



BANDO FONDAZIONE LICE 2022 PROGETTO di RICERCA
Responsabile del Progetto: Ricci Emilia
Data di nascita: 08.06.1985
Affiliazione: Centro Regionale Epilessia, ASST Santi Paolo Carlo, Milano Dipartimento di Scienze della Salute-DISS, Università degli Studi di Milano
Ente ospitante il Responsabile del Progetto: Ospedale San Paolo, via Antonio di Rudinì 8, 20142, Milano
Centri partecipanti 1-Centro Regionale Epilessia, ASST Santi Paolo Carlo, DISS Università degli Studi di Milano 2-UOC Neuropsichiatria dell'Età Pediatrica, IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, Università di Bologna 3-UOC Genetica Medica, IRCSS G.Gaslini, DiNOGMI (Dipartimento Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno Infantili) Università di Genova 4-UO Genetica Medica, Arcispedale Santa Maria Nuova di Reggio Emilia, Università di Modena e Reggio Emilia
Titolo del progetto: Analisi del profilo di espressione genica, della caratterizzazione morfologica e del controllo del differenziamento degli interneuroni GABAergici nelle mutazioni del gene ZEB2. Un possibile valido modello per lo studio delle epilessie con coinvolgimento primario dei network cortico-sottocorticali.
Sinossi Il gene <i>ZEB2</i> (Zinc finger E-box binding homeobox2) produce l'omonimo fattore di trascrizione, fondamentale per il corretto neurosviluppo pre/postnatale. <i>ZEB2</i> è stato descritto in associazione alla sindrome di Mowat-Wilson (MWS-OMIM #235730) causata, nella quasi totalità dei casi, da aploinsufficienza (varianti nonsenso, frameshift, delezioni di un allele) e caratterizzata da possibili malformazioni multiorgano, dismorfismi, disabilità intellettiva ed epilessia. Recentemente la letteratura ha inoltre presentato pazienti con varianti missenso di <i>ZEB2</i> che presentano epilessia in assenza dei restanti segni/sintomi costitutivi della MWS. L'interesse del mondo epilettologico verso <i>ZEB2</i> è progressivamente aumentato, fino ad inserirlo nei pannelli NGS (Next Generation Sequencing) per epilessia. Nel 2021 abbiamo descritto il profilo elettroclinico di 40 pazienti con MWS; l'epilessia è presente nella totalità dei casi >5 anni con caratteristiche sovrapponibili all'interno del campione, ad andamento età dipendente: crisi febbrili-crisi focali ipniche con semeiologia analoga-assenze atipiche-stato elettrico durante il sonno-remissione dall'adolescenza. Questo suggerisce che l'epilessia nella MWS possa essere considerata monogenica, con caratteristiche definite a fronte della stessa categoria di variante. Tra i meccanismi patogenetici indagati sui modelli murini con varianti di <i>Zeb2</i> in omozigosi, il ruolo di regolatore della differenziazione e migrazione neuronale è centrale. E' stato infatti dimostrato come la differenziazione degli interneuroni GABAergici nelle sottopopolazioni striatale e corticale sia alterata se <i>ZEB2</i> è mutato risultando nell'esubero degli interneuroni striatali e nella carenza (-90%) degli interneuroni corticali con particolare riferimento agli interneuroni Somatostatina+ e Parvalbumina+. Inoltre sono state osservate una crescita assonale ed una arborizzazione deficitarie. Quanto descritto appare correlabile al modificato profilo di espressione genica delle cellule neuronali <i>Zeb2</i> mutate, anch'esso finora indagato su modelli murini con riscontro di downregolazione dei geni <i>Cxcr4</i>, <i>Gria1</i>, <i>Ets1</i>, <i>Cxcr7</i>, <i>cMaf+</i>, <i>Grik1</i>, <i>Cntnap4</i>, <i>Grip1</i>, <i>Chl1</i>, <i>Cacng2</i>, <i>Csdc2</i>, <i>Cux2</i>, <i>Ntf3</i>, <i>Fgf9</i> e <i>Scn1a</i> e upregolazione di <i>Nkx2-1</i> (codificante per ulteriore fattore di trascrizione fondamentale per la differenziazione degli interneuroni GABAergici corticali), <i>Npy</i>, <i>Smad7</i> e <i>TacR1</i>. Modelli cellulari umani <i>ZEB2</i> mutati risulterebbero profondamente utili per studiare il meccanismo epilessia nei casi di alterazione di questo fondamentale fattore di trascrizione (si noti come <i>SCN1A</i> si trovi a valle del pathway di <i>ZEB2</i>). Ce ne si potrebbe inoltre avvalere per approfondire i meccanismi epilessia coinvolgenti primariamente i circuiti GABAergici cortico-sottocorticali, in cui il disequilibrio tra l'eccessiva risposta inibitoria striatale e l'ipereccitabilità corticale è infatti oggetto di studio, implicati sia nelle più comuni forme di epilessia autolimitantesi dell'infanzia sia in note encefalopatie dello sviluppo/epilettiche. L'obiettivo è quello di valutare il profilo di espressione genica e la caratterizzazione morfologica degli interneuroni GABAergici per la prima volta sull'uomo, tramite cellule pluripotenti staminali riprogrammate (iPSC) ottenute da fibroblasti/linee linfocitarie con varianti di <i>ZEB2</i> già disponibili in Biobanca. Le cellule iPSC verranno generate da fibroblasti di pazienti con mutazione del gene <i>ZEB2</i> utilizzando il CytoTuneTM-IPS 2.0 Reprogramming Kit, poi differenziate in neuroni utilizzando protocolli stabiliti. La maturazione neuronale verrà quindi valutata, rispetto a linee controllo, attraverso esperimenti di qRT-PCR e western blot volti alla valutazione del profilo di espressione di specifici marcatori neuronali (TUJ1, MAP2, SMI-312, VGLUT, VGAT, GAD65, Synapsins, Homer, PSD95). Un'approfondita analisi della morfologia neuronale verrà eseguita a diversi intervalli temporali attraverso esperimenti di immunofluorescenza combinata con microscopia confocale. Per esempio, valuteremo la specificazione assonale, la generazione del segmento assonale iniziale, la lunghezza assonale totale, l'arborizzazione dendritica e la formazione di sinapsi. Infine, verrà analizzato il trascrittoma globale mediante RNAseq e successiva analisi bioinformatica. I principali geni upregolati/downregolati nei neuroni mutati verranno validati mediante qRT-PCR, Western Blot e immunofluorescenza. Con il presente studio ci attendiamo di confermare le alterazioni del profilo molecolare e della morfologia degli interneuroni GABAergici su cellule umane approfondendo i meccanismi patogenetici alla base delle manifestazioni epilettiche coinvolgenti primariamente i circuiti cortico- sottocorticali. Parole chiave <i>ZEB2</i>, Induced Pluripotent Stem Cells, Circuito GABAergico corticostriatale, Epilessia

Razionale

Il gene *ZEB2* (Zinc finger E-box binding homeobox2) codifica per l'omonima proteina (conosciuta anche come SIP1 o ZFHx1B) appartenente ad una famiglia di fattori di trascrizione molto ristretta, il cui altro unico componente è *ZEB1*. La struttura che li accomuna è un omeodominio che separa, alle estremità, due cluster di domini zinc-fingers (N e C terminale), in grado di legare il DNA con elevata affinità (Nells et al., 2003; Verschuere et al., 1999; Higashi et al. 2002). La proteina è di 140 kDA, lunghezza di 1215 aminoacidi nel topo e 1214 nell'uomo, agisce principalmente come repressore della trascrizione ma può comportarsi anche da attivatore, in relazione alla presenza di specifici cofattori. (Conidi et al., 2011; Weng et al., 2012, Chng et al., 2010). *ZEB2* è espresso in diversi tessuti ed il suo ruolo è fondamentale per un corretto sviluppo del sistema nervoso (centrale e periferico) sia in fase embrionale che durante la neurogenesi post-natale. (Epifanova et al., 2018)

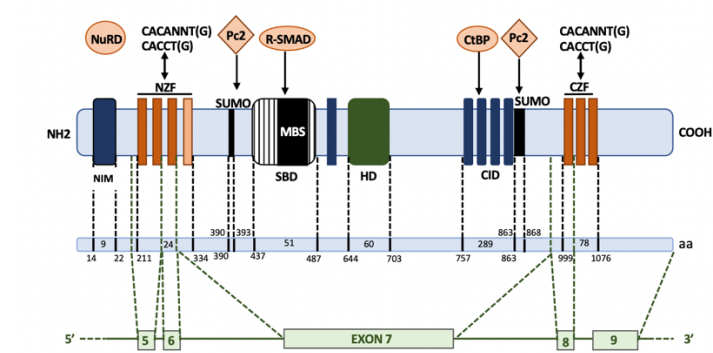


Figura 1. Struttura del gene *ZEB2* (Zinc finger E-box binding homeobox2). Tra le regioni più importanti: -Nurd (estremo N-terminale) e CtBP (estremo C terminale): due corepressori adiuvanti la funzione di *ZEB2* (Postigo and Dean 1999; van Grunsven et al., 2007; van Grunsven et al., 2006) -SUMO 390-393 e SUMO 865-868: due siti di sumoilazione post-traduzionali per *ZEB2* (Long et al., 2005) -SBD (SMAD BINDING DOMAIN): sito di legame con le proteine SMADS (Classe R e I; Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 4, Smad 5, Smad 7). Questa classe di proteine ha un ruolo chiave nella modulazione del segnale TGF-beta mediato (Verschuere et al., 1999; Kretschmar and Massague, 1998). Esse sono attivate dal legame con i complessi ligando-recettore TGF-beta e BMP in una complessa interazione di attivazione/inattivazione reciproca. (Attisano and Wrana, 2000; Massague, 2012). Modificata da Epifanova et al., 2018

In particolare, nel 2013 due diversi gruppi di studio confermavano il ruolo del fattore di trascrizione *ZEB2* nel regolare, in modo selettivo, la differenziazione e migrazione degli interneuroni GABA-ergici primariamente tramite downregolazione di un secondo fattore di trascrizione, *Nkx2-1*. (Van den Berghe et al., 2013; Tommassy et al., 2013) *ZEB2* modula infatti l'entità dell'espressione di *Nkx2-1* che fisiologicamente deve ridursi nelle fasi avanzate della vita embrionale per permettere la repulsione e successiva migrazione degli interneuroni GABAergici Parvalbumina+ (Pv+) e Somatostatina+ (Sst+), ad origine dalla eminenza gangliare mediale, dalle regioni striatali alla corteccia.

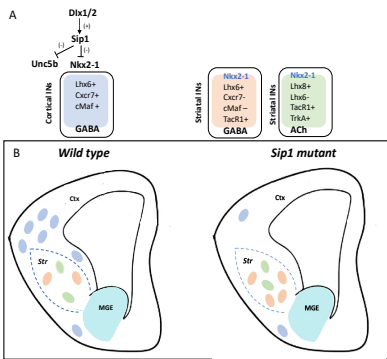


Figura 2. Alterazioni della migrazione e differenziazione degli interneuroni GABAergici a livello corticale nel modello murino mutato per *ZEB2* (proteina indicata come SIP1). Modificata da Tommassy et al., 2013

In questo contesto è stato inoltre mostrato, prelevando gli interneuroni rimasti “bloccati” a livello sottocorticale nel modello murino *Zeb2* mutato, come siano downregolati numerosi geni prevalentemente espressi a livello degli interneuroni GABAergici corticali (*Cxcr4*, *Gria1*, *Ets1*, *Cxcr7*, *Grik1*, *Cntnap4*, *Grip1*, *Chl1*, *Cacng2*, *Csdc2*, *Scn1a*, *Cux2*, *cMaf*) mentre ne siano iperespressi alcuni fisiologicamente presenti in quelli striatali (*Nkx2-1*, *TacR1+* e *Nyp*). L'esatta combinazione di geni iperespressi ed ipoesspressi non è ancora stata chiarita in modo univoco, ma è stato dimostrato che, in assenza di *Zeb2*, gli interneuroni GABAergici mantengano preferenzialmente caratteristiche molecolari rappresentative delle sottopopolazioni striatali a scapito di quelle corticali. (Tommassy et al., 2013) In merito a ciò, resta da valutare quanto il posizionamento ectopico degli interneuroni ne modifichi di per sé il profilo molecolare tramite un meccanismo di epigenetica.

Per quanto riguarda invece la morfologia cellulare, è stato finora evidenziato come *ZEB2* controlli lo sviluppo, la crescita e l'arborizzazione delle proiezioni cellulari a livello dei neuroni piramidali della neocorteccia. Questa regolazione sarebbe mediata da Ninein, una proteina microtubulo-associata. La lunghezza media degli assoni dei neuroni corticali nel topo *Zeb2* knockout è significativamente ridotta rispetto a quella del wild-type. (Srivatsa et al., 2015) La letteratura ha posto interesse negli ultimi anni alle variazioni morfologiche dei neuroni in caso di patologie monogeniche e non. Una delle constatazioni più interessanti in quest'ambito probabilmente riguarda la scarsa arborizzazione dendritica degli interneuroni GABAergici con varianti in *Scn1a*, tra l'altro di particolare interesse per il nostro studio in considerazione del legame tra *ZEB2* e *SCN1A*, apparentemente downregolato dallo stesso come già mostrato. (Goikolea-Vives A. and Stolp H.B., 2021; Tiraboschi E. et al., 2020)

E' importante ribadire come questi studi siano stati finora condotti quasi esclusivamente sul modello murino e sottolineare come in esso la mutazione debba essere provocata in omozigosi per ottenere fenotipi clinicamente significativi al contrario di quanto osservato nell'uomo. Questo potrebbe costituire un limite aggiunto rispetto alla validità del modello.

Il più noto quadro clinico associato a varianti germinali di ZEB2 è la sindrome di Mowat-Wilson (MWS-OMIM #235730) causata, nella quasi totalità dei casi, da aploinsufficienza (varianti nonsense, frameshift, delezioni di un allele) e caratterizzata da possibili malformazioni multiorgano, dismorfismi, disabilità intellettiva ed epilessia. Negli anni la letteratura ha poi raccolto alcuni pazienti con varianti missenso che presentano manifestazioni cliniche diverse ed in particolare, recentemente, pazienti con epilessia/encefalopatia epilettica in assenza dei restanti segni/sintomi costitutivi della MWS. (Gregory-Evans et al., 2004; Heinritz et al., 2006; Dastot-Le Moal et al., 2007; Ghommid et al., 2013; Babkina et al., 2016; Nardello et al., 2020) Nel 2021 ci siamo occupati di descrivere il profilo elettroclinico in 40 pazienti con MWS. L'epilessia è presente nella totalità dei casi >5 anni con caratteristiche sovrapponibili all'interno del campione, ad andamento età dipendente: crisi febbrili-crisi focali ipniche con semeiologia analoga-assenze atipiche-stato elettrico durante il sonno-remissione dall'adolescenza. Da notare come non siano state riscontrate differenze in termini di profilo elettroclinico tra i pazienti con agenesia del corpo calloso e quelli con normale rappresentazione dello stesso, indirizzando potenzialmente verso il coinvolgimento diretto di un network cortico-sottocorticale nello sviluppo dell'epilessia. A sostegno di questo, l'acido valproico risulta essere il farmaco maggiormente efficace nella gestione delle crisi epilettiche. (Ricci et al., 2021) L'insieme di questi dati suggerisce infine che l'epilessia nella MWS possa essere considerata monogenica, con caratteristiche definite a fronte della stessa categoria di variante.

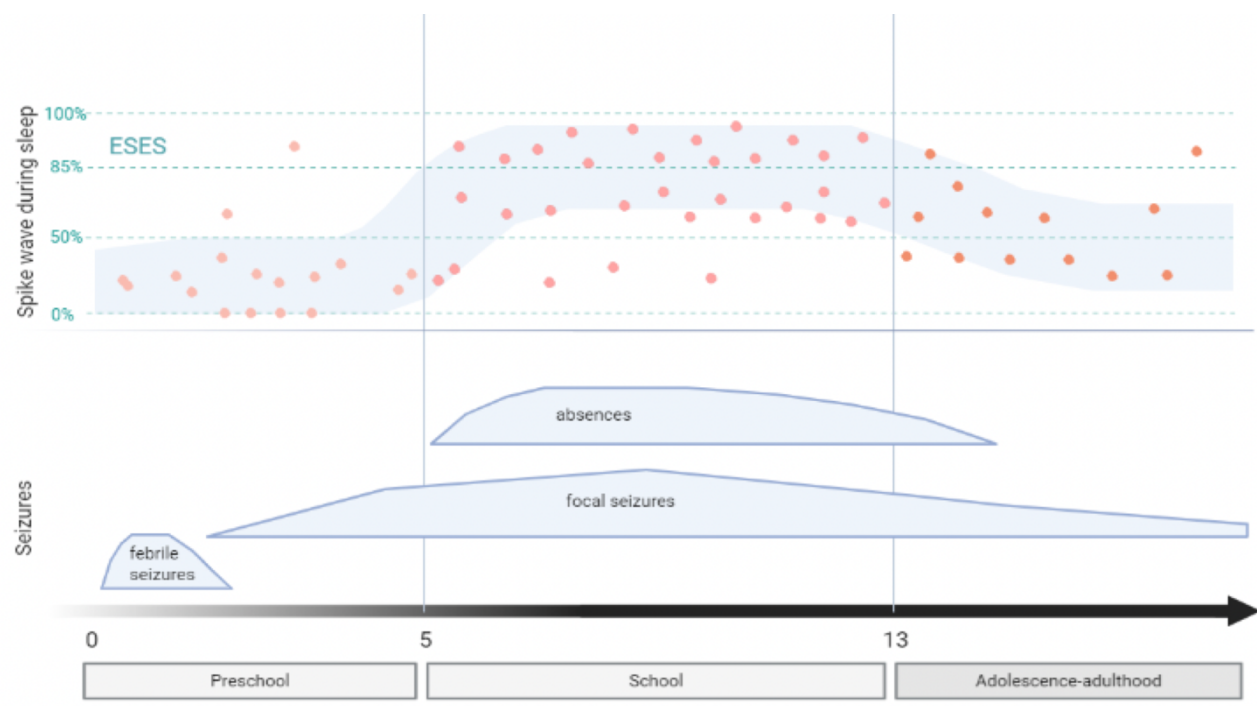


Figura 3: Ottenuto tramite Biorender. Il grafico mostra la distribuzione delle caratteristiche cliniche (tipo di crisi) ed elettroencefalografiche delle valutazioni dei pazienti analizzati in relazione alla fascia d'età.

Il coinvolgimento dei circuiti cortico-striatali nella genesi e/o mantenimento delle scariche di anomalie epilettiformi generalizzate è stato da tempo indagato nell'ambito della più ampia ricerca sulle connessioni cortico-sottocorticali. (Cavalheiro et al., 1986; Turski et al., 1991; Shehab et al., 1993; André et al., 1998) Negli anni la consapevolezza della complessità del sistema di dialogo tra i microcircuiti locali (inibitori-eccitatori intracorticali/all'interno dei circuiti sottocorticali tra i nuclei della base stessi e tra essi ed il talamo) e le afferenze/efferenze regolatrici dirette tra le regioni corticali e sottocorticali è aumentata tramite studi sperimentali prevalentemente su modelli animali. (Paz et al. 2007; Veliskova et al., 2017) Studi clinici hanno poi dimostrato il coinvolgimento del circuito cortico-striatale nell'epilessia mioclonica giovanile. (Link K et al., 2009) Recentemente è stato invece sottolineato come la risposta GABAergica inibitoria massiva, innescata a livello striatale dalle afferenze eccitatorie "sovrassoglia" provenienti dalla corteccia, abbia un ruolo nel mantenere attiva la scarica di anomalie a tipo punta-onda generalizzate osservate nelle assenze. (Arakaki et al., 2016) Allo stesso modo, indagando l'effetto delle mutazioni *SCN1A* e *STXBPI*, un recente lavoro evidenzia la centralità dei circuiti cortico-striatali nella genesi delle assenze riferendosi però in questo caso principalmente alla componente eccitatoria. (Miyamoto H. et al., 2019) L'esatta articolazione delle alterazioni a livello del circuito è ancora controversa e discussa, (Velisek et al., 2019) tuttavia una relazione diretta tra l'alterata omeostasi inibitoria/eccitatoria dell'asse corteccia-striato e fenomeni elettroclinici generalizzati sembra confermarsi nel tempo. Un ultimo dato interessante proviene da un articolo che mostra come il volume di caudato e putamen sia ridotto nei pazienti con epilessia autolimitantesi dell'infanzia con parossismi centro-temporali bilaterali attivati dal sonno e come questo correli con le ricadute cognitive. Questo non solo conferma un coinvolgimento delle strutture striatali nelle anomalie generalizzate ma allarga la riflessione alle anomalie che generalizzano in sonno ed agli effetti extra crisi epilettiche. (Shakeri M et al., 2017)

Obiettivi (max 500 parole)

L'obiettivo primario di questo studio è quello di ottenere per la prima volta un modello neuronale che abbia origine da cellule umane *ZEB2* mutate, realizzando iPSC da linee linfoblastoidi/fibroblasti e ridifferenziandole in senso neuronale.

Gli obiettivi saranno successivamente suddivisi su due distinti workpackage.

Obiettivi Workpackage 1:

- Osservare la morfologia degli interneuroni GABAergici ottenuti, in particolare valutandone il corretto sviluppo del corpo cellulare, la lunghezza assonale e la qualità dell'arborizzazione dendritica
- Confrontare la morfologia neuronale ottenuta con quella degli interneuroni GABAergici Pv + e Sst+ striatali e corticali rispettivamente, valutando le analogie/differenze con entrambe le popolazioni di interneuroni e le eventuali alterazioni patologiche in relazione ai diversi modelli
- Confrontare le caratteristiche morfologiche degli interneuroni ottenuti con i dati esistenti in letteratura in merito alle alterazioni dell'arborizzazione dendritica in epilessia e nei disordini del neurosviluppo, con particolare attenzione alle descrizioni sui modelli animali *SCN1A* mutati
- Valutare eventuali correlazioni tra il tipo/la posizione della variante di *ZEB2* e le alterazioni morfologiche

Obiettivi Workpackage 2:

-Studiare il profilo di espressione molecolare degli interneuroni GABAergici Pv+ e Sst + ottenuti. Anche in questo caso particolare attenzione verrà posta alla regolazione dell'espressione del gene *SCN1A*
-Confermare o confutare la tendenza degli interneuroni GABAergici Pv+ e Sst + ottenuti a mantenere profilo molecolare corrispondente alla sottopopolazione striatale a scapito di quella corticale
-Valutare eventuali correlazioni tra il tipo/la posizione della variante di *ZEB2* e le alterazioni del profilo di espressione molecolare degli interneuroni ottenuti

In base ai risultati ottenuti sarà dunque possibile:

-Ipotizzare anche su modelli cellulari umani i meccanismi patogenetici alla base dell'epilessia nelle mutazioni di *ZEB2*, confermando o meno il disequilibrio tra interneuroni GABAergici Pv+ e Sst + corticali e striatali
-Valutare eventuali differenze sia per quanto riguarda il workpackage 1 e 2 in base alle diverse fasce d'età in cui è stato prelevato il campione
-Valutare l'opportunità di proseguire il progetto anche su campioni di pazienti con varianti missenso di *ZEB2*
-Considerare se e come le alterazioni individuate possano essere causa anche delle manifestazioni neurologiche/neuropsicologiche e psichiatriche (indipendenti dall'epilessia o non linearmente correlate) osservate nelle varianti di *ZEB2* (in particolare il disturbo del linguaggio)
-Valutare specificità di definite terapie antiepilettiche nelle varianti di *ZEB2*
-Contribuire a porre le basi razionali per considerare o meno possibili future terapie con mRNA (RNA messaggero), ad oggi sperimentate in altre condizioni dovute ad aploinsufficienza, per le manifestazioni neurologiche nella MWS considerando un possibile contributo del meccanismo patogenetico anche nell'epoca postnatale
-Valutare la validità traslazionale del modello ipotizzato legato alla variante di *ZEB2* per le condizioni elettrocliniche che prevedano scariche protratte di anomalie a tipo punta-onda generalizzata a prevalenza anteriore (con particolare riferimento alle assenze atipiche ed allo stato elettrico durante il sonno). Questo modello, se confermato, sembrerebbe infatti proporsi a livello teorico come utile esempio di primario coinvolgimento del network cortico-sottocorticale nel suo distretto striatale con disequilibrio finale tra i potenziali eccitatori/inibitori dovuto ad una eccessiva scarica GABAergica inibitoria a livello striatale verosimilmente in risposta ad una carenza di regolazione inibitoria intracorticale.

Piano Sperimentale (max 2000 parole)

Unità 1-Centro Regionale Epilessia, ASST Santi Paolo Carlo, Università degli Studi di Milano

Unità 2-UOC Neuropsichiatria dell'Età Pediatrica, IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, Università di Bologna

Unità 3- UOC Genetica Medica, IRCCS G.Gaslini, DiNOGMI (Dipartimento Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno Infantili) Università di Genova

Unità 4-UO Genetica Medica, Arcispedale Santa Maria Nuova di Reggio Emilia, Università di Modena e Reggio Emilia

Se non concluse le procedure burocratiche nell'arco di tempo tra la notifica dell'ottenuto finanziamento e l'inizio del progetto, durante i primi 2 mesi (Fase1) dello stesso ci si riserva di ottenere la definitiva approvazione da parte del comitato etico di ciascuna Unità Operativa con contestuale acquisizione del consenso informato specifico per il progetto da parte dei caregiver dei pazienti i cui campioni/dati verranno utilizzati nello studio. Va sottolineato come l'attuale studio sia svolto in collaborazione con l'Associazione Italiana Mowat Wilson Onlus (A.I.M.W. Onlus) che ha già deliberato la sua approvazione rispetto a quanto proposto, nonché il cofinanziamento relativo. La stessa associazione, da qualche anno, ha chiesto ed ottenuto la creazione della Biobanca presso il laboratorio dell'Unità 3, al fine di favorire quanto più possibile la ricerca. Alla luce di quanto espresso, non si ipotizzano limitazioni rispetto all'acquisizione del consenso specifico necessario, risulta inoltre già ottenuto il consenso inerente l'estrazione e conservazione del materiale biologico per l'utilizzo in ambito di ricerca sperimentale secondo quanto regolamentato dalle procedure dell'Ente ospitante l'Unità 3. Allo stesso modo, non rendendosi necessaria alcuna procedura sul paziente ed essendo già regolamentate la conservazione/le modalità di utilizzo dei campioni biologici, non si ipotizzano limitazioni da parte dei diversi comitati etici. I campioni biologici (fibroblasti e/o linee linfoblastoidi) dei pazienti MWS disponibili ad oggi in Biobanca corrispondono a quelli di 30 pazienti. La disponibilità del materiale biologico, utilizzato contemporaneamente da altri colleghi per altri studi, è stata preliminarmente verificata. Considerando possibili problematiche impreviste in termini di conservazione appropriata del materiale o qualità dello stesso ed il budget a disposizione, si ritiene verranno utilizzati in questa fase i campioni di 10 pazienti. Per quanto riguarda il gruppo di controllo, sarà proposto ed eventualmente effettuato sempre entro la Fase 1, il reclutamento per prelievo ematico dei fratelli dei pazienti di cui sono già presenti i campioni in biobanca, immaginando siano facilitate in questo modo la motivazione alla partecipazione e l'acquisizione del consenso informato da parte dei caregiver e del minore se possibile, oppure del candidato a controllo qualora quest'ultimo sia maggiorenne. In caso di fallimento, verranno utilizzati i dati normativi a disposizione negli archivi bioinformatici di riferimento in letteratura. Anche in questo caso non sono comunque previste obiezioni da parte dei diversi comitati etici trattandosi di una manovra diagnostica a minima invasività e generalmente ben tollerata. Si prevede di arruolare per il momento 5 controlli sani. Di questo arruolamento si occuperà maggiormente l'Unità 4. La numerosità del gruppo di pazienti e del gruppo di controllo è stata decisa in modo da poter ottenere dati significativi con le risorse economiche disponibili. Ulteriori implementazioni potranno essere valutate in futuro. Dal mese 3 al mese 14 (totale 12 mesi, Fase 2) verrà svolta la parte sperimentale in laboratorio presso l'Unità 3, dedicando rispettivamente i primi 6 mesi al workpackage 1 e gli ultimi 6 al workpackage 2. L'Unità 3 ha esperienza consolidata rispetto al tipo di esperimento, pertanto risulta molto improbabile che si riscontrino difficoltà nel differenziamento dei neuroni. In questo caso, alcuni componenti dell'Unità 4 con esperienza in merito potranno contribuire alla buona riuscita. Durante gli stessi mesi le Unità 1, 2 e 4 implementeranno i dati di follow-up dei pazienti di cui si utilizzeranno i campioni, nell'ambito di quanto previsto dalla buona pratica clinica. I centri dedicati allo studio dell'epilessia potranno inoltre continuare ad osservare e confrontare l'efficacia dei diversi trattamenti terapeutici proposti al fine di confermare quanto finora osservato, potenzialmente utile alla successiva interpretazione dei dati. Verrà inoltre effettuata in questa fase una rivalutazione multidisciplinare, anche tramite discussione collegiale calendarizzata ogni mese, di ciascun caso arruolato con riconsiderazione della variante di *ZEB2* in relazione alla presentazione clinica epilettologica ma anche neurocomportamentale ed extraneurologica. Saranno prese in considerazione le variabili cliniche che definiscono la gravità del quadro, in particolare nell'ambito epilettologico (es: età di esordio; frequenza crisi per ciascuna fase della malattia, numero di antiepilettici tentati etc) e si rivaluteranno potenziali correlazioni con il tipo di variante, ad oggi non emerse in modo significativo. In questo senso, l'Unità 4, particolarmente esperta in merito alle varianti di *ZEB2* ed alla MWS potrà anche eventualmente ritestare con studi funzionali (qRT-PCR/Western blot) singole mutazioni, per verificare, ove possibile, l'effetto sulla proteina in caso di dati clinico-laboratoristici non completamente coerenti. Se necessario, in questi casi, l'Unità 1 e 2 si occuperanno di eventuali rivalutazioni dei pazienti per gli aspetti neurologici mentre l'Unità 4 potrà rivalutare i pazienti per quanto concerne i dati clinici extraneurologici. In seguito alla rivalutazione complessiva, verrà costituito un database elettronico complessivo con le informazioni cliniche e laboratoristiche della popolazione. Ogni 3 mesi (a metà ed al termine di ciascun Workpackage) verranno condivisi i dati ottenuti dall'Unità 3, con implementazione del database elettronico rispetto ai dati ottenuti ed eventuale rivalutazione delle correlazioni clinico-laboratoristiche, soprattutto in caso di grande variabilità interpaesante dei dati, sebbene non attesa. In questo caso la discussione collegiale sostituirà quella mensile consueta. Potrà inoltre essere rivalutata la ripetizione di alcuni test da parte dell'Unità 3 in caso di risultati dubbi/discordanti rispetto alle precedenti osservazioni. Dal mese 15 al mese 17 (totale 3 mesi, Fase 3) i dati ottenuti dal laboratorio dell'Unità 3 tramite IPSc saranno analizzati, elaborati e confrontati tra loro, nonché correlati alle già note informazioni genetiche e cliniche. Questa parte del progetto sarà svolta con la collaborazione di tutte le Unità coinvolte, con preponderante impegno temporale nel coordinamento da parte del responsabile del progetto (Unità1). I restanti 7 mesi (Fase 4) saranno dedicati alla pubblicazione dei risultati ottenuti ed alla loro divulgazione tramite la presentazione in almeno un congresso nazionale ed uno internazionale. Anche in questo caso, la parte indicata del progetto sarà svolta con la collaborazione di tutte le Unità coinvolte, con preponderante impegno temporale nel coordinamento da parte del responsabile del progetto (Unità1).

Metodi (max 2000 parole)

Questo studio prospettico multicentrico prevede il coinvolgimento di 4 Unità Operative con competenze cliniche e laboratoristiche complementari. Il reclutamento dei pazienti è già avvenuto ed ha avuto luogo presso le Unità Operative 1, 2, 3 e 4. In particolare, le Unità 1 e 2 si sono occupate della raccolta dei clinici ed elettroencefalografici inerenti il profilo elettroclinico/neurologico mentre le Unità 3 e 4 si sono occupate del prelievo/conservazione dei materiali biologici nella Biobanca dell'unità 3 (sangue con ottenimento di linee linfoblastoidi e/o fibroblasti in una minoranza dei casi), di studi funzionali preliminari sugli stessi quando possibile/opportuno e della raccolta dei dati clinici non neurologici. Il consenso informato per queste fasi è stato ottenuto da parte dei caregiver così come l'approvazione da parte di ciascun comitato etico. Dati clinici e laboratoristici preliminari sono stati pubblicati. (Ivanovski et al., 2018; Ricci et al., 2021) Nell'attuale studio saranno inclusi 10 su 40 tra i pazienti descritti nel recente lavoro sul fenotipo elettroclinico nella MWS dal nostro gruppo. Verrà raccolto il consenso informato progetto specifico da parte del caregiver, previa approvazione da parte dei comitati etici competenti.

CRITERI DI INCLUSIONE:

- Diagnosi geneticamente confermata di MWS con caratteristiche cliniche suggestive
- Acquisizione del consenso informato progetto specifico

CRITERI DI ESCLUSIONE:

- Co-occorrenza di altre varianti geniche a significato patogenetico certo o probabile (database Varsome e Franklin)

Si chiarisce come in questa fase saranno dunque prese in considerazione esclusivamente mutazioni che funzionino complessivamente come loss of function (non senso-frameshift-delezioni), responsabili pertanto di MWS tipica da aploinsufficienza, al fine di rendere lo studio dell'effetto della mutazione più mirato e specifico.

Saranno acquisiti dai precedenti studi/implementati i seguenti dati clinico-strumentali, costruendo un unico database Excel:

- Dati demografici
- Variante *ZEB2* ed effetto sulla funzione della proteina
- Circonferenza cranica, altezza, peso (nascita, età prescolare, età scolare, adolescenza, età adulta)
- Dismorfismi facciali
- Anomalie cardiache
- Anomalie apparato genito-urinario
- Anomalie gastrointestinali o morbo di Hirschsprung
- Anomalie oculari
- Livello disabilità intellettiva
- Disturbo del linguaggio
- Caratteristiche neuropsicologiche
- Profilo comportamentale/psichiatrico
- Tratti di spettro autistico
- Disturbi motori
- Neuroimaging
- Epilessia (tipo di crisi presentate, relative età d'esordio, crisi febbrili/altri trigger, crisi veglia/sonno, semeiologia crisi focali, frequenza crisi età prescolare-età scolare-adolescenza-età adulta, tentativi terapeutici effettuati e relativa efficacia)
- Disturbo del sonno
- Caratteristiche EEG (background veglia/sonno età prescolare-età scolare-adolescenza-età adulta, anomalie parossistiche [caratterizzazione grafoelemento e localizzazione] età prescolare-età scolare-adolescenza-età adulta, ESES, caratteristiche tracciati critici [grafoelemento e localizzazione])

Il gruppo di controllo, previsto di circa 5 pazienti, verrà costituito tramite campioni ottenuti da prelievo ematico dei fratelli sani dei pazienti inclusi nello studio. Verranno poi estratti i linfociti mediante Ficoll. Saranno esclusi tutti i candidati a gruppo di controllo valutati non idonei dal punto di vista psicologico tramite valutazione specialistica (eccessiva responsabilizzazione del minore, atteggiamento richiestivo da parte dei genitori, esagerate aspettative da parte del minore stesso circa gli effetti sulla salute del probando..etc). Non sono previsti prelievi ematici in individui di età inferiore ai 3 anni. Il prelievo sarà inserito all'interno di esami di routine qualora previsti nella storia clinica del fratello del probando, diversamente sarà eseguito minimizzando l'invasività anche tramite applicazione di anestetico topico. Il caregiver e/o il minorenne/maggiorenne candidato a componente del gruppo di controllo, verranno adeguatamente informati anche tramite modulistica diversificata in relazione all'età (bambino/adolescente/adulto). Allo stesso modo sarà diversificato il consenso informato al fine di poter risultare ben comprensibile. Per quanto possibile i campioni dei probandi e quelli dei controlli sani verranno confrontati suddivisi per fasce d'età. Ipotizziamo che l'utilizzo dei campioni provenienti dai fratelli dei probandi per il gruppo controllo, consentirà verosimilmente di ridurre l'errore potenzialmente attribuibile al background genetico e di ridurre tentativamente il numero di controlli necessari per ottimizzare la gestione delle spese.

Generazione di cellule iPS, differenziamento in neuroni, caratterizzazione morfologica e molecolare (protocolli stabiliti Fruscione et al. 2018, Aprile et al., 2019): le cellule iPS verranno generate a partire dai fibroblasti/linfociti dei pazienti e dei controlli utilizzando il CytoTune™-IPS 2.0 Reprogramming Kit. La qualità dei cloni generati verrà verificata mediante valutazione di marcatori di pluripotenza (SSEA1, OCT4, SOX2 e TRA1-60) tramite qRT-PCR e immunofluorescenza. Per il differenziamento neuronale verranno applicati protocolli standardizzati, come descritto in precedenza (Fruscione et al., 2018; Aprile et al., 2019). Brevemente, le cellule iPS verranno staccate e indotte a formare strutture simili a corpi embrionali in piastre AggreWell™800. I corpi embrionali verranno mantenuti in terreno STEMdiff™ Neural Induction Medium supplementato con SMADi e Y-27632 (STEMCELL) per 4 giorni, e poi seminati su piastre con coating di Geltrex per favorire la formazione di "rosette neurali" e quindi cellule neuroprogenitrici. Infine, per il differenziamento in neuroni corticali, si proseguirà la coltura dei neuroprecursori in condizioni "feeder-free" con terreno Neurobasal-A supplementato con L-glutamine (2mM), N2 (1:100), B27 (1:50), BDNF (10 ng/ ml), GDNF (10 ng/ ml) e acido retinoico. Dopo 35-40 giorni di differenziamento in vitro, i neuroni avranno raggiunto una maturazione morfologica e funzionale utile agli studi successivi.

La maturazione neuronale verrà quindi valutata, rispetto alle linee ottenute dai controlli, attraverso esperimenti di qRT-PCR e western blot volti alla valutazione del profilo di espressione di specifici marcatori (TUJ1, MAP2, SMI-312, VGLUT, VGAT, GAD65, Synapsins, Homer, PSD95).

Un'approfondita analisi della morfologia verrà eseguita a diversi intervalli temporali attraverso esperimenti di immunofluorescenza combinata con microscopia confocale. Per esempio, valuteremo la specificazione assonale, la generazione del segmento assonale iniziale, la lunghezza assonale totale, l'arborizzazione dendritica e la formazione di sinapsi. Infine, verrà analizzato il trascrittoma globale mediante RNAseq e successiva analisi bioinformatica. I principali geni upregolati/downregolati nei neuroni generati dai campioni dei pazienti verranno validati mediante qRT-PCR, western blot e immunofluorescenza.

I risultati ottenuti saranno via via analizzati, discussi collegialmente ed affiancati a quelli inerenti alle caratteristiche clinico-laboratoristiche e strumentali già note per ciascun paziente all'interno del foglio di lavoro Excel. In caso di significativa discordanza tra i dati ottenuti nell'ambito del singolo paziente o in caso di estrema variabilità interpaziente inattesa, verranno rianalizzati i dati del singolo caso ed eventualmente sarà ripetuta la

parte sperimentale di laboratorio.

Analisi statistica: i dati verranno analizzati in primo luogo attraverso statistica descrittiva. Le variabili categoriche saranno presentate come frequenze e percentuali, mentre le variabili quantitative continue come medie e deviazione standard in caso di distribuzione normale, come mediane e intervallo interquantile (IQR) in caso di distribuzione non normale. Il test t di Student o il test non parametrico di Mann-Whitney verranno utilizzati per determinare le differenze tra i campioni per dati distribuiti normalmente e non normalmente, rispettivamente. Per valutare l'associazione tra variabili categoriche o nominali verranno utilizzati il test del chi-quadrato (χ^2) di Pearson o il test di Fisher in caso di variabili nominali dicotomiche e campioni piccoli. Per valutare la relazione tra variabili quantitative o qualitative ordinali verrà calcolato il coefficiente Rho di Spearman. Verrà utilizzata la classica soglia di significatività statistica $P < 0,05$. Modelli di regressione logistica univariata/multivariata saranno utilizzati se possibile in relazione alla numerosità del campione/dei sottogruppi. I dati saranno analizzati tramite SPSS o STATA per Windows. I dati così elaborati verranno validati previo controllo in cieco da parte di due distinte UO, discussi collegialmente ed interpretati come sintesi in base alle specifiche competenze delle diverse componenti dell'equipe multidisciplinare.

I metodi di divulgazione dei risultati individuati prevedono la pubblicazione del lavoro su una rivista peer-reviewed internazionale, indicizzata su Pubmed. E' inoltre prevista l'esposizione preliminare dei risultati ad almeno un convegno nazionale ed uno internazionale nell'ambito dell'epilessia o delle malattie rare. Infine, tramite il sito web dell'Associazione Italiana Mowat Wilson, sarà scelta una opportuna modalità di condivisione della sintesi dei risultati ottenuti con le famiglie dei pazienti (es: seminario interattivo online, intervento a congresso nazionale, sezione "meet the expert" sul sito con riferimenti e contatti etc.).

Limiti dei metodi dello studio:

-Il modello di studio proposto mantiene una bidimensionalità che non rispecchia l'effettiva organizzazione del sistema nervoso centrale. In base ai risultati potrà anche essere in futuro valutata l'ipotesi di ottenere organoidi tridimensionali per approfondire quanto riscontrato.

Risultati attesi e rilevanza clinica (max 500 parole)

Workpackage 1

- Riscontro di alterazioni della morfologia cellulare degli interneuroni GABAergici, a conferma di quanto osservato sui modelli murini
- Riscontro di interneuroni GABAergici morfologicamente simili al sottotipo striatale
- Riscontro di alterazioni paragonabili a quanto osservato in letteratura per altre encefalopatie epilettiche e di sviluppo, con deficit dell'arborizzazione dendritica come osservato nelle varianti *SCN1A*
- Esclusione di variazioni intersoggetto delle alterazioni morfologiche in relazione al tipo ed alla posizione della variante di *ZEB2*

Workpackage 2

- Conoscenza del profilo di espressione molecolare degli interneuroni GABAergici Pv+ e Sst+ con attesa conferma di quanto osservato sui modelli murini. Conferma downregolazione di *SCN1A*
- Conferma di profilo di espressione molecolare complessivamente coerente con quello della sottopopolazione di interneuroni GABAergici striatali
- Esclusione di variazioni del profilo di espressione molecolare intersoggetto in relazione al tipo ed alla posizione della variante di *ZEB2*

Conseguenti risultati attesi:

- Consolidare l'ipotesi che un aumento degli interneuroni GABAergici striatali unitamente ad una riduzione degli interneuroni GABAergici corticali possano rappresentare almeno uno dei meccanismi patogenetici alla base dell'epilessia nella MWS
- Valutare eventuali differenze in base all'età del paziente al momento del prelievo di campione biologico sia rispetto al Workpackage 1 che 2. Il riscontro di aspetti età dipendenti porrebbe l'ipotesi che trattamenti precoci possano risultare maggiormente efficaci
- Porre le basi per valutare nel tempo la prosecuzione della ricerca anche tramite campioni biologici di pazienti con varianti missenso di *ZEB2*, al fine di oggettivare presumibili differenze nei casi in cui la variante ottenga un effetto gain of function. Questo amplierebbe e consoliderebbe la conoscenza sull'esatto meccanismo patogenetico alla base delle diverse manifestazioni cliniche
- Porre le basi per considerare come le alterazioni riscontrate possano essere causative anche degli aspetti clinici extra-epilessia (con particolare riferimento al linguaggio)
- Porre le basi per individuare eventuali terapie antiepilettiche specifiche rispetto al meccanismo patogenetico
- Porre le basi razionali per considerare possibili future terapie con mRNA (RNA messaggero), ad oggi sperimentate in altre condizioni dovute ad aploinsufficienza, per le manifestazioni neurologiche nella MWS, considerando un possibile contributo del meccanismo patogenetico anche nell'epoca postnatale
- Confermare la validità traslazionale del modello ipotizzato legato alla mutazione di *ZEB2* per le condizioni elettrocliniche che prevedano scariche protratte di anomalie a tipo punta-onda generalizzata a prevalenza anteriore (con particolare riferimento alle assenze atipiche ed allo stato elettrico durante il sonno). Proporre questo modello come utile esempio di primario coinvolgimento del network cortico-sottocorticale nel suo distretto striatale con disequilibrio finale tra i potenziali eccitatori/inibitori dovuto ad una eccessiva scarica GABAergica inibitoria a livello striatale verosimilmente in risposta ad una carenza di regolazione inibitoria intracorticale.

Aspetti di innovazione:

- A nostra conoscenza questo è il primo studio sull'epilessia nelle varianti di *ZEB2* che preveda l'utilizzo di modelli neuronali ad origine umana offrendo potenzialmente informazioni nuove ed utili per il proseguimento della ricerca e la cura delle condizioni cliniche relate. Nonostante *ZEB2* sia considerato gene epilessia, ad oggi la letteratura non mostra lavori che correlino i dati elettroclinici con i possibili meccanismi etiopatogenetici.
- Potenziale strutturazione di un modello teorico innovativo per lo studio delle epilessie con primario coinvolgimento del network cortico-sottocorticale.

Bibliografia

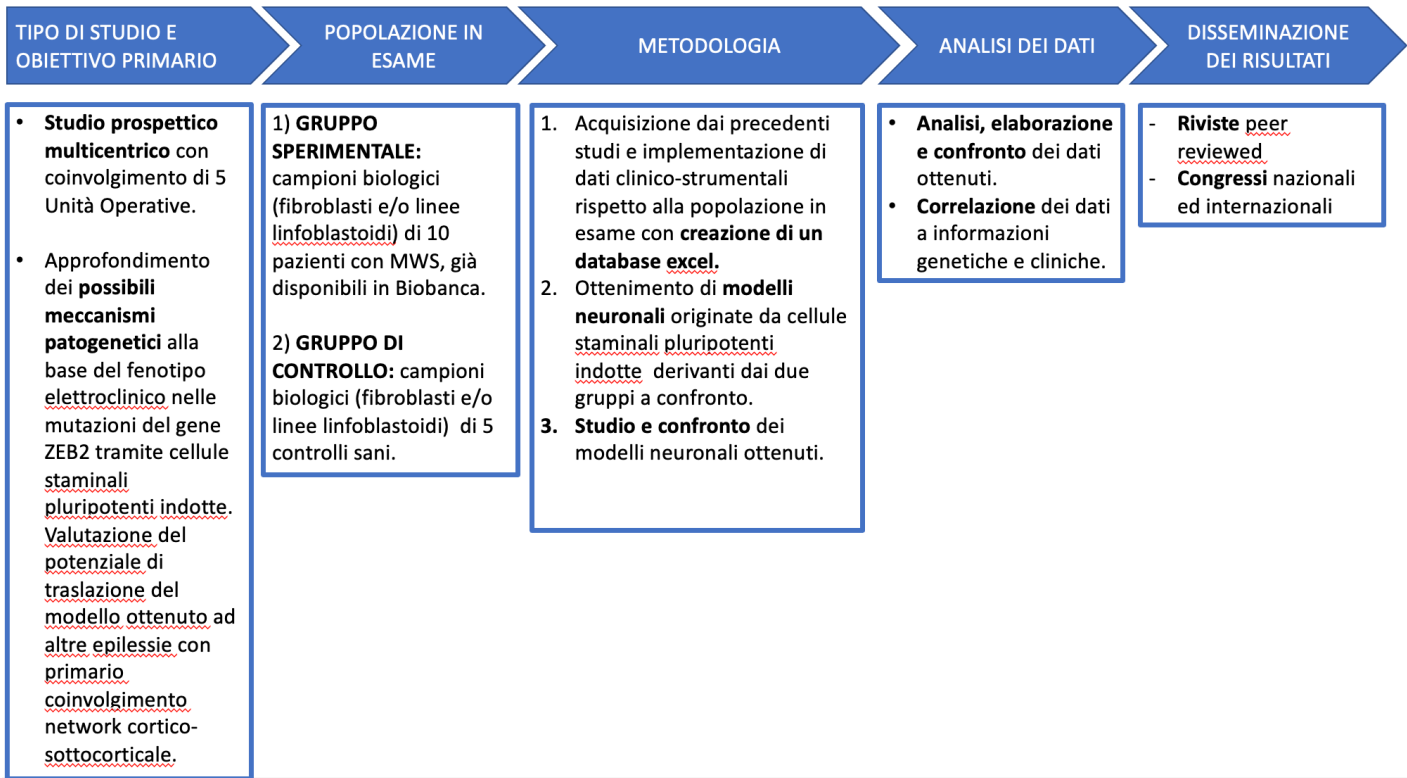
1. André V, Pineau N, Motte JE et al. Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. Eur J Neurosci. 1998; 10(6):2094-2106.
2. Aprile D., Fruscione F., Baldassari S. et al TBC1D24 regulates axonal outgrowth and membrane trafficking at the growth cone in rodent and human neurons Cell Death Differ. 2019; 26:2464-2478.
3. Arakaki T., Mahon S., Charpier S. et al. The role of striatal feedforward inhibition in the maintenance of absence seizures J Neurosci, 36 (2016), 9618-9632, 10.1523
4. Attisano L., Wrana J.L. Smads as transcriptional co-modulators. Curr. Opin. Cell Biol. 2000.12, 235–243.
5. Babkina N., Deignan J.L., Lee H. et al. Early Infantile Epileptic Encephalopathy with a de novo variant in ZEB2 identified by exome sequencing Eur J Med Genet, 59 (2016), 70-74, 10.1016
6. Cavalheiro E.A., Turski L. Intrastriatal N-methyl-D-aspartate pre- vents amygdala kindled seizures in rats. Brain Res 1986;377(1): 173-

7. Chng Z., Teo A., Pedersen RA., SIP1 mediates cell-fate decisions between neuroectoderm and mesendoderm in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010. 6, 59–70.
8. Conidi A., Cazzola S., Beets K. et al., Few Smad proteins and many Smad-interacting proteins yield multiple functions and action modes in TGFbeta/BMP signaling in vivo. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22, 287–300.
9. Dastot-Le Moal F., Wilson M., Mowat D. et al. ZFHX1B mutations in patients with Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mutat.* 2007;28:313–321.
10. Epifanova E., Babaev A., Newman A.G. et al. Role of Zeb2/Sip1 in neuronal development *Brain Res*, 1705 (2019), pp. 24–31, 10.1016/j.brainres.2018.09.034
11. Fruscione F., Valente P., Sterlini B. et al. PRRT2 controls neuronal excitability by negatively modulating Na⁺ channel 1.2/1.6 activity *Brain*. 2018; 141:1000–1016
12. Ghoumid J., Drevillon L., Alavi-Naini S.M. et al. ZEB2 zinc-finger missense mutations lead to hypomorphic alleles and a mild Mowat–Wilson syndrome. *Hum Mol Genet* 2013;22:2652–61. 10.1093/hmg/ddt114.
13. Goikolea-Vives A. and Stolp H.B., 2021 Connecting the Neurobiology of Developmental Brain Injury: Neuronal Arborisation as a Regulator of Dysfunction and Potential Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 30;22(15):8220
14. Gregory-Evans C.Y., Vieira H., Dalton R. et al. Ocular coloboma and high myopia with Hirschsprung disease associated with a novel ZFHX1B missense mutation and trisomy 21. *Am. J. Med. Genet.* 2004.131,86e90.
15. Heinritz W., Zweier C., Froster U.G. et al. A missense mutation in the ZFHX1B gene associated with an atypical Mowat Wilson syndrome phenotype, 1 *Am. J. Med. Genet.* 2006.A 140 (11),1223e1227
16. Higashi Y., Maruhashi M., Nelles L. et al., Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genesis* 2002. 32,82–84
17. Ivanovski I., Djuric O., Caraffi S.G. et al. Phenotype and genotype of 87 patients with Mowat-Wilson syndrome and recommendations for care *Genet Med*, 20 (2018), 965–975, 10.1038
18. Kretzschmar M., Massague J. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr. Opin. Genet.* 1998. Dev. 8, 103–111.
19. Lin K., Carrete H.Jr, Lin J. Magnetic resonance spectroscopy reveals an epileptic network in juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia.* 2009;50(5):1191–1200.
20. Long J., Zuo D., Park M. Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin. *J. Biol. Chem.* 2005.280,35477–35489.
21. Massague J. TGFbeta signalling in context *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012.13, 616–630.
22. McKinsey G.L., Lindtner S., Trzcinski B. et al. Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons *Neuron*, (2013),77, 83–98, 10.1016/j.neuron.2012.11.035
23. Miyamoto H., Tatsukawa T., Shimohata A. et al. Impaired cortico-striatal excitatory transmission triggers epilepsy *Nat Commun*, 10 (2019), 10.1038/s41467-019-09954-9
24. Miyamoto H., Tatsukawa T., Shimohata A., Impaired Cortico-Striatal Excitatory Transmission Triggers Epilepsy *Natura communications* 2019; 10:1917
25. Mowat D.R., Wilson M.J., Goossens M. Mowat-Wilson syndrome *J Med Genet*, (2003), 40, 305–310, 10.1136/jmg.40.5.305 2)
26. Nardello R., Fontana A., Mangano GD. Age-dependent epileptic encephalopathy associated with an unusual co-occurrence of ZEB2 and SCN1A variants *Epileptic Disord* 2020; 22 (1): 111–5
27. Nelles L., Van De Putte T., Van Grunsven L. et al., Organization of the mouse Zfhx1b gene encoding the two-handed zinc finger repressor Smad-interacting protein-1. *Genomics* 2003. 82, 460–469.
28. Paz JT, Chavez M, Saillet S, Deniau JM, Charpier S. Activity of ventral medial thalamic neurons during absence seizures and modulation of cortical paroxysms by the nigrothalamic pathway. *J Neurosci.* 2007;27(4):929–941.
29. Postigo A.A., Dean D.C. ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. 96, 6683–6688.
30. Ricci E., Fetta A., Garavelli L. et al Further delineation and long-term evolution of electroclinical phenotype in Mowat Wilson Syndrome. A longitudinal study in 40 individuals *Epilepsy & behavior* (2021)–11; Vol.124, p.108315
31. Shakeri M., Datta A.N., Malfait D. et al., Sub-cortical brain morphometry and its relationship with cognition in Rolandic epilepsy *Epilepsy Research* (2017) 39–45
32. Shehab S, Simkins M, Dean P, Redgrave P. The dorsal midbrain anticonvulsant zone—I. Effects of locally administered excitatory amino acids or bicuculline on maximal electroshock seizures. *Neuroscience.* 1993;65(3):671–679.
33. Srivatsa S., Parthasarathy S., Molnar Z. et al. Sip1 downstream effector ninein controls neocortical axonal growth, ipsilateral branching, and microtubule growth and stability. *Neuron* 2015;85:998e1012.
34. Tiraboschi E., Martina S., van der Ent W. et al., New insights into the early mechanisms of epileptogenesis in a zebrafish model of Dravet syndrome *Epilepsia* 2020 Mar; 61(3): 549–560
35. Tomassy G.S., Lodato S., Arlotta P. A sip of GABA for the cerebral cortex *Neuron*, 77 (2013), pp. 1–3, 10.1016/j.neuron.2012.12.026
36. Turski L., Diedrichs S., Klockgether T. et al. Paradoxical antic- onvulsant activity of the gamma-aminobutyrate antagonist bicu- culline methiodide in the rat striatum. *Synapse.* 1991;7(1):14–20.
37. van den Berghe V., Stappers E., Vandesande B. et al. Directed migration of cortical interneurons depends on the cell- autonomous action of Sip1 *Neuron*, 77 (2013), pp. 70–82, 10.1016/j.neuron.2012.11.009
38. van Grunsven L.A., Taelman V., Michiels C. et al., deltaEF1 and SIP1 are differentially expressed and have overlapping activities during *Xenopus* embryogenesis. *Dev. Dyn.* 2006. 235, 1491–1500.
39. van Grunsven L.A. Taelman V., Michiels C. et al., XSip1 neuralizing activity involves the co-repressor CtBP and occurs through BMP dependent and independent mechanisms. *Dev. Biol.* 2007. 306,34–49.
40. Velisek L., It's a storm, It's a Gale: Epilepsy Initiation From the Corticostriatal Circuit *Epilepsy Current* 2019, 19 (5) 333–335
41. Veliskova J, Shakarjian MP, Vel'is'ek L. Systemic chemoconvul- sants producing acute seizures in adult rodents. In: Pitkanen A, Buckmaster PS, Galanopoulou AS, Moshe' S, eds. *Models of Sei- zures and Epilepsy*. London, England: Academic Press; 2017; 491–512.
42. Verschuere K., Rémacle J.E., Collart C. et al., SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J.Biol. Chem.* 1999 274, 20489–20498.
43. Weng Q., Chen Y., Wang H et al.,. Dual-mode modulation of Smad signaling by Smad-interacting protein Sip1 is required for myelination in the central nervous system. *Neuron* 2012 73,713–728.

Piano Temporale del Progetto

[illegible]

Sintetico schema grafico del progetto



Piano economico

	costo totale del progetto	quota richiesta a Fondazione LICE	quota cofinanziata	Ente cofinanziatore
Personale di ricerca	-	-	-	-
Attrezzature	-	-	-	-
Materiali di consumo	46500 euro	36500 euro	10000 euro	Associazione Italiana Mowat Wilson Onlus
Servizi informatici	-	-	-	-
Partecipazioni a congressi e collaborazioni (max 10%)	1700 euro	1700 euro		
Costi di pubblicazione	1000 euro	1000 euro		
Overheads (max 10%)	800 euro	800 euro		

Dettaglio delle spese previste

Personale di ricerca: non è prevista assunzione di personale di ricerca tramite contratti *ad hoc* per il progetto, è stata verificata la fattibilità in termini di tempo/persona rispetto al personale facente già parte dell’equipe di ricerca.

Materiali di consumo: terreni e plasticheria per colture cellulari, mezzi e additivi per il differenziamento neuronale, reagenti per biologia molecolare e biochimica, anticorpi e altri reagenti per immunofluorescenza. RNAseq service.

Attrezzature e servizi informatici: non si prevedono costi in quanto verranno utilizzati le attrezzature già esistenti e gli strumenti del Bioinfo Core dell’IRCCS G. Gaslini.

Partecipazioni a congressi e collaborazioni: quota iscrizione 1 congresso internazionale + 1 congresso nazionale per 2 membri del gruppo di ricerca.

Costi di pubblicazione: costi di editing della pubblicazione prevista.