

8° simposio “ATP1A3 In Disease” - Reykjavik, 3-4.10.2019

Relazione a cura del gruppo di ricerca dell'Istituto G. Gaslini, DiNOGMI - Università di Genova

(L. Pisciotta, E. De Grandis, M. Stagnaro)

La giornata del 2 ottobre si è aperta per il nostro gruppo con la partecipazione ad una riunione organizzativa ristretta (partecipanti oltre al nostro gruppo il prof. Mikati e le d.sse Vavassori, Prange, Panagiotakaki, Vezyroglou) per il lancio dello studio coordinato dal prof. Mikati **OBSERV-AHC**, nell'ambito del *Consorzio IAHCRC*. Lo studio, al momento non ancora avviato in Italia perché ancora in corso di approvazione dal Comitato Etico del nostro Istituto, è ufficialmente iniziato a partire da settembre 2019 e prevede la raccolta di dati clinici al tempo 0 e dopo 1 anno, e la possibilità da parte dei pazienti di compilare un diario delle crisi.

Dopo l'apertura dei lavori da parte di **Sigurður Jóhannesson**, presidente dell'associazione islandese per l'EA, e del presidente islandese **Guðni Th. Jóhannesson**, il prof. **David Goldstein** (genetista, *Columbia University*, U.S.A.) ha parlato di come la genetica e la medicina di precisione abbiano cambiato negli ultimi anni l'approccio alle malattie rare. L'identificazione di mutazioni rare attraverso tecniche di genetica di ultima generazione permette di creare topi mutati, e quindi affetti dalla patologia. Misurando e studiando l'attività neuronale dei neuroni mutati di questi topi, è possibile identificare e valutare *in vitro* composti che poi potranno passare a modelli *in vivo*.

Il secondo intervento, a opera del dott. **Peter Vangheluwe**, dell'Università di Leuven, in Belgio, ha illustrato una piattaforma di *screening* progettata per lo studio di possibili composti terapeutici per le molecole ATPasi di tipo P, cui appartiene anche la proteina mutata causa dell'emiplegia alternante. Nel corpo umano sono presenti 36 tipi diversi di questo gruppo di ATPasi, il cui alterato funzionamento può provocare diversi tipi di malattie. Questa piattaforma, studiando il funzionamento e la struttura delle pompe ATP, è in grado di porre le basi per la progettazione di possibili farmaci e composti in grado di inibire o modulare il funzionamento delle pompe mutate, ossia alterate. È stato presentato un modello inerente 1-ATPasi la cui disfunzione è alla base del non corretto funzionamento cardiaco; attraverso questo approccio è stato possibile identificare composti in grado di migliorare la funzionalità cardiaca.

Il prof. **Mikati**, (*Duke University*, U.S.A.) ha poi parlato dei possibili meccanismi patogenetici alla base dell'emiplegia alternante. Il non corretto funzionamento della pompa causato dalla proteina mutata *ATP1A3* nella malattia, provocherebbe un alterato trasporto degli ioni sodio e potassio, la cui corretta concentrazione all'interno della cellula è essenziale per il normale funzionamento dei neuroni. Tali alterazioni potrebbero concentrarsi in particolare nella zona del cervelletto e dell'ippocampo, e provocare con una reazione “a catena” anche il malfunzionamento di altri circuiti, specificatamente deputati al controllo dei movimenti.

L'intervento successivo è stato proposto dalla prof. **Brashear** (*University of California*, U.S.A.), che ha sottolineato come negli ultimi anni la crescente ricerca nel campo abbia imputato a mutazioni del gene *ATP1A3* quadri clinici anche molto diversi tra loro, non solo emiplegia alternante e distonia-parkinsonismo ad esordio rapido ma anche forme di atassia. Il gene è stato implicato anche in malattie psichiatriche, come l'autismo e la schizofrenia. Inoltre, un dettagliato studio sui pazienti americani affetti da RDP svolto dal suo gruppo di lavoro ha permesso di caratterizzare la distonia, ossia l'anomala contrazione muscolare, mostrando la diversità dei pazienti affetti. Per tutte queste ragioni, le malattie legate alle mutazioni del gene *ATP1A3* potrebbero essere molto più comuni di quanto ad oggi si pensi e andrebbero ricercate anche in casi di altri quadri neurologici con distonia, ad esordio progressivo ma non particolarmente rapido e senza attacchi parossistici, che interessano sia adulti che bambini.

A questo intervento è seguita una breve relazione sullo stato dell'arte del trattamento, sempre ad opera del prof. **Mikati**, che ha sottolineato l'importanza dell'approccio multidisciplinare, questo anche grazie alla continua ed intensa ricerca clinica che il suo gruppo sta effettuando sulla malattia. Le figure coinvolte nella gestione del disturbo sono rappresentate principalmente dal *neurologo/neuropsichiatra* (disturbi motori cronici e parossistici, epilessia, disturbi del sonno, problematiche psichiatriche e comportamentali), il *cardiologo* (anomalie del ritmo cardiaco), il *genetista* (consiglio genetico, rapporto genotipo/fenotipo). E' molto importante inoltre coinvolgere altre figure professionali specializzate quali *terapisti occupazionali, psicologi, infermieri, fisioterapisti, psicomotricisti, logopedisti*.

La mattinata del primo giorno si è conclusa con 2 comunicazioni orali. La prima, ad opera della d.ssa **Panagiotakaki**, dell'Università di Lione, collaboratrice del prof. **Arzimanoglou**, che ha illustrato le anomalie morfologiche riscontrate alla RMN dell'encefalo in 22 pazienti francesi. L'analisi di questi dati nei pazienti francesi è risultata essere molto simile a quella effettuata dal nostro gruppo sui pazienti italiani in occasione del meeting del 2011 di Genova, sebbene anomalie strutturali siano state riscontrate in più casi (12/22): polimicrogiria, anomalie corticali, ipoplasia dell'opercolo frontoparietale associata ad atrofia frontoparietale, corpo calloso inspessito, sclerosi ippocampale bilaterale (dovuta ad episodi epilettici prolungati), e atrofia cortico-sottocorticale. La seconda, del dr. **Snow**, (*Vanderbilt University*, U.S.A.), focalizzata sullo studio delle cellule staminali totipotenti derivate dai pazienti affetti da malattia; in particolare l'intervento ha descritto le differenze tra il funzionamento delle cellule con mutazione E815K rispetto a quelle normali.

Il pomeriggio del primo giorno si è aperto con la **terza sessione** riguardante i progressi delle nuove terapie delle patologie correlate alla mutazione ATP1A3. Il primo intervento, di **S. Gray**, ha riportato i risultati dei tentativi della terapia genica intratecale in alcune patologie del sistema nervoso centrale, in particolare la *neuropatia assonale gigante*. I presupposti teorici della terapia genica consistono nell'utilizzo di vettori di virus adeno-associati (AAV) in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica, come l'AAV9. Gli studi condotti sinora dal *team* del prof. Gray hanno dimostrato che AAV9, quando è somministrato per via endovenosa o intratecale, può veicolare il trasferimento genico, dose dipendente e diffuso, a neuroni e astrociti sia nei topi sia nei primati non umani. Nel 2015 il laboratorio del prof. Gray ha iniziato la fase 1 clinica per testare la somministrazione intratecale di scAAV9/JeT-GAN nei pazienti con neuropatia assonale gigante (GAN). Il trasferimento del gene ATP1A3 per il trattamento dell'emiplegia alternante dell'infanzia (AHC) presenta sfide uniche che potrebbero rendere più complicata la terapia genica, ma si stanno intraprendendo i primi passi per valutarne la fattibilità.

Il secondo intervento è stato quello di **Van den Maagdenberg**, che ha riferito sull'avanzamento delle ricerche del secondo gene causativo dell'emiplegia alternante nei pazienti ATP1A3 negativi. Vi sono studi riguardanti il gene *ATP1A2*, che codifica per una pompa ATP-asi che importa il glutammato nei neuroni, e sull'eventuale coinvolgimento del gene *SCN2A*, coinvolto nella patogenesi di varie sindromi epilettiche.

La terza sessione è quindi proseguita con l'intervento del dott. **Akkuratov**, riguardante un modello murino (topo) *knock-in* portatore della mutazione più frequente nei pazienti con RDP (T613M), localizzata nella zona del gene ATP1A3 codificante la subunità alfa 3; di questo modello sono state studiate in modo specifico le anomalie del cammino. Mentre la mutazione omozigote è incompatibile con la vita e porta a morte già a livello embrionale, quella in eterozigosi consente la nascita; successivamente alcuni topi sono morti, altri hanno avuto disturbi del cammino talmente gravi da dover essere soppressi, mentre un topo ha mostrato distonia e atassia. Sono stati riportati i risultati di vari test a cui è stato sottoposto il topo portatore della mutazione in eterozigosi confrontandolo con il topo *wild-type*; essenzialmente il topo portatore della mutazione ha molte difficoltà motorie, in particolare di coordinazione motoria, si muove più velocemente e trascorre il doppio del tempo a stare con le zampe anteriori aperte e meno con le zampe anteriori chiuse; ha anche difficoltà nel nuoto. Considerando tutti i risultati ottenuti, è stato evidenziato come il topo portatore della mutazione ATP1A3 T613M abbia turbe della qualità e del ritmo del controllo del cammino, conducendo all'ipotesi di una funzione patologica dei neuroni del midollo spinale. Ci sono,

tuttavia, ancora troppo poche informazioni circa il ruolo svolto dalla ATP1A3 ATPasi nel midollo spinale, ma è stato scoperto che la subunità $\alpha 3$ della pompa Na/K ATP-asi sia ampiamente espressa nel midollo spinale.

La terza sessione si è conclusa con la presentazione della d.ssa **Roubertie**, che ha riportato i risultati di uno studio sulle manifestazioni non parossistiche in un gruppo di 28 pazienti AHC ATP1A3 positivi, sia visitandoli sia mediante l'analisi di video. Si è evidenziata la presenza di corea in 10 pazienti, distonia in 16 pazienti, mioclono in 4 pazienti, atassia in 2 pazienti. 9 soggetti avevano più di un disturbo del movimento, mentre 8 pazienti non ne avevano. Il grado di disturbo del movimento è stato da moderato a grave in 12 pazienti su 28. Al momento dell'inclusione nella casistica i soggetti con distonia erano più adulti rispetto ai non distonici; inoltre i pazienti con distonia e/o corea mostravano un esordio di patologia più precoce e una maggiore compromissione neurologica, senza una correlazione con il genotipo. Tutti i pazienti erano ipotonici, con una maggiore gravità in quelli con distonia e/o corea. Si è riscontrata un'associazione della bradicinesia ad un'età più giovane; in 11 pazienti su 25 è stata riscontrata una significativa disartria, infine in 7 casi vi era una storia positiva per un deterioramento neurologico acuto con successiva regressione delle prestazioni motorie, tipicamente dopo un evento stressante.

La **quarta sessione**, dedicata a "qualità di vita ed educazione", è stata carica di emozioni perché ha visto dapprima la testimonianza della d.ssa **Sigurðardóttir**, medico curante della figlia di Sigurður Hólmur Jóhannesson, e delle difficoltà incontrate nel processo che ha portato alla diagnosi di una malattia rara come la AHC, poi quella di una mamma, **Laura Darick Heimgartner**, che ha parlato di cosa comporta avere un figlio con AHC, la sua gestione e la ripercussione sulla qualità di vita di tutta la famiglia. La sessione era stata aperta da un intervento del dott. **Rosewich**, che ha proposto la stesura di un documento che potesse essere di aiuto alle famiglie ma anche ai medici curanti, contenente le risposte da parte di esperti di AHC alle domande più frequenti (FAQ); tale argomento è stato poi ripreso alla fine del simposio nell'ottica di identificare tra i presenti coloro che volessero contribuire attivamente a tale documento, creando un acceso ma stimolante dibattito.

Siamo poi andati tutti insieme a visitare il *Perlan Museum*, visita che si è conclusa con la proiezione di un filmato emozionante sulle aurore boreali (*northern lights*) e il loro mistero! Durante la cena siamo stati allietati dal canto di Særún Harðardóttir, che ha duettato anche con la figlia; infine, Helga Birgisdóttir ha tenuto un discorso dal titolo "We can do it". Personaggio molto energico e positivo, ha donato a tutti uno "smiler", lanciando il messaggio che sorridendo, ossia pensando positivo, si possono ottenere grandi risultati perché si alimenta la speranza, anche in situazioni così complesse come la sindrome dell'emiplegia alternante.

La **seconda giornata** è stata densa di novità interessanti, sia durante la sessione 5 dedicata allo studio del funzionamento delle pompe ATPasiche, che nella sessione 6 sugli attuali sviluppi terapeutici.

In particolare, durante la prima di queste sessioni, si è discusso del potenziale ruolo patogenetico della chinasi GAK (Cyclin G-associated kinase) a carico di *ATP1A3* espresso a livello dei neuroni CA1 e CA3, con un meccanismo simile a quello che si sta studiando in patologie come il morbo di Parkinson. Altro meccanismo che è stato ipotizzato è quello dello scorretto "ripiegamento" delle proteine (*misfolding*) e successiva mancata degradazione di queste ultime con accumulo tissutale, come sappiamo avviene in patologie neurodegenerative come l'Alzheimer e il Parkinson. Entrambe queste ipotesi potrebbero fornire spunti per terapie specifiche.

A conclusione di questa sessione, il dott. **Lorenzo Antonini** ha illustrato i progressi nello studio sui possibili stati conformazionali dell'ATPasi, sulla loro affinità con gli ioni sodio e potassio, anche in relazione alla presenza delle mutazioni D801N e E815K.

La sessione successiva è stata aperta dal prof. **Danilo Tiziano**, che ha mostrato come lo studio sulle molecole farmacologiche sia significativamente progredito. Sono state infatti identificate dal suo gruppo di ricerca 27 sostanze (su un totale di 600 esaminate) che si ipotizza riducano l'accumulo di protoni nelle cellule mutate. Questo risultato sarà verificato sul modello animale nel corso del 2020.

Nell'intervento successivo il prof. **George**, invece, prendendo spunto dal nostro studio sui farmaci e sulla loro efficacia, ha discusso di come le cellule staminali dei pazienti che non rispondono alla flunarizina in effetti non presentano modificazioni a livello neurofisiologico, come invece avviene in quelle dei pazienti per cui il farmaco è efficace.

La sessione si è chiusa con uno studio che ha dimostrato come tra i pazienti con SIDS (*Sudden Infant Death Syndrome*, sindrome della morte improvvisa infantile) ci siano anche pazienti *ATP1A3* mutati non diagnosticati. Questo risultato si potrebbe collegare al rischio cardiologico che sappiamo essere presente nei pazienti con emiplegia alternante, ma può suggerire anche un ampliamento dello spettro delle patologie *ATP1A3*-correlate.

La partecipazione a questo evento è stata un'ottima occasione per fare il punto su quanto di nuovo è emerso sia dal punto di vista clinico che sperimentale/terapeutico. Abbiamo avuto la possibilità di discutere e proporre nuove iniziative e studi, nonché future collaborazioni tra gruppi di ricerca a livello internazionale.

Rimbocchiamoci, quindi, le maniche e appuntamento nel 2020 a Stoccolma!

(Revisione del testo a cura di F. Franchini, vice presidente A.I.S.EA)