pathophysiology.

In ALS, TDP-43 mis-localizes from the nucleus to the cytoplasm, forming cytotoxic aggregates. Recent studies have highlighted the importance of post-translational modifications (PTMs) of TDP-43, in particular, SUMOylation, a covalent protein modification, appears to be involved in TDP-43 loss of function and aggregation. However, further studies are needed to fully elucidate these mechanisms.

To explore the effects of SUMOylation on TDP-43 aggregation and mis-localization, SH-SY5Y cells were treated with sodium arsenite (SA) to induce TDP-43 aggregation. The experiments were analyzed by immunofluorescence (IF), western blot (WB), and immunoprecipitation (IP). IF showed that SUMO-1 forms nuclear aggregates and co-localizes with TDP-43 aggregates under toxic conditions and newly formed cytoplasmic stress granules (SGs) were contained co-localized TDP-43 and SUMO-1. Co-IP confirmed both the SUMOylation of TDP-43 and their non-covalent interaction. Interestingly, the non-covalent interaction was lost as well as covalent SUMOylation was reduced.

Furthermore, in SA-treated cells, a reduction in nuclear TDP-43 and a corresponding increase in cytoplasmic TDP-43 were observed. Notably, SUMOylation of TDP-43 was more prominent in the cytoplasm of treated cells.

These findings suggest that SUMOylation plays a role in TDP-43 mis-localization and cytoplasmic aggregation. The non-covalent interaction between SUMO-1 and TDP-43 is crucial for normal cellular function, and when disrupted, TDP-43 becomes more prone to mis-localization and aggregation. These results highlight SUMOylation as a potential therapeutic target for ALS.



P23

LA SUMOILAZIONE INFLUENZA L'AGGREGAZIONE E LA DIVERSA LOCALIZZAZIONE DI TDP-43

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia neurologica che causa una progressiva degenerazione dei motoneuroni. TDP-43, una proteina legante RNA/DNA e coinvolta nel suo processamento, svolge un ruolo centrale nella patologia della SLA. Nella SLA, TDP-43 si sposta dal nucleo al citoplasma, dove forma aggregati citotossici. Studi recenti hanno evidenziato l'importanza delle modifiche post-traduzionali di TDP-43, in particolare la SUMOilazione, una modifica covalente delle proteine, che sembra essere coinvolta nella perdita di funzione e nell'aggregazione di TDP-43.

Per esplorare gli effetti della SUMOilazione sull'aggregazione e la mis-localizzazione di TDP-43, cellule SH-SY5Y sono state trattate con arsenite di sodio per indurne l'aggregazione. Gli esperimenti sono stati analizzati tramite immunofluorescenza (IF), western blot (WB) e immunoprecipitazione (IP). Le analisi IF hanno mostrato che SUMO-1 forma aggregati nucleari e co-localizza con gli aggregati di TDP-43 in condizioni tossiche. Inoltre, TDP-43 e SUMO-1 co-localizzano con i granuli da stress citoplasmatici. La co-IP ha confermato sia la SUMOilazione di TDP-43 che la loro interazione non covalente. È interessante notare che questa interazione non covalente è stata persa dopo trattamento, così come la SUMOilazione covalente risulta ridotta.

Inoltre, nelle cellule trattate con SA, si è osservata una riduzione di TDP-43 nucleare e un corrispondente aumento di TDP-43 citoplasmatica. In particolare, la SUMOilazione di TDP-43 era più evidente nel citoplasma delle cellule trattate.

Questi risultati suggeriscono che la SUMOilazione svolge un ruolo nella mis-localizzazione di TDP-43 e nella sua aggregazione e l'interazione non covalente tra SUMO-1 e TDP-43 è cruciale per il normale funzionamento cellulare, e quando viene interrotta, TDP-43 diventa più suscettibile alla mis-localizzazione e aggregazione. Questi risultati evidenziano la SUMOilazione come un potenziale bersaglio terapeutico per la SLA.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P24

FUS ORCHESTRATES METABOLIC PROCESSES ASSOCIATED WITH ALS PATHOPHYSIOLOGY

X. Mingaj¹, J. Awad¹, P. Cauchy², S. Megat², Q. Raas¹, L. Dupuis², S. Ciura¹, E. Kabashi¹, A. Marian¹

¹ *Imagine Institute, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité, Translational research for neurological disorders, Paris, France.*

² *Université de Strasbourg, Inserm, Strasbourg Translational Neuroscience and Psychiatry, Centre de Recherches en Biomédecine; Strasbourg, France*

Mutations in Fused in sarcoma (FUS) gene can cause a juvenile form of Amyotrophic lateral sclerosis (FUS-ALS) with a particularly aggressive motor degeneration that is currently untreatable. In fus-/- zebrafish recapitulating ALS features, including paralysis and increased larval mortality, we show disruption of muscle fiber organization and mitochondrial network integrity. Metabolomics and transcriptomics in fus-/- zebrafish, FUS depleted myoblasts and edited mutant FUS human motor neurons point to hypermetabolism, deregulation of carnitine transport of fatty acids, decrease of crucial TCA cycle intermediate and a shift towards glycolytic metabolism. Acetyl-L-carnitine supplementation rescued the motor phenotype and extended life in fus-/- zebrafish larvae. Moreover, a distinct subgroup of fus-/- zebrafish with significantly milder phenotypes was found to compensate the effects of fus mutation by upregulating a cancer-like state, including an increase of the PKM2 isoform enzyme. Indeed, pharmaceutical activation of PKM2 shifted the severely affected cohort towards a mild phenotype. Thus, our results elucidate an essential role of FUS in metabolic pathways involved muscle maintenance and identify therapeutic strategies for FUS driven ALS.



P24

FUS ORCHESTRA I PROCESSI METABOLICI ASSOCIATI ALLA FISIOPATOLOGIA DELLA SLA

Mutazioni nel gene Fused in sarcoma (FUS) possono causare una forma giovanile di sclerosi laterale amiotrofica (FUS-ALS) con una degenerazione motoria particolarmente aggressiva, attualmente non curabile. In un modello zebrafish fus-/- che ricapitola le caratteristiche della SLA, tra cui la paralisi e l'aumento della mortalità larvale, mostriamo un'alterazione dell'organizzazione delle fibre muscolari e dell'integrità della rete mitocondriale. Analisi metabolomiche e trascrittomiche in zebrafish fus-/-, in mioblasti con perdita di FUS e in motoneuroni differenziati da hiPSCs presentanti mutazioni comuni nel gene FUS è stato evidenziato ipermetabolismo, una deregolazione del trasporto di carnitina degli acidi grassi, una diminuzione di intermedi cruciali del ciclo TCA e uno spostamento verso il metabolismo glicolitico. La supplementazione di acetil-L-carnitina ha ripristinato il fenotipo motorio e prolungato la sopravvivenza nelle larve di zebrafish fus-/- . Inoltre, un sottogruppo distinto di zebrafish fus-/- con fenotipi significativamente più lievi è stato trovato in grado di compensare gli effetti della mutazione fus attraverso l'upregulation di uno stato metabolico tipicamente presente in cellule cancerogene, presentando quindi un aumento dell'enzima isoforma PKM2. In effetti, l'attivazione farmaceutica di PKM2 ha spostato la coorte gravemente colpita verso un fenotipo lieve. Pertanto, i nostri risultati chiariscono un ruolo essenziale di FUS nelle vie metaboliche coinvolte nel mantenimento del muscolo e identificano strategie terapeutiche per la SLA causata da perdita di funzione di FUS.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P25

THE RNA-BINDING PROTEIN HUD/ELAVL4 AS A POSSIBLE NEW TARGET IN FUS AND SPORADIC ALS

A. Rosa¹, B. Silvestri¹, M. Mochi¹, M. Medici¹, B. Borhy¹, V. de Turris², A. Colantoni¹, D. Mawrie³, M. G. Garone⁴, C. P. Zammerilla³, E. N. Anderson³, M. Simula¹, M. Ballarino¹, A. Setti¹, U. B. Pandey³

¹ Department of Biology and Biotechnologies "Charles Darwin", Sapienza University of Rome, Rome, Italy

² Center for Life Nano- & Neuro-Science, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Rome, Italy

³ Department of Pediatrics, Children's Hospital of Pittsburgh, University of Pittsburgh Medical Center, PA, USA

⁴ Stem Cell Medicine Department, Murdoch Children's Research Institute, Parkville, Australia

Early defects at the neuromuscular junction (NMJ) are among the first hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). According to the "dying back" hypothesis, disruption of the NMJ not only precedes, but is also a trigger for the subsequent degeneration of the motoneuron in both sporadic and familial ALS, including ALS caused by the severe FUS pathogenic variant P525L. However, the mechanisms linking genetic and environmental factors to NMJ defects remain elusive. By taking advantage of co-cultures of motoneurons and skeletal muscle derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs), we show that the neural RNA binding protein HuD (ELAVL4) may underlie NMJ defects and apoptosis in FUS-ALS. HuD overexpression in motoneurons phenocopies the severe FUS-P525L mutation, while HuD knockdown in FUS-P525L co-cultures produces phenotypic rescue. We validated these findings in vivo in a Drosophila FUS-ALS model. Neuronal-restricted overexpression of the HuD-related gene, *elav*, produces per se a motor phenotype, while neuronal-restricted *elav* knockdown significantly rescues motor dysfunction caused by FUS. Finally, we show that HuD levels increase upon oxidative stress in human motoneurons and in sporadic ALS patients with an oxidative stress signature. On these bases, we propose HuD as an important player downstream of FUS mutation in familial ALS, with potential implications for sporadic ALS related to oxidative stress. Development of RNA-based drugs targeting HuD is currently underway in our lab.



P25

LA PROTEINA DI LEGAME ALL'RNA HuD/ELAVL4 COME POSSIBILE NUOVO BERSAGLIO NELLA SLA FUS E SPORADICA

Difetti alla giunzione neuromuscolare (NMJ) sono tra i primi segni distintivi della sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Secondo l'ipotesi del "dying back", la disfunzione della NMJ non solo precede, ma è anche un fattore scatenante della successiva degenerazione del motoneurone sia nella SLA sporadica che familiare, inclusa la SLA causata dalla grave variante patologica P525L nel gene FUS. Tuttavia, rimangono da chiarire i meccanismi che collegano i fattori genetici e ambientali ai difetti della NMJ. Sfruttando co-culture di motoneuroni e muscolo scheletrico derivati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (iPSC), mostriamo che la proteina legante l'RNA neuronale HuD (ELAVL4) potrebbe essere alla base dei difetti della NMJ e dell'apoptosi nella SLA-FUS. La sovraespressione di HuD nei motoneuroni riproduce il fenotipo della grave mutazione FUS-P525L, mentre la riduzione dell'espressione di HuD in co-culture FUS-P525L porta a un recupero fenotipico. Abbiamo convalidato questi risultati in vivo in un modello di Drosophila della SLA-FUS. La sovraespressione limitata ai neuroni del gene ortologo di HuD, *elav*, produce di per sé un fenotipo motorio, mentre la riduzione dell'espressione neuronale di *elav* recupera in modo significativo la disfunzione motoria causata da FUS. Infine, dimostriamo che i livelli di HuD aumentano in presenza di stress ossidativo nei motoneuroni umani e nei pazienti con SLA sporadica che presentano una "signature" di stress ossidativo. Sulla base di questi risultati, proponiamo HuD come un importante fattore a valle della mutazione FUS nella SLA familiare, con potenziali implicazioni anche per la SLA sporadica legata allo stress ossidativo. Lo sviluppo di farmaci basati su RNA diretti contro HuD è attualmente in corso nel nostro laboratorio.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P26

GENERATION AND CHARACTERIZATION OF SPINAL CORD ORGANIDS FOR THE STUDY OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

E. Scarian¹, M. Bordoni¹, C. Viola², F. Dragoni³, R. Di Gerlando⁴, B. Rizzo³, R. Fontana⁴, L. Diamanti⁵, S. Gagliardi³, O. Pansarasa¹

¹ Cellular Models and Neuroepigenetics Section, IRCCS Mondino Foundation, Pavia, Italy

² Department of Brain and Behavioral Sciences, University of Pavia, Pavia, Italy

³ Molecular Biology and Transcriptomics Section, IRCCS Mondino Foundation, Pavia, Italy

⁴ Department of Biology and Biotechnology "L. Spallanzani", University of Pavia, Pavia, Italy

⁵ Neuroncology Unit, IRCCS Mondino Foundation, Pavia, Italy

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare neurodegenerative disease, which affects motor neurons leading to their degeneration. Unfortunately, only symptomatic treatments are available probably due to the absence of realistic models. Organoids are pluripotent stem cell-derived self-organizing structures, which allow the generation and the study of tissues in vitro. In our work we developed a new protocol for the generation of spinal cord organoids (SCOs) and we characterized them for morphology, transcriptomic and epigenetic profiles, comparing them to 2D cell cultures. By immunofluorescence analysis, we found a thicker glial layer and shorter neurites in sporadic ALS (sALS) SCOs compared to healthy controls (CTRL) SCOs. Moreover, by RNAseq, we discovered a significant deregulation in sALS SCOs compared to CTRL SCOs, particularly in genes related to extracellular matrix organization, and a high degree of resemblance with pathological human spinal cord. Because of this major deregulation, we performed an epigenetic characterization on organoids and 2D cultures at each differentiation step, investigating the DNA methylation status by ELISA and the expression of the principal DNA methyl-transferases (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) by RT-qPCR and by western blot. In sALS SCOs, we observed a reduced methylation status, indicating that the major deregulation may be caused by a minor methylated DNA and, as a result, a potential increase in transcription rate. Moreover, we found that DNA methylation differences are mainly due to changes in DNMT1 protein expression, and not to changes in DNA methyl-transferases genes expression. In conclusion, our findings imply that SCOs are a potentially useful tool for the study of ALS since they replicate many ALS characteristics mimicking the environment in which the cells physiologically grow.



P26

GENERAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI ORGANOIDI DI MIDOLLO SPINALE PER LO STUDIO DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

La sclerosi laterale amiotrofica è una malattia neurodegenerativa rara che causa la degenerazione dei motoneuroni. Gli unici trattamenti disponibili sono quelli sintomatici anche a causa dell'assenza di modelli realistici per studiarla. Gli organoidi sono strutture auto-organizzanti derivanti da cellule staminali pluripotenti, che consentono la generazione e lo studio di organi in vitro. Abbiamo sviluppato un protocollo per la generazione di organoidi di midollo spinale e li abbiamo caratterizzati per la loro morfologia, il profilo trascrittomico ed epigenetico, comparandoli alle culture 2D. Tramite immunofluorescenza abbiamo trovato che gli organoidi di midollo spinale di SLA sporadica (SLAs) presentavano uno strato gliale più spesso e neuriti più corti rispetto a quelli di controllo (CTRL). Inoltre, tramite RNAseq, è emersa un'importante deregolazione negli organoidi SLAs, in particolare in geni coinvolti nella matrice extracellulare. Inoltre, gli organoidi hanno mostrato un alto grado di similarità con il midollo spinale patologico umano. Vista la maggiore deregolazione, siamo andati a caratterizzare epigeneticamente tutti gli step di differenziamento delle colture 2D e degli organoidi, investigando lo stato di metilazione del DNA tramite tecnologia ELISA e l'espressione delle principali DNA metiltransferasi (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) tramite RT-qPCR e western blot. Abbiamo osservato un minore stato di metilazione del DNA negli organoidi SLAs, indice che la maggiore deregolazione potrebbe essere causata da un DNA meno metilato e quindi da una maggiore trascrizione. Inoltre, i dati hanno mostrato che le differenze nello stato di metilazione sono dovute principalmente a cambiamenti nell'espressione proteica di DNMT1. In conclusione, i risultati dimostrano che gli organoidi di midollo spinale sono un buon modello per lo studio della SLA in quanto ne riproducono molte caratteristiche, mimando l'ambiente in cui le cellule crescono e si sviluppano fisiologicamente.

IDENTIFICATION OF NEW TARGETS



P27

miR-129-5p: A KEY FACTOR AND THERAPEUTIC TARGET IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

F. Sironi¹, A. Romano², L. Ottoboni¹, M. Rizzuti², V. Melzi², D. Gagliardi², F. Verde¹, A. Ratti³, G. P. Comi³, N. Ticozzi³, V. Silani³, S. Corti²

¹ Department of Pathophysiology and Transplantation, Dino Ferrari Center, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

² Neurology Unit, Foundation IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

³ Department of Neurology and Laboratory of Neuroscience, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a debilitating neurodegenerative disease primarily marked by the progressive loss of motor neurons. While most ALS cases are sporadic, around 10% are familial. Although the exact mechanisms driving ALS remain elusive, there is growing evidence pointing towards RNA metabolism alterations and microRNA (miRNA) dysregulation. Among several miRNAs, we found that the levels of miR-129-5p were the most altered in in vitro and in vivo ALS models, as well as in PBMCs and CSF of ALS patients. We observed that the miR-129-5p upregulation caused the downregulation of one of its targets, the RNA-binding protein ELAVL4/HuD, predominantly expressed in neurons, where it controls several key neuronal mRNAs and the neurite outgrowth. Remarkably, we demonstrated that the administration of an antisense oligonucleotide (ASO) designed with a Morpholino chemistry targeting pre-miR-129-1p reduced TDP43 mislocalization and phosphorylation and DNA damage, increased the neurite length and restored the levels of some TDP43-dependent altered transcript in vitro. Moreover, the treatment with Morpholino significantly improved the neuromuscular phenotype and increased the survival in an ALS animal model. Collectively, these insights suggest that concurrent miRNA analysis across varied human samples might be pivotal in decoding the molecular mechanisms underlying ALS, paving the way for the identification of new potential disease biomarkers and innovative miRNA therapeutic interventions.



P27

miR-129-5p: UN FATTORE CHIAVE E UN BERSAGLIO TERAPEUTICO NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa debilitante caratterizzata principalmente dalla perdita progressiva dei motoneuroni. La maggior parte dei casi di SLA è sporadica, mentre circa il 10% è di origine familiare. Sebbene i meccanismi esatti che scatenano la SLA siano ancora poco chiari, un numero crescente di prove indicano alterazioni del metabolismo dell'RNA e una disregolazione dei microRNA (miRNA) tra le cause. Tra i vari miRNA, abbiamo riscontrato che i livelli di miR-129-5p sono i più alterati nei modelli di SLA in vitro e in vivo, nonché nei PBMC e nel liquido cerebrospinale (CSF) dei pazienti con SLA. Abbiamo osservato che l'aumento di miR-129-5p causa la riduzione di uno dei suoi bersagli, la proteina legante l'RNA ELAVL4/HuD, espressa principalmente nei neuroni, dove controlla diversi mRNA neuronali chiave e la crescita dei neuriti. Abbiamo dimostrato che la somministrazione di un oligonucleotide antisense (ASO) progettato con una chimica Morpholino mirata al pre-miR-129-1p riduce la mislocalizzazione e la fosforilazione di TDP43 e i danni al DNA, ha aumentato la lunghezza dei neuriti e ha ripristinato i livelli di alcuni trascritti alterati dipendenti da TDP43 in vitro. Inoltre, il trattamento con Morpholino ha migliorato significativamente il fenotipo neuromuscolare e aumentato la sopravvivenza in un modello animale di SLA. Complessivamente, questi risultati suggeriscono che l'analisi simultanea dei miRNA in vari campioni umani potrebbe essere fondamentale per decifrare i meccanismi molecolari alla base della SLA, aprendo la strada all'identificazione di nuovi potenziali biomarcatori della malattia e a interventi terapeutici innovativi basati sui miRNA.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P28

SITE-DIRECTED RNA EDITING FOR CORRECTING POINT MUTATIONS CAUSING fALS

D. Capuano¹, P. Frugis¹, M. De Robertis¹, A. Barbon², G. Pesole¹, E. Picardi¹, A. M. D'Erchia¹

¹ Università degli Studi di Bari, Bari

² Università degli Studi di Brescia, Brescia

RNA editing changes are prominent in the human transcriptome. The most common type involves the deamination of adenosine (A) into inosine (I), carried out by members of the ADAR family of enzymes acting on double-stranded RNA. In the last few years, advanced engineering of RNA editing is coming up as a promising therapeutic approach to perform programmable base conversion on target RNAs involved in a variety of human genetic diseases. Site-directed RNA editing harnessing endogenous ADARs is becoming an effective alternative to genome editing since transient and leaves unaltered the DNA blueprint. Several of such approaches relying on the recruitment of endogenous ADAR enzymes allow the correction of pathological G>A point mutations through antisense guide oligonucleotides (ASO) that specifically recognize the target transcript. Here, we explored the suitability of these novel strategies in correcting G>A point mutations causing the familial form of Amyotrophic Lateral Sclerosis (fALS). We conducted a comprehensive search on ClinVar for detecting all possible G>A mutations occurring in key fALS genes such as TARDBP, SOD1, and FUS. Then, for each mutation, we predicted the ADAR editability of target adenosines analyzing surrounding bases through dedicated bioinformatics tools. Gly298Ser mutation in TARDBP gene was finally selected for the design of ad hoc ASOs to express in HEK293 cell line carrying mutated transcript to assay the correction efficiency. Since the pairing between ASO and target is critical for ADAR-mediated editing, we designed circular antisense RNAs that should improve the recruitment of ADARs and we are currently investigating the degree of correction.



P28

RNA EDITING SITO-SPECIFICO PER CORREGGERE MUTAZIONI PUNTIFORMI CHE CAUSANO LA fALS

L'RNA editing è un processo rilevante nel trascrittoma umano. Il tipo più comune consiste nella deaminazione dell'adenosina (A) in inosina (I), un processo mediato dagli enzimi della famiglia ADAR che agiscono su RNA a doppio filamento. Negli ultimi anni, l'ingegnerizzazione dell'RNA editing si è affermata come un promettente approccio terapeutico per eseguire conversioni programmabili delle basi su RNA target, coinvolti in numerose malattie genetiche. L'RNA editing sito-specifico che sfrutta le ADAR endogene sta infatti emergendo come un'alternativa promettente all'editing del genoma, poiché è transiente e non altera il DNA. Alcuni di questi approcci, basati sul reclutamento delle ADAR endogene, permettono di correggere mutazioni puntiformi G>A patologiche tramite oligonucleotidi guida antisense (ASO), che riconoscono specificamente il trascritto mutato. In questo studio, abbiamo valutato l'efficacia di queste nuove strategie nel correggere mutazioni G>A che causano la forma familiare della sclerosi laterale amiotrofica (fALS). Abbiamo condotto una ricerca approfondita su ClinVar per individuare tutte le possibili mutazioni G>A nei principali geni legati alla fALS, come TARDBP, SOD1 e FUS. Successivamente, abbiamo predetto la capacità degli enzimi ADAR di modificare le adenosine target, analizzando le basi circostanti con strumenti bioinformatici. La mutazione Gly298Ser nel gene TARDBP è stata selezionata per il disegno di ASO specifici, da esprimere nella linea cellulare HEK293 portatrice del trascritto mutato, per testare l'efficienza di correzione. Dato che l'interazione tra ASO e trascritto è cruciale per l'editing mediato da ADAR, abbiamo progettato RNA antisense circolari, con l'obiettivo di migliorare il reclutamento degli ADAR, e stiamo attualmente investigando l'efficacia della correzione.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P29

A GENE THERAPY APPROACH TARGETING TDP-43 PATHOLOGY FOR ALS (GATTALS)

S. F. Columbro¹, A. Ghioni¹, M. Favagrossa¹, F. Conci², P. V. Fioretti², M. Basso², L. Pasetto¹, V. Bonetto¹

¹ Research Center for ALS, Mario Negri Pharmacological Research Institute IRCCS, Milan, Italy

² Department of Cellular, Computational and Integrative Biology - CIBIO, University of Trento, Trento, Italy

TDP-43 is a key RNA binding protein and the primary constituent of cytoplasmic neuronal inclusions in up to 97% of ALS patients. Both the gain of cytoplasmic functions and loss of nuclear functions of TDP-43 appear to contribute to the pathogenesis, with impaired TDP-43 trafficking being a key event driving pathology. In previous studies, we demonstrated that cyclophilin A (PPIA) is an interacting partner of TDP-43 that regulates its trafficking and function. Moreover, we provided evidence that the acetylated form of PPIA has a higher affinity for TDP-43. The aim of this project is to evaluate whether increasing PPIA levels in neurons and motor neurons restores TDP-43 localization and function and could serve as an effective therapeutic strategy for ALS. Here, we present the development of an AAV-based approach to deliver PPIA and an acetyl-PPIA mimetic into the central nervous system of a fast-progressing TDP-43 mouse model. We designed two AAV vectors: one with an ubiquitous promoter to achieve rapid and robust expression of the target protein and the other with a neuronal-specific promoter to avoid expression in other cell types. We analyzed the biodistribution of the AAVs and found that both AAVs transduce PPIA in the spinal cord and brain to varying degrees. However, significant off-target expression was observed with the ubiquitous promoter. We established a motor testing platform to evaluate motor deficits in the fast-progressing TDP-43 mouse model and developed a robust methodology for analysing cryptic and skiptic exons, as possible response biomarkers. A pilot trial with both AAVs is currently underway in the TDP-43 mouse model to assess their effects on neurodegeneration and denervation biomarkers. In parallel, we are investigating the impact of PPIA and acetyl-PPIA mimetic on TDP-43 mislocalization and nucleocytoplasmic transport in neuronal cell paradigms of TDP-43 pathology.



P29

UN APPROCCIO DI TERAPIA GENICA MIRATO ALLA PATOLOGIA TDP-43 PER LA SLA (GATTALS)

TDP-43 è una RNA binding protein ed è il principale costituente delle inclusioni citoplasmatiche neuronali in circa il 97% dei pazienti SLA. L'aumento delle funzioni citoplasmatiche e la perdita delle funzioni nucleari di TDP-43 sembrano contribuire alla patogenesi, con un alterato traffico di TDP-43 come evento chiave che guida la patologia. In studi precedenti, abbiamo dimostrato che la ciclofillina A (PPIA) interagisce con TDP-43, regolando il suo traffico e la sua funzione. Inoltre, abbiamo dimostrato che la forma acetilata di PPIA ha una maggiore affinità per TDP-43. L'obiettivo di questo progetto è valutare se l'aumento dei livelli di PPIA nei neuroni e nei motoneuroni possa ripristinare la localizzazione e la funzione di TDP-43, offrendo una strategia terapeutica per la SLA. Presentiamo lo sviluppo di un approccio basato su AAV per veicolare PPIA e un mimetico di acetil-PPIA nel sistema nervoso centrale di un modello murino di TDP-43 a rapida progressione. Abbiamo progettato due vettori AAV: uno con un promotore ubiquitario per espressione rapida e robusta, e l'altro specifico per i neuroni, per limitare l'espressione in altri tipi cellulari. La biodistribuzione degli AAV è stata analizzata, mostrando che entrambi trasducono PPIA nel midollo spinale e nel cervello, ma il promotore ubiquitario ha causato una significativa espressione in organi off-target. Abbiamo creato una piattaforma di test motori per valutare i deficit motori nel modello murino TDP-43 e una metodologia per analizzare esoni criptici e skiptici, potenziali biomarcatori di risposta. Attualmente, è in corso una sperimentazione pilota con entrambi gli AAV per valutarne gli effetti sulla neurodegenerazione e sui biomarcatori di denervazione. Parallelamente, stiamo studiando l'impatto di PPIA e del mimetico di acetil-PPIA sulla mislocazione di TDP-43 e sul trasporto nucleocitoplasmatico in cellule neuronali paradigma della patologia da TDP-43.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P30

DRUG X: A REPURPOSABLE COMPOUND MITIGATING SOD1-ALS PHENOTYPES IN FLY AND MURINE MODELS

F. Liguori¹, S. Amadio¹, I. Passaro¹, F. Alberti², M. Armida³, S. Bullitta³, C. Angioli⁴, A. Ferriero⁴, R. L. Potenza³, F. Verni⁴, C. Volonté⁵

¹ Experimental Neuroscience and Neurological Disease Models, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Rome

² Experimental Neuroscience and Neurological Disease Models, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Rome - TIGEM - Telethon Institute of Genetics and Medicine, Pozzuoli (NA)

³ National Centre for Drug Research and Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Rome

⁴ Department of Biology and Biotechnology "Charles Darwin", Sapienza University of Rome

⁵ Experimental Neuroscience and Neurological Disease Models, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Rome - Institute for Systems Analysis and Computer Science (IASI), National Research Council (CNR), Rome

Amotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of motor neurons. A portion of ALS cases is linked to mutations in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene. This study investigated the therapeutic potential of compound X, a repurposable antidepressant drug, which succeeded in ameliorating ALS-related symptoms in SOD1 *Drosophila* and mouse in vitro and in vivo models.

Our previous results obtained in transgenic fly models pan-neuronally expressing different human SOD1 mutations (hSOD1G85R or hSOD1A4V), demonstrated that mutant SOD1 expression decreased survival and up-regulated the IMD immune pathway through antimicrobial peptides (AMPs). Moreover, cytological analysis revealed hSOD1-induced chromosome aberrations. Interestingly, treatment with compound X reverted the above-mentioned phenotypes, extending lifespan, inhibiting AMPs expression and reducing the frequency of chromosome damage.

We next extended these results with in vitro and in vivo murine models. We adopted transiently transfected motor neuron-like NSC-34 cells and transgenic mice both expressing the hSOD1G93A mutation. NSC-34-hSOD1G93A cells treated with compound X revealed a strong modulation of the common markers of inflammation IL1 β , IL6, and TNF α transcripts. Likewise, compound X elicited a significant reduction of neuroinflammation and preservation of neuronal health in transgenic mice, when administered (i.p.) after the onset of motor symptoms.

These results demonstrated that treatment with compound X significantly reduced chromosome aberrations, microglial and astroglial activation, pro-inflammatory cytokine production, and neurotoxicity. Further studies will prove if compound X may represent a novel and appealing therapeutic strategy for the treatment of ALS.



P30

FARMACO X: UN COMPOSTO RIPOSIZIONABILE CHE ATTENUA IL FENOTIPO SLA-SOD1 IN MODELLI DI MOSCERINI E MURINI

La SLA è una malattia neurodegenerativa caratterizzata dalla graduale perdita di motoneuroni. Una parte dei casi di SLA è causata da mutazioni nel gene SOD1. Il nostro studio ha analizzato il potenziale terapeutico del composto X, un farmaco antidepressivo riposizionabile, che ha migliorato diversi sintomi associati alla SLA-SOD1 sia in modelli di *Drosophila* sia in modelli murini.

I nostri precedenti risultati, ottenuti in moscerini transgenici esprimenti la SOD1 umana mutata in tutti i neuroni (hSOD1-G85R o hSOD1-A4V), hanno dimostrato che questa riduce la sopravvivenza dei moscerini e incrementa il "pathway" dell'immunità innata IMD mediante i peptidi antimicrobici (AMPs). Inoltre, l'analisi citologica ha rivelato la presenza di aberrazioni cromosomiche. È interessante notare che il trattamento con il composto X ha revertito i fenotipi sopra menzionati, prolungando la durata della vita, inibendo l'espressione degli AMPs e riducendo la frequenza del danno cromosomico.

Abbiamo quindi continuato i nostri studi su modelli murini in vitro e in vivo, utilizzando sia la linea cellulare motoneuronale NSC-34 transitoriamente transfettata con la mutazione hSOD1-G93A, sia topi transgenici hSOD1-G93A. Le cellule NSC-34-hSOD1G93A trattate con il composto X hanno mostrato una forte modulazione dell'espressione di IL1 β , IL6 e TNF α , comuni marcatori di infiammazione. Allo stesso modo, il composto X ha determinato una significativa riduzione della neuroinfiammazione, risultando neuroprotettivo nei topi transgenici quando somministrato (i.p.) dopo l'insorgenza dei sintomi motori. I nostri risultati hanno dimostrato che il trattamento con il composto X riduce significativamente le aberrazioni cromosomiche, l'attivazione microgliale e astrogliale, la produzione di citochine pro-infiammatorie e la neurotossicità. Ulteriori studi dimostreranno se il composto X può rappresentare una strategia terapeutica nuova e interessante per il trattamento della SLA.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P31 **ENHANCING SKELETAL MUSCLE REGENERATION IN ALS VIA INTRAMUSCULAR ALLOSTERIC ACTIVATION OF THE P2X7 RECEPTOR**

C. Margotta¹, P. Fabrizio¹, S. Caravita¹, A. Passoni², A. Lanno², N. Innocenti³, C. Nastasi⁴, A. Tosolini⁵, F. Steyn⁶, E. Davoli², E. Biasini³, S. Ngo⁵, G. Nardo¹

¹Research Center for ALS, Department of Neuroscience, Mario Negri Institute for Pharmacological Research IRCCS, Milan, Italy

²Mass Spectrometry Centre for Health and for Environment, Mario Negri Institute for Pharmacological Research IRCCS, Milan, Italy

³Department of Cellular, Computational and Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy,

⁴Laboratory of Cancer Pharmacology, Department of Oncology, Mario Negri Institute for Pharmacological Research IRCCS, Milan, Italy

⁵The Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Brisbane QLD, Australia

⁶School of Biomedical Sciences, the University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal motor neuron disorder characterized by early skeletal muscle failure and irreversible atrophy at the periphery. We recently found that systemic intramuscular administration of the P2X7 agonist (BzATP), improved motor performance in ALS mice by enhancing satellite cells and the muscle pro-regenerative activity of infiltrating macrophages.

Here, we translated this evidence into a therapeutic strategy in ALS by investigating the disease-modifying effects of enhancing the P2X7 pathway in the skeletal muscle of ALS mouse models using a highly selective P2X7 positive allosteric modulator, the ginsenoside compound K (CK). CK has shown neuroprotective, anti-inflammatory, and pro-regenerative effects in chronic diseases, and it has high specificity for the P2X7 receptor in humans, making it a safe and effective drug for clinical use.

Preliminary data shows that CK stimulates, via the P2X7 pathway, the proliferation and the differentiation of muscle satellite cells isolated from ALS mice. Additionally, CK polarizes primary macrophage cells towards an M2 anti-inflammatory phenotype, which is crucial for effective muscle regeneration.

In parallel, a targeted pharmacokinetic and pharmacodynamics study was conducted to determine the optimal CK dose regimen. These data allowed us to obtain primary in vivo evidence in ALS mice. Intramuscular treatments with CK increases muscle mass, which correlates with more mature muscle fibers in early-stage ALS mice undergoing muscle atrophy.

Our data provide the first evidence to show that selective activation of the P2X7 pathway with CK exerts positive effects on skeletal muscle regeneration in ALS mice. Ongoing studies will systematically validate this therapeutic strategy to promote muscle regeneration that can be used alone or in combination with CNS-targeted drugs to improve the effectiveness of potential clinical treatments in ALS.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P31

PROMOZIONE DELLA RIGENERAZIONE MUSCOLARE NELLA SLA ATTRAVERSO L'INDUZIONE ALLOSTERICA DEL RECETTORE P2X7

La Sclerosi Laterale Amiotrofica è una malattia fatale dei motoneuroni, caratterizzata da atrofia irreversibile alla periferia. Abbiamo recentemente scoperto che la somministrazione sistemica intramuscolare dell'agonista del recettore P2X7 (BzATP) migliora le prestazioni motorie nei topi con SLA, potenziando le cellule satelliti e l'attività pro-rigenerativa dei macrofagi infiltranti nel muscolo.

In questo studio, abbiamo tradotto queste evidenze in una strategia terapeutica, indagando gli effetti modificanti della malattia tramite il potenziamento della via del P2X7 nel muscolo scheletrico, utilizzando un modulatore allosterico positivo selettivo per il recettore P2X7, il ginsenoside composto K (CK). Il CK ha dimostrato effetti neuroprotettivi, antinfiammatori e pro-rigenerativi in diverse malattie croniche e presenta un'elevata specificità per il recettore P2X7 negli esseri umani, rendendolo un farmaco sicuro ed efficace per l'uso clinico.

Dati preliminari mostrano che il CK stimola, la proliferazione e il differenziamento delle cellule satelliti muscolari. Inoltre, il CK polarizza le cellule macrofagiche primarie verso un fenotipo M2 antinfiammatorio, cruciale per una rigenerazione muscolare efficace.

Parallelamente, è stato condotto uno studio farmacocinetico e farmacodinamico mirato per determinare il regime di dosaggio ottimale del CK. I trattamenti intramuscolari con CK aumentano la massa muscolare, correlata a fibre muscolari più mature nei topi con SLA in fase iniziale di atrofia muscolare.

I nostri dati forniscono le prime evidenze che mostrano che l'attivazione selettiva della via del P2X7 con CK esercita effetti positivi sulla rigenerazione del muscolo scheletrico. Studi in corso mirano a validare sistematicamente questa strategia terapeutica per promuovere la rigenerazione muscolare, che potrebbe essere utilizzata da sola o in combinazione con farmaci mirati al sistema nervoso centrale per migliorare l'efficacia di potenziali trattamenti clinici.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P32

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL (iPSC)-DERIVED MICROGLIA AND MOTOR NEURONS FOR ALS MODELLING

E. Pellegrini¹, C. Lattuada², S. Invernizzi³, V. Casiraghi³, S. Santangelo³, V. Silani⁴, A. Ratti⁴, P. Bossolasco¹

¹ Department of Neuroscience - Laboratory of Neuroscience, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy

² Department of Neuroscience - Laboratory of Neuroscience, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy; Presently: IRCCS Humanitas Research Hospital, Rozzano, Milan, Italy

³ Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Università degli Studi di Milano, Segrate, Milan, Italy

⁴ Department of Neuroscience - Laboratory of Neuroscience, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy; "Dino Ferrari" Center, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

ALS is thought to be caused by the combination of cell-autonomous and non-cell autonomous mechanisms involving microglia, the innate immune cells of the central nervous system. Microglia regulate neuroinflammation but their uncontrolled activation, consisting in the aberrant persistence of a pro-inflammatory state, can promote neurotoxicity in ALS.

Aim of our study is to investigate the possible effects of ALS patient-derived microglia in promoting neurotoxicity and the potential neuroprotective role of healthy donor-derived microglia, co-culturing microglial cells obtained from induced pluripotent stem cells (iPSC-microglia) with iPSC-derived motor neurons (iPSC-MNs) and iPSC-derived spinal cord organoids (iPSC-spORGs).

Our work first focused on the preliminary optimization of the differentiation protocols used to obtain the iPSC-derived models to be further used in co-culture conditions.

iPSC-microglia, as iPSC-MNs, were obtained starting from iPSCs through embryoid bodies-based protocols. Microglial cells were phenotypically characterized by immunofluorescence (IF) for the expression of specific markers (CD11b, Vimentin, TREM2, TMEM119, IBA1) while their functionality was evaluated by assessing fluorescent latex-beads internalization, which confirmed their phagocytic activity. On the other hand, iPSC-MNs and iPSC-spORGs tested positive for the expression of neuronal and motor neuronal markers (SMI-312, β III-tubulin, ChAT and HB9) by IF and RT-PCR.

Our data indicate that we can efficiently obtain all the iPSC-derived in vitro models to be used in co-culture systems, from both healthy donors and ALS patients. This will allow to study the possible neurotoxicity of human ALS iPSC-microglia in triggering neuronal death and the neuroprotective role of healthy microglia in counteracting neurodegeneration in iPSC-MNs and iPSC-spORGs.

Our study will further help elucidate the complex interplay of cell-autonomous and non-cell autonomous mechanisms in ALS pathogenesis.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P32

MICROGLIA E MOTONEURONI DERIVATI DA CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI Indotte (iPSC) PER IL MODELING DELLA SLA

Si ritiene che la SLA sia causata dalla combinazione di meccanismi cellulari autonomi e non autonomi che coinvolgono anche la microglia, la quale regola la neuroinfiammazione. La sua attivazione incontrollata, che consiste nella persistenza di uno stato proinfiammatorio, può promuovere neurotossicità nella SLA.

Lo scopo del nostro studio è quindi indagare i possibili effetti della microglia umana derivata da pazienti SLA nel promuovere la neurotossicità e il potenziale ruolo neuroprotettivo della microglia umana derivata da donatori sani, co-coltivando cellule microgliali ottenute da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC-microglia) con motoneuroni derivati da iPSC (iPSC-MN) e organoidi spinali derivati da iPSC (iPSC-spORG).

Inizialmente il nostro lavoro si è concentrato sull'ottimizzazione degli specifici protocolli di differenziamento utilizzati per ottenere i modelli di microglia, motoneuroni e organoidi spinali derivati da iPSC da coltivare successivamente in condizioni di co-coltura.

Le cellule microgliali sono state caratterizzate fenotipicamente mediante immunofluorescenza (IF) per l'espressione di marcatori specifici (CD11b, Vimentina, TREM2, TMEM119, IBA1), mentre la loro funzionalità fagocitaria è stata valutata saggiandone l'internalizzazione di latex-beads fluorescenti. iPSC-MN e iPSC-spORG sono invece risultati esprimere marcatori neuronali e motoneuronali (SMI-312, β III-tubulina, ChAT e HB9) mediante IF e RT-PCR.

I nostri dati indicano che siamo in grado di ottenere tutti i modelli in vitro da utilizzare poi nei sistemi di co-coltura, differenziando sia iPSC provenienti da donatori sani che da pazienti SLA.

Ciò consentirà di studiare la neurotossicità della iPSC-microglia da pazienti SLA e il ruolo neuroprotettivo della iPSC-microglia sana nel contrastare la neurodegenerazione in iPSC-MN e iPSC-spORG.

Il nostro studio contribuirà a chiarire la complessa interazione fra meccanismi cellulari autonomi e non autonomi nella patogenesi della SLA.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P33

TARGETING UPPER MOTOR NEURONS: A CUTTING-EDGE NEURAL STEM CELL THERAPY FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

L. Quetti¹, L. Sali¹, M. Nizzardo¹, L. Ottoboni², F. Rizzo², S. Corti², G. P. Comi²

¹ *Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan*

² *University of Milan, Department Pathophysiology and Transplantation, Milan*

Amyotrophic lateral sclerosis is a neurodegenerative disease caused by progressive degeneration of upper (UMNs) and lower (LMNs) motor neurons leading to muscle atrophy and paralysis, with no effective therapy. Recently, upper motor neurons (UMNs) have been considered as a possible therapeutic target at the level of the motor cortex, with possible beneficial effects on the entire MN circuit.

Here we investigate a therapeutic approach based on transplantation of human neural stem cells (NSCs) derived from brain organoids into the central nervous system of a mouse model of ALS, SOD1G93A, in the early stage of the disease, exploiting the molecular and replacement potential of NSCs. Behavioral and ex-vivo tests were conducted to evaluate the efficacy of the treatment revealing enhanced outcomes in NSC-treated animals compared with vehicle-treated and WT littermates. To understand the mechanism responsible for the improved phenotype, massive sequencing was performed on total RNA extracted from sections of the cortical motor area of grafted and ungrafted animals. Analysis of the data led to the selection of certain genes coding for human proteins that could be produced by the therapeutic neuroprotective effect.



P33

TARGET SUI MOTONEURONI SUPERIORI: UNA TERAPIA ALL'AVANGUARDIA CON CELLULE STAMINALI NEURALI PER LA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

La sclerosi laterale amiotrofica è una malattia neurodegenerativa causata dalla progressiva degenerazione dei motoneuroni superiori (UMN) e inferiori (LMN) che porta all'atrofia muscolare e alla paralisi, senza alcuna terapia efficace. Recentemente, i motoneuroni superiori (UMN) sono stati considerati un possibile bersaglio terapeutico a livello della corteccia motoria, con possibili effetti benefici sull'intero circuito motoneuronale.

Qui studiamo un approccio terapeutico basato sul trapianto di cellule staminali neurali umane (NSC) derivate da organoidi cerebrali nel sistema nervoso centrale di un modello murino di SLA, SOD1G93A, nella fase iniziale della malattia, sfruttando il potenziale molecolare e di sostituzione delle NSC. Sono stati condotti test comportamentali ed ex-vivo per valutare l'efficacia del trattamento, rivelando risultati migliori negli animali trattati con NSC rispetto ai compagni di cucciolata WT e trattati con veicolo. Per comprendere il meccanismo responsabile del miglioramento del fenotipo, è stato eseguito un sequenziamento massivo dell'RNA totale estratto da sezioni dell'area motoria corticale di animali innestati e non innestati. L'analisi dei dati ha portato alla selezione di alcuni geni che codificano per proteine umane che potrebbero essere prodotte dall'effetto neuroprotettivo terapeutico.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P34

A SELECTIVE LIGAND TARGETING THE OLIGODENDROGLIAL GPR17 RECEPTOR IMPROVES FUNCTIONAL OUTCOME AND MYELIN INTEGRITY IN FEMALE SOD1G93A MICE

S. Raffaele¹, F. C. Mannella¹, N. Nguyen², M. Milanese², G. Bonanno², M. P. Abbracchio³, T. Bonifacino², M. Fumagalli¹

¹ Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences "Rodolfo Paoletti", Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

² Department of Pharmacy, Unit of Pharmacology and Toxicology, Università degli Studi di Genova, Genoa, Italy

³ Department of Pharmaceutical Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

Recent findings revealed an early role of oligodendrocyte dysfunction in promoting MN degeneration and disease progression in ALS. Thus, patients may benefit from pharmacological interventions able to restore the myelinating and trophic functions of oligodendrocytes. Our previous results described a pathological accumulation of immature oligodendrocytes expressing the GPR17 receptor in the spinal cord of the SOD1G93A mouse model and in post-mortem samples of ALS cases, paralleled by a significant loss of myelinating cells, suggesting that the aberrant upregulation of this receptor may contribute to remyelination failure. Notably, we previously showed that prolonged GPR17 activation by its endogenous ligands can induce receptor desensitization, leading to increased oligodendrocyte maturation.

Here, we evaluated the therapeutic effects of a potent and selective GPR17 agonist, named Galinex (GAL), in SOD1G93A mice. Briefly, female and male SOD1G93A mice and wild-type controls received chronic subcutaneous infusion of GAL (10 mg/kg/day) or vehicle from the early symptomatic phase until end stage and survival probability, body weight loss, and motor functions were measured. In parallel, oligodendrocyte maturation and myelination in the ventral gray matter of the lumbar spinal cord were evaluated at late symptomatic stage by immunohistochemistry. Results show that GAL treatment significantly extended survival probability, delayed body weight loss, and ameliorated motor functionality of female SOD1G93A mice, while no effects were observed in males. Moreover, GAL administration significantly counteracted the pathological upregulation of GPR17 in the spinal cord of female SOD1G93A mice, fostering oligodendrocyte differentiation into ASPA+ mature cells and myelin deposition. These results provide the first preclinical evidence indicating that a selective GPR17-targeted approach may represent a promising strategy for the treatment of ALS.



P34

UN LIGANDO SELETTIVO DEL RECETTORE OLIGODENDROGLIALE GPR17 MIGLIORA LA FUNZIONALITÀ MOTORIA E PRESERVA L'INTEGRITÀ DELLA MIELINA NEL MODELLO MURINO SOD1G93A

Contrastare la disfunzione degli oligodendrociti (OL), la quale contribuisce precocemente alla degenerazione dei MN nella SLA, potrebbe fornire nuove prospettive terapeutiche. I nostri risultati precedenti hanno descritto un accumulo patologico di OL immaturi esprimenti il recettore GPR17 nel midollo spinale del modello murino SOD1G93A e in campioni post-mortem di casi di SLA, accompagnato da una significativa perdita di cellule mielinizzanti, suggerendo che alterazioni di questo recettore potrebbero contribuire al fallimento della rimielinizzazione. Inoltre, abbiamo precedentemente dimostrato che l'attivazione prolungata di GPR17 da parte dei suoi ligandi endogeni induce la desensitizzazione del recettore, promuovendo la maturazione degli OL.

In questo studio, abbiamo valutato gli effetti di un agonista potente e selettivo di GPR17, denominato Galinex (GAL), nei topi SOD1G93A. In breve, topi SOD1G93A femmine e maschi e i relativi controlli hanno ricevuto un'infusione sottocutanea cronica di GAL (10 mg/kg/giorno) o veicolo dalla fase sintomatica precoce fino allo stadio terminale e sono state misurate la probabilità di sopravvivenza, la perdita di peso corporeo e le funzioni motorie. Parallelamente, la maturazione degli OL e la mielinizzazione nel midollo spinale sono state valutate nella fase sintomatica tardiva mediante immunohistochimica. I risultati mostrano che il trattamento con GAL ha esteso la probabilità di sopravvivenza, ritardato la perdita di peso corporeo e migliorato la funzionalità motoria dei topi SOD1G93A femmine, mentre non sono stati osservati effetti nei maschi. Inoltre, la somministrazione di GAL ha contrastato significativamente l'aumento patologico di GPR17 nel midollo spinale dei topi SOD1G93A femmine, favorendo il differenziamento degli OL e la mielinizzazione. Questi risultati forniscono la prima evidenza preclinica che indica che un ligando selettivo per GPR17 potrebbe rappresentare un farmaco promettente per il trattamento della SLA.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P35 **MyoMusALS - EXPLORING THE ROLE OF THE MYOKINE MUSCLIN AGAINST THE PROGRESSION OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS IN MOUSE MODELS**

A. D. Re Cecconi¹, M. Barone¹, M. Tortarolo¹, F. Palo¹, L. Zentilin², G. Sorarù³, G. Nardo¹, C. Bendotti¹, R. Piccirillo¹

¹ Mario Negri Research Institute for Pharmacological Research IRCCS, Milan, Italy

² International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste, Italy

³ University Hospital of Padua, Padua, Italy

Myokines are peptides secreted by skeletal muscles especially upon exercise. Muscles undergo atrophy during various disorders, as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), an incurable neuromuscular disease. Muscle atrophy associated with neuromuscular junction (NMJ) dysfunction is one of the earliest events in ALS and anticipates motoneurons loss. As a result, preserving muscle could be crucial to extend lifetime of ALS patients.

Musclin or osteocrin is an exercise-induced myokine whose we identified the ways of action in muscle homeostasis. Furthermore, our unpublished data show that musclin expression is reduced in atrophied gastrocnemius in two mouse models of ALS. We also found that intramuscular injection of musclin-AAV9 in tibialis anterior (TA) of SOD1-G93A 129Sv mice protects them from atrophy and denervation. We also observed that decreased protein content of musclin in Vastus Lateralis muscle might be linked to faster disease progression in ALS patients.

We aim to confirm musclin as able to counteract ALS-induced muscle atrophy and NMJ degeneration in mouse models. We plan also to test if musclin drop can be a biomarker of ALS in mice as in humans.

AIMS: We will test if musclin:

- 1) is reduced also in muscle and plasma of ALS patients;
- 2) is an early biomarker of muscle loss in ALS mice;
- 3) affects muscle size, NMJ integrity, Schwann cells, neurodegeneration, motor behavior and lifespan of ALS mice.

We will take advantage of the MyoRep technology that we patented and consists of a promoter engineered by us able to sense early muscle atrophy and to drive the expression in vivo of Firefly Luciferase. Preliminarily, in vivo imaging of TA injected with MyoRep-AAV9 shows that atrophy starts in SOD1-G93A 129Sv mice at 11 weeks of age, when the disease and muscle wasting has not started yet.

Since ALS is a devastating disease, this study could provide the basis for the development of new therapies and early biomarkers of ALS.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P35

MyoMusALS - ESPORARE IL RUOLO DELLA MIOCHINA MUSCLIN NELLA PROGRESSIONE DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA NEI MODELLI MURINI

Le miochine sono peptidi secreti dai muscoli scheletrici, specialmente durante l'attività fisica. I muscoli sono soggetti ad atrofia in diverse patologie, come la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), una malattia neuromuscolare incurabile. L'atrofia muscolare associata alla disfunzione della giunzione neuromuscolare (NMJ) è uno dei primi eventi nella SLA e precede la perdita dei motoneuroni. Preservare i muscoli potrebbe prolungare la vita dei pazienti con SLA. Musclin è una miochina indotta dall'attività fisica, di cui abbiamo identificato i meccanismi d'azione nell'omeostasi muscolare. Inoltre, dati non pubblicati mostrano che l'espressione di musclin è ridotta nel gastrocnemio atrofico in due modelli murini di SLA. L'iniezione intramuscolare di musclin-AAV9 nel tibiale anteriore di topi SOD1-G93A 129Sv li protegge da atrofia e denervazione. Inoltre, la riduzione di musclin nel muscolo Vastus Lateralis potrebbe essere legata a una progressione più rapida della SLA nei pazienti. Vogliamo confermare che musclin può contrastare l'atrofia muscolare indotta dalla SLA e la degenerazione della NMJ nei modelli murini. Vogliamo anche verificare se la riduzione di musclin possa essere un biomarcatore della SLA nei topi e negli umani.

Testeremo se musclin:

1. è ridotto nei muscoli e nel plasma dei pazienti SLA;
2. è un biomarcatore precoce dell'atrofia muscolare nei topi SLA;
3. influenza l'integrità della NMJ, la neurodegenerazione e sopravvivenza dei topi SLA.

Utilizzeremo la tecnologia MyoRep, da noi brevettata, con un promotore in grado di rilevare l'atrofia muscolare precoce e di esprimere in vivo la luciferasi. Preliminarmente, l'imaging in vivo del TA iniettato con MyoRep-AAV9 mostra che l'atrofia inizia nei topi SOD1-G93A a 11 settimane, prima che la malattia e l'atrofia muscolare abbiano inizio.

Questo studio potrebbe fornire le basi per nuove terapie e biomarcatori precoci per la SLA.

PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACHES



P36

INTERLEUKIN-9 AND ITS RECEPTOR ARE INVOLVED IN NEURONAL ACTIVITY WITHIN MURINE SPINAL CORD

C. Stacchiotti¹, S. De Stefano¹, P. Longone¹, A. Spalloni¹, E. Volpe¹

¹ *Molecular Neuroimmunology Unit, IRCSS Fondazione Santa Lucia, Rome, Italy*

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a disease characterized by degeneration of neurons in the spinal cord. Recent evidences indicate that neuroinflammation plays a major role in the neurodegeneration process, and anti-inflammatory molecules may exert a protective role in ALS. In this context, interleukin (IL)-9 is a cytokine with anti-inflammatory properties. Moreover, IL-9 reduces apoptosis in cortical neurons, and levels of IL-9 in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients inversely correlate with neurodegeneration. However, the role of IL-9 in spinal neurons and ALS has never been investigated. We hypothesise that IL-9 has a protective and anti-inflammatory role in spinal neurons, with beneficial role in ALS. The response to IL-9 is mediated by IL-9 receptor (IL-9R), and we demonstrated its expression in either adult murine spinal cord tissues than murine embryonal spinal cord cultures. In addition, analysis of specific spinal cell populations revealed that IL-9R is mainly expressed in neurons, within embryonal spinal cord cultures. Then, we found that IL-9 significantly activates phosphorylation of STAT and AKT, downstream pathways of IL-9/IL-9R binding, demonstrating the responsiveness of spinal cord cells to IL-9. Finally, to further insight into IL-9 function in spinal cord cells, we stimulated embryonal spinal cord cultures with or without IL-9 for 3 hours and we performed transcriptome-wide gene-level expression profile. Results revealed that IL-9 mediates transcriptional changes in spinal cord cells. In particular, gene ontology clustering discloses that IL-9 up-regulates genes related to TGF-beta pathway that is implicated in anti-inflammatory processes, and genes involved in neuronal functions, such as synaptic activity and potassium channel regulation. These results support our hypothesis that IL-9 could have a neuroprotective role in spinal neurons, that will be further investigated, with important implication in ALS disease.



P36

L'INTERLEUCHINA-9 E IL SUO RECETTORE SONO COINVOLTI NELL'ATTIVITÀ NEURONALE NEL MIDOLLO SPINALE MURINO

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è caratterizzata da degenerazione dei neuroni nel midollo spinale. Studi recenti hanno dimostrato che la neuroinfiammazione è implicata nella neurodegenerazione e che le molecole antinfiammatorie possono avere un ruolo protettivo nella SLA. In questo contesto, l'interleuchina (IL)-9 è una citochina con proprietà antinfiammatorie. Inoltre, IL-9 riduce l'apoptosi nei neuroni corticali e i suoi livelli nel liquido cerebrospinale di pazienti con sclerosi multipla sono inversamente correlati alla neurodegenerazione. Tuttavia, il ruolo dell'IL-9 nei neuroni spinali e nella SLA non è mai stato studiato. Ipotizziamo che IL-9 abbia un ruolo protettivo e antinfiammatorio sui neuroni spinali e nella SLA. La risposta all'IL-9 è mediata dal suo recettore (IL-9R) e ne abbiamo dimostrato l'espressione in midollo spinale di topo adulto e in colture embrionali di midollo spinale murino. L'analisi delle specifiche popolazioni cellulari all'interno delle colture embrionali di midollo spinale ha rivelato che IL-9R è espresso maggiormente nei neuroni. Abbiamo poi scoperto che IL-9 attiva STAT e AKT, vie di segnale a valle del legame IL-9/IL-9R, dimostrando la reattività delle cellule del midollo spinale all'IL-9. Infine, per approfondire la funzione dell'IL-9 in cellule di midollo spinale, abbiamo stimolato colture embrionali di midollo spinale con o senza IL-9 per 3 ore e abbiamo eseguito un profilo di espressione genica a livello trascrizionale. I risultati mostrano che IL-9 media cambiamenti trascrizionali nelle cellule del midollo spinale. In particolare, la Gene Ontology rivela che IL-9 up-regola geni legati alla via del TGF-beta, implicata nei processi antinfiammatori, e geni coinvolti nelle funzioni neuronali, come l'attività sinaptica e la regolazione dei canali del potassio. Questi risultati supportano la nostra ipotesi che IL-9 possa avere un ruolo protettivo nei neuroni spinali con implicazioni nella malattia della SLA.

FROM TRANSLATIONAL TO CLINICAL RESEARCH



P37

NEUROCHEMICAL PATHWAYS ARE ALTERED IN ALS

M. Manfredi¹, **T. Chipurura¹**, B. Purghè¹, L. Mazzini¹, F. De Marchi¹, M. Bellan¹

¹ Department of Translational Medicine, University of Piemonte Orientale, Novara

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare and incurable neurodegenerative disorder. Still, the diagnosis is mainly based on clinical symptoms, with limited treatment options, partially due to the lack of appropriate biomarkers. Several studies have found compositional changes in the gut microbiota of ALS patients which may contribute to the pathology of the disease. The gut microbiota is responsible for the synthesis and modulation of many neurotransmitters, neuromodulators and their precursors. Identifying modulated molecules in ALS patients may help in identifying new diagnostic and prognostic markers. In this research we investigated the levels of circulating neurotransmitters and precursors in 57 ALS patients and 27 matched healthy individuals through the targeted quantification of more than 60 molecules with high resolution mass spectrometry. ALS patients were characterized by lower serum levels of Serotonin (5HT), Xanthurenic acid (XA) and Indole-3-propionic acid (IPA), while Trimethylamine N-oxide (TMAO), N-acetyl-N-formyl-5-Methoxykynuramine (AFMK) and phenylacetyl L-glutamine (PAG) were more abundant compared to controls. Interestingly, IPA has neuroprotective effects, owing to its anti-inflammatory and antioxidant properties. The reduction in indole-3-propionic acid levels in ALS patients may indicate increased CNS inflammation. In addition, a general alteration of tryptophan metabolism was identified. Survival curves using metabolites levels as a covariate showed the presence of many molecules linked with the disease progression.

In conclusion, our data suggested the presence of altered neurochemical pathways in ALS patients that could be potentially targeted for new treatment options or used as prognostic markers.



P37

PATHWAY NEUROCHIMICI ALTERATI NELLA SLA

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa rara e incurabile che colpisce principalmente individui di età compresa tra 60 e 79 anni con un'incidenza mondiale di 4,42 su 100.000 persone. Il microbiota intestinale è responsabile della sintesi e della modulazione di molti neurotrasmettitori, neuromodulatori e dei loro precursori. L'identificazione di molecole alterate nei pazienti con SLA può aiutare a formulare nuovi trattamenti in grado di ridurre i sintomi, ma anche per il loro utilizzo come marcatori prognostici.

In questa ricerca abbiamo studiato i livelli di neurotrasmettitori e loro precursori in 57 pazienti con SLA e 27 individui sani attraverso la quantificazione di oltre 60 molecole con spettrometria di massa ad alta risoluzione. I pazienti con SLA hanno mostrato livelli sierici inferiori di serotonina (5HT), acido xanturenico (XA) e acido indolo-3-propionico (IPA), mentre trimetilammina N-ossido (TMAO), N-acetil-N-formil-5-metossichinuramina (AFMK) e fenilacetil L-glutamina (PAG) erano più abbondanti rispetto ai soggetti sani. È interessante notare che l'IPA ha effetti neuroprotettivi, grazie alle sue proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. La riduzione dei livelli di acido indolo-3-propionico nei pazienti con SLA può indicare un'infiammazione aumentata del SNC. Inoltre, è stata identificata un'alterazione generale del metabolismo del triptofano. Le curve di sopravvivenza hanno mostrato la presenza di molte molecole collegate alla progressione della malattia.

In conclusione, i nostri dati hanno suggerito la presenza di pathway neurochimici alterati nei pazienti con SLA che potrebbero essere potenzialmente utilizzati per sviluppare nuove opzioni terapeutiche o utilizzati come marcatori prognostici.

FROM TRANSLATIONAL TO CLINICAL RESEARCH



P38

CHARACTERIZATION OF THE CELLULAR PROLIFERATION AND MITOCHONDRIAL BIOENERGETIC PARAMETERS OF 5 ALS PATIENT-PATIENT-DERIVED FIBROBLASTS

F. Ciaiola¹, R. de Mori², M. de Bardi³, V. Nesci⁴, G. Borsellino⁵, C. Valle⁶, A. Ferri⁶, R. Massa⁷, L. Boffa⁷, E. Marchionni⁷, A. M. Nardone⁷, M. R. D'Apice⁷, G. Novelli⁷, N. B. Mercuri⁷, E. Buratti⁸, A. Spalloni⁹, P. Longone⁹

¹ *Laboratory of Molecular Neurobiology, IRCCS Santa Lucia Foundation, and Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome*

² *Stem Cell Facility, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Rome*

³ *Neuroimmunology Unit, IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome*

⁴ *Laboratory of Neurochemistry, IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome*

⁵ *Neuroimmunology Unit, IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome*

⁶ *Laboratory of Neurochemistry, IRCCS Santa Lucia Foundation, and Institute of Translational Pharmacology (IFT), National Research Council (CNR), Rome*

⁷ *Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata*

⁸ *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, ICGB, Trieste*

⁹ *Laboratory of Molecular Neurobiology, IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome*

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) remains untreatable. Conventionally classified as familial or sporadic presents a complex genetic architecture. The majority of cases (about 85%) are considered sporadic. At least 40 genes have been associated with the disease, with 4 genes accounting for about 48% of the familial cases C9orf72, SOD1, TARDBP (coding for TDP-43), and FUS. The genes associated with ALS vary in pathogenicity and in their susceptibility risk with highly penetrant mutations generally leading to disease, whereas some variants associated with ALS do not necessarily cause the disease but rather pose a risk of developing the disease. Because precision treatments against specific disease-causing mutations are gaining importance as a therapeutic framework, elucidating the pathogenicity of sporadic or identified ALS-related genes as well as ALS modifiers will provide valuable clues to better understanding ALS pathomechanisms and eventually develop effective therapies for ALS. Primary fibroblasts are a precious resource in the field of translational medicine. Dermal fibroblasts derived from human subject biopsies are being used as donor tissues for deriving patient-specific iPSC lines, which in turn are used for disease modeling, drug screening, and tissue engineering.

In familial ALS defects in cellular proliferation, mitophagy and ROS production have been abundantly described. In the present study we investigate cell proliferation and mitochondrial homeostasis in 2 controls and 5 patients-derived primary fibroblasts from 2 sporadic ALS patients, 1 patients carrying a mutation in the SQSTM1 gene (SQSTM1: c.833C>T;p.Thr278Ile), 1 carrying the C9orf72 expansion (one allele >145 G4C2 repeats), and 1 carrying the double mutation C9orf72 (one allele >145 G4C2 repeats)/TDP43 (TARDBP: c.800A>G;p.Asn267Ser). We believe that this analysis in such a diverse cohort may provide valuable insight into the cellular pathology of ALS.

FROM TRANSLATIONAL TO CLINICAL RESEARCH



P38

CARATTERIZZAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE E DELLA FUNZIONALITÀ MITOCONDRIALE IN 5 LINEE DI FIBROBLASTI PRIMARI OTTENUTI DA PAZIENTI

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) rimane incurabile. Convenzionalmente classificata come familiare o sporadica, presenta un'architettura genetica complessa. La maggior parte dei casi (circa l'85%) è considerata sporadica. Almeno 40 geni sono stati associati alla malattia, con 4 geni che rappresentano circa il 48% dei casi familiari: C9orf72, SOD1, TARDBP (che codifica per TDP-43) e FUS. I geni associati alla SLA variano in patogenicità e nel rischio di suscettibilità con mutazioni altamente penetranti, e varianti associate alla SLA che non causano necessariamente la malattia, ma rappresentano un rischio di svilupparla. Poiché i trattamenti di precisione contro specifiche mutazioni stanno acquisendo importanza come quadro terapeutico, chiarire la patogenicità di geni correlati alla SLA sporadici o identificati, nonché di modificatori della SLA, può fornire un indizio prezioso per comprendere i meccanismi patologici della SLA e sviluppare terapie efficaci.

I fibroblasti primari sono una risorsa preziosa nel campo della medicina traslazionale. I fibroblasti derivati da biopsie vengono utilizzati per la derivazione di linee iPSC specifiche per il paziente, utilizzate come modelli della malattia, per lo screening dei farmaci e l'ingegneria tissutale. Nella SLA familiare, i difetti nella proliferazione cellulare, nella mitofagia e nella produzione di ROS sono ampiamente descritti. Nel presente studio esaminiamo la proliferazione cellulare e l'omeostasi mitocondriale in 2 controlli e 5 pazienti: fibroblasti primari derivati da 2 pazienti con SLA sporadica, 1 paziente portatore di una mutazione nel gene SQSTM1 (SQSTM1: c.833C>T; p.Thr278Ile), 1 portatore dell'espansione C9orf72 (un allele >145 ripetizioni G4C2) e 1 portatore della doppia mutazione C9orf72 (un allele >145 ripetizioni G4C2)/TDP43 (TARDBP:c.800A>G;p.Asn267Ser). Riteniamo che queste analisi in una coorte così diversificata possano fornire preziose informazioni sulla patologia cellulare della SLA.

FROM TRANSLATIONAL TO CLINICAL RESEARCH



P39

IDENTIFICATION OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC ALS TARGETS THROUGH CELL-TYPE SPECIFIC ANALYSIS OF MOTOR NERVE DAMAGE (IDEALS)

A. Giordano¹, R. Lombardi¹, M. Viziello¹, T. Domi², L. Pozzi², G. Bath³, V. Faltracco¹, M. Cosonni¹, E. Dalla Bella¹, A. Quattrini², G. Lauria Pinter³, D. Bonanomi¹, N. Riva¹

¹ 3rd Neurology Unit and Motor Neuron Disease Centre; Fondazione IRCCS Carlo Besta Neurological Institute; Milan, Italy

² Experimental Neuropathology Unit, Division of Neuroscience, IRCCS Ospedale San Raffaele SRL, Università Vita-Salute San Raffaele; Milan, Italy

³ Molecular Neurobiology Laboratory, Division of Neuroscience, IRCCS Ospedale San Raffaele SRL, Università Vita-Salute San Raffaele; Milan, Italy

The lack of specific biomarkers is a major constrain for the development of new treatments in ALS. The selective damage of motor axons and loss of neuromuscular connections are early pathogenic events that precede full-blown neurodegeneration and the onset of clinical symptoms. Therefore, elucidating disease-related changes along peripheral nerves is critical to define the pathogenic mechanisms. Preliminary data from our team indicate that the nerve endothelium shows increased susceptibility to disease signals compared to spinal cord vessels. However, peripheral nerves are complex multicellular tissues and the contribution of individual cellular components to ALS is not yet understood. The overarching concept of this proposal is that specific nerve cell-types (e.g., Schwann cells, endothelial cells, fibroblasts, macrophages) act as exquisite early sensors of motor neuron damage and enact secondary responses that amplify neuropathology.

Spatial transcriptomics of PNS tissues from transgenic mice will be complemented with computational deconvolution of gene expression datasets of the same tissues. The earliest alterations that arise in peripheral nerves of a novel transgenic mouse model with motor-specific expression of mutant TDP-43 will be resolved with single-cell RNA-seq. Combined, these studies will reveal cell-type specific deregulation in the microenvironment of diseased nerves that will inform the discovery of diagnostic and prognostic biomarkers in the biofluids of ALS patients.

We will define the first cell types activated upon focal damage in peripheral nerves before full-blown neurodegeneration and use this information to guide biomarker discovery. The integrative approach pursued in this proposal will clarify pathogenic mechanisms establishing a roadmap towards the identification of candidate therapeutic targets.



P39

IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI ATTRAVERSO L'IDENTIFICAZIONE DEL DANNO MOTORIO NEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

Questo studio è volto ad identificare nuovi biomarcatori nel sangue per la SLA. La SLA è una patologia per la quale ad oggi non esiste una cura efficace e la mancanza di marcatori specifici per questa malattia è uno dei principali limiti per lo sviluppo di nuove terapie. La perdita delle fibre nervose che costituiscono i nervi periferici è causa principale di disabilità per le persone affette da SLA. In nostro team ha precedentemente evidenziato come nei nervi periferici di pazienti SLA siano individuabili delle alterazioni istologiche già in una fase precoce della malattia, indicando che questi studi potranno chiarire i processi molecolari della patologia. Finora, gli studi sull'espressione genica nella SLA umana sono stati eseguiti con tessuti post mortem. Invece, i nostri dati saranno raccolti da biopsie nervose ottenute da pazienti per scopi diagnostici in una fase precoce della malattia. Questa strategia aumenterà le possibilità di scoprire nuovi biomarcatori e bersagli molecolari specifici per la SLA. Lo studio di modelli animali preclinici della malattia aiuterà a chiarire come i nervi periferici reagiscono nei primissimi stadi della disfunzione dei motoneuroni. Applicheremo tecnologie molecolari all'avanguardia per definire le alterazioni che emergono nei diversi componenti cellulari dei nervi raccolti per diagnosi da pazienti affetti da SLA. I dati ottenuti in laboratorio guideranno gli studi clinici nel sangue di pazienti al fine di identificare biomarcatori specifici e più efficaci per monitorare l'inizio e la progressione della neuropatologia della SLA.

FROM TRANSLATIONAL TO CLINICAL RESEARCH



P40

DISCOVERY OF BIOMARKERS AND TARGETABLE CEREBROSPINAL FLUID PROTEIN COMPLEXES AND INTERACTIONS FOR ALS DIAGNOSIS AND THERAPEUTIC APPROACHES (TARCO4ALS)

V. De Giorgis¹, F. Mohammadinezhad¹, L. Tapella², L. Corrado³, L. Mazzini¹, F. De Marchi¹, **M. Manfredi¹**

¹ Department of Translational Medicine, University of Piemonte Orientale

² Department of Pharmacy, University of Piemonte Orientale

³ Department of Health Sciences, University of Piemonte Orientale

The misfolding of proteins, which is a feature of neurodegenerative diseases but also of ALS, could lead not only to a wrong protein assembly which results in the formation of toxic complexes, but also to the absence of complexes fundamental for the physiological activities. The aim of the current pilot project is to map the global network of complexes and proteins interactions in the cerebrospinal fluid (CSF) from ALS patients in order to identify new biomarkers and molecular targets involved in ALS pathogenesis and disease progression.

We have recently developed a new method that uses size exclusion chromatography, mass spectrometry and bioinformatic analysis to map how circulating complexes and proteins may interact in biological fluids and tissues.

In the first part of the project, we compared CSF network asset from ALS patients with CSF from non-ALS subjects who underwent CSF study for non-inflammatory or non-neurodegenerative conditions. The analysis allowed the identification of several homo- and hetero- complexes enriched or absent in CSF from ALS patients. The validation with WB of these targets is ongoing.

To assess whether structural changes in CSF reflect pathological events in the brain we will apply the same approach to postmortem temporal cortex samples from a small independent cohort. Finally, we will also evaluate the toxic effect of relevant CSF complexes on motoneurons and glial cells.

We expect to deepen new information about the role played by these protein complexes, or the interactions, in ALS. These would provide the knowledge for the better understanding of ALS pathogenesis, and importantly for the identification of new diagnostic and therapeutic targets.



P40

RICERCA DI BIOMARCATORI E COMPLESSI PROTEICI NEL LIQUIDO CEREBROSPINALE PER LA DIAGNOSI DELLA SLA E LO SVILUPPO DI NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI (TARCO4ALS)

Il ripiegamento errato delle proteine, che è una caratteristica delle malattie neurodegenerative ma anche della SLA, potrebbe portare non solo a un assemblaggio proteico non corretto che si traduce nella formazione di complessi tossici, ma anche all'assenza di complessi fondamentali per le attività fisiologiche. L'obiettivo di questo progetto pilota è mappare la rete di complessi e interazioni proteiche nel liquido cerebrospinale (CSF) dei pazienti con SLA al fine di identificare nuovi biomarcatori e bersagli molecolari coinvolti nella patogenesi della SLA e nella progressione della malattia. Abbiamo recentemente sviluppato un metodo che utilizza la cromatografia ad esclusione dimensionale, la spettrometria di massa e l'analisi bioinformatica per mappare il modo in cui i complessi e le proteine circolanti possono interagire nei fluidi e nei tessuti biologici.

Nella prima parte del progetto, abbiamo confrontato l'abbondanza e l'identità dei complessi proteici presenti nel CSF di pazienti con SLA con il CSF di soggetti non affetti da SLA. L'analisi ha consentito l'identificazione di diversi omo- ed etero-complessi arricchiti o assenti nel CSF di pazienti con SLA. La validazione con WB di questi target è in corso. Per valutare se i cambiamenti strutturali nel CSF riflettono eventi patologici nel cervello, applicheremo lo stesso approccio a campioni di corteccia temporale post-mortem. Infine, valuteremo anche l'effetto tossico dei complessi del CSF sui motoneuroni e sulle cellule gliali. Ci aspettiamo di ottenere nuove informazioni sul ruolo svolto da questi complessi proteici, o sulle loro interazioni, nella SLA. Ciò potrebbe permettere di migliorare la nostra conoscenza della patogenesi della SLA e, soprattutto, l'identificazione di nuovi target diagnostici e terapeutici.

FROM TRANSLATIONAL TO CLINICAL RESEARCH



P41

ACCELERATED PROGRESSION OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS ASSOCIATED WITH THE KIF5A p.Pro986Leu RISK VARIANT

A. Manini¹, R. Vasta², A. Brusati³, F. Scheveger⁴, S. Peverelli⁵, A. Maranzano⁵, A. Doretto¹, F. Gentile⁶, E. Colombo⁵, M. Brunetti², C. Moglia², A. Canosa², U. Manera², M. Grassano², D. Gentilini³, S. Messina⁵, F. Verde⁵, C. Morelli⁵, J. E. Landers⁷, B. J. Traynor⁸, A. Chiò², V. Silani³, A. Calvo², A. Ratti⁹, N. Ticozzi¹

¹ Department of Pathophysiology and Transplantation, "Dino Ferrari" Center, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

² Rita Levi Montalcini Department of Neuroscience, University of Turin, Turin, Italy

³ Department of Brain and Behavioral Sciences, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy

⁴ Neurology Residency Program, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

⁵ Department of Neurology-Laboratory of Neuroscience, IRCCS, Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy

⁶ Biology of Myelin Unit, Division of Genetics and Cell Biology, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy.

⁷ Department of Neurology, University of Massachusetts Chan Medical School, Worcester, MA, USA

⁸ Neuromuscular Diseases Research Section, National Institute on Aging, Bethesda, MD, USA

⁹ Department Medical Biotechnology and Translational Medicine, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

KIF5A, encoding for the molecular motor kinesin-5A, is a causative gene of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Rare, loss-of-function variants in the C-terminal domain lead to highly penetrant, younger-onset and slowly progressive ALS, while the rs113247976 variant (p.Pro986Leu) represents a low-penetrance risk allele for ALS.

The contribution of rs113247976 to the phenotypic variability of ALS was studied in two independent Italian cohorts including 865 (discovery) and 1174 (replication) patients.

The rs113247976 minor allele (T) frequency (0.015) was similar to other European cohorts (0.02). No patients were homozygous (TT) for p.Leu986, enabling a comparative analysis only between wild type and heterozygous carriers. Heterozygous p.Leu986 carriers in the discovery cohort showed faster disease progression, according to the ALS Functional Rating Scale Revised (ALSFRS-R) preslope, but not a shorter survival. Our results were independently validated within the replication cohort and by assessing both cohorts together. In multiple linear regression, p.Leu986 and age at onset significantly predicted the ALSFRS-R preslope.

Our findings suggest that heterozygous p.Leu986 in KIF5A is associated with a more rapid functional deterioration in ALS. Consequently, genetic screening for rs113247976 could be contemplated for clinical trials to enhance the interpretation of outcomes and refine patients' selection.

FROM TRANSLATIONAL TO CLINICAL RESEARCH



P41

ACCELERATA PROGRESSIONE DI MALATTIA NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA ASSOCIATA ALLA VARIANTE DI RISCHIO p.Pro986Leu IN KIF5A

KIF5A, che codifica per la chinesina 5A, proteina motrice molecolare, è un noto gene causativo di Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). Varianti genetiche rare, determinanti una perdita di funzione della proteina e localizzate nel dominio C-terminale, sono ad alta penetranza, e portano a forme di SLA ad esordio giovanile e lentamente progressive. Al contrario, la variante rs113247976 (p.Pro986Leu) rappresenta un allele di rischio a bassa penetranza per la patologia.

Il contributo della variante rs113247976 sulla variabilità fenotipica in pazienti affetti da SLA è stato studiato in due coorti Italiane indipendenti, che hanno incluso rispettivamente 850 (coorte di scoperta) e 1174 (coorte di replica) pazienti.

La frequenza dell'allele minore (T) della variante rs113247976 (0.015) è risultata simile a quella di altre coorti Europee (0.02). Nessun paziente è risultato omozigote (TT) per la variante p.Leu986, permettendo dunque un'analisi comparativa solo tra i pazienti wild-type e i portatori eterozigoti della variante. Nella coorte di scoperta, i portatori della variante p.Leu986 in eterozigosi hanno mostrato una progressione più rapida di malattia, sulla base del preslope dell'ALS Functional Rating Scale Revised (ALSFRS-R), ma non una sopravvivenza ridotta. I nostri risultati sono stati validati indipendentemente nella coorte di replica, e studiando entrambe le coorti insieme. In un modello di regressione lineare multipla, la variante p.Leu986 e l'età d'esordio hanno predetto in modo significativo l'ALSFRS-R preslope.

I nostri risultati suggeriscono che la variante p.Leu986 in KIF5A in eterozigosi sia associata ad un più rapido deterioramento funzionale in pazienti affetti da SLA. Di conseguenza, lo screening genetico per tale variante potrebbe essere contemplato nei trials clinici per incrementare l'interpretazione dei risultati e permettere una più accurata selezione dei pazienti arruolati.

CLINICAL RESEARCH



P42

BULBAR ONSET ALS CLUSTERING BY CLINICAL INFORMED MULTI-OMICS (BULB-OMICS)

M. Vizziello¹, V. Faltracco¹, A. Giordano¹, E. Mehmeti², G. Farinazzo², A. De Palma³, D. Perico³, R. Lombardi¹, N. Riva¹, E. Salvi², S. Marcuzzo², M. Consonni¹, G. Lauria⁴, P. Mauri³, E. Dalla Bella¹

¹ *Neurologia III – Centro Malattie del Motoneurone/Unità di Neuroalgologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia*

² *Neurologia IV – Unità di Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia*

³ *Istituto per le Tecnologie Biomediche, ITB CNR, Segrate (Mi), Italia*

⁴ *Direttorato Scientifico, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia*

The bulbar-onset ALS (bALS) is the most homogeneous phenotype in terms of progression and neuropathological features. Therefore, it could be the keystone to approaching the complexity of the huge clinical and epigenetic heterogeneity. However, bALS may present distinct subtypes depending on the prevalence of lower/upper motor neuron involvement and/or cognitive impairment. The underlying molecular signatures of bALS subtypes are unknown.

We demonstrated a dose-dependent effect of guanabenz only in bALS that may act on miR-106b transcriptional levels in serum as a specific potential biomarker for monitoring therapy response. To investigate molecular mechanisms underlying bALS in comparison with the spinal phenotype (sALS), we performed an integrated miRNA and proteomics profiling showing a down regulation of miR-150-5p and miR-483-5p in bALS against sALS patients and HC and an up-regulation of miR-30b-5p in bALS patients with cognitive impairment. Our Partner identified differentially expressed proteins in bALS compared to sALS patients involved in glucose metabolism, immune response, translation, vesicle-mediated transport and stress response.

Based on our initial but solid preliminary findings, we aim to provide reliable clues in support to the hypothesis that bALS represents a unique pathophysiological paradigm of the disease with distinct and potentially druggable molecular mechanisms.

We will integrate deep clinical phenotyping/genotyping with miRNomics, long non-coding RNomics, and proteomics, in discovery and a validation phase on independent cohorts of 60 bALS and 20 sALS in total, and 20 HC. By means of machine learning, we will reconstruct tailored pathways implicated in bALS pathogenesis.

Identification of dysregulated molecules and specific pathways that can concretely advance the state-of-the-art and contribute to new potential treatment targets.



P42

CARATTERIZZAZIONE DELLA SLA BULBARE ATTRAVERSO UN APPROCCIO MULTI-OMICO (BULB-OMICS)

La SLA bulbare (b-SLA) è il fenotipo SLA più omogeneo per progressione e neuropatologia, costituendo un modello utile per studiare l'eterogeneità della malattia. Clinicamente, la b-SLA può manifestarsi in forme diverse in base al prevalere del coinvolgimento del I o II motoneurone, e alla presenza di alterazioni cognitivo-comportamentali. Ad oggi, le signatures molecolari della b-SLA sono ignote.

Abbiamo già dimostrato un effetto dose-dipendente del guanabenz nei b-SLA, che sarebbe legato ad un'azione del composto sui livelli sierici di trascrizione del miR-106b. Tale molecola potrebbe quindi costituire un potenziale biomarcatore per il monitoraggio terapeutico. Per investigare i meccanismi distintivi della b-SLA rispetto alla SLA spinale (s-SLA) abbiamo effettuato un'analisi integrata di profilazione di miRNA e proteomica, trovando una down-regolazione del miR-150-5p e miR-483-5p nei b-SLA rispetto a s-SLA e controlli sani, e una up-regolazione del miR-30b-5p nei b-SLA con alterazioni cognitive. Abbiamo trovato proteine differenzialmente espresse nei b-SLA, coinvolte nel metabolismo del glucosio, traduzione, trasporto vescicolare e stress response.

Sulla base dei nostri iniziali ma solidi preliminari, l'obiettivo primario è di fornire dati a supporto dell'ipotesi che la b-SLA rappresenti un paradigma della malattia con meccanismi molecolari distinti e potenzialmente targettabili.

Il progetto prevede l'integrazione di dati fenotipici e genotipici con dati di miRNomica, long non-coding RNomica e proteomica, attraverso una fase di discovery e successiva validazione su due coorti indipendenti di 60 b-SLA e 20 s-SLA, e 20 controlli. Mediante analisi integrate di machine learning intendiamo ricostruire algoritmi relativi a specifiche vie biologiche implicate nella patogenesi della b-SLA.

Identificazione di molecole chiave e pathways d'interesse che possano contribuire all'avanzamento dello stato dell'arte e rappresentare potenziali target terapeutici futuri.

CLINICAL RESEARCH



P43

MULTIMODAL ASSESSMENT OF BULBAR DECLINE IN ALS USING AUDIO-VISUAL AND MACHINE LEARNING APPROACHES

F. Pierotti¹, G. Currao¹, F. Bianchi², B. Fattori², G. Siciliano², **A. Bandini¹**

¹ Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

² Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by speech and swallowing difficulties, primarily due to bulbar dysfunction. Early detection and prediction of bulbar decline are essential for timely therapeutic intervention, but current diagnostic methods are often invasive, expensive, and difficult to access. Therefore, there is a need for non-invasive, objective techniques to improve accessibility and efficiency.

The Multimodal Intelligent Methods for Orofacial and Speech Assessment (MIMOSA) project aims to address these limitations by developing a multimodal approach that integrates clinical assessments, artificial intelligence, and audio-visual analysis to predict bulbar decline in ALS.

In this preliminary study, we used the Toronto NeuroFace dataset, comprising data from 9 ALS patients (6F, aged 45-75) and 11 healthy controls (4F, aged 33-78). We extracted features from sentence (/Buy Boppy a Puppy/) and syllable repetition (/pa/ and /pataka/) tasks. Audio features such as word error rate and activation frequency were obtained using the Kaldi speech recognition toolkit, while video features, including range of motion, mouth speed, symmetry, and shape, were extracted using the Face Alignment Network.

We trained and tested support vector regression (SVR) and a multi-layer perceptron regressor to automatically estimate speech impairment levels. The best performance was achieved by a linear SVR trained on audio syllable features, yielding a mean root mean square error (mRMSE) of 0.79 (0.80 for ALS and 0.78 for healthy controls). Video-based analysis performed best with a sigmoidal SVR trained on the sentence task (mRMSE of 1.57) while combining all audio and video features with a radial basis function SVR resulted in an mRMSE of 1.36.

These findings highlight the potential of using acoustic and visual speech data to assess bulbar decline in ALS.



P43

VALUTAZIONE MULTIMODALE DEL DECLINO BULBARE NELLA SLA TRAMITE APPROCCI DI INTELLIGENZA ARTIFICIALE

La SLA è una malattia neurodegenerativa che causa difficoltà dell'eloquio e della deglutizione. La diagnosi precoce e la previsione del declino bulbare sono essenziali per accedere tempestivamente a terapie, ma i metodi diagnostici attuali sono spesso invasivi, costosi o difficilmente accessibili. Esiste la necessità di sviluppare tecniche oggettive per superare queste limitazioni.

Il progetto Multimodal Intelligent Methods for Orofacial and Speech Assessment (MIMOSA) mira a rispondere a questa esigenza, proponendo un approccio multimodale che integra valutazioni cliniche, intelligenza artificiale e analisi audio-video del parlato per prevedere il declino bulbare nella SLA.

In uno studio preliminare, abbiamo utilizzato il dataset Toronto NeuroFace, che include dati di 9 pazienti con SLA (6F, 45-75 anni) e 11 soggetti sani di controllo (4F, 33-78 anni). Le caratteristiche audio e video sono state estratte da compiti di ripetizione di frasi (/Buy Boppy a Puppy/) e sillabe (/pa/ e /pataka/). Per l'analisi audio, sono state ricavate diverse misure come il word error rate e la frequenza di attivazione utilizzando il toolkit di riconoscimento vocale Kaldi, mentre per i video, l'algoritmo Face Alignment Network ha estratto misure relative al movimento facciale, tra cui ampiezza di movimento, velocità, simmetria e forma buccale.

Sono stati addestrati e testati modelli di regressione, come support vector regression (SVR) e perceptrone multistrato, per stimare automaticamente il livello di compromissione dell'eloquio. I migliori risultati sono stati ottenuti con un SVR lineare addestrato sulle caratteristiche audio delle sillabe (mRMSE=0.79). L'analisi video ha dato i risultati migliori con un SVR sigmoide (mRMSE=1.57) addestrato sulla ripetizione di frasi, mentre la combinazione di tutte le caratteristiche audio e video ha raggiunto mRMSE=1.36.

Questo studio preliminare indica il potenziale delle informazioni acustiche e visive per la valutazione bulbare nella SLA.

CLINICAL RESEARCH



P44

AN EMERGING ERA IN ITALY: THE IMPACT OF THE PALS-LED VOLUNTEERS FROM ASSOCIAZIONE conSLAncio ONLUS

M. Consonni¹, S. Pozzi¹, R. Piovesana¹, T. Petrozziello¹, M. de Majo¹, M. Peviani¹, D. Sproviero¹, M. Boido¹, S. Gagliardi¹, F. De Marchi¹, E. Grossini¹, J. C. Ayala¹, A. Desiderato¹, G. Merlini¹, R. Schellino¹, S. Stanga¹, S. F. Conte¹, N. De Rossi¹, A. Zicchieri¹

¹ Associazione conSLAncio Onlus, Terracina (LT), Italy

Global ALS patient advocacy and support are rapidly evolving with numerous advancements in recent years. All-volunteer associations, including Associazione conSLAncio Onlus, provide new effective approaches in improving ALS care support through integrating diverse community participation.

Here we present the advancements of conSLAncio, an all-volunteer patient-led Italian association, dedicated to facilitating the dynamic engagement of patients, caregivers, researchers and stakeholders belonging to the Italian and international ALS community.

By using the conSLAncio Design-Build Approach, and promoting an all-inclusive equal opportunity community, we have united people living with ALS (PALS), caregivers, clinicians and researchers, organizations, and individuals of different backgrounds to work together with one common goal: providing urgent care assistance to the ALS community.

Since its founding in 2015, conSLAncio has recruited 46 volunteers worldwide. We have achieved numerous milestones: the first patient-led Italian ALS association to present at international scientific conferences; leader in reporting real time global ALS research news resources in Italy; innovating ALS caregiver training accessibility with the launch of the first free online caregiver training program in Italy, co-founders of the new Italian ALS Coalition in 2024; and many international partnerships. Our work led to a 92.5% increase in website visits, with a total of 187,330 visits since January 2019, and a constant increase in participation on Facebook and X. conSLAncio regularly surveyed PALS and caregivers to implement new interventions for the ALS community.

conSLAncio has had a significant impact in improving ALS community support mainly in Italy, but also in Switzerland, Canada, and the United States, thus demonstrating how teamwork is critical to achieve significant changes to improve care for the ALS community.



P44

UN NUOVA ERA IN ITALIA: L'IMPATTO DEL LAVORO DEI VOLONTARI GUIDATI DA PERSONE CON SLA DELL'ASSOCIAZIONE conSLAncio ONLUS

Il sostegno e la difesa dei diritti dei pazienti affetti da SLA (PSLA) stanno evolvendo rapidamente, con numerosi progressi negli ultimi anni. Le associazioni gestite da volontari, tra cui l'Associazione conSLAncio Onlus, forniscono nuovi approcci efficaci per migliorare l'assistenza, integrando la partecipazione di diverse componenti della comunità.

Presentiamo qui i progressi di conSLAncio, un'associazione italiana guidata da pazienti e gestita da volontari, dedicata a favorire la collaborazione di pazienti, caregiver, ricercatori e altri stakeholder della comunità SLA italiana e internazionale.

Attraverso il metodo conSLAncio Design-Build e promuovendo una comunità inclusiva e paritaria, abbiamo riunito PSLA, caregiver, clinici, ricercatori, organizzazioni per lavorare insieme con un obiettivo comune: fornire assistenza urgente alla comunità SLA.

Dalla sua fondazione nel 2015, conSLAncio ha reclutato 46 volontari a livello globale raggiungendo numerosi traguardi: prima associazione italiana guidata da pazienti a presentarsi in conferenze scientifiche internazionali sulla SLA; leader nella diffusione di notizie in tempo reale sulle ricerche sulla SLA in Italia; lancio del primo programma di formazione online gratuito per i caregiver; cofondatori della nuova Coalizione Italiana SLA nel 2024; numerose collaborazioni internazionali.

I nostri sforzi hanno portato a un aumento del 92,5% delle visite al sito, con un totale di 187.330 visite da gennaio 2019, e un incremento costante di partecipazione su Facebook e X. conSLAncio effettua regolarmente sondaggi tra PALS e caregiver per implementare nuove iniziative per la comunità SLA.

conSLAncio ha avuto un impatto significativo nel miglioramento del supporto alla comunità SLA, principalmente in Italia ma anche in Svizzera, Canada e Stati Uniti, dimostrando come il lavoro di squadra sia fondamentale per ottenere cambiamenti significativi nell'assistenza alla comunità SLA.

CLINICAL RESEARCH



P45

SOCIAL FUNCTIONING DURING LIFETIME INFLUENCES THE EXTENT OF BEHAVIOURAL DECLINE IN FRONTOTEMPORAL LOBAR DEGENERATION

V. Faltracco¹, A. Telesca¹, E. M. Giuga¹, G. Gandini¹, A. Ferraro¹, P. Amami¹, E. Soldini¹, C. Villa¹, S. Prioni¹, S. Piacentini¹, P. Caroppo¹, N. Riva¹, E. Dalla Bella¹, G. Lauria¹, M. Consonni¹

¹ *Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan*

Social health is increasingly recognized as protective against age-related cognitive decline and dementia. Our study explored the impact of social functioning on cognitive and behavioral involvement (CBI-I) in frontotemporal lobar degeneration.

We developed an interview (Likert scale) to measure loneliness, social network size, leisure activities, and satisfaction with social ties/activities in childhood, adolescence, youth, adulthood, and older age. By calculating the mean values of each social domain in each age stage, we obtained an index of social reserve (SRI) ranging from 0 (no social life) to 40 (rich/satisfying social life). We evaluated this new SRI, along with the standard cognitive reserve index (CRI), and neuropsychological profiles of 109 patients: 29 with Progressive Supranuclear Palsy/Corticobasal Syndromes (PSP/CBS), 61 with amyotrophic lateral sclerosis (31 with CB-I; ALScbi), and 19 with frontotemporal dementia (FTD/FTD-ALS). Correlation and regression analyses examined the association between SRI, CRI, and psychometric measurements.

SRI and CRI showed no association. SRI correlated with neurobehavioral changes: increased depression and anxiety were linked to severe loneliness ($p < 0.001$), and poorer social networks were tied to significant behavioral changes ($p < 0.01$). CRI was specifically associated with cognitive abilities and executive functions ($p < 0.001$). Regression analyses supported SRI and CRI as predictors of behavioral ($p < .001$) and cognitive impairment ($p < 0.02$), respectively.

Social functioning influences the extent of neurobehavioral involvement, while cognitive reserve impacts cognitive impairment. This supports the concept that reserve should encompass both cognitive and social domains to study personal resilience against the loss of function caused by neurodegenerative diseases.



P45

IL FUNZIONAMENTO SOCIALE DURANTE L'INTERO ARCO DI VITA INFLUENZA L'ENTITÀ DEL DECLINO COMPORTAMENTALE NELLA DEGENERAZIONE LOBARE FRONTOTEMPORALE

La salute sociale è un fattore protettivo contro il declino cognitivo legato all'età e la demenza. Questo studio ha esaminato l'impatto del funzionamento sociale sul coinvolgimento cognitivo e comportamentale (CBI-I) nella degenerazione lobare frontotemporale.

Abbiamo sviluppato un'intervista (scala Likert) per misurare solitudine rete sociale, attività ricreative e soddisfazione nei legami sociali durante le diverse fasi della vita: infanzia, adolescenza, gioventù, età adulta e vecchiaia. Calcolando i valori medi di ogni dominio sociale, abbiamo creato un indice di riserva sociale (SRI) che va da 0 (assenza di vita sociale) a 40 (vita sociale soddisfacente). Abbiamo valutato il SRI, insieme all'indice standard di riserva cognitiva (CRI) e ai profili neuropsicologici di 109 pazienti: 29 con Paralisi Supranucleare Progressiva/Sindromi Corticobasali (PSP/CBS), 61 con sclerosi laterale amiotrofica (31 con CB-I; ALScbi) e 19 con demenza frontotemporale (FTD/FTD-ALS). Sono state effettuate analisi di correlazione e regressione per esaminare l'associazione tra SRI, CRI e misurazioni psicometriche.

Non è stata trovata associazione tra SRI e CRI. Tuttavia, lo SRI ha mostrato correlazioni con cambiamenti neuro comportamentali: un aumento di depressione e ansia era legato a solitudine severa ($p < 0.001$) reti sociali più povere erano associate a cambiamenti comportamentali significativi ($p < 0.01$). Il CRI si è rivelato associato alle capacità cognitive e alle funzioni esecutive ($p < 0.001$). Le analisi di regressione hanno confermato SRI e CRI come predittori di compromissione comportamentale ($p < 0.001$) e cognitiva ($p < 0.02$).

Il funzionamento sociale influisce sull'entità del coinvolgimento neurocomportamentale, mentre la riserva cognitiva incide sul declino cognitivo. Questi risultati suggeriscono che la riserva dovrebbe includere sia i domini cognitivi che sociali per comprendere la resilienza contro le malattie neurodegenerative.

CLINICAL RESEARCH



P46

M-AERIALS: MULTIPARAMETRIC ASSESSMENT OF EARLY RESPIRATORY INVOLVEMENT IN ALS - PRELIMINARY RESULTS

L. Fontanelli¹, C. Meoni², F. Cucchiara², M. Monfroì², I. Corda², S. Cappelli², L. Becattini², V. Montano², M. Gherardi², F. Bianchi², C. Carlesi², L. Carrozzi², F. Corradi², G. Siciliano²

¹ Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

² Università di Pisa

Early detection of respiratory involvement is critical for timely intervention, potentially improving patient outcomes and quality of life in people with ALS. The m-AERIALS study aims to provide a comprehensive, multi-parametric assessment of early respiratory dysfunction in ALS patients using non-invasive techniques.

In this ongoing study, we enroll patients diagnosed with ALS who undergo a thorough neurological evaluation. In addition to the clinical exam, participants receive an ultrasound examination of diaphragm and accessory respiratory muscles, alongside spirometry testing, to identify early signs of respiratory impairment and correlate them with disease progression.

Preliminary data from the first cohort of enrolled participants (n=11) reveal a significant correlation between spirometric and echo-derived data: in particular peak expiratory flow correlate with diaphragmatic displacement ($r=0.79$, $p < 0.05$) as well as diaphragmatic velocity ($r=0.78$, $p<0.05$). Moreover, we observed significant relation between clinical data and echographic assesment: ALS patients with an increased bulbar Penn Upper Motorneuron Score have an increased diaphragmatic excursion ($p<0.05$, Kruskal Wallis).

These preliminary results underscore the potential utility of combining spirometry and ultrasound to detect early respiratory dysfunction in ALS patients. We plan to enroll further patients and to extend the evaluation at different time points to track and predict disease progression.



P46

VALUTAZIONE MULTIPARAMETRICA DELL'INTERESSAMENTO RESPIRATORIO PRECOCE NELLA SLA - RISULTATI PRELIMINARI

Nei pazienti affetti da SLA, il rilevamento precoce del coinvolgimento respiratorio migliora l'outcome e la qualità della vita nei pazienti. Lo studio m-AERIALS mira a fornire una valutazione completa e multiparametrica della disfunzione respiratoria nei pazienti con SLA utilizzando tecniche non invasive.

In questo studio, attualmente in corso, ii pazienti affetti da SLA effettuano una valutazione neurologica, un'ecografia diaframmatica e dei muscoli respiratori accessori e test spirometrici allo scopo di identificare segni precoci di compromissione respiratoria e correlare questi dati con la progressione della malattia.

I dati preliminari del primo gruppo di partecipanti arruolati (n=11) rivelano una correlazione significativa tra i dati spirometrici e quelli ecografici: in particolare, il picco di flusso espiratorio si correla con lo spostamento diaframmatico ($r=0.79$, $p<0.05$) e con la velocità diaframmatica ($r=0.78$, $p<0.05$). Inoltre, è stata osservata una relazione significativa tra i dati clinici e la valutazione ecografica: i pazienti con SLA che presentano un punteggio elevato di Penn Upper Motorneuron Score per la componente bulbare mostrano un'escursione diaframmatica aumentata ($p<0.05$, Kruskal Wallis).

Questi risultati preliminari evidenziano il potenziale della combinazione di spirometria ed ecografia per rilevare precocemente la disfunzione respiratoria nei pazienti con SLA. Pianifichiamo di arruolare ulteriori pazienti ed estendere la valutazione in momenti diversi per monitorare e prevedere la progressione della malattia.

CLINICAL RESEARCH



P47

IMPROVING ONLINE CAREGIVER TRAINING FOR ALS PATIENTS IN ITALY: A TWO-YEAR UPDATE

M. Peviani¹, A. Desiderato¹, S. F. Conte¹, S. Pozzi¹, P. Contessa¹, J. C. Ayala¹, M. Consonni¹, T. Petrozziello¹, E. Grossini¹, S. Gagliardi¹, S. Rota¹, F. De Marchi¹, R. Schellino¹, S. Stanga¹, G. Merlini¹, **N. De Rossi¹**, A. Zicchieri¹

¹Associazione conSLAncio Onlus, Terracina, Italy

Accessibility to training can help address the burden of care for those who engage in patient caregiving. Therefore, online training is a powerful tool to facilitate participation of individuals across different regions or who cannot attend in person.

This study aims to determine whether the online course for ALS caregivers and complex fragile patients has the potential to improve access to caregiver training two years after the Italian multidisciplinary patient-led ALS association, conSLAncio, launched it.

The course was developed from an innovative interdisciplinary design-build approach integrating feedback from the Italian ALS community. The program was the first and is the only free caregiver training available on demand 24/7 for ALS and complex fragile patients in Italy. It covers 14 topics in a user-friendly format. Users were asked to complete a survey at the completion of the course.

More than 200 users enrolled since launched in January 2021. We received 78 surveys from caregivers (n=27), social health workers (n=21) and other personnel (n=30) from participants across Italy and residents abroad, including Switzerland, Canada, USA, and India. The majority of users recommended the course to others, except one who found it too advanced. No significant differences in the degree of satisfaction were found between the three groups of users. Most recommended topics (>64%) were: artificial nutrition, percutaneous endoscopic gastrostomy and nasogastric tube, anatomical concepts, artificial ventilation and venous accesses. The least interesting (<44%) was the topic about effective communication.

Overall, we achieved widespread enrollment across Italy and abroad. The data showed an improvement in ALS care engagement. We plan to continue expanding the program while improving content based on feedback received from users.



P47

MIGLIORARE LA FORMAZIONE ONLINE DEI CAREGIVER PER I PAZIENTI AFFETTI DA SLA IN ITALIA: UN AGGIORNAMENTO DI DUE ANNI

L'accessibilità alla formazione può aiutare a ridurre il carico di cura per coloro che si occupano dell'assistenza ai pazienti. Pertanto, la formazione online è uno strumento potente per facilitare la più ampia partecipazione.

Questo studio mira a determinare se il corso online per i caregiver di pazienti con SLA e pazienti fragili complessi lanciato da conSLAncio (un'associazione italiana multidisciplinare guidata da pazienti) ha il potenziale per migliorare l'accesso alla formazione per i caregiver a due anni dalla prima erogazione.

Il corso è stato sviluppato con un approccio innovativo di progettazione interdisciplinare, integrando i feedback della comunità italiana della SLA. Il programma è stato il primo ed è l'unico corso di formazione per caregiver di pazienti con SLA e pazienti fragili complessi disponibile in Italia gratuitamente su richiesta. Copre 14 argomenti in un formato facilmente usufruibile. Dalle risposte ottenuti dagli utenti a un sondaggio di gradimento, risulta che più di 200 utenti si sono iscritti dal lancio nel gennaio 2021. Abbiamo ricevuto 78 sondaggi da caregiver (n=27), operatori socio-sanitari (n=21) e altro personale (n=30) da partecipanti in tutta Italia e residenti all'estero, inclusi Svizzera, Canada, USA e India. La maggior parte degli utenti ha raccomandato il corso ad altri. Non sono state riscontrate differenze significative nel grado di soddisfazione tra i tre gruppi di utenti. Gli argomenti più raccomandati (>64%) sono stati: nutrizione artificiale, gastrostomia endoscopica percutanea e sondino nasogastrico, concetti anatomici, ventilazione artificiale e accessi venosi.

Nel complesso, abbiamo raggiunto un'ampia iscrizione in tutta Italia e all'estero. I dati hanno mostrato un miglioramento nell'impegno per la cura della SLA. Abbiamo pertanto in programma di continuare ad espandere il programma migliorando i contenuti del corso in base ai feedback ricevuti dagli utenti.

CLINICAL RESEARCH



P48

EVTestInALS: EXTRACELLULAR VESICLES IN ALS: TESTING THEIR USE AS BIOMARKERS FOR PROGNOSIS AND DISEASE PROGRESSION

L. Pisoni¹, L. Donini¹, P. Gasperini¹, I. Pesce¹, R. Frigerio², G. Tomè¹, M. Pedrotti¹, P. V. Fioretti¹, D. Peroni¹, R. Belli¹, A. Cutarelli¹, G. De Marco³, I. Merulla³, C. Paolantonio³, L. Pasetto⁴, T. Tebaldi¹, F. Rinaldi⁵, A. Ratti⁶, F. Verde⁷, N. Ticozzi⁷, N. Riva⁸, J. Mandrioli⁹, A. Gori², V. Bonetto⁴, R. Zuccarino¹⁰, R. Tanel¹⁰, A. Calvo³, M. Basso¹

¹ Department of Cellular, Computational and Integrative Biology-CIBIO, Università degli Studi di Trento, Trento, Italy.

² National Research Council of Italy, Istituto di Scienze e Tecnologie Chimiche (SCITEC-CNR), Milan, Italy.

³ Dipartimento di Neuroscienze "Rita Levi Montalcini", Università degli Studi di Torino and Centro Regionale Esperto per la SLA and AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, Turin, Italy.

⁴ Research Center for ALS, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Milan, Italy

⁵ Department of Mathematics, University of Padova, Padova, Italy

⁶ Department Medical Biotechnology and Translational Medicine, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy and Department of Neurology and Laboratory of Neuroscience, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy

⁷ Department of Neurology and Laboratory of Neuroscience, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy and Department of Pathophysiology and Transplantation (DEPT), Dino Ferrari Center, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

⁸ 3rd Neurology Unit and Motor Neuron Disease Centre, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta and Department of Clinical Neurosciences, Milan, Italy

⁹ Department of Biomedical, Metabolic and Neuronal Sciences, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italy and Department of Neurosciences, St. Agostino-Estense Hospital, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena, Modena, Italy

¹⁰ Centro Clinico NeMO/U.O. Neurologia, APSS Ospedale Riabilitativo Villa Rosa, Pergine, Italy

Extracellular vesicles (EVs) are membranous nanoparticles secreted by all cells in the extracellular space and biofluids. Their cargo is made of proteins, nucleic acids, and lipids, mirroring the composition of the cell of origin. These properties make them attractive sources of information and pave the way for their use as biomarkers, especially for diseases that are inaccessible and difficult to study, as in the case of neurodegenerative diseases. Recently, we demonstrated that the biochemical and biophysical properties of plasma-derived EVs can be used as biomarkers to discriminate Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) patients from healthy subjects and patients affected by muscular dystrophies or Kennedy disease. Furthermore, plasma EVs can discriminate against ALS patients with fast or slow disease progression rates. We are now performing a prospective longitudinal study that aims to analyze how EVs change in plasma samples collected from ALS patients at three different time points: at the diagnosis and after six and twelve months. We have outlined a new pipeline to address the plasma EV characteristics and integrate quality control measurements. Following the MiBlood-EV guidelines, we measure platelet plasma amount through flow cytometry, as well as albumin and lipoproteins copurified in EV samples with an automated Western Blot System. All these data will be considered in the mathematical model applied for the analysis. We are now validating a new marker of neuronal EVs to maximize the information we can obtain from peripherally circulating EVs. Briefly, we have studied the proteome of EVs isolated from the primary culture of murine cortical neurons, and we have selected transmembrane proteins. After verifying their specificity in the mouse model, we are now applying the single molecule array (Simoa) technology to measure these markers in biological samples sensitively.

CLINICAL RESEARCH

 **P48**

EVTestInALS: VESCICOLE EXTRACELLULARI IN SLA: TESTARE IL LORO USO COME BIOMARCATORI PROGNOSTICI E DI PROGRESSIONE DI MALATTIA

Le vescicole extracellulari (EVs) sono nanoparticelle secrete da tutte le cellule nello spazio extracellulare e nei biofluidi. Il loro contenuto biomolecolare, composto da proteine, acidi nucleici e lipidi, riflette lo stato fisiopatologico della cellula d'origine. Queste proprietà rendono le EVs informative e utilizzabili come biomarcatori, in particolare in quelle patologie difficili da studiare tra cui le malattie neurodegenerative. Recentemente, abbiamo dimostrato che le proprietà biochimiche e biofisiche delle EVs isolate da plasma possono essere utilizzate come biomarcatori per discriminare pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA) dai controlli sani e pazienti affetti da malattia di Kennedy e distrofie muscolari. Inoltre, queste possono fornire informazioni prognostiche discriminando i pazienti con una progressione rapida da quelli con progressione lenta. Attualmente, è in corso uno studio prospettico con l'obiettivo di identificare longitudinalmente come le EVs cambiano nei campioni di plasma di pazienti SLA collezionati a diverse tempistiche: alla diagnosi, e dopo sei e dodici mesi. Abbiamo definito una nuova pipeline per integrare le caratteristiche delle EVs con delle misurazioni di qualità. Seguendo le linee guida MiBlood-EVs abbiamo misurato le piastrine residue nel plasma tramite citofluorimetria e la contaminazione di lipoproteine e albumina nelle EVs tramite un sistema di western blot automatizzato. Tutti questi dati verranno integrati nel modello matematico. Per incrementare l'informatività delle EVs ottenute da plasma, stiamo validando un nuovo marcatore neuronale. Tramite proteoma delle EV isolate dalla coltura primaria di neuroni corticali murini abbiamo selezionato proteine candidate transmembrana. Dopo aver verificato la loro specificità nel modello murino stiamo ora applicando la tecnologia SIMOA per avere misure sensibili di questi marcatori in campioni biologici.

CLINICAL RESEARCH



P49

EMOTIONS, TRAUMA, AND QUALITY OF LIFE IN ALS PATIENTS: PRELIMINARY RESULTS

E. Zambetti¹, I. Baronchelli², P. Manzoni², C. Mucci¹, A. Greco¹

¹ University of Bergamo

² RSA Villa dei Cedri (Merate, LC)

In Italy, about 2.000 people a year become ill with ALS, a disease whose psychological aspects are little known. Patients' psychophysical well-being seems to decline over time, with an increase in depression and/or anxiety, and pathological emotional lability in about 50% of cases (Ingre et al., 2015). Little is known about the causes and risk factors, among which oxidative stress seems relevant (Kuraszkiewicz et al., 2018). This study aims to explore indirect symptomatology and psychosocial factors that may influence ALS (emotional lability, quality of life, and adverse childhood experiences).

Patients diagnosed with ALS without psychiatric comorbidities and dementia were involved and completed validated in literature questionnaires: the CNS-LS (Smith et al., 2004) for emotional lability, the CTQ-SF (Sacchi et al., 2018) for adverse childhood experiences, and the ALSSQOL-SF (Gentili et al., 2023) for quality of life, supplemented by sociodemographic and clinical variables.

Of the 15 patients (6 females), with mean-severe severity ($M=12.86$; $SD=10.36$) and mean age of 71.67 years ($SD=9.37$), most (73.3%) reported frequent episodes of uncontrolled laughing and/or crying, which decreased the more years elapsed since onset ($rs(1)=-.577$; $p<.024$). A good percentage (about 30.0% to 47.0%) experienced childhood trauma of low, moderate, or high severity. On average, quality of life is acceptable ($M=5.20$; $SD=3.55$) and increases as more years have elapsed since diagnosis ($rs(12)=.602$; $p=.023$).

Emotional lability is common in ALS, especially in the early stages. A good percentage of patients have experienced several adverse childhood experiences of various severities. Quality of life is acceptable and seems to improve with time spent in the healthcare facility. Bio-psycho-social caretaking aimed not only at curing but especially at caring is important. Further analysis will delve into the experience of formal and informal caregivers.



P49

EMOZIONI, TRAUMI E QUALITÀ DI VITA NEI PAZIENTI SLA: RISULTATI PRELIMINARI

In Italia, circa 2000 persone l'anno si ammalano di SLA, malattia di cui sono poco noti gli aspetti psicologici. Il benessere psicofisico dei pazienti sembra diminuire col tempo, con un aumento di depressione e/o ansia, e labilità emotiva patologica in circa il 50% dei casi (Ingre et al., 2015). Poco si sa sulle cause e sui fattori di rischio, tra cui sembra rilevante lo stress ossidativo (Kuraszkiewicz et al., 2018). Lo studio intende approfondire la sintomatologia indiretta e i fattori psicosociali che possono influenzare la SLA (labilità emotiva, qualità di vita e esperienze infantili avverse).

Sono stati coinvolti pazienti con diagnosi di SLA senza comorbidità psichiatriche e demenza, che hanno compilato una batteria di questionari validati in letteratura: CNS-LS (Smith et al., 2004) per la labilità emotiva, CTQ-SF (Sacchi et al., 2018) per le esperienze infantili avverse e ALSSQOL-SF (Gentili et al., 2023) per la qualità di vita, integrati da variabili sociodemografiche e cliniche.

Dei 15 pazienti (6 donne), con gravità media severa ($M=12.86$; $DS=10.36$) e età media di 71.67 anni ($DS=9.37$), la maggior parte (73.3%) riporta episodi frequenti di riso e/o pianto incontrollati, che diminuiscono più anni trascorrono dall'esordio ($rs(13)=-.577$; $p<.024$). Una buona percentuale (dal 30.0% al 47.0% ca.) ha subito traumi infantili di gravità bassa, moderata o alta. In media la qualità di vita è accettabile ($M=5.20$; $DS=3.55$) e aumenta più anni trascorrono dalla diagnosi ($rs(12)=.602$; $p=.023$).

La labilità emotiva è comune nella SLA, soprattutto nelle fasi iniziali. Una buona percentuale di pazienti ha vissuto traumi infantili di varie gravità. La qualità di vita è accettabile, e sembra migliorare col tempo trascorso in struttura. È importante una presa in carico bio-psico-sociale volta non solo a curare (to cure) ma soprattutto a prendersi cura (to care). Ulteriori analisi approfondiranno il vissuto di caregivers formali e informali.



FONDAZIONE ITALIANA DI RICERCA PER LA SLA
SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA
ENTE DEL TERZO SETTORE

Segreteria Scientifica
Fondazione Italiana di Ricerca per la SLA
Sclerosi Laterale Amiotrofica
Ente del Terzo Settore
via Poerio 14, 20129 Milano
tel 02. 20242390
m segreteria@arisl.org
www.arisla.org