Bando Fondazione LICE 2024

PROGETTO DI RICERCA

Identificazione di biomarcatori della malattia di Lafora attraverso analisi multiomica

Responsabile progetto	Dr. Lorenzo Muccioli
Affiliazione ed ente ospitante capofila	IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche – Azienda USL di Bologna
Unità e servizi coinvolti afferenti all'ente ospitante capofila	Programma Epilessia – Responsabile: Prof.ssa Francesca Bisulli Programma di Neurogenetica – Responsabile: Prof. Valerio Carelli Laboratorio di Proteomica, Metabolomica e Chimica Bioanalitica (PMCB) – Responsabile: Prof.ssa Jessica Fiori UOSI Epidemiologia e Statistica – Responsabile: Dr. Francesco Nonino
Centri collaboratori	Università della Florida, Stati Uniti – Responsabile locale: Prof. Matthew Gentry Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG) – Responsabile locale: Dr. Giuseppe d'Orsi Università di Perugia, Perugia (PG) – Responsabile locale: Prof.ssa Cinzia Costa
Tipo di progetto	Ricerca clinica
Versione	1.0 del 15/05/2024

Sommario

SINOSSI 3
PAROLE CHIAVE 4
BACKGROUND E RAZIONALE 5
Fisiopatologia e diagnosi 5
Caratteristiche cliniche 5
Esami strumentali 5
Storia naturale e terapie 6
Biomarcatori 6
Le scienze “omiche” 6
OBIETTIVI 7
PIANO SPERIMENTALE 8
Disegno di studio 8
Popolazione 8
Durata 9
Esiti 9
Procedure 11
Fattibilità 12
Milestones e monitoraggio 14
METODI 14
Obiettivo 1: Caratterizzazione del decorso di malattia 14
Obiettivo 2.1: Analisi genomica 15
Obiettivo 2.2: Analisi trascrittomica 16
Obiettivo 2.3: Analisi proteomica *bottom-up* 16
Obiettivo 2.4: Analisi metabolomica *target* 17
Analisi statistiche 18
RISULTATI ATTESI E RILEVANZA CLINICA 18
Storia naturale di malattia e marcatori clinico-strumentali 18
Biomarcatori derivati da analisi multiomica 19
BIBLIOGRAFIA 20
PIANO TEMPORALE (GANTT) 22
SCHEMA GRAFICO DEL PROGETTO 22
PIANO ECONOMICO 23

SINOSSI

La malattia di Lafora (ML) è un'epilessia mioclonica progressiva autosomica recessiva ultrarara che colpisce bambini o adolescenti, causando epilessia farmaco-resistente, mioclono, e deterioramento psicomotorio, portando alla morte in età giovane adulta in quanto non sono disponibili trattamenti efficaci. Ad oggi i dati sulla storia naturale di malattia derivano principalmente da revisioni sistematiche della letteratura e non esistono biomarcatori di malattia validati. Lo scopo del presente studio è quello di (obiettivo 1) descrivere il decorso della ML definendone le *milestones* e caratterizzandolo approfonditamente dal punto di vista clinico-strumentale e (obiettivo 2) utilizzare un approccio multiomico (genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica) per identificare biomarcatori specifici della ML.

Nello studio saranno inclusi 10 pazienti con diagnosi genetica di ML in qualsiasi stadio di malattia, che saranno osservati prospetticamente nell'arco di 18 mesi con valutazioni al basale e ad ogni semestre successivo ed analisi multiomica effettuata all'inizio ed al termine dell'osservazione. Saranno inoltre inclusi 10 soggetti sani appaiati per età e sesso che fungeranno da controlli per le analisi "omiche".

Nell'ambito dell'obiettivo 1 saranno analizzate le principali *milestones* di malattia (età all'esordio di malattia in generale e di epilessia, deterioramento cognitivo, mioclono, così come età all'allettamento, posizionamento PEG ed exitus, qualora si verifichino) e procedure specifiche al basale e nei semestri successivi per epilessia (valutazione frequenza crisi tonico-cloniche ed EEG), funzioni cognitive (batteria di test neuropsicologici), funzioni motorie (scale per mioclono ed atassia, test di destrezza manuale, di equilibrio e del cammino) e per l'impatto globale di malattia (scale specifiche per ML come la Lafora Disease Performance Scale e generali per le autonomie e la qualità di vita). In aggiunta, saranno eseguite una RM encefalo ed una FDG-PET encefalo a inizio e fine studio. Per l'analisi del decorso di malattia saranno utilizzate statistiche descrittive.

Nell'ambito dell'obiettivo 2 saranno eseguiti un prelievo di sangue periferico e (opzionale) di liquor mediante rachicentesi al basale e a 18 mesi. Saranno eseguiti analisi genomica su DNA alla valutazione basale, per ricercare varianti strutturali o in regioni non codificanti che potrebbero modulare il fenotipo clinico. Inoltre saranno effettuate al basale e ripetute a 18 mesi le seguenti analisi: trascrittomica su cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC), che includerà il sequenziamento dell'RNA sia *bulk* che *single-cell* per analizzare l'espressione genica di pazienti con ML; proteomica su plasma e liquor utilizzando un approccio *bottom-up* per ottenere il profilo proteico dei pazienti ML; metabolomica *target* su siero, PBMC e liquor per studiare il profilo metabolico in pazienti ML. Sarà effettuata una *principal component analysis* per identificare clusters di espressione genica, peptidi/proteine e metaboliti target e t-test per confrontare i seguenti gruppi: I) pazienti al

basale vs controlli, II) pazienti al basale in stadio precoce-intermedio vs avanzato-terminale e III) analisi al basale vs 18 mesi.

Attraverso questo studio di aspettiamo di contribuire a definire la storia naturale della ML ed identificare biomarcatori che possano essere utili per migliorare la comprensione della ML ed essere potenzialmente utilizzati nell'ambito di future sperimentazioni cliniche.

PAROLE CHIAVE

Storia naturale, genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica

BACKGROUND E RAZIONALE

La malattia di Lafora (ML) è una forma autosomica recessiva di epilessia mioclonica progressiva per la quale non esistono terapie curative. È una malattia ultrarara (circa 200 casi diagnosticati al mondo, di cui circa 25 in Italia) che colpisce bambini o adolescenti, causando epilessia farmaco-resistente, mioclono, e deterioramento psicomotorio, portando alla morte in età giovane adulta.[1] L'IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna è centro clinico di riferimento nazionale per la ML ed ha in carico la maggior parte dei pazienti italiani.

Fisiopatologia e diagnosi

La ML è causata da mutazioni *loss-of-function* nel gene *EPM2A*, codificante la laforina, o *NHLRC1*, codificante la malina, due proteine coinvolte nel metabolismo del glicogeno.[2] La perdita di funzione o assenza di una delle due proteine determina una scarsa ramificazione ed iperfosforilazione del glicogeno, che precipita, si aggrega e si accumula in corpi di Lafora in diversi organi, inclusi il cervello e tessuti periferici.[3] L'accumulo di corpi di Lafora cerebrali è responsabile della neurodegenerazione e delle manifestazioni cliniche della malattia.[4,5]
La diagnosi viene posta mediante test genetico di *EPM2A* e *NHLRC1* in casi sospetti.

Caratteristiche cliniche

L'età media all'esordio della malattia è di 13 anni.[1] I primi sintomi consistono in crisi miocloniche, tonico-cloniche generalizzate, o focali con sintomi visivi. L'epilessia nel tempo diventa difficile da trattare portando a episodi di stato epilettico.[6] Oltre al mioclono epilettico, i pazienti possono sviluppare mioclono corticale e sottocorticale sensibile all'azione e agli stimoli, che diventa continuo nelle fasi tardive della malatti.[6] L'atassia insieme al mioclono contribuisce alla disabilità motoria.[6] Il declino cognitivo si manifesta tipicamente con difficoltà scolastiche e progredisce verso una demenza profonda. Gli esami neuropsicologici possono rilevare un coinvolgimento predominante delle funzioni esecutive.[7]

Esami strumentali

All'esordio, l'EEG presenta un'attività di fondo normale con anomalie epilettiformi generalizzate e focali posteriori e possibile fotosensibilità. Con il passare del tempo, l'attività di fondo rallenta e le anomalie epilettiformi aumentano in frequenza fino a divenire subcontinue.[8]
Le tecniche di neuroimaging strutturale come la risonanza magnetica (RM) dell'encefalo spesso non mostrano anomalie o evidenziano gradi variabili di atrofia cerebrale e cerebellare. Al contrario, la tomografia ad emissione di positroni con fluorodesossiglucosio (FDG-PET) può rilevare ampie aree di ridotto metabolismo glucidico, spesso coinvolgenti molteplici regioni corticali e subcorticali.

L'ipometabolismo è più marcato in soggetti in stadio avanzato di malattia e peggiora in esami seriati, pertanto la FDG-PET sembra correlare con la progressione di malattia.[9]

Storia naturale e terapie

La ML è una condizione ultrarara ed attualmente non sono disponibili informazioni dettagliate sulla storia naturale. Una meta-analisi dei casi riportati in letteratura ha mostrato che la perdita delle autonomie ed il decesso si verificano dopo una mediana di 6 e 11 anni dall'esordio, rispettivamente.[1] Al momento non sono disponibili terapie che abbiano dimostrato efficacia nel modificare il decorso di malattia. Alcuni pazienti italiani stanno assumendo alglucosidasi o il farmaco sperimentale VAL-1221 in uso compassionevole, che non hanno determinato chiari segnali di efficacia. Sono in fase di sperimentazione preclinica altre terapie, come l'oligonucleotide antisenso ION283. Conoscere la storia naturale della ML è fondamentale in vista di un trial clinico, in quanto trattandosi di una condizione ultrarara e fatale sarebbe difficile e non etico includere un gruppo placebo, mentre dati sulla storia naturale potrebbero essere utilizzati come braccio sintetico di controllo.

Biomarcatori

L'utilizzo dei biomarcatori nella valutazione della storia naturale delle malattie rare come la ML è fondamentale per migliorare la comprensione della malattia, monitorare la sua progressione e guidare lo sviluppo di nuove terapie.[10] I biomarcatori possono infatti fornire informazioni obiettive sullo stato della malattia e sulla sua evoluzione nel tempo ed essere utilizzati per valutare l'efficacia di terapie sperimentali, oltre che a contribuire ad identificare sottogruppi di pazienti con caratteristiche specifiche che possono rispondere meglio a determinati trattamenti o che presentano un rischio maggiore di complicanze (personalizzazione della cura).[10] Seppur EEG e FDG-PET abbiano un ruolo nella determinazione della progressione di malattia, per la ML non esistono biomarcatori validati.

Le scienze "omiche"

Le scienze "omiche" si occupano dello studio di insiemi di molecole in determinati campioni biologici come strategia per raggiungere una comprensione completa delle funzioni biologiche. L'approccio multiomico, che si basa sull'integrazione dei dati ottenuti dalle varie omiche, si è dimostrato efficace nell'identificare biomarcatori in diverse condizioni cliniche.
Le scienze "omiche" comprendono:

Genomica: scienza che studia il completo genoma degli organismi, ossia l'insieme delle sequenze codificanti, in cui si concentra l'85-90% delle varianti patogeniche, e non codificanti. Queste ultime possono determinare la *up* o la *down* regolazione dell'espressione genica, anche mediante la

trascrizione in RNA non codificanti. La genomica ha assunto negli ultimi anni un ruolo sempre più importante per l'identificazione di biomarcatori di malattia, potendo identificare varianti genetiche che influenzano l'espressione fenotipica di malattia e la risposta a determinati farmaci.[11]

Trascrittomica: si occupa dello studio del trascrittoma, cioè l'insieme dei trascritti (mRNA) di una cellula. La trascrittomica può permettere di identificare i geni attivati o soppressi nella ML, e quindi comprendere i meccanismi molecolari coinvolti nella definizione del fenotipo in vari stadi di malattia e potenzialmente della risposta del paziente a terapie sperimentali. Studi di trascrittomica su modelli murini di ML hanno permesso l'identificazione della neuroinfiammazione come tratto chiave nella fisiopatologia.[12]

Proteomica: studio dell'insieme di tutte le proteine di una cellula, tessuto o organismo. Lo scopo della proteomica è caratterizzare le proteine, con l'obiettivo di comprenderne le funzioni e le interazioni con agenti esterni. L'analisi proteomica *bottom-up* non mirata fornisce una panoramica completa della composizione proteica di un campione biologico e può essere utilizzata per ottenere informazioni dettagliate sulla patogenesi delle malattie e sull'identificazione di biomarcatori potenziali.[13]

Metabolomica: scienza che studia il metaboloma, cioè l'insieme dei metaboliti utilizzati o formati dalle cellule in associazione con il suo metabolismo. Il metaboloma costituisce l'insieme di molecole più numeroso, complesso e comprensivo da analizzare. La metabolomica può essere distinta in base alle metodiche analitiche utilizzate in *target*, mirata a gruppi di molecole conosciute, e *untarget*, analisi più comprensiva e meno specifica di molecole non note a priori. Modelli murini e pazienti Lafora hanno dimostrato di avere un profilo metabolico distintivo rispetto ai controlli, con un'alterazione di metaboliti correlati alla neurodegenerazione e all'epilessia quali glutammina e glutammato e numerosi glucidi[14-15] (comunicazioni personali Prof. Gentry).

OBIETTIVI

Il progetto è articolato in due obiettivi:

Obiettivo 1: Descrizione del decorso della ML attraverso l'analisi retrospettiva di dati clinici e strumentali e continuando con visite prospettiche a cadenza semestrale nell'arco di 18 mesi inclusive di valutazioni dell'epilessia (crisi tonico-cloniche ed EEG), test neuropsicologici, funzioni motorie, autonomie e *burden* globale di malattia con definizione dello stadio di malattia, RM encefalo e FDG-PET encefalo.

Obiettivo 2: identificazione di biomarcatori specifici della ML attraverso l'analisi multiomica, che consisterà in:

2.1: analisi genomica, con l'obiettivo di identificare varianti strutturali o regioni regolatorie alterate che, insieme alle varianti patogenetiche già identificate nei geni *EPM2A* o *NHLRC1*, possano influenzare il fenotipo e la progressione di malattia.

2.2: analisi trascrittomica, con l'obiettivo di identificare geni o gruppi di geni con espressione aumentata o ridotta nei pazienti con ML rispetto a controlli, stratificando per stadio di progressione e valutando eventuali differenze tra l'analisi al basale e a 18 mesi.

2.3: analisi proteomica *bottom-up*, con l'obiettivo di caratterizzare il profilo proteico dei pazienti con ML rispetto a controlli, stratificando per stadio di progressione e valutando eventuali differenze tra l'analisi al basale e a 18 mesi.

2.4: analisi metabolomica *target*, con l'obiettivo di caratterizzare il profilo metabolico dei pazienti con ML rispetto a controlli, stratificando per stadio di progressione e valutando eventuali differenze tra l'analisi al basale e a 18 mesi.

PIANO SPERIMENTALE

Disegno di studio

Lo studio sarà condotto in un unico centro, l'IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna (ISNB). Il disegno differisce a seconda dell'obiettivo:

Obiettivo 1: studio di coorte retrospettivo e prospettico

Obiettivo 2.1: studio trasversale descrittivo

Obiettivi 2.2-2.3-2.4: studio di coorte prospettico con confronto di controlli appaiati al basale.

Popolazione

Saranno arruolati 10 pazienti con ML già in carico presso l'IRCCS ISNB o riferiti dai centri collaboranti IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo ed Università di Perugia, che soddisfino i seguenti criteri di inclusione:

- Documentata diagnosi genetica di ML (varianti patogeniche bialleliche nel gene *EPM2A* o *NHLRC1*);
- Età uguale o maggiore a 12 anni;
- In grado di partecipare alle visite previste dal protocollo di studio, anche tramite un caregiver affidabile di età uguale o maggiore a 18 anni;

- Qualsiasi stadio di malattia.*

* è prevista l'inclusione di almeno tre pazienti in stadio precoce o intermedio di malattia (definiti come stadio 1 e 2 secondo la scala di progressione della ML[16]) e di almeno tre pazienti in stadio avanzato o terminale di malattia (definiti come stadio 3 e 4 secondo la scala di progressione della ML[16]), di cui non più di due pazienti in stadio terminale (4).

Nel dettaglio, la scala di progressione della ML[16] è basata su una valutazione delle funzioni cognitivo-motorie, le autonomie nelle attività della vita quotidiana e le interazioni sociali, ed è suddivisa in: 1) deterioramento cognitivo e motorio lievi, preservate attività della vita quotidiana ed interazioni sociali; 2) deterioramento cognitivo moderato, limitazioni nelle attività motorie e nelle interazioni sociali; 3) deterioramento cognitivo e motorio severo, necessità di aiuto per la deambulazione e per svolgere attività della vita quotidiana, scarsa interazione sociale; 4) paziente in sedia a rotella o allettato, senza significative attività della vita quotidiana e interazione sociale.

Il numero dei pazienti da includere è stato deciso sulla base della possibilità di reclutamento ed analisi dati dell'ente proponente IRCCS ISNB e non sulla base di analisi statistiche formali.

Saranno inoltre arruolati 10 soggetti sani (assenza di segni neurologici) appaiati per età e sesso ai pazienti inclusi nello studio, per poter confrontare i risultati delle analisi di trascrittomica, proteomica e metabolomica con una popolazione di controllo.

Durata

La durata globale del progetto è di 24 mesi, inclusivi di un periodo di arruolamento di 4 mesi, l'osservazione dei pazienti per 18 mesi con valutazioni al basale e ogni semestre ed analisi multiomica all'inizio ed al termine dell'osservazione, e l'analisi finale dei dati di 2 mesi.

Esiti

OBIETTIVO 1:

Gli esiti relativi all'obbiettivo 1 (decorso di malattia) sono suddivisi in:

Milestones di malattia:

- Età all'esordio della malattia clinica e modalità
- Età all'esordio dell'epilessia
- Età all'esordio di deficit cognitivi
- Età all'esordio del mioclono
- Età all'esordio dell'atassia
- Età al confinamento alla carrozzina o allettamento

- Età al posizionamento della PEG
- Età all'exitus

Epilessia (visite V1, V2, V3, V4 – rispettivamente al basale, 6 mesi, 12 mesi e 18 mesi)

- Cambiamenti nella frequenza di crisi tonico-cloniche rispetto al semestre precedente la visita basale
- Cambiamenti nella prevalenza di anomalie epilettiformi e frequenza dell'attività di fondo

Funzioni cognitive (visite V1, V2, V3, V4 – rispettivamente al basale, 6 mesi, 12 mesi e 18 mesi)

- Cambiamenti nel test Montreal Cognitive Assessment (MoCA)
- Cambiamenti nei test Leiter Performance Scale 3 (Leiter-3)
- Cambiamenti nel test Visual Motor Integration (VMI)
- Cambiamenti nel test children's color trail test
- Cambiamenti nel subtest di inibizione della scala NEPSY-II
- Cambiamenti nei test di fluenza verbale
- Cambiamenti nel subtest di memoria di lavoro nella WAIS

Funzioni motorie (visite V1, V2, V3, V4 – rispettivamente al basale, 6 mesi, 12 mesi e 18 mesi)

- Cambiamenti nel 4-stage balance test
- Cambiamenti nel timed-up and go (TUG) test
- Cambiamenti nel 6-minute walk test (6MWT)
- Cambiamenti nel 10-meter walk test (10MWT)
- Cambiamenti nel 9-hole peg test (9HPT)
- Cambiamenti nella Scale for Assessment and Rating of Ataxia (SARA)
- Cambiamenti nella Unified Myoclonus Rating Scale (UMRS)

Valutazione globale di malattia (visite V1, V2, V3, V4 – rispettivamente al basale, 6 mesi, 12 mesi e 18 mesi)

- Cambiamenti nello stadio di progressione della ML[16]
- Cambiamenti nella Lafora Disease clinical Performance Scale (LDPS)
- Cambiamenti nell'indice di Barthel
- Cambiamenti nella scala Vineland-II
- Cambiamenti nella Clinical, Patient e Caregiver Global Impression of Change (CGI, PGI, CaGI-C)
- Cambiamenti nella qualità di vita (QOLIE)

Indagini strumentali (visite V1 e V4 – rispettivamente al basale e a 18 mesi)

- Cambiamenti nei reperti (trofismo) di RM encefalo
- Cambiamenti nei reperti (ipometabolismo) di FDG-PET encefalo

OBIETTIVO 2 (analisi multiomica):

- Genomica: Identificazione di varianti regolatorie o strutturali che possano avere un effetto addizionale sulla progressione e sulla gravità del fenotipo oltre alle varianti causative già note per i pazienti in *EPM2A e NHLRC1.*
- Trascrittomica: Differenze nei clusters di espressione genica tra: I) pazienti al V1 (basale) e controlli; II) gruppi di pazienti in stadio precoce/iniziale e avanzato/terminale al V1 (basale); III) analisi al V1 (basale) e V4 (18 mesi)
- Proteomica: Proteine discriminanti tra: I) pazienti al V1 (basale) e controlli; II) gruppi di pazienti in stadio precoce/iniziale e avanzato/terminale al V1 (basale); III) analisi al V1 (basale) e V4 (18 mesi)
- Metabolomica: Metaboliti target discriminanti tra: I) pazienti al V1 (basale) e controlli; II) gruppi di pazienti in stadio precoce/iniziale e avanzato/terminale al V1 (basale); III) analisi al V1 (basale) e V4 (18 mesi)

Procedure

Ogni paziente con stadio di malattia precoce, intermedio o avanzato (stadio 1-3) sarà sottoposto a 4 visite, una al basale ovvero al momento dell'inclusione (V1), una dopo 6 mesi (V2), una dopo 12 mesi (V3) ed una dopo 18 mesi (V4).

I pazienti in stadio terminale di malattia (stadio 4) saranno sottoposti a due visite, una al basale ovvero al momento dell'inclusione (V1) ed una dopo 18 mesi (V4).

OBIETTIVO 1

Alla visita V1 saranno valutati i criteri di eleggibilità, firmato il consenso informato, e fatta una revisione della storia di malattia con focus sulle *milestones* raggiunte fino a quel momento. Alle visite successive se il paziente raggiungerà successive *milestones* come definite negli esiti queste saranno annotate. Ad ogni visita sarà fatta una ricognizione anamnestica e farmacologica.

La verifica della frequenza delle crisi tonico-cloniche degli ultimi sei mesi e l'EEG saranno eseguiti in tutte le visite (V1, V2, V3 e V4).

La valutazione delle funzioni motorie (esame obiettivo neurologico generale ed i seguenti test: 4-stage balance test, TUG test, 6MWT, 10MWT, 9HPT, SARA, UMRS) sarà eseguita in tutte le visite (V1, V2, V3 e V4).

La valutazione delle funzioni cognitive (test MoCA, Leiter-3, VMI, children's color trail test, subtest di inibizione della scala NEPSY-II, test di fluenza verbale, subtest di memoria di lavoro nella WAIS) sarà eseguita in tutte le visite (V1, V2, V3 e V4).

La valutazione dell'impatto globale di malattia (stadio di malattia, LDPS, indice di Barthel, Vineland-II, CGI, PGI, CaGI-C, QOLIE) sarà eseguita alla V1, V2, V3 e V4.

RM encefalo e FDG-PET encefalo saranno eseguite alla V1 e alla V4.

OBIETTIVO 2

Alla visita V1 e V4 sarà eseguito un prelievo di sangue periferico e (opzionale) di liquor mediante rachicentesi. Il sangue sarà processato per campionare plasma, siero, DNA e cellule mononucleate (PBMCs). Il liquor sarà centrifugato per ottenere pellet e sovranatante.

Questi campioni biologici saranno utilizzati per eseguire le analisi di genomica da DNA (V1), trascrittomica da PBMC (V1 e V4), proteomica su plasma e liquor (V1 e V4) e metabolomica su siero e liquor (V1 e V4), come dettagliato nei metodi.

I soggetti sani appaiati per età e sesso ai pazienti inclusi saranno sottoposti a un esame obiettivo neurologico per verificare l'assenza di segni neurologici e ad un singolo prelievo di sangue periferico che sarà processato in modo analogo a quanto descritto per i pazienti.

Fattibilità

L'ente capofila IRCCS ISNB è centro clinico di riferimento nazionale per la ML e segue la maggior parte dei pazienti italiani, che vengono visitati a intervalli regolari e valutati clinicamente e mediante le indagini strumentali oggetto del presente studio. È presente una stretta collaborazione tra l'IRCCS ISNB e l'associazione italiana della ML (AILA), la quale riferisce periodicamente i pazienti con nuova diagnosi di ML. Inoltre, su input di AILA, l'IRCCS ISNB ha redatto il protocollo e la scheda di raccolta dati del registro nazionale della ML ospitato dall'Istituto Superiore di Sanità sulla piattaforma RegistRARE.

L'IRCCS ISNB è capofila del progetto PNRR dal titolo "Drug Discovery and Repurposing to Find a Treatment for Lafora Disease (DEFEAT-LD)" (PNRR-MR1-2022-12376430) finanziato con 1 milione di euro dal Ministero della Salute, che mira a trovare una terapia per la ML attraverso il riposizionamento e la scoperta di nuovi farmaci. Tra i centri collaboranti figurano IRCCS San Giovanni Rotondo e Università di Perugia, che contribuiranno al reclutamento di pazienti per lo studio descritto in questo protocollo.

L'attività scientifica nell'ambito della ML del dell'IRCCS ISNB è testimoniato da numerose pubblicazioni su riviste internazionali ad alto impatto[1,9,17-23] e dall'organizzazione dell'ultimo simposio

internazionale della ML a Bologna (https://chelseashope.org/annual-lafora-disease-science-symposium/).

Per quanto riguarda le attrezzature ed il personale, l'IRCCS ISNB è dotato di una unità studi clinici (*study coordinator*, *study nurses*) e camere di degenza (in regime ordinario o Day Hospital) a disposizione per i pazienti dello studio, incluse due camere per il monitoraggio V-EEG in continuo, elettroencefalografi Nikon Kohden, 1 scanner RM MAGNETOM Skyra 3T. Le PET saranno eseguite con scanner PET/CT Siemens Healthineers presso l'UOC Medicina Nucleare dell'Ospedale S.Orsola di Bologna. L'esperienza dell'IRCCS ISNB nell'assistenza di pazienti con epilessia è testimoniata dal riconoscimento ottenuto dalla LICE di Centro Medico III livello.

All'interno dell'IRCCS ISNB operano il laboratorio di neurogenetica (responsabile Prof. Carelli, https://www.ausl.bologna.it/istituto-delle-scienze-neurologiche/assistenza/laboratori/laboratorio-di-neurogenetica), che si occuperà dell'esecuzione delle analisi genomica e trascrittomica, attività che esegue già per altri progetti di ricerca in ambito epilettologico e neurologico in generale. Presso l'IRCCS è inoltre attivo il Laboratorio di Proteomica, Metabolomica e Chimica Bioanalitica (PMCB) (responsabile Prof.ssa Fiori, https://www.ausl.bologna.it/istituto-delle-scienze-neurologiche/assistenza/laboratori/laboratorio-di-proteomica-metabolomica-e-chimica-bioanalitica-pmcb), che si occuperà dell'esecuzione dell'analisi proteomica, attività eseguita routinariamente per ricerca in ambito neurologico.

L'IRCCS ISNB ha una stretta collaborazione con il laboratorio dell'Università della Florida diretto dal prof. Gentry (https://www.gentry-lab.com/research), che si occuperà dell'esecuzione dell'analisi metabolomica. Il laboratorio è l'unico al mondo con esperienza in studi di metabolomica in modelli murini e pazienti con ML (a cui ha contribuito in passato anche l'IRCCS ISNB con invio di campioni), che hanno evidenziato in maniera preliminare la presenza di un profilo metabolico caratteristico della ML con disregolazione di alcuni metaboliti *target* quali glutammina, glutammato e glucidi, dimostrando peraltro nel modello murino una normalizzazione del profilo metabolico dopo l'iniezione di terapie sperimentali *disease-modifying* quali VAL-0417 e VAL-1221[14,15] (comunicazioni personali e a congressi del prof. Gentry).

I laboratori coinvolti sono già in possesso dell'attrezzatura e dei softwares necessari ad eseguire le analisi multiomiche previste (descritti in dettaglio nei metodi) e di personale dedicato (genetisti, biologi molecolari, chimici analitici, bioinformatici, tecnici di laboratorio).

Alla luce di quanto sopra riportato non si ravvisano rischi rilevanti di non realizzazione degli obiettivi.

Milestones e monitoraggio

L'IRCCS ISNB è dotato di un servizio interno di monitoraggio degli studi clinici. Il monitoraggio dello stato di avanzamento dello studio sarà effettuato sulla base del raggiungimento delle seguenti *milestones*:

Milestones 12 mesi: reclutamento dei pazienti, analisi descrittiva delle *milestones* di malattia, esiti di epilessia, motori, cognitivi ed impatto globale di malattia V1 e V2, analisi genomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica V1.

Milestones 24 mesi: analisi descrittiva delle *milestones* di malattia, esiti di epilessia, motori, cognitivi ed impatto globale di malattia V3 e V4, analisi trascrittomica, proteomica e metabolomica V4, completamento analisi statistiche obiettivo 1 e 2 e report finale dello studio.

METODI

Obiettivo 1: Caratterizzazione del decorso di malattia

Le procedure relative all'obiettivo 1 saranno eseguite presso l'IRCCS ISNB, secondo le modalità di seguito dettagliate. Si cercherà per quanto possibile di far sì che lo stesso esaminatore valuti lo stesso paziente nel corso dello studio.

Milestones di malattia: raccolta mediante analisi retrospettiva all'inclusione e prospetticamente nei 18 mesi di osservazione dell'età del paziente all'esordio della malattia, dell'epilessia, dei deficit cognitivi, del mioclono, dell'atassia, al confinamento alla carrozzina/allettamento, al posizionamento della PEG e all'exitus (qualora la specifica *milestone* si sia verificata).

Valutazione frequenza crisi tonico-cloniche (V1, V2, V3, V4): la frequenza delle crisi tonico-cloniche (sia generalizzate che focali a evoluzioni tonico-cloniche bilaterale e di origine sconosciuta) sarà raccolta per i 6 mesi precedenti alla valutazione basale e per ogni semestre successivo attraverso la revisione del diario delle crisi e/o informazioni contenute nella documentazione clinica.

Video-EEG (V1, V2, V3, V4): eseguito con sistema 10:20 e della durata di almeno 60 minuti. Sarà quantificata la prevalenza di anomalie epilettiformi (*spike and wave index*-SWI) e valutata la frequenza dominante del ritmo di fondo.

Valutazione funzioni cognitive (V1, V2, V3, V4): sarà eseguita una batteria di test neuropsicologici *ad hoc* elaborata da una neuropsicologa con specifica expertise nella ML (dr.ssa Mazzone), per una durata di circa due ore a valutazione. La batteria include i seguenti test: MoCA (screening), Leiter-3 (test di intelligenza non verbale), VMI (valutazione sviluppo visuo-motorio), Children's Color Trail

Test (funzioni attentivo-esecutive), subtest di inibizione NEPSY-II (funzioni esecutive), test di fluenza verbale semantica e fonemica, subtest di memoria di lavoro WAIS-IV.

Valutazione funzioni motorie (V1, V2, V3, V4): batteria di test motori della durata di circa un'ora da eseguire con contestuale ripresa video. Include i seguenti test: 4-stage balance test (equilibrio statico), timed-up and go test (mobilità e agilità), six-minute walking test (capacità funzionale di deambulazione), ten-meter walk test (velocità di cammino), nine-hole peg test (destrezza manuale), UMRS (scala quantitativa per la valutazione del mioclono a riposo, d'azione e funzionale), SARA (valutazione semiquantitativa dell'atassia cerebellare).

Valutazione impatto globale di malattia (V1, V2, V3, V4): includerà le seguenti scale: stadio di progressione ML (1, precoce; 2, intermedio; 3, avanzato; 4, terminale), Lafora disease clinical performance scale o LDPS (scala sviluppata *ad hoc* per la ML con sei domini, ciascuno con punteggio da 0 a 3 nei domini crisi tonico-cloniche, mioclono, deambulazione, funzioni cognitive, linguaggio: score totale da 0 a 18, punteggi più bassi indicano maggiore severità), indice di Barthel (autonomie nella attività della vita quotidiana), Vineland-II (autonomie nelle attività della vita quotidiana con focus sull'adattamento sociale), Clinical, Patient and Caregiver Global Impression of Change (impressione globale di cambiamento di neurologo, paziente e caregiver), QOLIE (qualità di vita in persone con epilessia).

RM encefalo (V1, V4): eseguita con scanner 3T per analizzare segni di atrofia cerebrale ed eventuali altre anomalie, valutata qualitativamente e quantitativamente (morfometria *voxel-based* usando il software SPM).

FDG-PET encefalo (V1, V4): valutazioni qualitative e quantitative usando il software SPM.[9]

Obiettivo 2.1: Analisi genomica

L'analisi verrà effettuata su DNA genomico estratto da sangue periferico per identificare varianti genetiche e regioni regolatorie in pazienti con malattia di Lafora. Questa procedura sarà effettuata una unica volta al basale presso il Laboratorio di Neurogenetica dell'IRCCS ISNB.

Le librerie saranno preparate con xGen DNA Library Prep Kit EZ e verranno sequenziate con piattaforma Novaseq 6000 (Illumina). Le reads saranno allineate al genoma di riferimento Grch38. Le varianti strutturali verranno chiamate utilizzando GATK-SV e le varianti singolo nucleotide utilizzando GATK e annotate successivamente con Ensemble-VEP.

Questa analisi consentirà di identificare varianti strutturali o varianti in regioni non codificanti, ma in geni di potenziale interesse patofisiologico, che potrebbero essere considerate potenziali modulatori del fenotipo clinico.

Obiettivo 2.2: Analisi trascrittomica

L'analisi verrà effettuata su PBMC derivanti dai pazienti e dai controlli e includerà sia il sequenziamento *bulk* (RNA totale del campione di PBMC) che *single-cell* (RNA di ogni singola cellula isolata e separata dal campione di PBMC) per analizzare l'espressione genica di pazienti con ML. Questa procedura sarà effettuata al basale e ripetuta dopo 18 mesi presso il Laboratorio di Neurogenetica dell'IRCCS ISNB.

Al fine di analizzare il profilo trascrittomico totale per ogni paziente verrà utilizzato un kit ad hoc per l'estrazione dell'RNA totale che include anche i piccoli RNA non tradotti ma funzionali come i micro RNA, nello specifico miRNeasy Kit(Qiagen)

Le librerie per il sequenziamento bulk saranno preparate con Illumina Stranded mRNA prep e sequenziati su Novaseq 6000 (Illumina). Le reads saranno allineate al genoma di riferimento GRCh38 utilizzando STAR e contate con Salmon. Questi dati saranno analizzati applicando specifici pacchetti R (DESeq2), generando un profilo trascrizionale. Le librerie per il sequenziamento single-cell saranno preparate con Chromium GEM-X Single Cell 3' Kit v4 (10x Genomics) e sequenziate su Novaseq6000 (Illumina). L'analisi bioinformatica sarà effettuata utilizzando il software Loupe.

Obiettivo 2.3: Analisi proteomica *bottom-up*

L'analisi verrà effettuata su plasma e su liquor di pazienti e plasma di controlli sani appaiati per età e sesso per la caratterizzazione del profilo proteomico in pazienti con ML. Questa procedura sarà effettuata al basale e ripetuta dopo 18 mesi presso il Laboratorio di Proteomica, Metabolomica e Chimica Bioanalitica dell'IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna.

Utilizzando l'approccio *bottom-up*, si otterrà il profilo proteico dei campioni tramite spettrometria di massa ad alta risoluzione accoppiata a micro cromatografia liquida (microLC-HRMS). I campioni di fluidi biologici verranno processati utilizzando procedure standard di estrazione, clean-up, digestione delle proteine e purificazione dei peptidi.

Le proteine contenute nei campioni di plasma e liquor verranno precipitate con l'aggiunta di 4 volumi di 20 mM di NaCl/acetone (20/80 v/v). Il pellet essiccato sarà risospeso in condizioni denaturanti e riducenti per 45 minuti a 56°C sotto agitazione, le proteine verranno poi alchilate. Dopo incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio, i campioni, diluiti con bicarbonato di ammonio acquoso, subiranno digestione enzimatica proteolitica con tripsina.

Dopo digestione, i peptidi saranno purificati su piastre SPE (Oasis HLB µElution SPE). L'eluato sarà essiccato, risospeso in acido formico allo 0,1% e filtrato prima dell'iniezione.

L'analisi microLC-HRMS verrà eseguita su un sistema Eksigent M5 MicroLC (Sciex, Concord, Ontario, Canada) accoppiato a spettrometro di massa TripleTOF 6600+ con OptiFlow Turbo V Ion Source (Sciex, Concord, Ontario, Canada). 5 µl di ciascun campione saranno iniettati e i componenti separati su colonna Kinetex XB C18 50 × 0,5 mm I.D., 2,6 µm 100 Å. Durante l'analisi la temperatura della colonna sarà di 35°C. La separazione cromatografica sarà ottenuta in 60 minuti con flusso costante di 20 µL/min ed eluizione in gradiente.

L'analisi dei campioni sarà eseguita in modalità di acquisizione dipendente (IDA - information dependent acquisition) e indipendente (SWATH - Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra). La miscela di PepCal Mix (Sciex, Concord, Ontario, Canada) verrà utilizzata per garantire calibrazioni MS e MS/MS costanti durante l'intero periodo di analisi. Per l'elaborazione dei dati grezzi e per l'identificazione delle proteine saranno utilizzati il software PeakView e ProteinPilot (Sciex, Concord, Ontario, Canada) con il database UniProt Human Proteome, rispettivamente.

I dati di proteomica ottenuti dall'analisi in spettrometria di massa in IDA saranno elaborati con il software ProteinPilot (Sciex, Concord, Ontario, Canada) per l'identificazione delle proteine in ciascun campione. L'identificazione avverrà per confronto dei dati sperimentali con il database UniProt Human Proteome, utilizzando l'algoritmo Paragon. I dati SWATH verranno elaborati con SWATH Acquisition MicroApp nel software PeakView (Sciex, Concord, Ontario, Canada) per l'allineamento dei tempi di ritenzione tra i vari campioni.

Obiettivo 2.4: Analisi metabolomica *target*

L'analisi verrà effettuata su siero, PBMC e liquor di pazienti e siero e PBMC di controlli per studiare il profilo metabolico in pazienti con malattia di Lafora. Questa procedura sarà eseguita al basale (V1) e ripetuta dopo 18 mesi (V3) presso il Laboratorio del Prof. Matthew Gentry dell'Università della Florida negli Stati Uniti, con una specifica expertise nello studio del metaboloma di modelli murini e pazienti con ML.

Il metodo è riportato dettagliatamente nelle referenze [24-26]. In breve, in seguito a trattamento con metanolo freddo e L-norvalina e centrifugazione, il sopranatante contenente metaboliti polari verrà concentrato con SpeedVac, mentre il pellet contenente proteine verrà lavato con metanolo, idrolizzato con 3N HCl e concentrato con SpeedVac. Dopo trattamento con metossiamina, N-metil-trimetilsiliazione ed incubazioni a temperature controllate i campioni saranno analizzati mediante gas cromatografia-spettrometria di massa (Agilent 5977A GC/MSD). Verrà usata la modalità full scan (m/z: 50-800) per l'analisi di metaboliti *target*, tra cui prodotti della glicolisi e del ciclo di Krebs, così come aminoacidi, nucleotidi, mono-, di- e trisaccaridi. I risultati saranno analizzati con MetaboAnalyst 4.0.

Analisi statistiche

OBIETTIVO 1: Per l'analisi del decorso di malattia saranno utilizzate statistiche descrittive. In particolare, i dati basali saranno riassunti utilizzando le statistiche n, mediana, media, std, min, max, per tutte le variabili continue e come n, percentuale (%) per ogni variabile categorica. Questi riepiloghi descrittivi saranno generati anche per ciascuna visita per tutti gli esiti. Per l'analisi degli esiti continui saranno generate statistiche di sintesi (n, media, std, min, max 95% intervallo di confidenza [IC]) della variazione dal basale a 18 mesi. Gli esiti categorici saranno riassunti utilizzando la proporzione e l'IC al 95%. Statistiche di sintesi simili per la variazione dal basale a 18 mesi saranno generate come appropriato per tutti gli esiti, così come statistiche di sintesi corrispondenti per la variazione dal basale a ciascuna visita per tutte le variabili.

OBIETTIVO 2:

Per le analisi statistiche dei dati derivanti dalle varie "omiche" saranno utilizzati i seguenti tools bioinformatico-statistici:

- Trascrittomica: software Loupe (https://www.10xgenomics.com/support/software/loupe-browser/latest)
- Proteomica: software MarkerView (Sciex, Concord, Ontario, Canada)
- Metabolomica: pacchetto ClustVis per R (https://github.com/taunometsalu/ClustVis)

Mediante i sopracitati softwares saranno effettuate la normalizzazione dei dati e l'analisi multivariata "*principal component analysis*" (PCA) e heatmap per identificare clusters di espressione genica (trascrittomica), peptidi/proteine (proteomica), e metaboliti target (metabolomica).
Saranno in seguito eseguiti t-test per eseguire confronti tra due gruppi con lo scopo di identificare differenze statisticamente discriminanti nei pattern di espressione genica, peptidi/proteine e metaboliti target tra : (I) pazienti al V1 (basale) vs controlli; (II) gruppi di pazienti al V1 (basale) stratificati in stadio di progressione precoce/intermedio (1-2) vs avanzato/terminale (3-4); (III) analisi eseguite alla visita V1 (basale) vs analisi eseguite alla visita V4 (18 mesi). Sulla base dei risultati ottenuti si valuterà la possibilità di eseguire sub-analisi confrontando esiti specifici di malattia.

RISULTATI ATTESI E RILEVANZA CLINICA

Storia naturale di malattia e marcatori clinico-strumentali

Lo studio di coorte retrospettivo e prospettico dei pazienti con ML permetterà di caratterizzare la storia naturale della ML definendone le *milestones*. L'utilizzo di numerosi test ed esiti utilizzati per studiare l'epilessia, le funzioni motorie, cognitive e l'impatto globale di malattia, oltre che le indagini di neuroimaging, permetteranno di comprendere quali sono gli accertamenti più sensibili nel valutare

la progressione di malattia dagli stadi iniziali a quelli più avanzati. Conoscere la storia naturale della ML è fondamentale nell'ottica di progettare un trial clinico, una possibilità che ci auguriamo sia prossima visto l'alto numero di sperimentazioni precliniche di successo in atto. Organizzare trials clinici per malattie ultrarare e fatali come la ML è infatti un'impresa ardua per diversi motivi, tra cui la difficoltà di includere un numero sufficiente di pazienti per effettuare una sperimentazione controllata con placebo, che sarebbe inoltre gravata dalla non eticità di privare alcuni soggetti della possibilità di assumere una terapia potenzialmente in grado di modificare il decorso di malattia. I dati di storia naturale di malattia, se raccolti in modo rigoroso come ci prefiggiamo di fare, potrebbero essere utilizzati come braccio sintetico di controllo in una sperimentazione clinica, con una notevole rilevanza clinica per i pazienti con ML.

Biomarcatori derivati da analisi multiomica

L'approccio multiomico sta venendo sempre più utilizzato nell'ambito di diverse condizioni cliniche per identificare biomarcatori di malattia. Per quanto riguarda la ML, tuttavia, allo stato attuale le scienze "omiche" sono state utilizzate in modo solo preliminare e prevalentemente sul modello murino. Sfruttando la collaborazione di diversi laboratori con grande *expertise* nello studio delle varie "omiche" in associazione ad una accurata caratterizzazione clinica di pazienti con ML, ci aspettiamo di validare su paziente i dati preliminari a disposizione (es. aumentata espressione di geni proinfiammatori, profilo metabolico caratteristico) ed in generale di identificare biomarcatori che possano essere utili per migliorare la comprensione della ML, fornire informazioni obiettive sullo stato di malattia e sulla sua evoluzione, e potenzialmente anche per valutare in un futuro l'efficacia di terapie sperimentali e contribuire ad identificare sottogruppi di pazienti con caratteristiche specifiche che possono rispondere meglio a determinati trattamenti o che presentano un rischio maggiore di complicanze (personalizzazione della cura). Queste informazioni potrebbero quindi essere fondamentali, in maniera complementare ai dati sulla storia naturale, nell'organizzazione di trial clinici nella ML.

BIBLIOGRAFIA

1. Pondrelli F, Muccioli L, Licchetta L, et al. Natural history of Lafora disease: a prognostic systematic review and individual participant data meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis*. 2021;16(1):362. Published 2021 Aug 16. doi:10.1186/s13023-021-01989-w
2. Sullivan MA, Nitschke S, Steup M, Minassian BA, Nitschke F. Pathogenesis of Lafora Disease: Transition of Soluble Glycogen to Insoluble Polyglucosan. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1743. Published 2017 Aug 11. doi:10.3390/ijms18081743
3. Nitschke F, Ahonen SJ, Nitschke S, Mitra S, Minassian BA. Lafora disease - from pathogenesis to treatment strategies. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(10):606-617. doi:10.1038/s41582-018-0057-0
4. Ganesh S, Delgado-Escueta AV, Sakamoto T, et al. Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. Hum Mol Genet. 2002;11(11):1251-1262. doi:10.1093/hmg/11.11.1251
5. DePaoli-Roach AA, Tagliabracci VS, Segvich DM, Meyer CM, Irimia JM, Roach PJ. Genetic depletion of the malin E3 ubiquitin ligase in mice leads to lafora bodies and the accumulation of insoluble laforin. J Biol Chem. 2010;285(33):25372-25381. doi:10.1074/jbc.M110.148668
6. Turnbull J, Tiberia E, Striano P, et al. Lafora disease. Epileptic Disord. 2016;18(S2):38-62. doi:10.1684/epd.2016.0842
7. Pichiecchio A, Veggiotti P, Cardinali S, Longaretti F, Poloni GU, Uggetti C. Lafora disease: spectroscopy study correlated with neuropsychological findings. Eur J Paediatr Neurol. 2008;12(4):342-347. doi:10.1016/j.ejpn.2007.09.008
8. Riney K, Bogacz A, Somerville E, et al. International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset at a variable age: position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. Epilepsia. 2022;63(6):1443-1474. doi:10.1111/epi.17240
9. Muccioli L, Farolfi A, Pondrelli F, et al. FDG-PET assessment and metabolic patterns in Lafora disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2020;47(6):1576-1584. doi:10.1007/s00259-019-04647-3
10. Jain KK. Role of Biomarkers in Health Care. *The Handbook of Biomarkers*. 2010;115-188. Published 2010 Jan 20. doi:10.1007/978-1-60761-685-6_5
11. Simon R. Genomic biomarkers in predictive medicine: an interim analysis. *EMBO Mol Med*. 2011;3(8):429-435. doi:10.1002/emmm.201100153
12. Lahuerta M, Gonzalez D, Aguado C, et al. Reactive Glia-Derived Neuroinflammation: a Novel Hallmark in Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy That Progresses with Age. *Mol Neurobiol*. 2020;57(3):1607-1621. doi:10.1007/s12035-019-01842-z
13. Alharbi RA. Proteomics approach and techniques in identification of reliable biomarkers for diseases. *Saudi J Biol Sci*. 2020;27(3):968-974. doi:10.1016/j.sjbs.2020.01.020
14. Brewer MK, Uittenbogaard A, Austin GL, et al. Targeting Pathogenic Lafora Bodies in Lafora Disease Using an Antibody-Enzyme Fusion. *Cell Metab*. 2019;30(4):689-705.e6. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.002
15. Gentry MS, Guinovart JJ, Minassian BA, Roach PJ, Serratosa JM. Lafora disease offers a unique window into neuronal glycogen metabolism. *J Biol Chem*. 2018;293(19):7117-7125. doi:10.1074/jbc.R117.803064
16. Franceschetti S, Gambardella A, Canafoglia L, et al. Clinical and genetic findings in 26 Italian patients with Lafora disease. *Epilepsia*. 2006;47(3):640-643. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00479.x
17. Pondrelli F, Minardi R, Muccioli L, et al. Prognostic value of pathogenic variants in Lafora Disease: systematic review and meta-analysis of patient-level data. *Orphanet J Rare Dis*. 2023;18(1):263. Published 2023 Sep 2. doi:10.1186/s13023-023-02880-6
18. d'Orsi G, Farolfi A, Muccioli L, et al. Association of CSF and PET markers of neurodegeneration with electroclinical progression in Lafora disease. *Front Neurol*. 2023;14:1202971. Published 2023 Jun 28. doi:10.3389/fneur.2023.1202971

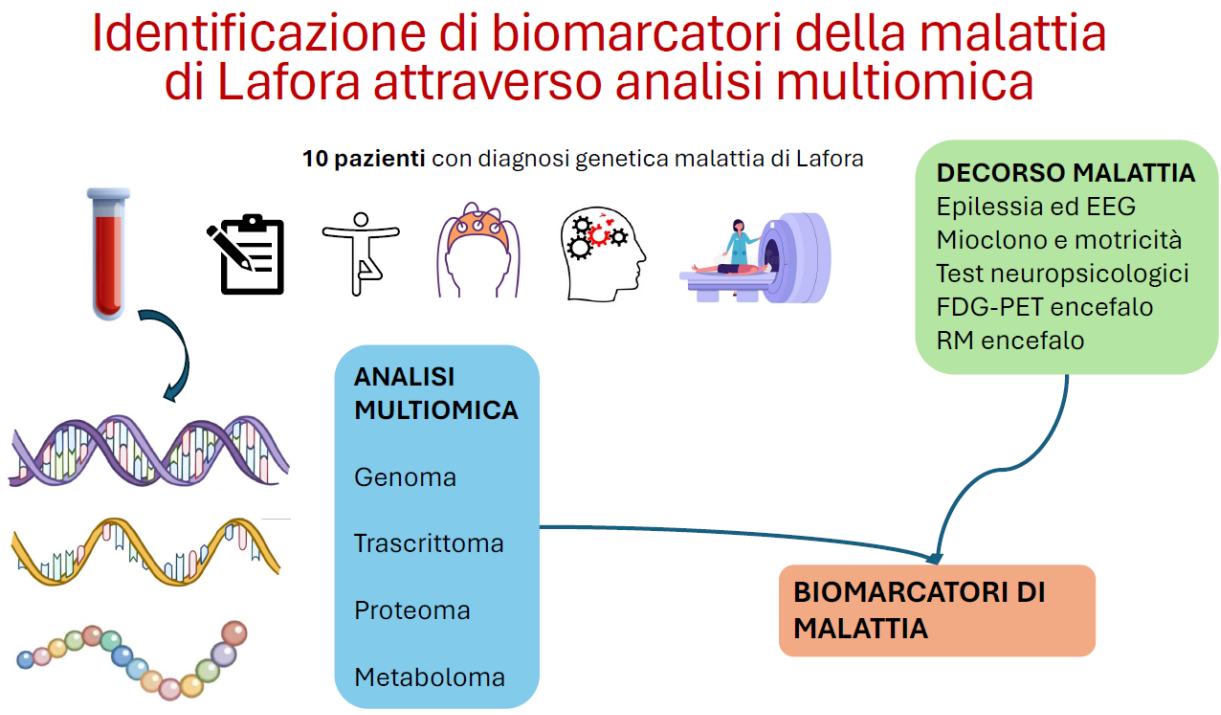
19. Riva A, Orsini A, Scala M, et al. Italian cohort of Lafora disease: Clinical features, disease evolution, and genotype-phenotype correlations. *J Neurol Sci*. 2021;424:117409. doi:10.1016/j.jns.2021.117409
20. Mostacci B, Bisulli F, Muccioli L, et al. Super refractory status epilepticus in Lafora disease interrupted by vagus nerve stimulation: A case report. *Brain Stimul*. 2019;12(6):1605-1607. doi:10.1016/j.brs.2019.08.008
21. Bisulli F, Muccioli L, d'Orsi G, et al. Treatment with metformin in twelve patients with Lafora disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):149. Published 2019 Jun 21. doi:10.1186/s13023-019-1132-3
22. Gómez-Abad C, Gómez-Garre P, Gutiérrez-Delicado E, et al. Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study. *Neurology*. 2005;64(6):982-986. doi:10.1212/01.WNL.0000154519.10805.F7
23. Ferlazzo E, Canafoglia L, Michelucci R, et al. Mild Lafora disease: clinical, neurophysiologic, and genetic findings. *Epilepsia*. 2014;55(12):e129-e133. doi:10.1111/epi.12806
24. Fiehn O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Curr Protoc Mol Biol*. 2016;114:30.4.1-30.4.32. Published 2016 Apr 1. doi:10.1002/0471142727.mb3004s114
25. Sun RC, Dukhande VV, Zhou Z, et al. Nuclear Glycogenolysis Modulates Histone Acetylation in Human Non-Small Cell Lung Cancers. Cell Metab. 2019;30(5):903-916.e7. doi:10.1016/j.cmet.2019.08.014
26. Young LEA, Brizzee CO, Macedo JKA, et al. Accurate and sensitive quantitation of glucose and glucose phosphates derived from storage carbohydrates by mass spectrometry. *Carbohydr Polym*. 2020;230:115651. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115651

PIANO TEMPORALE (GANTT)

Mese	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Visita					V1						V2						V3						V4	
Reclutamento pazienti																								
Osservazione																								
Valutazione epilessia, motoria, cognitiva, globale																								
RM encefalo e FDG-PET																								
Analisi genomica																								
Analisi trascrittomica, proteomica, metabolomica																								
Analisi dati																								
Rendicontazione																								

*le tempistiche sono riferite all'ultimo paziente incluso ipotizzando un reclutamento della durata di 4 mesi.

SCHEMA GRAFICO DEL PROGETTO



PIANO ECONOMICO

	Costo totale del progetto	Quota richiesta a fondazione LICE	Quota cofinanziata	Ente cofinanziatore
Personale di ricerca	60.000 E	35.000 E	25.000 E	IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna
Attrezzature	0 E	0 E	0 E	/
Materiali di consumo	50.000 E	2500 E	47.500 E	IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna
Servizi informatici		0		/
Partecipazione a congressi e costi di pubblicazione (max 10%)	3500 E	1500 E	2000 E	IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna
Overheads (max 10%)	5000 E	1000 E	4000 E	IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna

I costi riferiti al personale di ricerca riguardano l'assunzione di un neurologo presso IRCCS ISNB che possa coordinare il progetto il di ricerca in tutte le sue parti, coadiuvando i vari laboratori coinvolti e lavorando attivamente nella caratterizzazione clinica-strumentale dei pazienti con ML.
I materiali di consumo riguardano quelli per eseguire gli esperimenti di genomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica come indicato nei metodi.