

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

selezione pubblica per n. 1 posto di Ricercatore a tempo determinato in tenure track (RTT), riservata ai sensi dell'art.14 comma 6-septiesdecies del decreto legge 30 aprile 2022, n. 36 convertito con modificazioni, dalla Legge 29 giugno 2022, n. 79

per il settore concorsuale 05/G1 - FARMACOLOGIA, FARMACOLOGIA CLINICA E FARMACOGNOSIA, settore scientifico-disciplinare BIO/14

presso il Dipartimento di Bioscienze

(avviso bando pubblicato sulla G.U. n. 81 del 24/10/2023) Codice concorso 5411.

Dario Besusso

CURRICULUM VITAE

INFORMAZIONI PERSONALI (NON INSERIRE INDIRIZZO PRIVATO E TELEFONO FISSO O CELLULARE)

COGNOME	BESUSSO
NOME	DARIO
DATA DI NASCITA	15/01/1976

TITOLI

TITOLO DI STUDIO

07/05/2001 Laurea in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Milano con votazione di 110/110, Titolo tesi: "Utilizzo di molecole batteriche per indurre una risposta immune antitumorale". Relatore: Prof. Roberto Comolli. Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali.

TITOLO DI DOTTORE DI RICERCA O EQUIVALENTI, OVVERO, PER I SETTORI INTERESSATI, DEL DIPLOMA DI SPECIALIZZAZIONE MEDICA O EQUIVALENTE, CONSEGUITO IN ITALIA O ALL'ESTERO

18/01/2007 Dottorato di Ricerca in Morfologia Umana, presso il Dipartimento di Anatomia Umana, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano. Coordinatore Prof.ssa Magda Gioia. Titolo della Tesi: Apratassina e la divisione cellulare.

CONTRATTI DI RICERCA, ASSEGNI DI RICERCA O EQUIVALENTI

01/04/2014 al 31/03/2020 Titolare di Assegno di Ricerca presso il Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli Studi di Milano

01/04/2020 al 30/09/2020 Titolare di Contratto di Collaborazione presso il Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli studi di Milano nell'ambito del progetto CHDI JSC (3 mesi) - NSCreconstruct (3 mesi)

01/10/2020 al 30/11/2020 Titolare di Contratto di Collaborazione presso il Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli studi di Milano nell'ambito del progetto CHDI JSC (1 mesi) - NSCreconstruct (1 mesi)

01/12/2020 al 31/12/2020 Titolare di Contratto di Collaborazione presso il Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli studi di Milano nell'ambito del progetto ERC HD Dittograph

14/01/2021 al 29/01/2021 Titolare di Contratto di Collaborazione presso il Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli studi di Milano nell'ambito del progetto ERC HD Dittograph.

PRINCIPALI INTERESSI DI RICERCA

Da oltre 15 anni, la mia attività di ricerca si concentra sullo studio di malattie neurodegenerative ed in particolar modo sulla malattia di Huntington (MH), condizione monogenica ereditaria che determina la progressiva atrofia del corpo striato con conseguente compromissione motoria e cognitiva. Nella prima parte della mia carriera mi sono focalizzato sui meccanismi molecolari alla base della MH che ho studiato mediante l'utilizzo di modelli animali geneticamente modificati. Nel 2014, entrando nel laboratorio guidato dalla Prof.ssa Elena Cattaneo, mi sono avvicinato al nascente settore delle cellule staminali come strumento di studio e di terapia per la MH. In questo nuovo contesto, la mia attività di ricerca si è focalizzata sui seguenti ambiti:

(i) Approcci di medicina rigenerativa per lo sviluppo di terapie per la MH.

In questo ambito, i miei sforzi si sono concentrati sullo sviluppo di un approccio completo mirato a comprendere i meccanismi attraverso i quali un progenitore neuronale sano proveniente da cellule staminali pluripotenti può funzionare come agente terapeutico quando introdotto nell'ambiente affetto dalla malattia. Per raggiungere questo obiettivo, ho adottato una strategia innovativa basata sul differenziamento *in vitro* di cellule staminali pluripotenti umane per generare derivati da trapiantare nel cervello di modelli animali affetti da malattia di Huntington. In questo contesto, negli ultimi otto anni mi sono interessato all'analisi delle complesse interazioni tra cellule donatrici del trapianto e i tessuti dell'organismo ospite, facendo ampio uso delle moderne tecnologie di sequenziamento genomico a singola cellula e di recenti approcci di manipolazione genica al fine di controllare in modo specifico l'attività del trapianto stesso. Questo lavoro si è valso della continua e costante collaborazione con la Prof.ssa Annalisa Buffo dell'università di Torino e della interazione con diversi gruppi internazionali del consorzio europeo NeuroStemCellRepair prima e NeuroStemCellReconstruct poi, coordinati della Prof.ssa Elena Cattaneo.

Principali risultati raggiunti:

Questa attività di ricerca ha portato alla pubblicazione di diversi lavori che hanno dimostrato le potenzialità terapeutiche di un approccio di medicina rigenerativa nell'ambito della MH a partire da cellule staminali pluripotenti. In particolare, (i) in Besusso, Stem Cell Reports, 2020 abbiamo dimostrato la capacità a breve termine di progenitori striatali derivati da cellule staminali di sopravvivere, di integrarsi con i tessuti ospite e di mitigare fenotipi motori in modelli animali della MH. (ii) In Schellino, Besusso, Stem Cell Res Ther, 2023 questo approccio è stato esteso ad analisi lungo termine ed è stato abbinato ad un regime di training motorio spontaneo dimostrando come questa combinazione stimoli la connessione tra trapianto ed i tessuti dell'ospite.

(ii) Sviluppo di una piattaforma basata su cellule staminali umane per lo studio dell'instabilità del tratto CAG del gene HTT. La conoscenza acquisita nel campo delle cellule staminali mi ha permesso di partecipare allo sviluppo di un nuovo progetto dedicato a svelare i complessi meccanismi molecolari alla base dell'instabilità delle ripetizioni CAG all'interno del gene *HTT*, supportato dall'European Research Council - Advanced (GA no. 742436, titolare Prof.ssa Elena Cattaneo). In questo contesto, avvalendomi di cellule staminali umane e dell'ingegneria genetica basata sul sistema CRISPR, ho contribuito a sviluppare una piattaforma di cellule staminali umane modificata in modo da portare una cassetta di ricombinazione genica fiancheggiante il primo esone del gene *HTT*. Grazie a questa cassetta, è possibile modificare con relativa facilità

l'organizzazione strutturale dell'esone 1 del gene in modo da poter inserire varianti di interesse quali ad esempio lunghezze diverse della regione ripetuta CAG, per valutarne l'instabilità somatica *in vitro*. Grazie a questa piattaforma, che vanta attualmente numerose linee staminali distinte portanti lunghezze diverse della ripetizione CAG e sue varianti strutturali, siamo ora in grado di monitorare la stabilità somatica del tratto ripetuto sia in cellule proliferanti che nei neuroni post-mitotici derivati dalle staminali. Contestualmente è stata sviluppata una strategia molecolare e bioinformatica basata su sequenziamento genomico long-reads di terza generazione che permette a partire dal DNA genomico di misurare la lunghezza del CAG e sue variazioni di sequenza.

Principali risultati raggiunti:

Questa attività di ricerca ha richiesto un grosso sforzo sperimentale per la generazione della piattaforma cellulare e per la messa a punto di un protocollo per l'amplificazione e il sequenziamento del tratto CAG basato su tecniche di terza generazione. Il mio ruolo è stato proporre la metodologia di sequenziamento e sviluppare la pipeline di amplificazione. In questo contesto costante è stata l'interazione con il gruppo di bioinformatici per l'analisi dei dati di instabilità. I risultati ottenuti sono oggetto di una pubblicazione attualmente in fase di preparazione.

(iii) Ottimizzazione del protocollo di differenziamento striatale a partire da cellule staminali umane. La continua necessità di ottenere neuroni *in vitro* con caratteristiche striatali sempre più vicine a quelle fisiologiche, mi ha portato a contribuire a diversi studi volti ad ottimizzare il protocollo originale stabilito dal laboratorio Cattaneo (Delli Carri A., Development, 2013). Inoltre, questo sistema modello, grazie alle sue caratteristiche embrionali, risulta ideale per lo studio di aspetti inerenti allo sviluppo del corpo striato fornendo l'opportunità di investigare potenziali aspetti patologici della MH. Al fine di caratterizzare gli eventi molecolari e cellulari alla base dello sviluppo fisiologico del corpo striato nell'uomo, ho anche partecipato ad uno studio volto ad analizzare il profilo trascrizionale a singola cellula dello striato umano durante il suo sviluppo mediante approcci di single cell RNA sequencing a partire da tessuti embrionali derivati da terminazioni volontarie di gravidanza. Questi dati hanno permesso di delineare un atlante a singola cellula dello sviluppo dello striato umano pubblicato sulla rivista Science nel 2021.

Principali risultati raggiunti:

In questo ambito ho contribuito (i) allo sviluppo e alla caratterizzazione di linee staminali esprimenti fattori trascrizionali dello sviluppo del corpo striato al fine di ottenere una resa migliore di neuroni maturi (Faedo A., PNAS, 2017; IF: 9.423); (ii) all'analisi di linee pluripotenti indotte derivate da pazienti al fine di caratterizzare le ricadute in termini di differenziamento striatale (Conforti P., PNAS, 2018; IF: 9.661), (iii) allo sviluppo di un nuovo protocollo più veloce e più efficiente (Conforti P., Cell Rep Methods, 2022; IF: N/A); (iv) alla progettazione e sviluppo mediante approcci CRISPR di una linea staminale reporter per il fattore trascrizionale GSX2, chiave dello sviluppo dello striato (Besusso D., Stem Cell Res. 2020; IF:4.489); e (v) all'analisi trascrittomiche a singola cellula di tessuti embrionali umani (Bocchi V., Science 2021; IF 42.779).

Nel complesso, il mio ruolo attuale è sviluppare, supervisionare e gestire i tre progetti qui descritti e in particolare il primo di cui sono il principale responsabile. In questo contesto svolgo attività di supervisione di studenti di laurea, dottorandi e post-doc. Sono coinvolto inoltre nell'attività di reporting e di divulgazione dei risultati raggiunti.

ESPERIENZA DI RICERCA

1999-2004 Ho iniziato la mia carriera come studente sviluppando strategie terapeutiche anti-tumorali utilizzando il DNA batterico come modulatore immunitario. Avvalendomi di modelli di topo convenzionali, knock-out e transgenici, ho valutato il contributo

di sequenze di DNA batteriche nella terapia contro tumori spontanei e trapiantati. Ho analizzato anche il meccanismo di protezione, concentrandomi sul ruolo del sottogruppo linfocitario NK-T. Ho anche studiato l'espressione del recettore TLR9, che risponde al DNA batterico, nella mucosa intestinale del topo. Ho dimostrato che le cellule di Paneth, situate in gruppi da 5-15 alla base di ogni cripta intestinale e coinvolte in attività antimicrobiche, esprimono il recettore e degranulano in risposta al trattamento con CpG.

- 2004-2006 Dopo 4 anni di ricerca in immunologia sul cancro, mi sono trasferito negli Stati Uniti per acquisire specifiche competenze in biochimica e spettrometria di massa. A questo scopo, ho raggiunto il Baylor College of Medicine a Houston, dove mi sono unito al laboratorio del Dr. Jun Qin specializzato in "Network Analysis Proteomics". Qui ho acquisito un'ampia esperienza in biochimica, purificazione delle proteine e tecniche di spettrometria di massa, che ho applicato a due progetti principali. Uno di questi aveva l'obiettivo di indagare il ruolo di una proteina di riparazione del DNA chiamata Aprataxin durante la divisione cellulare. Grazie a questo progetto, ho iniziato a sviluppare un interesse per le neuroscienze e le condizioni patologiche correlate al sistema nervoso centrale (CNS).
- 2007-2009 Grazie all'esperienza acquisita nella purificazione di complessi proteici, all'inizio del 2007 ho avuto l'opportunità di unirmi al laboratorio della Dr.ssa Liliana Minichiello presso la Mouse Biology Unit dell'EMBL a Monterotondo (Roma). Qui, ho potuto applicare la mia esperienza in biochimica e spettrometria di massa a diversi modelli unici di topi geneticamente modificati che consentono l'isolamento in vivo dei complessi proteici di HTT. Nel laboratorio Minichiello, che vanta una lunga esperienza nel campo delle neurotrofine, mi sono concentrato sullo studio dell'interattoma dell'HTT in diverse aree del cervello del topo.
- 2007-2012 Durante la mia attività di ricerca presso il laboratorio della Dott.ssa Liliana Minichiello presso l'Università di Edimburgo, ho focalizzato la mia ricerca sui recettori delle neurotrofine concentrandomi sul ruolo di TrkB nei neuroni striatali di proiezione particolarmente vulnerabili nella malattia di Huntington (MH). Ho lavorato su linee di topi condizionali che ho caratterizzato ottenendo informazioni sul ruolo del segnale di TrkB nella modulazione dell'attività dei neuroni striatali di tipo D2 che proiettano al globo pallido. Un secondo progetto nel laboratorio a cui ho preso parte mi ha permesso di indagare il ruolo del segnale NGF-TrkA nello sviluppo postnatale del sistema colinergico murino e la sua rilevanza per la malattia di Alzheimer.
- 2012-2013 Ho partecipato ad un progetto mirato alla caratterizzazione *in vitro* e *in vivo* del ruolo delle cellule dendritiche nella risposta immunitaria associata all'encefalomielite sperimentale indotta (EAE), nel laboratorio del Dr. Richard Mellanby presso il QMRI, Università di Edimburgo, Regno Unito.
- 2014-oggi Da quando mi sono unito al laboratorio della Prof.ssa Elena Cattaneo presso l'Università di Milano, sono stato coinvolto nel consorzio europeo NeuroStemCellRepair (2013-2017), mirato allo sviluppo di strategie basate sulle cellule staminali per il trattamento della malattia di Huntington (HD) e Parkinson (PD). Il progetto si è poi evoluto nel nuovo consorzio europeo NeuroStemCellReconstruct (2020-2024), nel quale ho contribuito specificamente alla definizione delle strategie di WP1 e WP3 (<https://www.nsc-reconstruct.com/en/index.do>). All'interno di questo consorzio, coordino per il laboratorio le attività di ricerca e sperimentali che a partire da cellule staminali embrionali, prevedono la generazione e sviluppo di prodotti cellulari neuronali trapiantabili e compatibili con le norme GMP. In questo contesto, studio *in vivo* la

loro funzionalità e il potenziale di connessione con il tessuto ospite attraverso approcci chemogenetici, virali e molecolari mediante analisi anche a singola cellula. Sono anche responsabile del coordinamento delle attività scientifiche dei dottorandi e dei postdoc del laboratorio coinvolti nel progetto.

La mia attività di ricerca è inoltre focalizzata allo sviluppo di approcci per modellare in vitro la malattia di Huntington nell'ambito dei progetti finanziati dal European Research Council (progetto HD-Dittograph) e dalla Fondazione CHDI (<https://chdifoundation.org/>). In particolar modo mi occupo di sviluppare tecnologie di editing del genoma per studiare l'instabilità somatica delle ripetizioni del gene *HTT*. Attualmente sto sviluppando un modello basato su cellule staminali embrionali in cui l'espansione e la contrazione della regione ripetuta CAG può essere monitorata nel tempo attraverso approcci di sequenziamento di terza generazione con tecnologia Oxford Nanopore. Nell'ambito di queste attività supervisiono e coordino un gruppo di lavoro composto da due giovani ricercatori, un dottorando e un Post-doc.

ATTIVITÀ DIDATTICA A LIVELLO UNIVERSITARIO IN ITALIA O ALL'ESTERO

A.A. 2023-2024

25/09/2023 al 23/10/2023 - Laurea triennale L-13 in Scienze Biologiche, Università degli Studi di Milano; Docente in carica del modulo di Farmacologia nell'ambito del corso "Elementi di Anatomia umana, Farmacologia e Immunologia", linea A-L. F62-65.24.1. Responsabile del corso: Prof.ssa Isabella Dalle Donne. 24 ore, 3 CFU, 50 studenti.

A.A. 2022/2023

29/09/2022 al 27/10/2022 - Laurea triennale L-13 in Scienze Biologiche, Università degli Studi di Milano; Docente in carica del modulo di Farmacologia nell'ambito del corso "Elementi di Anatomia umana, Farmacologia e Immunologia", linea A-L. F62-65.23.3. Responsabile del corso: Prof.ssa Isabella Dalle Donne. 24 ore, 3 CFU, 70 studenti.

18/05/2023 - Lezione didattica: "CRISPR screening to reveal gene function and new drug targets" Course on "Stem cell and genetic diseases". Responsabile: Prof.ssa Chiara Zuccato. Molecular Biology of the Cell, Università degli Studi di Milano.

11/05/2023 - Lezione didattica: "Gene editing and stem cell for next generation therapies" Course on "Stem cell and genetic diseases". Responsabile: Prof.ssa Chiara Zuccato. Molecular Biology of the Cell, Università degli Studi di Milano.

03/05/2023 - Lezione didattica: "Ingegneria genetica e cellule staminali per le terapie del futuro" Nell'ambito del corso: "Approcci cellulari, molecolari e funzionali alle malattie genetiche". Responsabile: Prof.ssa Marta Valenza. Biologia applicata alla ricerca biomedica (Classe LM-6), Università degli Studi di Milano.

A.A. 2021/2022

18-19/10/2021 - Corso nell'ambito del "Dottorato di ricerca in biologia molecolare e cellulare", Università degli Studi di Milano, coordinatori D. Besusso, E. Cattaneo: "*Everything you need to know about single cell genomics and how to apply it to cell-based therapies: theoretical and practical course*". R11-21.22.1 - Edizione unica, 13 ore, 2 CFU

15-16/10/2021 - Corso nell'ambito del "Dottorato di ricerca in biologia molecolare e cellulare", Università degli Studi di Milano, coordinatori D. Besusso, E. Cattaneo: "*Genome editing of stem cells for advanced disease modelling*". R11-22.22.1 - Edizione unica, 12.5 ore, 2 CFU

15/04/2021 - Lezione didattica: "CRISPR Technologies and Stem Cell Engineering" nell'ambito del corso su "Stem cell and genetic diseases". Responsible: Prof.ssa Chiara Zuccato. Molecular Biology of the Cell, Università degli Studi di Milano.

A.A. 2018/2019

11/03/2019 - 19/03/2019 - "Attività didattiche integrative e compiti didattici extra-curricolari", Università degli Studi di Milano, 562/AB-supervisore per: Tirocinio percorso 11; Neurobiologia-Modulo 1; Responsabile del corso: Prof.ssa Chiara Zuccato.

16/11/2018 - Lezione didattica: "Genome Editing: history, mechanisms and applications." Course on "Tecniche Avanzate di Indagine Biomedica", Responsible Prof.ssa Chiara Zuccato, Università degli Studi di Milano.

A.A. 2017/2018

26/02/2018 - 9/03/2018 - "Attività didattiche integrative e compiti didattici extra-curricolari", Università degli Studi di Milano, 373/AB supervisore per: Tirocinio percorso 11; Neurobiologia-Modulo 1; Responsabile del corso: Prof.ssa Chiara Zuccato.

A.A. 2016/2017

16/05/2017 - Lezione didattica: "Genome editing and applications to hPSCs". Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano.

SUPERVISIONE DI TIROCINIO E TESI DI STUDENTI MASTER E DI DOTTORATO

A partire dall'anno accademico 2015-2016, ho coordinato e supervisionato le attività sperimentali, fungendo da correlatore nella preparazione delle tesi di laurea sperimentale o di dottorato per i seguenti studenti:

Gianluca Damaggio Dottorato di Ricerca con tesi dal titolo: "*HD-DittoGraph: a digital human Embryonic Stem Cell platform for Huntington's repeats*", discussione prevista nel 2024. University Federico II, Napoli, Italy

Manuel Cernigoj Dottorato di Ricerca con tesi dal titolo: "*Investigating the immediate consequences of normal and mutant HTT loss in HD-hESC through the dTAG system*", 2021 Università degli Studi di Milano, Italy.

Christian Cassarino, Tesi Specialistica dal titolo: "*Molecular strategies to modulate ESC-derived transplants*", 2023, Università degli Studi di Milano, Italy. Voto finale: 110/110 cum laude.

Greta Galeotti, Tesi Specialistica dal titolo: "*Strategies to increase the production of human striatal neurons from stem cells for Huntington's Disease cell therapy*". 2022. Università degli Studi di Milano, Italy. Voto finale: 110/110 cum laude.

Pasquale Ogno, Tesi Specialistica dal titolo: "*Caratterizzazione di una piattaforma cellulare ricombinante per il gene Huntington.*" 2021. Università degli Studi di Milano, Italy. Voto finale: 92/110.

Ayat Omer Ahmed Mohamed, Tesi Specialistica dal titolo: “*CRISPR/Cas9-engineered hESC models to investigate Huntingtin Exon 1 function and striatal differentiation.*” 2020. Università degli Studi di Milano, Italy. Voto finale: 110/110 cum laude.

Andrea Cossu, Tesi Specialistica dal titolo: “*Generazione di linee hES per l’arricchimento di progenitori striatali in vitro per trapianto sperimentale nel modello Huntington*”. 2019. Università degli Studi di Milano, Italy. Voto finale: 110/110 cum laude.

Manuel Cernigoj, Tesi Specialistica dal titolo: “*Strategie per la Riprogrammazione di fibroblasti a neuroni striatali come modello di malattia di Huntington.*” 2017. Università degli Studi di Milano, Italy. Voto finale: 110/110 cum laude.

Sara Oppi, Tesi Specialistica dal titolo: “*Differenziamento a neuroni striatali di cellule staminali embrionali “Clinical Grade*”. 2016. Università degli Studi di Milano, Italy. Voto finale: 110/110 cum laude.

DOCUMENTATA ATTIVITÀ DI FORMAZIONE O DI RICERCA PRESSO QUALIFICATI ISTITUTI ITALIANI O STRANIERI;

2021-ad oggi - Ricercatore (RTD-A) presso il dipartimento di Bioscienze dell’Università degli Studi di Milano, Italy.

2014-2020 - Senior Postdoc presso il laboratorio della Prof.ssa Elena Cattaneo, nel dipartimento di Bioscienze dell’Università degli Studi di Milano, Italy.

2013-2014 - Research Assistant presso il laboratorio del Dott. Richard Mellanby, Università di Edimburgo, Queen’s Medical Research Institute; Edimburgo, Scozia (UK).

2010-2012 - Postdoctoral fellow presso il laboratorio della Dott.ssa Liliana Minichiello, Centre for Neuroregeneration School of Biomedical Sciences; Università di Edimburgo, Chancellor’s Building; Edimburgo, Scozia (UK).

2007-2009 - Postdoc presso il laboratorio della Dott.ssa Liliana Minichiello, Mouse Biology Unit, EMBL, Monterotondo (Rome -Italy).

2004-2006 - Pre-doctoral fellow presso il laboratorio del Prof. Jun Qin, Department of Biochemistry and Cell Biology at the Baylor College of Medicine, Houston, Texas, (USA).

2001-2004 - Borsista presso l’unità di Bersagli molecolari, Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy.

1999-2001 - Tirocinio di tesi sperimentale presso il laboratorio del Prof. Andrea Balsari, presso l’unità di Bersagli molecolari, Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy.

REALIZZAZIONE DI ATTIVITÀ PROGETTUALE

Progetti nazionali ed internazionali alla cui stesura ed elaborazione ho direttamente contribuito e che sono risultati vincenti:

(i) PRIN 2022, dal titolo “*In vitro and in vivo molecular mapping of cell therapy for Huntington Disease at single cell resolution*”
Coordinatore E. Cattaneo; 2 partners; budget totale richiesto 255.675 Euro

Il mio ruolo nella proposta complessiva: Ho proposto e progettato le parti scientifiche relative all'identificazione mediante barcodes delle cellule donatrici prima del trapianto e agli esperimenti su singole cellule per identificare i tipi di cellule donatrici che contribuiscono in modo più attivo all'effetto terapeutico del trapianto in un modello di ratto di malattia di Huntington.

(ii) Large-Scale Integrated EU Project dal titolo “NSC-Reconstruct: Novel Strategies for Cell-based Neural Reconstruction”. Finanziato dal EU Horizon 2020 GA no. 875758.

Coordinatore E. Cattaneo; 15 partners.

Il mio ruolo all'interno del progetto: identificazione e implementazione delle condizioni di sopravvivenza e differenziamento di neuroni striatali umani derivati dalle cellule staminali dopo il trapianto nel cervello del modello animale affetto da malattia di Huntington (MH). Mi occupo dello studio dell'interazione tra le cellule donatrici (sane) e le cellule ospiti supervisionando e coordinando gli sforzi scientifici all'interno del laboratorio finalizzati a una terapia cellulare per la malattia di Huntington. Sono responsabile della comunicazione dei dati e degli obiettivi raggiunti all'Unione Europea e del coordinamento degli scambi scientifici e delle collaborazioni sul tema dell'ingegneria delle cellule staminali e degli studi *In vivo*.

(iii) ERC Advanced Grant 742436 dal titolo “HD-DittoGraph: a digital human Embryonic Stem Cell platform for Huntington's repeats”. Finanziato nel contesto di H2020-EU.1.1. - EXCELLENT SCIENCE - European Research Council (ERC) GA no. 742436. Responsible PI: E. Cattaneo.

Il mio ruolo all'interno del progetto: proponente ed ideatore della strategia di sviluppo della piattaforma di cellule staminali necessaria per raggiungere gli obiettivi del progetto. Inoltre, ho progettato la strategia di screening per l'identificazione di modificatori genetici dell'instabilità delle ripetizioni CAG del gene HTT. Coordino le attività per la generazione della piattaforma e supervisiono le attività del personale coinvolto nel progetto.

(iv) CHDI Foundation “Joint Steering Committee on stem cell for HD research” 2016-oggi.

Questo finanziamento è il risultato di una intesa contrattuale tra il laboratorio Cattaneo e la fondazione americana CHDI. Quest'ultima si occupa di finanziare e coordinare attività di ricerca nell'ambito della MH al fine di accelerare la progressione verso una terapia. In questo contesto il laboratorio conta tre progetti attivi e per due di questi svolgo il ruolo di coordinatore delle attività di ricerca inerenti. Questi due progetti sono volti a (i) sviluppare approcci *in vitro* per investigare meccanismi molecolari della malattia e (ii) caratterizzare lo sviluppo embrionale del corpo striato mediante moderni approcci di sequenziamento a singola cellula.

Nello specifico:

- coordino le attività sperimentali
- propongo e sviluppo approcci e sistemi per rispondere alle domande biologiche
- coordino e partecipo all'attività di reporting dirette alla fondazione. Gli avanzamenti scientifici vengono discussi con un comitato della fondazione ogni tre mesi durante una riunione di due giorni che si svolge tre volte l'anno a Milano e una volta presso la sede centrale della fondazione a New York.

(v) PRIN 2015 dal titolo “Generation of functional striatal neurons for brain repair in Huntington Disease”. Finanziato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca. Responsabile PI: E. Cattaneo (2017-2020).

Il mio ruolo all'interno del progetto: Supervisione e coordinamento delle attività scientifiche legate allo sviluppo di strategie di sostituzione cellulare per la malattia di Huntington a partire dalle cellule staminali pluripotenti. In questa collaborazione con la Prof.ssa Annalisa Buffo presso l'Università di Torino, mi occupo della fase di sviluppo scientifico *in vitro* dei derivati striatali differenziati dalle cellule staminali. Questi prodotti vengono generati nel laboratorio di Milano e, quando raggiungono lo stadio di progenitore, vengono trasportati a Torino per essere trapiantati nei modelli di ratti affetti dalla malattia di Huntington. La mia responsabilità principale è la supervisione e il progresso scientifico della fase *in vitro*, oltre alla coordinazione

delle attività con il laboratorio della Prof.ssa Buffo. Questa collaborazione ha portato a progressi significativi nello sviluppo preclinico di una terapia basata sulle cellule staminali per la malattia di Huntington.

(vi) Large-Scale Integrated EU Project dal titolo “NeuroStemcellRepair. The European stem cell consortium for neural cell replacement, reprogramming and functional brain repair”. Finanziato nell’ambito del programma europeo FP7 GA no. 602278 e coordinato dalla Prof.ssa Elena Cattaneo - Università di Milano, con il Prof. Ernest Arenas come coordinatore aggiunto presso il Karolinska Institutet. 2014-2019

Il mio ruolo all’interno del progetto: Ho identificato il tipo di cellula donatrice più adatta per il trapianto nel modello murino di malattia di Huntington. Ho coordinato le attività scientifiche che hanno portato al primo trapianto riuscito in modelli animali della malattia. All’interno di questo progetto ho collaborato con i laboratori del Prof. Alessandro Vercelli e della Prof.ssa Annalisa Buffo presso l’Università di Torino per la realizzazione e sviluppo delle attività sperimentali sia *in vitro* che *in vivo*.

Progetti nazionali ed internazionali alla cui stesura ed elaborazione ho direttamente contribuito e che stati sottomessi:

(i) Fondazione Telethon - Multiround 21-24 - Round 3 2023 Track Basic, GMR23T1216. Investigating the relationship between HTT CAG repeats, somatic instability and neuronal dysfunction in Huntington’s Disease using a highly parallel stem cell-based single cell approach. Lead Applicant: Dr Dario Besusso. In questo contesto mi sono occupato dell’ideazione e dell’intera stesura della richiesta di finanziamento.

(ii) ERC Synergy Grant 2022 dal titolo “Custom-made neurons for cell therapy in PD and HD” sottomesso nel mese di Novembre 2022 e risottomesso nel Novembre 2023. Coordinatore, Prof.ssa E. Cattaneo; 4 partners; finanziamento totale richiesto: 10.194.821 Euro. Il mio ruolo nella stesura del progetto: Ho proposto e progettato: (i) le strategie cellulari e molecolari per il potenziamento e il controllo dell’attività e della funzione dei trapianti di progenitori striatali nella malattia di Huntington; (ii) le strategie per la selezione dei tipi di cellule derivate da cellule staminali pluripotenti umane per una composizione razionale del trapianto; (iii) la progettazione delle strategie per generare derivati di cellule staminali resistenti alla malattia per sostenere l’attività terapeutica a lungo termine del trapianto.

ATTIVITÀ DI RELATORE A CONGRESSI E CONVEGNI NAZIONALI E INTERNAZIONALI

15 November, 2023

Giornata a tema presso l’Accademia Medica di Roma su “Modelli cellulari e strategie terapeutiche per la malattia di Huntington” Moderatore: Antonio Musarò, Sapienza Università di Roma; Intervento dal titolo: Staminali ed editing genomico per lo studio della malattia di Huntington. Relatore: Dario Besusso, Università degli Studi di Milano - Rome, Italy.

14-17 September, 2023

20th National Congress of the Italian Society for Neuroscience, Symposium "From ontogenesis, to physiology and cell replacement: insight into the striatum" proposed by Dr D. Besusso with Prof. A. Buffo (Università di Torino) and Prof. G. Martino (HSF, Milano), - Torino, Italy

11-13 April, 2023

NSC-Reconstruct Annual Meeting, speaker ed chair della sessione “Turn struggle into inspiration”,

Bellagio, Italy.

25-26 Gennaio, 2023

Chair per la sessione “Approaches to the study of neural heterogeneity and transplant composition” nell’ambito del NSC-Reconstruct Workshop, Munich (Germany).

8-10 Novembre, 2020

31st Annual meeting of the Network for European CNS Transplantation and Restoration (NECTAR).
Presentazione orale: “An optimized protocol for efficient production of hESC-derived striatal projection neurons that can rapidly mature in vivo.” Online.

2-4 Marzo, 2020

Cell Symposia: Gene- and Cell-Based Therapies: CRISPR, Stem Cells, and Beyond; San Francisco, USA. Oral presentation su invito: “ESC-based cell therapy in a preclinical model of Huntington disease”

1-4 Ottobre, 2017

17th Italian Society for Neuroscience Congress, Ischia, Italy

Presentazione orale: “Harnessing CRISPR/Cas9 technology to generated stem cell-based model of Huntington disease”.

8-10 Aprile, 2017

Neurostemcellrepair Annual Meeting, Presentazione orale: “Genome engineering for improving HD modeling and cell therapy”, Bellagio, Italy.

9-11 Aprile, 2016

NeurostemcellRepair Annual Meeting, Presentazione orale: “Cell replacement and 3D modelling potential of hESC-derived neural progenitors in HD”. Bellagio. Italy.

8-10 Novembre, 2015

Neurostemcellrepair Workshop & Public Event at the Italian Republic Senate, Presentazione orale: “Progress in hES-based cell therapy for HD”. Roma, Italy.

11-13 Aprile, 2015

Neurostemcellrepair Annual Meeting, Presentazione orale: “Improved MSNs differentiation and transplantation of hES and iPS cells by employing TFs and morphogens”. Bellagio. Italy.

23 Maggio, 2012

Neuroscience Seminar Series 2012. Centre for Neuroregeneration (CNR) - Edinburgh University, Biomedical Science, Presentazione orale: “Huntington Disease and BDNF signaling”, 23 May, 2012.

TITOLI DI CUI ALL’ARTICOLO 24 COMMA 3 LETTERA A) E B) DELLA LEGGE 30 DICEMBRE 2010, N. 240

01/02/2021 - 31/01/2024

RICERCATORE A TEMPO DETERMINATO (Lettera A), presso il Dipartimento di Bioscienze SSD BIO/14 - FARMACOLOGIA, Settore concorsuale 05/G1 - FARMACOLOGIA, FARMACOLOGIA CLINICA E FARMACOGNOSIA.

PRODUZIONE SCIENTIFICA

Indici bibliografici (SCOPUS)

15 years: *h-index*: 12; total publications: 19; total citations: 517; average IF: 8.89

10 years: *h-index*: 10; total publications: 16; total citations: 349; average IF: 11.90

5 years: *h-index*: 7; total publications: 13; total citations: 242; average IF: 13.723

Dal 2001, ho contribuito alla produzione scientifica con un totale di 27 manoscritti indicizzati, compresa una review per *Nat Rev Neurol.* nel 2021 (IF: 27.00). Il mio impact factor medio degli ultimi 5 anni si attesta a 13.723, mentre il numero totale di citazioni raggiunge la cifra di 517, secondo i dati di Scopus. Tra le mie pubblicazioni originali di rilievo per cui ho contribuito in qualità di primo autore, spiccano contributi su riviste come *Stem Cell Reports* (IF:5.499), *Stem Cell Res Ther* (IF: 7.500), *Nat. Commun.* (IF: 17.694), e *Nat. Neuroscience* (IF: 15.251). Ho inoltre contribuito come primo autore per una review per la rivista *Nat. Rev. Neurol.* nel 2021 dove viene suggerito un nuovo approccio all'utilizzo delle cellule pluripotenti per stabilire modelli cellulari che siano più attendibili nel predire aspetti clinici delle malattie neurodegenerative. In questi anni ho anche contribuito allo sviluppo di approcci basati sulle recenti tecnologie di manipolazione genica di tipo CRISPR per lo sviluppo di modelli staminali umani reporter per fattori di trascrizione chiave dello sviluppo del corpo striatale. Questo modello è stato pubblicato sulla rivista *Stem. Cell. Res.* nel 2020 (IF: 4.489).

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

1. Zobel M., Mignogna ML., Scalzo D., Damaggio G., Battistella M., Rossi R., Colonna E., Besusso D., Cattaneo E. CAG repeat purity, not polyglutamine, drives Huntington's Disease pathology in hESC-derived neurons. *In preparation.*
2. Galimberti M., Nucera MR., Bocchi Dickinson V., Conforti P., Vezzoli E., Falqui A., Cordiglieri C., Cremona M., Espuny-Camacho I., Faedo a., Ranzani V., Zuccato C., Besusso D., Cattaneo E. Non-cell autonomous rescue of HD cell type-specific vulnerability in mosaic organoids. Submitted in *Nat. Neurosci.* 2023.
3. Schellino R.*, Besusso D.*, Parolisi R., Gómez-González G.B., Dallere S., Scaramuzza L., Ribodino M., Campus I., Conforti P., Parmar M., Boido M., Elena Cattaneo E., Buffo A. Enriched environment promotes long-term human striatal graft maturation, circuits reconstruction and motor recovery in a rat model of Huntington's disease. *Stem Cell Res Ther.* 2023 Jul 28;14(1):189. doi: 10.1186/s13287-023-03422-4. IF: 7.500. * co-first authors
4. Conforti P., Bocchi V.D., Campus I., Scaramuzza L., Galimberti M., Lischetti T., Talpo F., Pedrazzoli M., Murgia A., Ferrari I., Cordiglieri C., Fasciani A., Arenas E., Felsenfeld D., Biella G., Besusso D., Cattaneo E. In vitro derived medium spiny neurons recapitulate human striatal development and complexity at single-cell resolution. *Cell Rep Methods.* 2022 Dec 19;2(12):100367. doi: 10.1016/j.crmeth.2022.100367. IF: N/A.
5. Wang Y., Bel L., Russell C., Armstrong C., Wu Y., Spampanato J., Cui J., Tarboton P., Besusso D., Vezzoli E., Das S., Coon H., Shcheglovitov, A. Modeling human telencephalic development and autism-associated SHANK3 deficiency using organoids generated from single neural rosettes. *Nat Commun.* 2022 Oct 6;13(1):5688. doi: 10.1038/s41467-022-33364-z. IF: 17.694
6. Bocchi Dickinson V., Conforti P., Vezzoli E., Besusso D., Cappadona C., Lischetti T., Galimberti M., Ranzani V., Bonnal R.J.P., De Simone M., Rossetti G., Espuny-Camacho I., Faedo A., Gervasoni F., Vuono R., He X., Chen J., Felsenfeld D., Pavesi G., Barker R.A., Pagani M. and Cattaneo E. The coding and long non-coding single-cell atlas of the developing human fetal striatum. *Science* 2021, 2021 May 7;372(6542):eabf5759. doi: 10.1126/science.abf5759. IF:42.779
7. Rivetti di Val Cervo P.*, Besusso D.*, Conforti P., Cattaneo E. hiPSCs for predictive

modelling of neurodegenerative diseases: dreaming the possible. *Nat Rev Neurol*. 2021 Mar 3;1-12. doi: 10.1038/s41582-021-00465-0. IF: 27.00. * co-first authors

8. Cozzolino F., Vezzoli E., Cheroni C., Besusso D., Conforti P., Valenza M., Iacobucci I., Monaco V., Birolini G., Bombaci M., Falqui A., Saftig P., Rossi R.L., Monti M., Cattaneo E., Zuccato C. ADAM10 hyperactivation acts on piccolo to deplete synaptic vesicle stores in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2021 Feb 18;ddab047. doi: 10.1093/hmg/ddab047. IF:5.100.
9. Besusso D., Cossu A., Mohamed A., Cernigoj M., Codega P., Galimberti M., Campus I., Conforti P., Cattaneo E. A CRISPR-strategy for the generation of a detectable fluorescent hESC reporter line (WAe009-A-37) for the subpallial determinant GSX2. *Stem Cell Res*. 2020 Dec;49:102016. doi: 10.1016/j.scr.2020.102016. IF:4.489.
10. Besusso D.*, Schellino R.*, Boido M., Belloli S., Parolisi R., Conforti P., Faedo A., Cernigoj M., Campus I., Laporta A., Dickinson Bocchi V., Murtagh V., Parmar M., Spaiardi P., Talpo F., Maniezzi C., Toselli M.G., Biella G., Moresco R.M., Vercelli A., Buffo A. and Cattaneo E. Stem cell derived human striatal progenitors innervate striatal targets and alleviate sensorimotor deficit in a rat model of Huntington Disease. *Stem Cell Reports*, 2020 May 12;14(5):876-891. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.03.018. IF:5.499. * co-first authors
11. Vezzoli E., Caron I., Talpo F., Besusso D., Conforti P., Battaglia E., Sogne E., Falqui A., Petricca L., Verani M., Martufi P., Caricasole A., Bresciani A., Cecchetti O., Rivetti di Val Cervo P., Sancini G., Riess O., Phuc Nguyen H., Seipold L., Saftig P., Biella G., Cattaneo E., Zuccato C. Inhibiting pathologically active ADAM10 rescues synaptic and cognitive decline in Huntington's disease. *J Clin Invest*. 2019 May 6;130. doi: 10.1172/JCI120616. IF:13.25.
12. Mair I., Besusso D., Saul L, Patel S.D., Ravindran R., McPherson R.C., Leech M.D., O'Connor R.A., Anderton SM, Mellanby RJ. PD-1 expression is upregulated on adapted T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis but is not required to maintain a hyporesponsive state. *Eur J Immunol*. 2019 Jan;49(1):112-120. doi: 10.1002/eji.201847868. IF 4.247.
13. Conforti P., Besusso D., Bocchi VD., Faedo A., Cesana E., Rossetti G., Ranzani V., Svendsen C.N., Thompson L.M., Toselli M., Biella G., Pagani M., Cattaneo E. Faulty neuronal determination and cell polarization are reverted by modulating HD early phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(4):E762-E771. doi: 10.1073/pnas.1715865115. IF: 9.661.
14. Faedo A, Laporta A, Segnali A, Galimberti M, Besusso D, Cesana E, Belloli S, Moresco RM, Tropiano M, Fucà E, Wild S, Bosio A, Vercelli AE, Biella G, Cattaneo E. Differentiation of human telencephalic progenitor cells into MSNs by inducible expression of Gsx2 and Ebf1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jan 30. pii: 201611473. doi: 10.1073/pnas.1611473114. IF: 9.423.
15. Saul L, Besusso D, Mellanby RJ. LPS-matured CD11c+ bone marrow-derived dendritic cells can initiate autoimmune pathology with minimal injection site inflammation. *Lab Anim*. 2017 Jun;51(3):292-300. doi: 10.1177/0023677216663584. IF: 1.450.
16. Besusso D., Saul L., Leech M.D., O'Connor R.A., MacDonald A.S., Anderton S.M., Mellanby R.J. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-Conditioned CD11c+ Dendritic Cells are Effective Initiators of CNS Autoimmune Disease. *Front Immunol*. 2015, 18;6:575. doi: 10.3389/fimmu.2015.00575. IF:5.695.
17. Besusso D., Geibel M., Kramer D., Pendolino V., Picconi B., Calabresi P., Minichiello L.

Depletion of BDNF/TrkB signaling in striatopallidal neurons alters inhibition of locomotor behaviour. *Nat Commun.* 2013; 4:2031. doi: 10.1038/ncomms3031. IF:11.329.

18. Besusso D.*, Müller M.*, Triaca V.*, Costanzi M., Horn JM., Koudelka J., Geibel M., Cestari V., and Minichiello L. Loss of NGF-TrkA Signaling From The Central Nervous System Is Not Sufficient To Induce Cognitive Impairments in Young-Adult or Intermediate-Aged Mice. *J Neurosci.* 2012 Oct 24;32(43):14885-98, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2849-12.2012. IF: 15.251. * co-first authors
19. Leng M, Besusso D, Jung SY, Wang Y, Qin J. Targeting Plk1 to chromosome arms and regulating chromosome compaction by the PICH ATPase. *Cell Cycle.* 2008 May 15;7(10):1480-9, doi: 10.4161/cc.7.10.5951. IF: 3.952.
20. Mu JJ, Wang Y, Luo H, Leng M, Zhang J, Yang T, Besusso D, Jung SY, Qin J. A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *J Biol Chem.* 2007 Jun 15;282(24):17330-4, doi: 10.1074/jbc.C700079200.. IF: 4.573.
21. Sfondrini L, Rossini A, Besusso D, Merlo A, Tagliabue E, Menard S, Balsari A. Antitumor Activity of the TLR-5 Ligand Flagellin in Mouse Models of Cancer. *J Immunol.* 2006 Jun 1;176(11):6624-30, doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6624. IF: 5.95
22. Rumio C.*, Besusso D.*, Arnaboldi F., Palazzo M., Selleri S., Gariboldi S., Akira S., Uematsu S., Bignami P., Ceriani V., Menard S., Balsari A. Activation of smooth muscle and myenteric plexus cells of jejunum via toll-like receptor 4. *J Cell Physiol.* 2006 Jul;208(1):47-54, doi: 10.1002/jcp.20632. IF:3.839. * co-first authors
23. Rumio C.*, Besusso D.*, Palazzo M., Selleri S., Ménard S. and Balsari A.: "Paneth cells express Toll-like Receptor 9 and degranulate after exposure to bacterial DNA". *Am. J. Pathol.*, 2004 Aug;165(2):373-81, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63304-4. * C.R. and D.B. contributed equally to this work and positions are interchangeable. IF:6.967. * co-first authors
24. Nardini E., Morelli D., Aiello P., Besusso D., Calcaterra C., Mariani L., Palazzo M., Vecchi A., Paltrinieri S., Menard S., Balsari A. CpG-oligodeoxynucleotides induce mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood in association with mouse KC (IL-8) production. *J Cell Physiol.* 2005 Sep;204(3):889-95, doi: 10.1002/jcp.20360. IF: 3.839.
25. Battaini F., Besusso D., Sfondrini L., Rossini A., Morelli D., Tagliabue E., Menard S., Balsari A. Antibody response after vaccination with antigen-pulsed dendritic cells. *Int J Biol Markers.* 2004 Jul-Sep;19(3):213-20. IF: 0.92.
26. Balsari A., Tortoreto M., Besusso D., Petrangolini G., Sfondrini L., Maggi R., Ménard S. and Pratesi G. "Combination of a CpG-oligodeoxynucleotide and a topoisomerase I inhibitor in therapy of human tumor xenografts." *Eur. J. Cancer*, 2004 May;40(8):1275-81, doi: 10.1016/j.ejca.2004.01.023. IF: 5.417.
27. Sfondrini L., Besusso D., Bronte V., Macino B., Colombo M.P., Ménard S., Balsari A.: "CpG-Oligodeoxynucleotides activate tyrosinase-related protein 2-specific T lymphocytes but do not lead to a protective tumor-specific memory response". *Cancer Immunol. Immunother.*, 2004 Mar; 18, doi: 10.1007/s00262-004-0516-x. IF: 4.086.
28. Sfondrini L., Besusso D., Rumio C., Rodolfo M., Ménard S. and Balsari A.: "Prevention of spontaneous mammary adenocarcinoma in Her-2/neu transgenic mice by CpG-oligodeoxynucleotides". *FASEB Journal.* 2002 Nov; 16(13):1749-54, doi: 10.1096/fj.02-

0383com. IF: 5.299.

29. Sfondrini L., Besusso D., Zoia M.T., Rodolfo M., Invernizzi A.M., Taniguchi M., Nakayama T., Colombo M.P., Ménard S. and Balsari A.: “Absence of the CD1 molecule upregulates anti-tumor activity induced by CpG oligodeoxynucleotides in mice”. J Immunol. 2002 Jul 1; 169(1):151-8, doi: 10.4049/jimmunol.169.1.151. IF: 4.920.

ATTIVITA' DIVULGATIVE

UniStem Day (2023, Marzo 2022, Marzo 2018 e Ma 2017, Milan

Ho coordinato le attività per un gruppo di 40 studenti delle scuole superiori e li ho introdotti alle tecnologie di imaging, all'approccio di ricerca nel campo della microscopia, dell'editing genico, al sequenziamento di terza generazione e delle tecnologie delle cellule staminali. Gli studenti hanno potuto vedere di persona e apprendere i principi di base della tecnologia confocale e degli screening ad alto contenuto.

UniStem Day 2015, March 13, Varese

“Riparare il cervello: cellule staminali e non solo”. University of Insubria, Varese;

Data

24/11/2023

Luogo

Milano