2015

LA RICERCA SULLA SCLEROSI MULTIPLA

Finanziata dalla

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

A cura di
Roberta Guglielmino
Area Ricerca scientifica AISM-FISM

Coordinamento editoriale
Silvia Zino
Area Comunicazione e Ufficio Stampa AISM

Progetto grafico
Francesca Massa

Copyright 2015
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - Onlus
Via Operai 40 - 16149 Genova
Tel. 010 27 13 226
Fax 010 27 13 205
fism@aism.it

Tutti i diritti sono riservati. È vietata la riproduzione con qualsiasi mezzo,
anche se parziale, senza il permesso scritto dell'editore

Pubblicato e distribuito da
Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Onlus
Via Operai, 40 - 16149 Genova

ISBN 9788871481043

INTRODUZIONE / INTRODUCTION

Mario A. Battaglia 7

Insieme, siamo più forti della sclerosi multipla / Together, we are stronger than multiple sclerosis

Paola Zaratin 11

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Filippi Massimo 16

Definizione della rete di connettività strutturale e funzionale nella sclerosi multipla tramite l'applicazione dell'approccio "graph theory"

Mapping structural and functional brain networks in multiple sclerosis: a graph theory approach

Filippi Massimo 19

Mappatura regionale della struttura e delle funzioni dell'ippocampo nella sclerosi multipla: correlazioni con le forme cliniche della malattia e con il deficit cognitivo

Regional mapping of hippocampal structure and function in multiple sclerosis: correlations with disease clinical phenotypes and cognitive impairment

Bove Marco 22

L'impatto della riabilitazione motoria e cognitiva sulle proprietà dinamiche della struttura cerebrale: verso la personalizzazione di interventi terapeutici in pazienti affetti da sclerosi multipla

The impact of motor and cognitive rehabilitation on the dynamic properties of brain structure: towards the individual tailoring of therapeutic interventions in multiple sclerosis patients

Trompetto Carlo 26

Effetto delle onde d'urto sulla rigidità della caviglia in pazienti con sclerosi multipla

Effects of shock waves on ankle stiffness in patients with multiple sclerosis

Restivo Domenico Antonio 29

Valutazione dell'efficacia della stimolazione transcranica a corrente diretta (tDCS) nella disfagia associata a sclerosi multipla

Transcranial direct current stimulation (tcs) for dysphagia associated to multiple sclerosis

Malucchi Simona 31

Studio longitudinale sul funzionamento neuropsicologico in pazienti con sclerosi multipla in confronto con la popolazione generale

Longitudinal study of neuropsychological functioning in multiple sclerosis patients in comparison to general population

Furlan Pier Maria 34

L'efficacia dell'Eye Movement Desensitization and Reprocessing (EMDR) in pazienti con disturbo post traumatico da stress con diagnosi di sclerosi multipla. Uno studio randomizzato controllato

The efficacy of Eye Movement Desensitization and Reprocessing (EMDR) in patients with post-traumatic stress disorder in multiple sclerosis. A randomized controlled trial

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA / DISEASE CLASSIFICATION AND DIAGNOSIS

Martucci Morena 38

Identificazione di marcatori infiammatori e dei relativi meccanismi specifici per la sclerosi multipla

Identification of inflammatory biomarkers related to underlying multiple sclerosis specific mechanisms

Martinelli Vittorio 41

Caratterizzazione di profili di espressione di geni e di microRNA da cellule di sangue perifierico di pazienti affetti da sclerosi multipla

Characterization of genes and microRNAs expression profiles from peripheral blood cells in patients affected by multiple sclerosis

Magliozzi Roberta 43

Studio neuropatologico e molecolare mirato a comprendere la relazione tra processo infiammatorio nelle meningi e danno cerebrale corticale nella sclerosi multipla

A combined neuropathological and molecular study addressing the link between meningeal inflammation and cortical brain damage in multiple sclerosis

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

Salvetti Marco 48
Caratterizzazione dei genotipi del virus di Epstein-Barr nella sclerosi multipla attraverso approcci di sequenziamento massivo
Characterization of Epstein-Barr virus genotypes in multiple sclerosis through next generation sequencing approaches

D'Alfonso Sandra 51
Mappatura fine dei loci di suscettibilità alla sclerosi multipla nella popolazione dell'Italia continentale: dai marcatori genetici identificati attraverso studi di associazione genome-wide alle varianti causali
Fine-Scale mapping of multiple sclerosis loci in the Continental Italian population: from tag genetic markers identified in Genome Wide Association studies to causal variants

Bergamaschi Laura 56
Analisi molecolare dell'espressione allele specifica di IL-7Ralpha e il suo effetto sul segnale mediato da IL-7 in cellule: mDC, CD4+ e CD8+ isolate da pazienti con sclerosi multipla e controlli sani
Molecular analysis of IL-7Ralpha allele specific expression and IL7 signaling in mDCs, CD4+ and CD8+ T cells from multiple sclerosis patients and controls

Di Luca Dario 59
Studio delle alterazioni nelle risposte antivirali dell'immunità innata in pazienti con sclerosi multipla
Study of altered antiviral innate immunity responses in multiple sclerosis patients

Musio Silvia 61
Il ruolo dei basofili nella encefalite autoimmune sperimentale, un modello animale di sclerosi multipla
The role of basophils in experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis

Lucca Liliana Elisa 64
Linfociti T che co-riconoscono antigeni mielinici e neuronali: tolleranza immunologica e contributo relativo all'autoimmunità del sistema nervoso centrale
Myelin reactive T-cells that co-recognise a neuronal antigen: immune tolerance and relative contribution to central nervous system autoimmunity

Falcone Marika 67
Ruolo dei meccanismi immunoregolatori intestinali nella patogenesi della sclerosi multipla
Gut immune regulation in multiple sclerosis patients

Martire Serena 70
Studio dei meccanismi alla base della deregolazione del gene anti-infiammatorio TNFAIP3 in pazienti con sclerosi multipla
Deeper insight into the mechanisms underlying the deregulation of the anti-inflammatory gene TNFAIP3 in patients with multiple sclerosis

Sambucci Manolo 73
Ruolo svolto dall'immunosenescenza nell'insorgenza e nella progressione della sclerosi multipla
A role for immunosenescence in the onset and progression of multiple sclerosis

Valtorta Flavia 76
Ruolo delle citochine pro- e anti-infiammatorie nella modulazione dell'attività e della composizione presinaptica: nuove prospettive nella ricerca sulla sclerosi multipla
Role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the modulation of presynaptic composition and functioning: new perspectives in multiple sclerosis research

Falco Anna 79
Regolazione degli interneuroni cerebrali e spinali da parte delle GTPasi Rac
Regulation of cerebral and spinal interneurons by Rac GTPases

Vinet Jonathan 82
Caratterizzazione di un fenotipo microgliale favorevole alla rimielinizzazione
Characterization of a supportive phenotype of microglia toward remyelination

VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

Furlan Roberto 85
IL-27 e IL 35 nella encefalomielite autoimmune sperimentale: un affare di famiglia
IL-27 and IL-35 in experimental autoimmune encephalomyelitis: a family affair

Pluchino Stefano 87
RNA non codificanti e plasticità terapeutica delle cellule staminali neurali
Noncoding RNAs and therapeutic plasticity of neural stem cells

Agresti Cristina 91
Studio del ruolo dei recettori del TNF durante i processi di demielinizzazione e rimielinizzazione
Studies on TNF receptor signalling during demyelination and remyelination

Uccelli Antonio 94
Studio di un modello murino transgenico per la caratterizzazione del proteoglicano NG2/CSPG4 nella patogenesi della sclerosi multipla
Exploitation of a transgenic mouse model for the unveiling of the role of proteoglycan NG2/CSPG4 in the pathogenesis of multiple sclerosis

Leocani Letizia 97
Stimolazione cerebrale transcranica a corrente diretta come terapia immunomodulante nella sclerosi multipla: studio pilota in modelli murini
Brain tDCS as a disease-modifying treatment of multiple sclerosis: a pilot study in mice models

Tuosto Loretta 99
Caratterizzazione delle vie di segnalazione del CD28 come bersagli terapeutici nella regolazione della tolleranza immunologica nella sclerosi multipla
Characterization of CD28 signalling pathways as therapeutic targets to regulate immune tolerance in multiple sclerosis

Chiocchetti Annalisa 102
Ruolo di Osteopontin a degli anticorpi anti-Osteopontina nella sclerosi multipla
Role of Osteopontin and anti Osteopontin antibodies in multiple sclerosis

Boscia Francesca 105
Studio del ruolo dell'isoforma dello scambiatore Na+/Ca2+ NCX3 nelle cellule oligodendrocitiche per individuare nuove strategie terapeutiche per il controllo della demielinizzazione e rimielinizzazione nella sclerosi multipla
Exploring the role of the Na+/Ca2+ exchanger NCX3 in oligodendrocytes to establish new strategies to control demyelination and remyelination in multiple sclerosis

De Simone Roberta 108
I mitocondri come bersagli e mediatori degli effetti benefici degli agonisti PPARγ nella sclerosi multipla
Mitochondria as targets and mediators of the PPARγ agonist beneficial effects in multiple sclerosis

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DALLA FISM /
FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS
2014, 2013 113

COMITATO SCIENTIFICO FISM /
FISM SCIENTIFIC COMMITTEE
2014, 2013 120

LISTA DEGLI AUTORI /
LIST OF THE AUTHORS 126

Introduzione

«Si deve assicurare lo sviluppo continuo di una ricerca rigorosa e innovativa, capace di produrre evidenze che impattino sulla vita delle persone con SM»: così l'Associazione Italiana Sclerosi Multipla, AISM, apre l'Agenda della Sclerosi Multipla che presenta nella Settimana Nazionale 2015 della SM.

Un'Agenda che, come vuole la parola stessa, mette in rilievo le azioni quotidiane necessarie per concretizzare quella "Carta dei Diritti delle persone con SM" che tanti ricercatori hanno firmato e condiviso durante il Congresso 2014 della Fondazione di AISM.

Infatti, il punto di partenza della ricerca scientifica che AISM da 47 anni indirizza, promuove e sostiene è anche la sua meta: arrivare a sconfiggere definitivamente la sclerosi multipla affermando il diritto delle persone con SM ad essere anzitutto persone, cioè ad avere dalla ricerca le risposte che consentano loro di mettere in opera al meglio le proprie qualità umane e professionali. In una parola, di essere "protagonisti" della propria storia e "risorse" per la collettività, prima che "pazienti".

La strada per arrivare a dare risposte concrete alla persona con SM, che è sempre l'autentico centro di ogni ricerca scientifica promossa da AISM, è sostanzialmente una: bisogna mettersi insieme, tutti gli attori devono cooperare, verso questo stesso obiettivo.

Bisogna che ciascun ricercatore collochi sempre la propria ricerca nel quadro ampio composto da tutto ciò che gli altri ricercatori nel mondo stanno scoprendo, favorendo interazioni e sinergie in grado di valorizzare sempre più i risultati della ricerca.

Ecco un punto nodale, che emerge leggendo questo prezioso Compendio dei 23 progetti di ricerca e delle 8 borse di studio finanziate dalla Fondazione di AISM e conclusi nel 2014: è fondamentale che ogni ricerca sulla SM si interfacci con l'insieme di tutte le altre. Le ricerche in neuro-riabilitazione, capaci di mostrare l'impatto della riabilitazione sulle funzionalità e sulla struttura del sistema nervoso centrale, devono necessariamente essere connesse con le ricerche impegnate a migliorare gli strumenti per la classificazione e diagnosi della malattia, con gli studi che indagano innovativi meccanismi patogenetici e fattori di rischio e con le ricerche impegnate a valutare se i fattori individuati possono diventare bersaglio di nuovi trattamenti terapeutici.

È e sarà sempre più determinante che la ricerca innovativa e di eccellenza, finanziata dai Bandi FISM, si costruisca in sinergia stretta con una ricerca traslazionale e clinica fortemente promossa da iniziative speciali, indirizzata a rispondere alle emergenze ancora orfane di risposte, come quelle legate alla piena comprensione e al trattamento delle forme progressive di sclerosi multipla.

Vale insomma per la ricerca quella visione che in altri campi della storia propose Mahatma Ghandi: «Una goccia strappata dall'oceano perisce inutilmente. Se rimane parte dell'oceano, ne condivide la gloria di sorreggere una flotta di poderose navi».

A ben guardare, le ricerche pubblicate in questo Compendio, dimostrano come i risultati raggiunti dalla «scuola di ricerca» promossa da FISM siano molto più che singole gocce in un oceano:

i 52,5 milioni di euro investiti da FISM negli ultimi 25 anni, serviti a finanziare 360 ricercatori dal 1987 sino ad oggi, con 439 progetti di ricerca e 145 borse di studio, così come le 111 pubblicazioni realizzate nel 2014 (che portano a 752 il totale degli studi FISM pubblicati dal 2007 al 2014) stanno costruendo un mondo sempre più libero dalla SM.

E questo è riconosciuto da tutti gli stakeholder di AISM: in una ricerca commissionata nel 2013 al CENSIS, i diversi "azionisti sociali" di AISM e l'intera opinione pubblica italiana evidenziano in particolare «un'eccellenza nel supporto che l'Associazione fornisce da tempo e con continuità alla ricerca scientifica, con studi che hanno consentito di individuare terapie in grado di migliorare la qualità della vita dei pazienti» e di trattare la malattia.

Dunque la via è collaborare per consentire alle persone di essere più forti della sclerosi multipla e possiamo dire che lo stiamo già facendo da tempo.

Ma dobbiamo farlo ancora meglio, più velocemente, più efficacemente e senza barriere geografiche o "politiche". Domani è già oggi. Lo chiedono e lo meritano tutte le persone con SM.

Mario A. Battaglia
Presidente FISM

Introduction

"We must ensure the continuous development of rigorous and innovative research, capable to produce evidence that impacts on the lives of people with MS": this is how the Italian Multiple Sclerosis Association, AISM, opens the Agenda of Multiple Sclerosis to be presented during the 2015 National Week of MS.

Agenda that, according to the word itself, emphasises the daily actions necessary to implement the "Bill of Rights of people with MS" that many researchers have signed and shared during the 2014 Congress of AISM Foundation.

The scientific research that AISM, through its Foundation, influences, promotes and supports, and is documented precisely by this Compendium, is proof that there exists a rigorous research to give answer to people with MS toward the final goal to create a world that is finally free of multiple sclerosis.

And to arrive to give specific answers to the persons with MS, which is always the authentic focus of all scientific research promoted by AISM, it is fundamental to get together, all the actors must work together towards this same goal.

Each researcher must always place his own research in the broad framework of worldwide research, fostering interactions and synergies that will enhance more and more research results.

The key point that emerges reading this valuable Compendium (23 research projects and 8 fellowships funded by the Italian MS Foundation) states that: it is crucial that every MS research interfaces with the set of all the others. The research in neurorehabilitation, able to show the impact on central nervous system functionality and structure, has to be connected with research undertaken to improve the tools for classification and diagnosis of the disease, with studies investigating innovative pathogenic mechanisms and risk factors and with research devoted to assess potential targets of new therapeutic treatments.

It is and it will be increasingly important that the innovative and excellence research, funded by FISM annual call, is built in close synergy with a translational and clinical research strongly promoted by special initiatives to respond to emergencies still orphan of responses, such as those related to full understanding and treatment of progressive forms of multiple sclerosis.

What Mahatma Ghandi proposed in other fields of history is therefore valid for research: "A drop torn from the ocean perishes without doing any good. If it remains a part of the ocean, it shares the glory of carrying on its bosom a fleet of mighty ships." The studies published in this Compendium show that the results achieved by the "FISM school" of researchers are much more than individual drops in the ocean:

52.5 million euro invested by FISM in the last 25 years, that helped finance 360 researchers from 1987 to date, with 439 research projects and 145 fellowships, as well as 111 publications produced in 2014 (leading the total of FISM studies published from 2007 to 2014 to 752) are building a world increasingly free from MS.

The results of a study commissioned by AISM in 2013 to CENSIS, showed that all the AISM stakeholders recognised the value of the scientific research always promoted by AISM, that allowed to identify therapies to treat disease and to improve the quality of life of patients.

Therefore to be stronger than multiple sclerosis we have to work together. We are already doing this, but we must do it better, faster, more efficiently and with no geographical barriers or "policies". Tomorrow is already today. All the people with MS demand and deserve it.

Mario A. Battaglia
Presidente FISM

Insieme, siamo più forti della sclerosi multipla

«Together we are stronger than MS». Insieme noi siamo più forti della sclerosi multipla. Il motto scelto dalla Federazione Internazionale della Sclerosi Multipla per la Giornata Mondiale della SM 2015 è quanto di più appropriato si possa individuare per fotografare la ricerca sulla sclerosi multipla. Quel "noi" raccoglie, infatti, anche i più recenti e promettenti indirizzi della ricerca sulla sclerosi multipla.
Lavorare insieme per abbattere le barriere della malattia in tutto il mondo è il tema della Giornata Mondiale della SM di quest'anno e quindi promuovere una cooperazione internazionale sempre più integrata è un passaggio obbligato per soddisfare i diritti delle persone con SM.

Da qui nasce la necessità di definire un'agenda globale della ricerca sulla SM e indirizzare tutte le risorse nelle aree di ricerca innovative e strategiche.

L'Associazione, insieme alla sua Fondazione, crede che l'identificazione e l'utilizzo diversificato di nuovi modelli di promozione e finanziamento della ricerca e di cooperazione siano una condizione fondamentale per vincere questa sfida, e che meritino attenzione e risorse.

Negli anni FISM ha sviluppato una mappa strategica di promozione e finanziamento della ricerca (Zaratin P et al. Trends in Pharmacological Sciences 2014) che ha permesso di investire nell'innovazione, aumentare i successi nella conoscenza dei meccanismi coinvolti nella malattia, di migliorare la diagnosi della malattia e della sua progressione, di supportare terapie 'orfane' quali quelle con le cellule staminali e dimostrare l'importanza del trattamento riabilitativo.

È importante mantenere viva l'innovazione della ricerca e far sì che questa innovazione venga presa in carico da reti e collaborazioni in grado di tradurla in risposte concrete per la persona con SM. Questa è una sfida che richiede la cooperazione di tutti gli attori coinvolti che lavorano insieme condividendo rischi e risorse verso un obiettivo comune. Questo sarà possibile solo definendo metriche di impatto della ricerca che siano significative e riconosciute da ciascuna parte interessata e funzionali all'obiettivo comune da raggiungere. In questo processo è fondamentale il ruolo svolto da AISM che ha diversi gradi di coinvolgimento nei progetti di ricerca: da finanziatore a promotore fino ad essere collaboratore e/o partner della ricerca stessa. Solo in questo modo la ricerca sarà stimolata a non limitarsi metaforicamente a 'cogliere la frutta che cresce sui rami più bassi' (*low hanging fruit*) e a rispondere invece ai bisogni ancora privi di risposta (unmeet needs).

In questo orizzonte, l'esempio più consistente è rappresentato da uno dei «Progetti speciali» 2014, l'International Progressive Multiple Sclerosis Alliance (PMSA), di cui AISM è capofila. La PMSA nel 2014 ha lanciato il suo secondo Bando di ricerca internazionale per favorire la formazione di network collaborativi globali di eccellenza impegnati nella ricerca per le forme progressive di SM. Tali network dovranno essere costituiti da almeno tre organizzazioni, rappresentate da un minimo di tre Nazioni. Questi network dovranno promuovere attività di ricerca integrate e lo scambio di conoscenze in aree di ricerca chiave per lo sviluppo di candidati preclinici di potenziali farmaci, la validazione di misure cliniche significative ('outcome') da integrate precocemente negli studi clinici e l'avvio di nuove sperimentazioni cliniche farmacologiche e riabilitative per la SM progressiva.

In questa stessa ottica di network trovano pieno significato anche gli investimenti di FISM per la costruzione di Registri di malattia sia nazionali che internazionali, come strumenti di ricerca scientifica per lo sviluppo di studi epidemiologici e clinici e di programmazione sanitaria. Lo stesso vale per l'impegno della Fondazione di AISM nel promuovere e realizzare la ricerca in neuro-riabilitazione volta alla personalizzazione dei trattamenti. Tutti i risultati prodotti dalla ricerca contribuiranno a sviluppare nuovi trattamenti terapeutici riabilitativi e a fornire utili indicazioni anche al Servizio Sanitario Nazionale per ottimizzare la pianificazione sanitaria del territorio.

Questo Compendio si apre proprio con la presentazione degli studi in neuro-riabilitazione e qualità della vita conclusi nel 2014. È sempre più chiaro, infatti, che promuovere la cooperazione nazionale ed internazionale risulta un passaggio obbligato anche per aumentare l'accesso delle persone con SM ad un trattamento riabilitativo personalizzato. Dimostrare l'impatto della riabilitazione sull'attività di malattia e la centralità della

persona nella gestione del trattamento riabilitativo sono sfide che si possono vincere solo attraverso una ricerca cooperativa.

Ma la dimensione collaborativa della ricerca attraversa già tutti gli ambiti finanziati con i precedenti Bandi della Fondazione di AISM.

Un dato, ripreso sinteticamente delle ricerche presentate in questo Compendio, può essere rappresentativo di questa tendenza collaborativa che è già in atto e va implementata ma non inventata: tolte le 8 Borse di studio che, per definizione, sono proposte da un singolo ricercatore con un proprio mentore, sui 23 studi qui presentati e conclusi, 12 indicano di essere stati effettuati in collaborazione tra diversi gruppi di ricerca, operanti anche a livello internazionale.

Ed è significativo che le collaborazioni si intensifichino nei progetti qui raggruppati sotto i titoli “Patogenesi e fattori di rischio” e “Verso nuovi trattamenti”. Quanto più ci si avvicina alla fase clinica tanto più diventa necessario integrare competenze, banche dati e risorse.

L’auspicio e il desiderio con cui ogni anno la Fondazione di AISM organizza il Congresso scientifico cui invita caldamente tutti i ricercatori che finanzia e segue, del resto, è esattamente quello di favorire e rafforzare la collaborazione tra i ricercatori e tra i ricercatori e altri attori importanti.

Come dice un proverbio africano: «Se vuoi arrivare primo, corri da solo. Se vuoi arrivare lontano, cammina insieme».

Paola Zaratin
Direttore Ricerca Scientifica

Together, we are stronger than multiple sclerosis

"Together we are stronger than MS." The motto chosen by the International Federation of Multiple Sclerosis for the 2015 World MS Day is the most appropriate we can find to depict overall the research on multiple sclerosis. "We" includes, in fact, the most recent and promising directions of research on multiple sclerosis.

This year World MS Day focuses on working together to break down barriers of the disease in the world and thus, to promote increasingly integrated international cooperation is a necessary step to satisfy the rights of people with MS.

Hence, a necessity to define a global MS research agenda and direct all resources in areas of innovative and strategic research arises.

The Association, together with its Foundation, believes that identification and use of new models of diversified promotion, funding of research and co-operation are a fundamental condition to win this challenge, and therefore they deserve attention and resources.

Over the years, FISM has developed a strategic map for promoting and funding research (Zaratin P et al. Trends in Pharmacological Sciences 2014) that allowed to invest in innovation, to increase the success in the knowledge of the mechanisms involved in the disease, to improve diagnosis of disease and its progression, to support "orphan" therapies such as stem cell therapy and to demonstrate the importance of rehabilitation treatment.

It is important to keep research innovation alive and to ensure that this innovation is taken over by networks and collaborations that can translate it into specific answers for the person with MS. This is a challenge that requires the cooperation of all factors involved in working together, sharing risks and resources towards a common goal. This will only be possible by defining research impact metrics, which are significant and recognized by each interested party and functional to the common goal to reach.

In this process the role played by AISM is essential with varying degrees of involvement in research projects: from funder to promoter, up to be a collaborator and / or a partner of research itself. Only in this way MS community will be stimulated to reap 'high hanging fruits' and to respond to the still unanswered needs (unmet needs).

In this context, the most significant example is represented by one of 2014 "special projects" the International Progressive Multiple Sclerosis Alliance (PMSA), of which AISM is one of the managing MS Society The PMSA in 2014 launched its second RFA for international research to facilitate a formation of collaborative global network of excellence committed to the search for progressive forms of MS. These networks will be composed of at least three organisations, representing a minimum of three Nations. These networks should promote integrated research activities and exchange of knowledge in key areas of research for the development of preclinical candidates of potential drugs, the validation of significant clinical measures ('outcome') from integrated early clinical studies and the launch of new pharmacological and rehabilitative clinical trials for progressive MS.

In this same view of network the Italian Multiple Sclerosis Association, through its Foundation, promotes and supports the development of disease Registries, both national and international, in order to improve the coverage and the efficiency of the collection of clinical and epidemiological data.

The same applies to the AISM Foundation's commitment to promote and carry out research in neurorehabilitation aimed at personalising treatments. All the results produced by the research will help to develop new therapeutic rehabilitation and also provide useful information to the National Health Service in order to optimize health planning on the territory.

This Compendium opens with the presentation of the neurorehabilitation and quality of life studies concluded in 2014. It is increasingly clear, in fact, that promotion of national and international cooperation is also a necessary step to increase the access of people with MS to a personalised rehabilitation treatment. Demonstrating the impact of rehabilitation on the activity of the disease and the importance of the individual in the management of rehabilitation treatment are challenges that can be overcome only by a cooperative research.

But the collaborative dimension of the research was already present in previous FISM Calls.

A fact, briefly resumed in the research presented in this Compendium, may be representative of this collaborative tendency that is already in action and should be implemented but not invented: except for the 8 Fellowships which, by definition, are proposed by an individual researcher 12 studies out of the 23 presented here were carried out in collaboration between different research groups operating at the international level.

And it is significant that the collaborations will intensify in the projects here grouped under the headings "Pathogenesis and Risk Factors" and "Towards new treatments." The closer we approach the clinical phase, the more it becomes necessary to integrate expertise, databases and resources.

This is the reason why FISM organises every year its Scientific Congress and warmly urges all researchers that it finances and follows to participate; FISM wants to encourage and strengthen collaboration between researchers themselves and between researchers and other important stakeholders.

As an African proverb says: "If you wish to arrive first, run alone. If you wish to go far, walk together."

Paola Zaratin
Direttore Ricerca Scientifica

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA

NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Massimo Filippi
Unità di Neuroimaging Quantitativo, Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

COLLABORATORI:
Maria Assunta Rocca, Laura Parisi, Paolo Preziosa, Elisabetta Pagani, Paola Valsasina, Vittorio Martinelli, Andrea Falini, Giancarlo Comi

Definizione della rete di connettività strutturale e funzionale nella sclerosi multipla tramite l'applicazione dell'approccio "graph theory"

PREMESSE E OBIETTIVI

La variabilità interindividuale della distribuzione del danno strutturale e l'efficienza dei meccanismi di plasticità corticale sono tra i fattori responsabili dell'accumulo di disabilità clinica nei pazienti con sclerosi multipla (SM). La maggior parte degli studi precedenti ha analizzato specifiche reti neuronali (per esempio quella motoria) al fine di valutare la relazione tra una loro disfunzione e la disabilità clinica nel corrispondente sistema funzionale clinico (per esempio il sistema piramidale). La definizione dell'intera architettura funzionale delle reti cerebrali (conosciuta con il termine "connettone") potrebbe contribuire a capire meglio le dinamiche che regolano i processi cognitivi e comportamentali di questi pazienti. I vari tentativi effettuati nel caratterizzare questa moltitudine dei dati, hanno portato, nell'ultimo decennio, all'emergere di un approccio multidisciplinare allo studio dei sistemi complessi che ha origine proprio nello studio delle reti, conosciuta come teoria dei grafi. Lo scopo principale del nostro progetto è stato di applicare la teoria dei grafi per identificare la disorganizzazione funzionale del connettone umano nei pazienti con SM e di stimarne la correlazione con variabili cliniche, neuropsicologiche e radiologiche. Nel dettaglio, abbiamo valutato:

a) se e come le proprietà globali dei network funzionali cerebrali erano alterate nei pazienti con SM rispetto ai controlli sani;

b) la presenza di modifiche dei principali nodi funzionali (definiti come regioni cerebrali che interagiscono con numerose altre regioni) in questi pazienti;

c) le correlazioni tra le modifiche di connettività funzionale e misure cliniche, neuropsicologiche a di RM convenzionale nei pazienti con SM.

La nostra ipotesi di lavoro era che modifiche funzionali dei principali network cerebrali, sia a livello globale che a livello regionale, possono contribuire a spiegare le manifestazioni cliniche della malattia, soprattutto in termini di compromissione cognitiva, e che la presenza di un danno strutturale possa influenzare tali modifiche di funzione.

RISULTATI

Abbiamo utilizzato l'analisi dei grafi per valutare le modifiche di organizzazione del connettone funzionale cerebrale in 246 pazienti destrimani con SM con i principali fenotipi clinici di malattia. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione neurologica. Come misura di compromissione cognitiva abbiamo utilizzato il punteggio al Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT), un test neuropsicologico che è sensibile ai deficit della memoria di lavoro e della velocità di processazione delle informazioni. Come gruppo di controllo abbiamo reclutato 55 soggetti sani, destrimani, con una storia neurologica, psichiatrica e medica negativa e con una normale obiettività neurologica. Rispetto ai soggetti sani, i pazienti con SM hanno mostrato un'alterazione delle proprietà globali dei network cerebrali. Tali modifiche erano utili per distinguere i pazienti con compromissione cognitiva rispetto ai controlli sani, mentre non differenziavano i pazienti con i principali fenotipi clinici di malattia. Rispetto ai controlli sani, i pazienti con SM hanno anche mostrato delle modifiche regionali dei network, caratterizzate da: 1) una perdita dei nodi localizzati a livello del giro frontale superiore, precuneo e cingolo anteriore nell'emisfero di sinistra; 2) una diversa lateralizzazione dei nodi localizzati a livello dei gangli della base (localizzati a livello dell'emisfero di sinistra nei

controlli sani e dell'emisfero di destra nei pazienti con SM); e 3) la formazione di nodi, non presenti nei controlli sani, nel lobo temporale e cervelletto. Queste modifiche delle proprietà regionali dei network contribuivano a caratterizzare sia i pazienti con compromissione cognitiva, sia i principali fenotipi clinici di malattia. Nei pazienti, non abbiamo trovato correlazioni significative tra le modifiche globali e regionali dei network cerebrali e misure di danno strutturale (carico lesionale sulle sequenze pesate in T2 e atrofia cerebrale).

CONCLUSIONI

Applicando la teoria dei grafi per analizzare immagini di RM funzionale a riposo abbiamo dimostrato la presenza di un'alterata organizzazione dei network funzionali cerebrali sia a livello globale che a livello regionale nei pazienti con SM. L'alterazione delle proprietà globali di questi network indica un ridotta capacità di scambiare le informazioni tra aree cerebrali distanti, con un impatto sulla presenza di disturbi cognitivi in questi pazienti. Le modifiche regionali dell'organizzazione dei network contribuiscono a spiegare non solo alla presenza di deficit cognitivi, ma anche la variabilità fenotipica di questi pazienti. Quest'analisi regionale ha anche evidenziato che la preservazione funzionale di alcuni nodi cerebrali a la perdita di altri sono dei meccanismi che aiutano a spiegare le manifestazioni cliniche della malattia. Questi risultati possono essere utili per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nei pazienti con SM, soprattutto in ambito riabilitativo.

Mapping structural and functional brain networks in multiple sclerosis: a graph theory approach

INTRODUCTION AND AIMS

Previous investigations in multiple sclerosis (MS) have demonstrated that interindividual variability in the distribution of structural brain damage and efficiency of brain plasticity are among the factors responsible for the accumulation of irreversible clinical deficits in these patients. However, most of these studies were hypothesis-driven and focused on the analysis of specific brain networks (for instance, the motor network) and their relationship with impairment in the corresponding functional systems (for instance, the pyramidal system). An important step to understand the disruption of intrinsic brain functional and structural organization in MS is to map the elements and connections of the brain networks, to create a comprehensive structural and functional description of the network architecture, known as the connectome. The aim of this project was to apply "graph theory" to identify the functional connectome in patients with MS, with the following objectives:
a) to define if and how global network properties are modified in MS patients *vs* healthy controls (HCs);
b) to assess if and how cortical hubs (defined as brain regions that interact with many other regions) are modified with the disease;
c) to estimate the correlation between functional connectivity disruption *vs* clinical, neuropsychological and conventional MRI variables in patients with MS.
Our working hypothesis was that the disruption of brain network functional connectivity at a global and regional level is likely to contribute to the clinical manifestations of the disease, especially cognitive impairment, and that structural damage might modulate rewiring of functional connectivity.

RESULTS

By applying graph analysis to resting state (RS) functional magnetic resonance imaging (fMRI) data, we have investigated the organization of the functional brain connectome in 246 right-handed MS patients with the main disease clinical phenotypes. All patients underwent a complete neurologic examination, with rating of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score. As a measure of cognitive impairment, we used the Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT), which is sensitive to abnormalities of working memory and information processing speed. Patients were considered cognitively impaired (CI) when PASAT score was 2SD below the average score of a comparable control group for age, gender and education. Fifty-five right-handed, age- and gender-matched HC with no previous history of neurological, psychiatric, or medical disor-

ders, and a normal neurological exam were also enrolled. Global network properties (network degree, global efficiency, hierarchy, path length and assortativity) were abnormal in MS patients compared to HC, and contributed to distinguish cognitively impaired MS patients from HC, but not the main MS clinical phenotypes. Compared to HC, MS patients showed: 1) a loss of hubs in the superior frontal gyrus, precuneus and anterior cingulum in the left hemisphere; 2) a different lateralisation of basal ganglia hubs (mostly located in the left hemisphere in HCs, and in the right hemisphere in MS patients); and 3) a formation of hubs, not seen in HCs, in the left temporal pole and cerebellar lobule IV-V. Finally, MS patients also experienced a decreased nodal degree in the bilateral caudate nucleus and right cerebellum. Such a modification of regional network properties was found to contribute to cognitive impairment and phenotypic variability of MS. In patients, global and regional network properties were not correlated with T2 lesion volume and normalized brain volume.

CONCLUSIONS

By using a graph theoretical analysis of RS fMRI, we showed abnormalities of global and regional topological brain functional organization in a large cohort of MS patients. Abnormalities of global network properties suggested a reduced competence in information exchange between distant brain areas and were related to the presence of cognitive impairment. Regional abnormalities of network organization contributed to distinguish MS patients from HCs and also to characterize cognitive performance and phenotypic variability of patients. Such a regional analysis also suggested that functional preservation of “critical” hubs as well as loss and/or functional incompetence of alternative hubs are among the mechanisms associated to the clinical manifestations of the disease.This novel pieces of information are likely to contribute developing future therapeutic strategies, particularly in the field of rehabilitation.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Rocca MA, Valsasina P, Meani A, Falini A, Comi G, Filippi M. Impaired functional integration in multiple sclerosis: a graph theory study. Brain Struct Funct. 2014 Sep 26. [Epub ahead of print]

Rocca MA, Valsasina P, Sala S, Meani A, Falini A, Comi G, Filippi M. Abnormalities of the brain connectome in patients with multiple sclerosis. Mult Scler J 2013; 19 (Suppl 1): 407.Presented at the 29th Congress of ECTRIMS. Copenhagen, 2-5 October 2013

Filippi M, Rocca MA, Valsasina P, Sala S, Meani A, Falini A, Comi G. Abnormalities of the brain connectome in patients with multiple sclerosis. Neurol Sci 2013; 34 (Suppl October 2013): S60-S61. Presented at the 44th Congress of Società Italiana di Neurologia. Milano, 2-5 November 2013

Filippi M, Valsasina P, Sala S, Meani A, Falini A, Comi G, Rocca MA. Abnormalities of the brain connectome in patients with multiple sclerosis. J Neurol 2013; 260 (Suppl 1): S31-S32. Presented at the 23rd Meeting of the European Neurological Society Conference, Barcelona, Spain 8th to 11th June 2013.

Filippi M, Valsasina P, Sala S, Meani A, Falini A, Comi G, Rocca MA. Abnormalities of the brain connectome in patients with multiple sclerosis. Proc Intl Soc Mag Reson Med 2013; 21: 3553. Presented at the 21st Scientific Meeting of the International Society for Margnetic Resonance in Medicine. Salt Lake City, 20-26 April 2013

Filippi M, Valsasina P, Sala S, Meani A, Falini A, Comi G, Rocca MA. Abnormalities of the brain connectome in patients with multiple sclerosis. Neurology 2013; 80 (Suppl 1): PD6.009 Presented at the 65th Annual Meeting of the American Academy of Neurology. San Diego, 16-23 March 2013

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno e l’ammontare di 30.000 €

Massimo Filippi
Unità di Neuroimaging Quantitativo, Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

COLLABORATORI:
Maria Assunta Rocca, Vittorio Martinelli, Andrea Falini, Giancarlo Comi

Mappatura regionale della struttura e delle funzioni dell'ippocampo nella sclerosi multipla: correlazioni con le forme cliniche della malattia e con il deficit cognitivo

PREMESSE E OBIETTIVI

La definizione della distribuzione regionale del danno a livello del sistema nervoso centrale (SNC) contribuisce a migliorare la comprensione delle manifestazioni cliniche dei pazienti affetti da sclerosi multipla (SM). I deficit cognitivi sono presenti nel 25-60% di questi pazienti, anche in chi è affetto da una disabilità fisica lieve. Alcuni studi preliminari hanno dimostrato una correlazione tra una riduzione di volume dell'ippocampo, struttura del SNC di importanza strategica per le funzioni di memoria verbale e visuo-spaziale, e la presenza di disturbi della memoria in pazienti con SM. Recenti studi patologici hanno suggerito che la suscettibilità al danno può essere diversa nelle diverse strutture dell'ippocampo e, soprattutto, che la capacità di neurogenesi delle cellule staminali potrebbe essere preservata in alcune sue porzioni. Lo scopo del progetto è stato di fornire una precisa descrizione del coinvolgimento dell'ippocampo in corso di SM, utilizzando tecniche avanzate di risonanza magnetica (RM) funzionale e strutturale. Tra queste, abbiamo utilizzato metodi che permettono di stimare le modificazioni di volume e di forma di superficie dell'ippocampo, di valutare l'integrità strutturale dei fasci di connessione di questa struttura e di analizzare l'organizzazione funzionale dei circuiti ippocampali. L'obiettivo principale del progetto è stato quello di definire il grado di atrofia globale e regionale dell'ippocampo in pazienti SM nei diversi fenotipi clinici e come tale danno correli con la loro performance neuropsicologica. Abbiamo inoltre studiato la connettività funzionale e strutturale dell'ippocampo con le altre regioni del cervello.
L'ipotesi di lavoro era che la connettività funzionale e strutturale tra l'ippocampo e le altre regioni cerebrali rilevanti per la memoria (e più in generale per le funzioni cognitive) vari nelle diverse fasi della malattia e che ciò possa contribuire alla presenza e alla severità del deficit di memoria e cognitivo. Il diverso coinvolgimento delle sottostrutture dell'ippocampo, con la presenza in alcune di una maggiore suscettibilità al danno secondario alla malattia e in altre di una preservazione del potenziale di neurogenesi, potrebbe contribuire a spiegare l'eterogeneità delle manifestazioni cognitive della malattia.

RISULTATI

Abbiamo reclutato 115 pazienti con SM destrimani e 42 volontari sani di pari sesso ed età. I pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione neurologica e neuropsicologica. Tutti i soggetti hanno eseguito uno studio di RM, utilizzando un magnete a 3.0 Tesla, durante il quale sono state acquisite le seguenti sequenze: 1) pesata in doppio eco, 2) "double inversion recovery", 3) 3D pesata in T1, 4) diffusione e 5) RM funzionale a riposo. Per valutare l'atrofia ippocampale ed il coinvolgimento dei diversi settori istologici dell'ippocampo, abbiamo segmentato manualmente gli ippocampi sulle immagini pesate in T1, utilizzando degli atlanti anatomici come riferimento. Abbiamo trovato che rispetto ai soggetti sani, i pazienti con SM avevano un'atrofia (perdita di tessuto) significativa degli ippocampi. Nei pazienti con SM, abbiamo riscontrato un'atrofia selettiva a livello della porzione CA1 e del subicolo dell'ippocampo posteriore, bilateralmente. Era, inoltre, coinvolto l'ilo del giro dentato della testa dell'ippocampo di destra. Tali modifiche regionali del volume degli ippocampi erano correlate al volume delle lesioni della sostanza bianca, ma non alla disabilità dei pazienti. Inoltre, la perdita di tessuto a livello del CA1 e del subicolo correlava con i deficit a test neuropsicologici mirati per le funzioni ippocampali.

In 69 pazienti con SM senza compromissione cognitiva e 42 soggetti sani abbiamo valutato la correlazione tra le modifiche di connettività funzionale a riposo (RS FC) dell'ippocampo e il carico lesionale sulle sequenze pesate in T2, così come la presenza di depressione. Rispetto ai soggetti sani, i pazienti avevano una ridotta RS FC tra gli ippocampi e diverse regioni cortico-sottocorticali. La ridotta RS FC tra gli ippocampi e il "default-mode network" (DMN) erano strettamente correlati ad un maggior volume delle lesioni pesate in T2, alla durata di malattia e alla gravità della depressione e della disabilità.

CONCLUSIONI

Questi risultati evidenziano che le diverse regioni dell'ippocampo hanno una differente vulnerabilità al danno nei pazienti con SM, con un relativo risparmio della testa dell'ippocampo di sinistra. La valutazione della distribuzione regionale del danno a livello ippocampale può contribuire a spiegare il deficit di specifiche funzioni cognitive nei pazienti con SM, tra cui la memoria e le abilità visuospaziali.
Nei pazienti con SM senza compromissione cognitiva, le lesioni della sostanza bianca influenzano l'integrazione funzionale dell'ippocampo con altre regioni del DMN, determinando una sindrome da disconnessione che contribuisce alla manifestazioni cliniche della malattia, tra cui la presenza di depressione.

Regional mapping of hippocampal structure and function in multiple sclerosis: correlations with disease clinical phenotypes and cognitive impairment

INTRODUCTION AND AIMS

The definition of the regional distribution of structural damage in the different central nervous system (CNS) compartments is contributing to improve the understanding of the clinical manifestations of multiple sclerosis (MS), including cognitive dysfunction. Impaired cognition is present in 25-60% of MS patients and can occur even in the setting of a relatively mild physical disability.
Although information-processing speed and working memory are the most frequently detected cognitive deficits, verbal and spatial learning are also affected, possibly reflecting a hippocampal dysfunction. Consistently with the crucial role played by the hippocampus in memory functions, a few preliminary studies in MS have found a correlation between hippocampal atrophy and memory impairment. However, the hippocampus is not a homogeneous structure, in terms of both morphology and function. Recent pathological studies have suggested that susceptibility to damage might differ in the different portions of the hippocampus and, most importantly, that the neurogenecity of neuronal stem cells might be preserved in some of them.
Aim of this project was to achieve an accurate description of hippocampal involvement in MS across the entire spectrum of the disease, by employing advanced structural and functional magnetic resonance imaging (fMRI) techniques. The main objectives of this project were:
a) To assess the degree of global hippocampal atrophy and the differential involvement of hippocampal histological subfields in MS patients with the main disease clinical phenotypes;
b) To estimate the correlation of neuropsychological impairment with global and regional hippocampal atrophy;
c) To study the structural and functional connectivity of the hippocampus with other brain regions to investigate the adaptive/maladaptive role of such abnormalities.
Our working hypothesis was that functional and structural connectivities between the hippocampus and other brain regions relevant for memory (and, more generally, for cognition) vary across the main stages of the disease and that such variation might contribute to the presence and severity of memory/cognitive impairment. We also postulate that the differential involvement of hippocampal histological subfields, with susceptibility to MS-related damage in some of them and preservation of the neurogenesis potential in others, might contribute to explain the heterogeneous cognitive manifestations of the disease.

RESULTS

We have recruited 115 consecutive right-handed patients with MS and 42 sex- and age matched right-handed healthy individuals. MS patients underwent a neurological examination with rating of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and a neuropsychological evaluation. Using a 3.0 T scanner, we have acquired dual-echo (DE), double inversion recovery (DIR), 3D T1-weighted, diffusion tensor (DT) MRI and resting state (RS) functional MRI sequences. To assess the degree of global hippocampal atrophy and the differential involvement of hippocampal histological subfields, the hippocampi were manually traced on 3D T1-weighted images and then, their anatomical segmentation has been performed using a standard neuroanatomical atlas of the hippocampus. We found that hippocampal volume was reduced in MS patients *vs* healthy controls. In MS patients, radial atrophy affected CA1 subfield and subiculum of posterior hippocampus, bilaterally. The dentate hilus of the right hippocampal head was also affected. Regional hippocampal atrophy correlated with brain T2 and T1 lesion volumes, while no correlation was found with disability. Damage to the CA1 and subiculum was significantly correlated to the performances at hippocampal-targeted neuropsychological tests.

From 69 cognitively intact MS patients and 42 matched healthy controls we have assessed the relationship between abnormalities of hippocampal RS functional connectivity (FC) with brain T2 lesion volumes and presence and severity of depression. Compared to healthy controls, MS patients experienced a significant atrophy of the whole brain and left hippocampus as well as a distributed pattern of decreased RS FC between the hippocampi and several cortical-subcortical regions. Reduced hippocampal RS FC with the default-mode network (DMN) was strongly correlated to higher T2 lesion volume as well as to disease duration, severity of depression and disability.

CONCLUSIONS

These results show that hippocampal subregions have a different vulnerability to MS-related damage, with a relative sparing of the head of the left hippocampus. The assessment of regional hippocampal atrophy may help explain deficits of specific cognitive functions in MS patients, including memory and visuospatial abilities.

In cognitively preserved MS patients, brain focal WM lesions influence the functional integration of the hippocampus to other brain regions of the DMN, leading to a disconnection syndrome. Such a disruption of hippocampal RS FC contributes to the occurrence of depression and to clinical disability.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Longoni G, Rocca MA, Pagani E, Riccitelli G, Colombo B, Rodegher M, Falini A, Comi G, Filippi M. Deficits in memory and visuospatial learning correlate with regional hippocampal atrophy in MS. Brain Struct Funct. 2015 Jan;220(1):435-44.

Rocca MA, Pravatà E, Valsasina P, Radaelli M, Colombo B, Vacchi L, Gobbi C, Comi G, Falini A, Filippi M. Hippocampal-dmn disconnectivity in MS is related to WM lesions and contributes to depression. *Submitted*

Longoni G, Rocca MA, Pagani E, Riccitelli GC, Colombo B, Rodegher M, Falini A, Comi G, Filippi M. Surface expansion of the hippocampal dentate gyrus in multiple sclerosis: an in-vivo evidence of neurogenesis? Neurology 2013; 80 (Suppl 1): P06.127

Longoni G, Rocca MA, Pagani E, Riccitelli G, Colombo B, Rodegher M, Falini A, Comi G, Filippi M. Surface expansion of the hippocampal dentate gyrus in multiple sclerosis: in vivo evidence of neurogenesis? J Neurol 2013; 260 (Suppl 1): S227

Riccitelli GC, Rocca MA, Longoni G, Pagani E, Colombo B, Rodegher M, Falini A, Comi G, Filippi M. Surface expansion of the hippocampal dentate gyrus in multiple sclerosis: in vivo evidence of neurogenesis? Mult Scler J 2013; 19 (Suppl 1): 416-417. Presented at the 29th Congress of ECTRIMS. Copenhagen, 2-5 October 2013

Ricciteli G, Rocca MA, Longoni G, Pagani E, Colombo B, Rodegher M, Falini A, Comi G, Filippi M. Surface expansion of the hippocampal dentate gyrus in multiple sclerosis: an in vivo evidence of neurogenesis? Neurol Sci 2013; 34 (Suppl October 2013): S159. Presented at the 44th Congress of Società Italiana di Neurologia. Milano, 2-5 November 2013

Messina R, Rocca MA, Longoni G, Pagani E, Colombo B, Rodegher M, Comi G, Falini A, Filippi M. Surface Expansion of the Hippocampal Dentate Gyrus in Multiple Sclerosis: an In-Vivo Evidence of Neurogenesis? Oral presentation ASNR 52nd Annual Meeting & Symposium. Montreal 19-22 May 2014

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 97.500 €

Marco Bove
DIMES, Università degli Studi di Genova, Genova

COLLABORATORI:
Ludovico Pedullà

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Laura Bonzano, Gianluigi Mancardi, DINOGMI, Università degli Studi di Genova, Genova
Luca Roccatagliata, DISSAL, Università degli Studi di Genova, Genova
Giampaolo Brichetto, Andrea Tacchino, Area Ricerca Scientifica, FISM, Genova
Laura Lopes De Carvalho, Servizio Riabilitazione AISM, Genova

L'impatto della riabilitazione motoria e cognitiva sulle proprietà dinamiche della struttura cerebrale: verso la personalizzazione di interventi terapeutici in pazienti affetti da sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La plasticità strutturale cerebrale ha un ruolo nell'induzione di fenomeni di plasticità funzionale ai fini di un adattamento a stimoli esterni e condizioni patologiche. In soggetti sani l'apprendimento cognitivo e motorio induce significative modificazioni della sostanza bianca.

I pazienti con sclerosi multipla (SM) presentano deficit cognitivi e motori, che sembrano essere seguiti da riorganizzazione corticale. Quindi si potrebbero definire protocolli riabilitativi per ottenere un adattamento cerebrale efficiente alla fase della malattia per preservare le funzionalità del paziente. Tuttavia mancano dati riproducibili sull'efficacia di protocolli riabilitativi e sul loro effetto su circuiti nervosi cerebrali. Infatti, sebbene un protocollo riabilitativo riduca la disabilità, i risultati variano da paziente a paziente. Parte di tali variazioni potrebbe riferirsi a differenze nell'anatomia residua cerebrale in diverse fasi della malattia. Valutazioni quantitative in vivo della microstruttura della sostanza bianca, correlate a compiti motori e cognitivi, potrebbero predire le risposte ad uno specifico trattamento allo scopo di personalizzare interventi riabilitativi e ottimizzare il risultato finale.

Il progetto ha esaminato quanto misure di connettività strutturale (circuiti di sostanza bianca) possano fornire indicazioni sugli effetti di protocolli riabilitativi sulla performance di pazienti con SM. In dettaglio, sono stati studiati: a) gli effetti della riabilitazione dell'arto superiore sulla funzione motoria della mano; b) gli effetti della riabilitazione cognitiva sull'attenzione sostenuta, la memoria di lavoro e la velocità di elaborazione dell'informazione; c) l'impatto della riabilitazione motoria sull'architettura strutturale del cervello con tecniche non convenzionali di risonanza magnetica (RM); d) la correlazione tra prestazioni motorie e cognitive e parametri di RM per ricercare indicatori utili a predire la risposta dei pazienti ad uno specifico trattamento; e) la correlazione di scale cliniche e gli effetti della riabilitazione sugli aspetti motori e cognitivi.

Riabilitazione motoria

Nel primo anno sono stati reclutati 30 pazienti con SM e deficit motorio alla mano, randomizzati in 2 gruppi che hanno ricevuto un protocollo riabilitativo attivo o passivo. Entrambi i gruppi sono stati sottoposti a 20 sessioni di trattamento di 1 ora, tre volte alla settimana. Il "gruppo trattato" ha ricevuto una riabilitazione motoria attiva, basata su esercizi volontari, tra cui esercizi "task-oriented", mentre il "gruppo di controllo" è stato sottoposto ad una mobilizzazione passiva di spalla, gomito, polso e dita. Prima e dopo i protocolli di riabilitazione, la prestazione motoria è stata valutata in tutti i pazienti con test standard. Inoltre, i movimenti di precisione delle dita sono stati valutati grazie ad un guanto ingegnerizzato in grado di valutare la cinematica di sequenze di movimenti di opposizione delle dita ed indici di coordinazione bimanuale.

Nelle stesse sedute, al fine di valutare l'integrità della sostanza bianca cerebrale, ogni paziente è stato sottoposto ad una valutazione RM con tensore di diffusione per ottenere mappe parametriche di anisotropia frazionale, diffusività media, diffusività assiale, e diffusività radiale. Il valore medio di ogni parametro è stato calcolato separatamente all'interno delle regioni di interesse tra i fasci di fibre che collegano aree cerebrali coinvolte nel controllo del movimento volontario.

Riabilitazione cognitiva

Nel secondo anno del progetto, sono state reclutate 24 persone con SM con disturbi cognitivi, i quali sono stati sottoposti ad un intervento di riabilitazione cognitiva per 8 settimane con una nuova applicazione software sviluppata ad hoc per offrire trattamenti intensivi e personalizzati a casa (COGNI-TRAcK). Le persone sono stati divise in due gruppi: un gruppo seguiva un programma adattivo, in cui il livello di difficoltà degli esercizi si modulava in base alla performance del paziente, mentre l'altro gruppo seguiva un programma che manteneva la difficoltà degli esercizi costante ad un basso livello.

Inoltre, prima e dopo l'intervento riabilitativo, entrambi i gruppi sono stati sottoposti a una valutazione cognitiva tramite la Rao's Brief Repeatable Battery (BRB).

RISULTATI

I due protocolli riabilitativi motori hanno indotto effetti positivi e simili sulla performance motoria unimanuale, tuttavia il compito di coordinazione bimanuale ha rivelato che le capacità di coordinazione residue sono state mantenute nei pazienti trattati mentre erano significativamente peggiorate nel gruppo di controllo. Inoltre, l'integrità della sostanza bianca nel corpo calloso e nei tratti corticospinali nel "gruppo trattato" era conservata mentre un peggioramento dell'integrità microstrutturale dovuto alla malattia è stato trovato nel gruppo di controllo. Infine, un aumento significativo di diffusività radiale è stato osservato nei fascicoli longitudinali superiori di entrambi i gruppi, indicando l'assenza di effetto del trattamento su questa struttura, che mostra la progressione di un danno probabilmente dovuto ad un processo di demielinizzazione in atto durante la malattia.

Per quanto riguarda il protocollo di riabilitazione cognitiva, i risultati ottenuti indicano che il sistema proposto è stato ben recepito dalle persone con SM, come evidenziato dall'alta aderenza al trattamento (media dell'84% di sessioni completate sul totale pianificato). L'efficacia di COGNI-TRAcK nel contesto di un programma di riabilitazione cognitiva intensiva e personalizzata è stata valutata con una batteria di test neuropsicologici (BRB) solitamente utilizzata per indagare la performance cognitiva. Nel gruppo che seguiva un programma adattivo, i risultati hanno mostrato un effetto positivo e statisticamente significativo dell'intervento sulla performance cognitiva in tutti i test, evidenziando come COGNI-TRAcK sia uno strumento adatto ed efficace per la riabilitazione cognitiva nella SM.

CONCLUSIONI

Questi risultati indicano l'importanza della somministrazione, quando possibile, di un trattamento riabilitativo costituito da movimenti volontari. Inoltre, abbiamo dimostrato che gli effetti benefici di un trattamento riabilitativo sono dipendenti dal compito motorio che viene svolto durante la riabilitazione e selettivi nel loro effetto a livello della struttura cerebrale; e questo diventa fondamentale se si vogliono sviluppare degli approcci riabilitativi personalizzati.

Inoltre, abbiamo dimostrato come un training cognitivo adattivo sia più efficace rispetto ad uno non adattivo in persone con SM con deficit cognitivi. Una riabilitazione cognitiva intensiva e personalizzata basata su esercizi di memoria di lavoro sembra migliorare lo stato cognitivo in questi pazienti. Infine abbiamo dimostrato che il trattamento intensivo e personalizzato proposto attraverso COGNI-TRAcK è ben accettato, facilmente utilizzabile ed efficace nel migliorare le funzioni cognitive.

The impact of motor and cognitive rehabilitation on the dynamic properties of brain structure: towards the individual tailoring of therapeutic interventions in multiple sclerosis patients

INTRODUCTION AND AIMS

In adult brains structural neuroplasticity plays a crucial role relative to functional plasticity in adaptation to external stimuli and pathological conditions. In healthy subjects, white matter (WM) changes can be observed after motor and cognitive training.

Motor and cognitive impairments are present in patients with multiple sclerosis (PwMS), and it has been suggested that motor and cognitive disturbances are followed by cortical reorganization in these patients. Thus, rehabilitation protocols could be designed to obtain efficient brain adaptation to preserve patients' outcome. However, consistent data on the real efficacy of rehabilitative procedures are lacking, in particular concerning the rehabilitation effect on brain networks. In fact, although, impairment can be reduced through rehabilitative interventions, individual patients' outcomes are highly variable. Part of this variation is likely due to variation in residual brain anatomy. Imaging measures of WM microstructure in combination with motor and cognitive tasks could predict responses to an intervention allowing for individual tailoring of therapeutic interventions to optimize outcomes.

This project aimed at assessing whether imaging measures of structural brain connectivity (WM pathways) could give new hints on the effects of motor and cognitive rehabilitative protocols in PwMS' performance. Particularly, we investigated a) the effects of upper limb rehabilitation, focused on hand motor function; b) the effects of cognitive rehabilitation on sustained attention, working memory and speed of information processing; c) the impact of motor rehabilitation on structural brain architecture using non-conventional MRI techniques; d) the correlation between motor performance and non-conventional MRI data in order to identify possible indicators able to predict the response of the patients to a specific rehabilitative treatment; e) the correlation of clinical scales with motor and cognitive outcomes.

Motor rehabilitation

In the first year of the project, 30 PwMS with hand motor deficits were recruited and randomized into 2 homogenous groups to receive active or passive motor rehabilitation treatment. Both groups underwent twenty 1-hour treatment sessions, three times a week. The "treatment group" received an active motor rehabilitation treatment, based on voluntary exercises including task-oriented exercises, while the "control group" underwent passive mobilization of the shoulder, elbow, wrist and fingers. Before and after the rehabilitation protocols, motor performance was evaluated in all patients with standard tests. Additionally, finger motor performance accuracy and bimanual coordination were assessed by an engineered glove.

In the same sessions, in order to evaluated white matter integrity, every patient underwent diffusion tensor imaging to obtain parametric maps of fractional anisotropy, mean diffusivity, axial diffusivity, and radial diffusivity. The mean value of each parameter was separately calculated within regions of interest including the fiber bundles connecting brain areas involved in the control of voluntary movements.

Cognitive rehabilitation

In the second year of the project, 24 cognitive impaired PwMS were recruited and submitted to a 8-week home-based training program delivered by means of an ad hoc developed innovative application software in order to offer personalized at-home intensive cognitive rehabilitation (COGNI-TRAcK). PwMS were randomized into 2 homogeneous groups of 12 patients each: the "study group" underwent an adaptive working memory training given by the automatic adjustment of the tasks difficulty to the subjects' performance; the "control group" was trained with the same working memory exercises, but at a constant difficulty level. Before and after the intervention PwMS' cognitive status was assessed using the Rao's Brief Repeatable Battery (BRB).

RESULTS

The two motor rehabilitation protocols induced similar effects on unimanual motor performance, but the bimanual coordination task revealed that the residual coordination abilities were maintained in the treated patients while they significantly worsened in the control group. Further, in the treatment group white matter integrity in the corpus callosum and corticospinal tracts was preserved while a mi-

crostructural integrity worsening was found in the control group. Conversely, a significant increase of radial diffusivity was observed in the superior longitudinal fasciculi in both groups, indicating lack of treatment effects on this structure, showing damage progression likely due to a demyelination process.
Concerning cognitive rehabilitation, our findings suggest that the proposed new system was very well accepted by PwMS as deduced by the high adherence to the treatment (average adherence of 84%). The effectiveness of COGNI-TRAcK in an adaptive and intensive cognitive rehabilitation intervention was evaluated with a standard neuropsychological tests battery (BRB). In the "study group", results showed a significant positive effect of the intervention on the performances in all tests, highlighting that COGNI-TRAcK is a tool suitable and useful for cognitive rehabilitation in MS.

CONCLUSIONS

All these findings indicate the importance of administering, when possible, a rehabilitation treatment consisting of voluntary movements. We also demonstrated that the beneficial effects of a rehabilitation treatment are task-dependent and selective in their target; this becomes crucial towards the implementation of tailored rehabilitative approaches.
Further, we also demonstrated that an adaptive cognitive training is more effective than a non-adaptive training in cognitive impaired PwMS. Intensive and personalized cognitive rehabilitation based on working memory exercises seems to improve cognitive status in these patients. Finally, we demonstrated that the intensive personalized training program administered by COGNI-TRAcK is well accepted by patients, high usable and effective in improving cognitive status in PwMS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Bonzano L, Tacchino A, Brichetto G, Roccatagliata L, Dessypris A, Feraco P, Lopes De Carvalho ML, Battaglia MA, Mancardi GL and Bove M. Upper limb motor rehabilitation impacts white matter microstructure in multiple sclerosis. Neuroimage 2014;15;90:107-16

Tacchino A, Pedullà L, Bonzano L, Vassallo C, Battaglia MA, Mancardi GL, Bove M, Brichetto G. A new App for at-home cognitive training: description and pilot study on people with multiple sclerosis. *Original paper submitted to Journal of Medical Internet Research*

Bonzano L,. Tacchino A,. Brichetto G, Roccatagliata L, Feraco P, Mancardi GL and Bove M. Motor rehabilitation impacts white matter microstructure in patients with Multiple Sclerosis, HBM Seattle, USA, 2013

Bonzano L, Tacchino A, Brichetto G, Roccatagliata L, Feraco P, Mancardi GL, Battaglia MA and Bove M. Motor rehabilitation impacts white matter microstructure of corpus callosum in patients with Multiple Sclerosis, ECTRIMS, Copenaghen, Denmark, 2013 (premiato come Best Poster presentation).

Bonzano L, Bove M, Tacchino A, Brichetto G, Roccatagliata L, Feraco P, Battaglia MA and Mancardi GL. Effects of motor rehabilitation on corpus callosum microstructural integrity in Multiple Sclerosis XLIV Congresso Nazionale SIN, Milano, 2013

Pedullà L, Tacchino A, Vassallo C, Bonzano L, Battaglia MA, Bove M, Brichetto G. Riabilitazione cognitiva nella sclerosi multipla: un trattamento personalizzato intensivo a domicilio tramite un'Applicazione per tablet non commerciale. SIRN, Genova, 2014

Pedullà L, Tacchino A, Vassallo C, Bonzano L, Battaglia MA, Bove M, Brichetto G. Home-based personalized cognitive training with a customized tablet application in people with multiple sclerosis. RIMS 2014, Brighton, United Kingdom

Pedullà L, Tacchino A, Vassallo C, Bonzano L, Battaglia MA, Bove M, Brichetto G. A new tool for personalized at-home intensive cognitive rehabilitation. GNB, Pavia, 2014

Tacchino A, Pedullà L, Vassallo C, Bonzano L, Battaglia MA, Bove M, Brichetto G. Riabilitazione cognitiva nella Sclerosi Multipla - Un trattamento personalizzato intensivo a domicilio tramite un'applicazione per tablet non commerciale. SIMFER 2014, Torino

Tacchino A, Pedullà L, Vassallo C, Bonzano L, Battaglia MA, Bove M, Brichetto G. Adaptive vs non-adaptive cognitive rehabilitation training based on working memory: effects on people with multiple sclerosis. RIMS, Milano, 2015

Bonzano L, Tacchino A, Brichetto G,. Roccatagliata L, Feraco P,. Mancardi GL, Battaglia MA and Bove M. Brain reorganization following upper limb motor rehabilitation in patients with multiple sclerosis. RIMS, Milano, 2015

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 146.000 €

Carlo Trompetto
Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantile (DINOGMI), Università di Genova, Genova

COLLABORATORI:
Lucio Marinelli, Laura Mori

Effetto delle onde d'urto sull'ipertono spastico in pazienti affetti da sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Nei soggetti affetti da sindrome del motoneurone superiore (UMN), uno dei segni clinici è la spasticità che può essere definita come una forma di ipertono dovuta ad un aumento velocità dipendente nei riflessi tonici da stiramento (Sheean, 2002). È ben noto come l'ipertono spastico sia dovuto sia ad una componente riflessa (Sheean, 2002) che alle componenti intrinseche del muscolo (Gracies, 2005). Recenti studi suggeriscono che il trattamento con onde d'urto radiali (Radial Shock Wave Therapy, RSWT), già utilizzato in numerose patologie a carico dell'apparato muscolo scheletrico, possa ridurre l'ipertono in soggetti affetti da esiti di paralisi cerebrale infantile (PC) e stroke (Vidal, 2011; Gonkova, Kim, 2013).

L'ipertono muscolare colpisce circa l'80% di soggetti affetti da sclerosi multipla (SM) (Crayton, 2004; Rizzo, 2004) ed è spesso associato a dolore (Truini, 2013).Il dolore potrebbe essere dovuto sia alle prolungate contrazioni muscolari causate dall'ipertono, che alle conseguenze sulle articolazioni e sui tessuti molli (Sheean, 2002). Inoltre, il dolore stesso è causa di ipertono e questo porta all'instaurarsi di un circolo vizioso tra dolore, ipertono e disabilità (Ward e Kadies, 2002).

Per valutare gli effetti a lungo termine della RSWT su dolore e ipertono, in questo studio randomizzato in doppio cieco controllato con gruppo placebo, la RSWT è stata usata per trattare l'ipertono doloroso dei muscoli plantiflessori della caviglia in una coorte di soggetti affetti da SM.

RISULTATI

Dei 68 soggetti con SM che rispondevano ai criteri d'inclusione, 34 hanno ricevuto il trattamento con RSWT e 34 il trattamento placebo. I partecipanti sono stati valutati al livello basale (T0), 1 settimana dopo la prima sessione (T1), 1 settimana (T2) e 4 settimane (T3) dopo l'ultimo trattamento. Sono stati valutati la percezione soggettiva del dolore tramite la *Visual Analogic Scale* (VAS), e l'ipertono con la *Modified Ashworth Scale* (MAS) ed è stata studiata l'eccitabilità spinale mediante lo studio del riflesso H. Il trattamento con RSWT è consistito in 4 sessioni a cadenza settimanale, per un totale di circa 2000 *shots*, ad una frequenza di 4 Hz e una pressione di 1,5 Bar. Nel trattamento placebo un cuscinetto in schiuma è stato posto davanti alla punta dell'applicatore. A T1 è stata riscontrata una riduzione del dolore alla scala VAS ($p<0,0001$), a T2 una riduzione sia alla VAS ($p<0,0001$) che alla MAS ($p<0,0001$), mentre a T3 si è evidenziato il mantenimento dell'effetto solo alla VAS ($p=0,0004$). La valutazione elettrofisiologica è stata eseguita a T0 e T2 nel solo gruppo trattato con RSWT, ma l'eccitabilità spinale è risultata sostanzialmente invariata ($p>0,05$). Il risultato principale di questo studio è che 4 sedute di RSWT hanno prodotto una riduzione del dolore nei soggetti sottoposti a trattamento. Nel momento del massimo effetto sul dolore (T2), è stata osservata una riduzione consensuale dell'ipertono, nonostante non si siano osservati cambiamenti nella stenia né nei test funzionali (*10 meters walking test*). Non si è evidenziato nessun cambiamento nel gruppo sottoposto a trattamento placebo. Sebbene i risultati sul dolore siano in linea con la letteratura, l'effetto sull'ipertono ha avuto durata inferiore. È possibile che la discrepanza con gli studi effettuati su soggetti affetti da PC sia correlata all'età dei soggetti; inoltre, la spasticità nelle persone SM è spesso dovuta a lesioni spinali, mentre nello *stroke* e nella PC è dovuta a lesioni cerebrali ed è noto che i meccanismi fisiopatologici sono

parzialmente diversi (Sheean, 2002; Ward and Kadies, 2002). Un'altra spiegazione potrebbe essere l'effetto della RSWT sulla fibrosi e le altre componenti non riflesse dell'ipertono (Gonkova, 2013), che, modificando l'eccitabilità dei fusi neuromuscolari, potrebbero portare ad una secondaria riduzione della spasticità.

CONCLUSIONI

In seguito al trattamento con RSWT non sono stati osservati effetti collaterali in nessuno dei soggetti trattati. In particolare, la RSWT non ha prodotto debolezza nei muscoli trattati, confermando così i risultati ottenuti in precedenti studi. La debolezza muscolare è il principale effetto collaterale nel trattamento farmacologico dell'ipertono, che spesso va a limitare o compromettere i benefici clinici (Gracies, 1997).
Il fatto che la RSWT possa ridurre il dolore e il tono muscolare in persone con SM, senza alcun effetto sulla forza muscolare, conferma l'idea che questo trattamento agisca sulle componenti non riflesse dell'ipertono. Con questo studio è stato possibile evidenziare quante sessioni di trattamento siano necessarie e quanto durino gli effetti. Durante il trattamento i pazienti non hanno eseguito trattamento fisioterapico, in modo da riferire i cambiamenti nelle misure di *outcome* alla sola RSWT. Per ottimizzare i risultati funzionali ottenuti, la RSWT dovrebbe essere integrata in un programma riabilitativo completo.

Effect of radial shock wave therapy on muscle hypertonia in patients with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

In subjects with upper motor neuron syndrome (UMN), one of the clinical signs is spasticity, which can be defined as a form of hypertonia due to a velocity-dependent increase in tonic stretch reflexes resulting from abnormal spinal processing of proprioceptive inputs (Sheean, 2002). In addition to spasticity, however, it is well known that subjects with UMN syndrome are also suffering from a non-reflex hypertonia, due to connective tissue changes (Gracies, 2005).
Radial shock wave therapy (RSWT) has been extensively used in rehabilitative medicine to treat musculoskeletal disorders, and more recently muscle hypertonia, in patients with cerebral palsy (PC) and stroke (Vidal, 2011; Gonkova, Kim, 2013). Muscle hypertonia affects up to 80% of subjects with multiple sclerosis (MS) (Crayton, 2004; Rizzo, 2004) and is often painful (Truini, 2013). Pain probably reflects the prolonged abnormal contractions due to spasticity, but it also depends on the musculoskeletal consequences due to spasticity and the other components of the UMN syndrome (Sheean, 2002). The relationship between spasticity and pain is made even more strict by the fact that pain increases spasticity, creating a spiralling course of more pain and disability (Ward and Kadies, 2002).
To assess the long-term effects of RSWT on pain and hypertonia, in this randomised, double blind, placebo-controlled study RSWT has been used to treat the painful hypertonia of ankle extensor muscles in a cohort of subjects affected by MS.

RESULTS

On a total 68 subjects affected by MS who met the inclusion criteria, 34 subjects received RSWT and 34 subjects received placebo treatment. Participants were assessed at baseline (T0), 1 week after the first session (T1), 1 week (T2) and 4 weeks (T3) after the last session. We measured pain using the visual analogue scale for pain (VAS), muscle tone using Modified Ashworth Scale (MAS) and we evaluated spinal excitability using the H-reflex. RSWT consisted of a course of 4 sessions with a 1week interval, with an amount of 2000 shots at a 4 Hz frequency and 1.5 Bars. In the placebo sessions we placed a thin foam cushion on the metal applicator. At T1 we assessed a reduction in VAS score ($p<0,0001$), at T2 a reduction both in VAS score ($p<0,0001$) and in MAS score ($p<0,0001$), while at T3 the effect lasted just in VAS score ($p=0,0004$). The electrophysiological evaluation was performed at T0 and T2 only in the RSWT group, but spinal excitability resulted unaffected ($p>0,05$). The main finding of this study, was that a course of 4 sessions of RSWT produced a pain reduction. At the time of the maximal effect on pain

(T2), a reduction of muscle tone was observed, while no significant changes were observed in strength or in functional test (10 meters walking test). No changes were assessed in the placebo group.
Though our results on pain were in line with the literature, our findings on muscle tone lasted for a shorter time. We suggest that the discrepancy between our results and those reported in the studies performed in PC patients is probably related to the patients' age; moreover, spasticity in MS patients is often due to spinal lesions, while in stroke and PC patients is due to cerebral lesions and it is known that pathophysiological mechanisms are partially different (Sheean, 2002; Ward and Kadies, 2002). Another mechanism could be the effect of RSWT on muscle fibrosis and other non-reflex components of muscle hypertonia (Gonkova, 2013) which could modify muscle spindles excitability, leading to a secondary reduction of spasticity.

CONCLUSIONS

After RSWT no adverse effects were observed in any patient. In particular, RSWT did not induce weakness in the treated hypertonic muscles, confirming previous results. Weakness is a major side effect in the pharmacological treatment of muscle hypertonia, which often limits or even overwhelms the clinical benefit (Gracies, 1997).
The fact that RSWT can reduce the pain and the muscle tone in MS patients, without any effect on muscle strength, supports the idea that RSWT is likely to act on non-reflex hypertonia. We know how many sessions are needed and how long the results last. During the study, patients have not been treated with physiotherapy, in order to refer any changes in outcome measures to RSWT itself. To optimise the effect in MS patients and obtain functional results, RSWT should be integrated in a rehabilitation program.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Marinelli L, Mori L, Solaro C, Uccelli A, Pelosin E, Currà A, Molfetta L, Abbruzzese G, Trompetto C. Effect of radial shock wave therapy on pain and muscle hypertonia: a double-blind study in patients with multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal 25 sept 2014, pages 1-8

Oral presentation at: XIV Congresso Nazionale SIRN, Genova 8-10 maggio 2014. and 42° Congresso Nazionale SIMFER, Torino 28 settembre-1 ottobre 2014

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 2 anni per l'ammontare di 41.273 €

Domenico Antonio Restivo
Unità Operativa di Neurologia, P.O. "Nuovo Garibaldi", Catania

COLLABORATORI:
Antonino Pavone, Davide Maimone, Maurilio Russo

Valutazione dell'efficacia della stimolazione transcranica a corrente diretta nella disfagia associata a sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La disfagia è considerata una complicazione della sclerosi multipla (SM) molto severa ed invalidante. La sua prevalenza può essere stimata intorno al 30-40%. Inoltre la polmonite da aspirazione (polmonite ab ingestiis) associata a disfagia è una delle prime cause di morte nei pazienti con SM.
Ad oggi non esiste alcun trattamento farmacologico per la disfagia nelle persone con SM. Negli scorsi anni, la stimolazione transcranica a corrente diretta (tDCS) ha dimostrato di essere utile nel modulare l'eccitabilità corticale per periodi superiori alla durata di applicazione dello stimolo (Jeffery et al., 2007; Nitsche MA e Paulus w 2001). Recentemente è stato dimostrato che la tDCS con corrente anodica con intensità di 1.5 mA per 10 min o di 1 mA per 20 min, applicata alle aree corticali implicate nella deglutizione, è stata in grado di indurre un incremento dell'eccitabilità delle aree corticali della deglutizione, rispetto alla stimolazione fittizia ("sham") in soggetti sani (Jefferson et al., 2009). Tale incremento sembra correlare con un miglioramento delle funzioni deglutitorie. Questi risultati sono stati confermati in pazienti con disfagia da stroke, in cui la tDCS anodica è stata applicata all'area corticale deglutitoria dell'emisfero non affetto (Kumar et al., 2011). In questo studio, abbiamo valutato 18 pazienti con disfagia associata a SM, allo scopo di valutare l'effetto della tDCS anodica con intensità di 2mA per 20 minuti sulle funzioni deglutitorie studiante mediante videofluroscopia, elettromiografia e scale di valutazione cliniche quali la *Penetration/Aspiration Scale* (PAS) e la scala di severità della disfagia a 5 punti, e di comparalo con l'effetto indotto da stimolazione elettrica del faringe (PES), oltre che con stimolazione sham.

RISULTATI

Dopo tDCS "real" (6 pazienti) così come dopo PES (6 pazienti) si è osservato un significativo miglioramento ($p < 0.05$) di tutti i parametri di outcome, rispetto alla stimolazione sham (6 pazienti). L'effetto era più evidente al quinto giorno (T_1), subito dopo la fine dell'ultima sessione di stimolazione elettrica, ed a 2 settimane (T_2) dopo la fine, ma manteneva ancora la sua significatività anche a 4 settimane (T_3).

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio suggeriscono che la tDCS anodica applicata sull'area corticale della deglutizione è potenzialmente in grado di migliorare le funzioni deglutitorie in pazienti con disfagia associata a SM, con un effetto simile a quello indotto da stimolazione elettrica del faringe. Tuttavia la tDCS è sicuramente meglio tollerata della stimolazione elettrica del faringe e più facile da applicare. Considerando il vasto impatto della disfagia sulla progressione e sulla severità della malattia e considerando anche l'assoluta carenza di terapie farmacologiche, questo trattamento terapeutico e riabilitativo, in associazione con altri trattamenti riabilitativi e fisici già utilizzati potrebbe rappresentare un utile approccio per trattare un sintomo così grave e disabilitante quale la disfagia associata a SM.

Transcranial direct current stimulation (tdcs) for dysphagia associated to multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Dysphagia, is considered a very severe and life-threatening complication of MS. Its prevalence in MS can be attested around 30-40%. Furthermore, the aspiration pneumoniae due to dysphagia is the leading cause of death in MS patients. No specific pharmacological treatment has been reported for dysphagia in MS patients, up to now. Recently, transcranial direct current stimulation (tDCS) has shown to be able to modulate brain excitability for periods overlasting the duration of the stimulus application (Jeffery et al., 2007; Nitsche MA e Paulus w 2001). Recently, it has been demonstrated that as compared with sham, anodal tDCS both 1.5 mA for 10 min or 1 mA for 20 min, over cortical swallowing areas, increased swallowing motor cortex excitability in healthy subjects (Jefferson et al., 2009). More recently, the increase in cortical excitability was also observed in patients with stroke-related dysphagia, by applying anodal tDCS over the unaffected hemisphere (Kumar et al., 2011). The increase in swallowing motor cortex excitability was correlated to a clinical improvement in swallowing ability (Kumar et al., 2011).

The aim of this study was to assess in 18 dysphagic MS patients, the efficacy and effects of 2mA, 20 min anodal tDCS on swallowing functions, measured by videofluoroscopic, electromyographic, and clinical evaluations represented by the Penetration/Aspiration Scale (PAS) and by the 5-point dysphagia severity scale, as compared to both 5 Hz pharyngeal electrical stimulation (PES) and sham.

RESULTS

A significant ($p < 0.05$) improvement was observed after “real” tDCS (6 patients) and PES (6 patients) as compared to “sham” group (6 patients) in all the outcome measures. The effect was stronger at day 5 (T_1), immediately after the last session of electrical stimulation, at two (T_2) weeks, but still persisted at 4 weeks (T_3)

CONCLUSIONS

The results of this suggest that anodal tDCS over the swallowing motor cortex is potentially capable of improving swallowing functions in dysphagic MS pateints. The beneficial effect of tDCS was similar to the effect produced by PES. However, tDCS is better tolerated and easier to perform than PES. Considering the large impact of dysphagia on the disease progression and severity, and considering also the complete lack of pharmacological treatment, this technique, in association with physical/rehabilitation, may represent an useful approach to treat this very disabling and troublesome symptom.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 1 anno e l’ammontare di 35.000 €

Simona Malucchi
CReSM (Centro di Riferimento regionale Sclerosi Multipla), AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano - Torino

COLLABORATORI:
Martina Borghi, Francesco Scavelli, Marco Cavallo, Luca Ostacoli, Sara Carletto, Antonio Bertolotto

Studio longitudinale sul funzionamento neuropsicologico in pazienti con sclerosi multipla in confronto con la popolazione generale

PREMESSE E OBIETTIVI

Il presente progetto si propone di valutare e monitorare la progressione del deficit cognitivo facendo uso della *Rao's Brief Repeatable Battery*, che è di gran lunga lo strumento più utilizzato per stimare la disfunzione cognitiva nei pazienti SM. La batteria è stata somministrata a pazienti colpiti da SM che fanno capo al CReSM (Centro Regionale di Riferimento per la Sclerosi Multipla) dell'AOU San Luigi Gonzaga di Orbassano, Torino. 303 persone sono state reclutate, e ricavate le seguenti variabili demografiche: età, sesso, durata della malattia, dettagli sulla malattia.
Al fine di neutralizzare eventuali effetti di apprendimento, la stessa batteria neuropsicologica è stata somministrata ad un gruppo di controllo di persone sane provenienti dalla stessa area. Il confronto con il gruppo di controllo è stato effettuato considerando le distribuzioni di sesso, età e livello di istruzione.
I risultati dei pazienti sono stati confrontati con quelli del gruppo di controllo, che ha fornito la proporzione di effetto di apprendimento da considerare al fine di avere un quadro pulito del reale declino. Le due coorti sono state seguite per tre anni e il test è stato somministrato annualmente. La disabilità fisica dei pazienti è stata valutata utilizzando la scala EDSS di Kurtzke.
Dai dati raccolti è stato possibile ottenere: prevalenza delle disfunzioni cognitive in una generica popolazione SM, percentuale della reale progressione cognitiva per anno, eventuale correlazione tra le funzioni cognitive e EDSS, depressione, fatica e ansia.

RISULTATI

Come previsto, da un punto di vista clinico, il gruppo di pazienti presenta livelli più elevati di ansia, depressione e fatica rispetto ai controlli sani, come misurato rispettivamente dalle scale di valutazione HADS (Hospital Anxiety Depression Scale) e FSS (Fatigue Severity Scale).
Da un punto di vista cognitivo, la differenza tra pazienti e controlli sani alla *Rao's BRB* è risultata statisticamente significativa in tutti i test. In primo luogo sono state confrontate le prestazioni alla batteria neuropsicologica dopo uno (T1) e due anni (T2), al fine di verificare se le differenze significative sono state mantenute nel tempo.
A T1, la differenza tra la performance in due test non è stata statisticamente significativa tra i due gruppi, mentre negli altri test è stata rilevata una differenza statisticamente significativa, con i pazienti che hanno avuto una prestazione peggiore rispetto ai controlli. A T2, in tutti i test è emersa una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, con pazienti che hanno avuto una performance peggiore rispetto ai controlli.
Le differenze tra basale (T0) dei pazienti e le performances successive [(T1-T0)/T0, e (T2-T1)/T1] su tutti i test sono state confrontate attraverso t-test con le corrispondenti differenze del gruppo di controllo sano. Il primo confronto tra i due gruppi di partecipanti (T1-T0)/T0 non ha mostrato alcuna differenza significativa: questo modello di risultati potrebbe significare che quando si considera un periodo relativamente breve (un anno rispetto al basale) e se si tiene conto delle prestazioni a T0, non ci sono cambiamenti significativi nel profilo cognitivo dei pazienti. È interessante notare che il secondo confronto (T2-T1)/T1 ha mostrato una differenza significativa nei seguenti test: SDMT, PASAT2, SRT-D, e WLG: questo modello di risultati potrebbe significare che quando si considera un periodo più

lungo (due anni rispetto al basale), alcuni test diventano più impegnativi per i pazienti con sclerosi multipla rispetto ai controlli sani.

CONCLUSIONI

Il campione è composto da 303 pazienti (91 maschi e 212 femmine) e 279 controlli (84 maschi e 195 femmine). 267 pazienti su 303 (88%) sono classificati come SM recidivante-remittente (RR), 9 (3%) come primaria progressiva (PP), 21 (7%) secondaria progressiva (SP), e 6 (2%) come recidivante-progressiva (RP).Al T0 i due gruppi di partecipanti differiscono in HADS-ansia e HADS-depressione. Inoltre, il livello di fatica valutato con FSS, è significativamente diversa. Il deficit cognitivo è stato definito operativamente come il sussistere di due o più test BRB con punteggi di almeno 1,5 deviazioni standard al di sotto del punteggio dei controlli sani. 195/303 pazienti (64,4%) non ha mostrato la presenza di *impairment* cognitivo (C.I.); 34/108 (11,2%) presentano un grado lieve di C.I.; 31/108 (10,2%) presentano una C.I. moderata; 43/108 (14,2%) mostrano un C.I. grave. I predittori significativi più sensibili dei punteggi alla *BRB-N* sono stati: la presenza di SM, l'età, l'istruzione, e il vocabolario. I predittori significativi se si considerano solo i pazienti con SM sono stati: corso di SM, età, istruzione, vocabolario e depressione.
I risultati confermano l'evidenza della presenza e della natura del deterioramento cognitivo in un ampio campione di pazienti con sclerosi multipla. Inoltre, i nostri risultati identificano importanti fattori clinici e demografici di deterioramento cognitivo nei pazienti con SM: il decorso, la durata della malattia, il punteggio EDSS e il vocabolario. I pazienti che hanno forme progressive di SM tendono a presentare un profilo clinico e cognitivo più grave, rispetto ai pazienti con forma recidivante remittente della malattia.

Longitudinal study of neuropsychological functioning in MS patients in comparison to general population

INTRODUCTION AND AIMS

The project aims to evaluate and monitor the cognitive impairment progression by means of the Rao's Brief Repeatable Battery, that is by far the most widely used tool to estimate cognitive disfunction in MS patients. The battery was administered to patients affected by MS referring to the CReSM (Centro Regionale di Riferimento per la Sclerosi Multipla) of AOU San Luigi Gonzaga in Orbassano, Turin.
303 persons were recruited and the following demographic variables were collected: age, sex, disease duration and details on the disease. In order to neutralize possible practice effects, the same neuropsychological battery was administered to a control group made of healthy subjects from the same catchment area. Group matching was used to obtain comparable distribution of sex, age and educational level. Patients' results were compared with those of the control group, providing the rate of practice effect to be considered in order to have a clear picture of the real decline. The two cohorts were followed for three years and the test was performed yearly. Physical disability was rated using Kurtzke's EDSS score. From the data gathered by the research it was possible to obtain: prevalence of cognitive dysfunctions in a general MS population, rate of real cognitive progression for year, possible correlation between cognitive functions and EDSS, depression, fatigue and anxiety.

RESULTS

As expected, from a clinical standpoint, the group of patients presented with higher levels of anxiety, depression and fatigue than healthy controls, as measured by the HADS (Hospital Anxiety Depression Scale) and the FSS (Fatigue Severity Scale), respectively.
From a cognitive point of view, the difference between patients and healthy controls on the Rao's BRB subtests was statistically significant for all of them. We firstly compared patients' and healthy controls' performances on the Rao BRB subtests on both T1 and T2, in order to verify whether the significant differences were maintained over time.
At the T1 assessment, participants' performance on two subtests was not statistically significantly different between the two groups, whereas the other

subtests maintained a statistically significant difference, with patients performing worse than controls. Then, at the T2 assessment, participants' performance on all of the cognitive subtests presented a statistically significant difference between the two groups, with patients performing worse than controls.
Secondly, in order to reach our goal, the differences between patients' baseline and the following performances [(T1-T0)/T0, and (T2–T1)/T1] on all of the cognitive subtests were compared with the corresponding differences in the healthy control group via t-test. The first comparison between the two groups of participants (T1–T0)/T0 did not show any significant difference: this pattern of results could mean that when considering a relatively short period (one year from baseline) and when taking into account baseline performance, there is no significant change in patients cognitive profile. Interestingly, the second comparison (T2–T1)/T1 showed a significant difference in the following subtests: SDMT, PASAT2, SRT-D, and WLG: this pattern of results could mean that when considering a longer period (two years from baseline), even if we take into account one-year performance, some subtests become more challenging for patients with MS, as compared to healthy controls.

CONCLUSIONS

The sample consists of 303 patients (91 males and 212 females) and 279 controls (84 males and 195 females). 267 patients out of 303 (88%) are classified as relapsing-remitting (RR), 9 (3%) as primary progressive (PP), 21 (7%) as secondary progressive (SP), and 6 (2%) as relapsing-progressive (RP).
At T0 the two groups of participants differed in HADS-anxiety and HADS-depression. In addition, the level of fatigue, FSS, was significantly different too. Cognitive impairment was defined operatively as having two or more BRB tests with scores at least 1.5 standard deviations below the scores of healthy controls. 195/303 patients (64.4%) did not show the presence of cognitive impairment (C.I.); 34/108 (11.2%) presented with a mild degree of C.I.; 31/108 (10.2%) with a moderate C.I.; 43/108 (14.2%) presented with a severe C.I. The significant predictors of the most sensitive BRB-N scores were: presence of MS, age, education, and vocabulary. The significant predictors when considering MS patients only were: course of MS, age, education, vocabulary, and depression.
The results corroborate the evidence about the presence and the nature of cognitive impairment in a large sample of patients with MS. Furthermore, our findings identify significant clinical and demographic determinants of cognitive impairment in MS patients: course of MS, duration of illness, EDSS score and vocabulary. Patients presenting with the progressive forms of MS tend to present a more severe clinical and cognitive profile, as compared to patients with the relapsing remitting form of the disease.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Borghi M, Cavallo M, Carletto S, Ostacoli L, Zuffranieri M, Picci RL, Scavelli F, Johnston H, Furlan P.M, Bertolotto A., Malucchi S, Presence and significant determinants of cognitive impairment in a large sample of patients with multiple sclerosis", PLOS One, 2013 July 29;8(7); -abstract presented to the American Academy of Neurology, Philadelphia 2014

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2009 per il periodo di 3 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 100.000 €

Pier Maria Furlan
Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino, Torino

COLLABORATORI:
Luca Ostacoli, Sara Carletto, Martina Borghi, Gabriella Bertino, Simona Malucchi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI: **Centro Regionale di Riferimento per la Sclerosi Multipla (CReSM), A.O.U. San Luigi Gonzaga, Orbassano (Torino)**

L'efficacia dell'Eye Movement Desensitization and Reprocessing (EMDR) in pazienti con Disturbo Post Traumatico da Stress con diagnosi di sclerosi multipla. Uno studio randomizzato controllato

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) può essere associata a molti sintomi psicologici. Uno dei sintomi più rilevanti è l'esperienza di disagio legata all'impatto traumatico della diagnosi o di episodi recidivanti e alla progressione della malattia, che può portare allo sviluppo di un Disturbo Post-Traumatico da Stress (DPTS). La prevalenza di DPTS in pazienti affetti da SM varia tra il 16% e il 18% secondo l'unica ricerca pubblicata in letteratura precedente a questo progetto (Chalfant et al., 2004), e non ci sono altri studi sull'efficacia dei trattamenti psicologici per pazienti con SM nonostante la sua rilevanza per la qualità di vita delle persone con SM. Lo scopo primario di questa ricerca è quello di valutare l'efficacia del trattamento con EMDR (Eye Movement Desensitization and Reprocessing) per il DPTS secondario alla SM, comparandolo alla Terpia di Rilassamento (RT). L'EMDR è il trattamento elettivo (insieme alla terapia cognitivo-comportamentale) per il DPTS secondo le linee guida internazionali. Inoltre come obiettivi secondari si vuole valutare l'efficacia dell'EMDR sui sintomi associati al DPTS di ansia e depressione, e sulla qualità della vita dei pazienti.

RISULTATI

Il risultato più significativo che emerge da questo studio è che la maggior parte dei pazienti sono stati in grado di superare il DPTS dopo 10 sedute di terapia. Entrambi i trattamenti sembrano essere efficaci nel ridurre il DPTS e i sintomi concomitanti di ansia, depressione e nel migliorare la qualità di vita delle persone affette da SM, anche in un numero limitato di sedute, con un effetto che dura anche dopo 6 mesi dalla fine del trattamento psicologico, soprattutto per il gruppo trattato con EMDR. Un dato da sottolineare è la minore prevalenza di DPTS risultata rispetto al previsto (6,9%). L'unica altra ricerca condotta finora è stata quella di Chalfant e collaboratori nel 2004, che ha registrato una prevalenza di DPTS in pazienti con SM di quasi il 16-18%. Sulla base di questi risultati avevamo ipotizzato che la somministrazione del IES-R a circa 500 pazienti ci avrebbe permesso di raggiungere il numero di 60 pazienti trattati. Invece, abbiamo dovuto ampliare il nostro gruppo di screening a circa 1.000 pazienti affetti da SM. Una possibile spiegazione di questa discrepanza tra i risultati trovati da Chalfant e collaboratori [2004] e i risultati di questo progetto è l'impiego di diversi questionari per valutare e approfondire la diagnosi di DPTS. Questa procedura differente può comportare una diversa efficienza nel rilevare la presenza di DPTS. Inoltre, il nostro campione è molto più ampio di quello dello studio di Chalfant, ed è quindi possibile che i nostri risultati possano rappresentare una stima più realistica del reale prevalenza di DPTS secondario alla SM.

CONCLUSIONI

Questo progetto di ricerca mostra che in pazienti con SM, l'EMDR e la Terapia di Rilassamento sono efficaci nel ridurre i sintomi di DPTS anche con un numero limitato di sedute. L'EMDR può essere più efficace della RT, perché la sua efficacia permane anche sei mesi dopo la fine del trattamento e in al-

cuni casi i risultati sono più visibili nel lungo termine. Questi risultati incoraggianti dimostrano che è essenziale che i sintomi di DPTS vengono rilevati e che interventi brevi e costo-efficaci per ridurre il DPTS e i sintomi associati, vengano offerti ai pazienti con SM, al fine di aiutare questi pazienti a ridurre il carico psicologico associato ala loro malattia.

The efficacy of Eye Movement Desensitization and Reprocessing (EMDR) in patients with Post Traumatic Stress Disorder in multiple sclerosis. A randomized controlled trial

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) can be associated to many psychological symptoms. One of the most relevant symptom is the experience of distress related to the traumatic impact of the diagnosis or of relapsing episodes and the progression of the disease, that can lead to the development of Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD). The prevalence of PTSD in MS ranges between 16% and 18% (Chalfant et al., 2004), and as far as we know there are no studies on the efficacy of psychological treatments in MS in spite of its relevance for patients' quality of life.
Primary aim of this research is to evaluate the efficacy of the treatment with EMDR (Eyes Movement Desensitization and Reprocessing) in PTSD secondary to MS, in comparison with Relaxation Therapy (RT). EMDR is the elective treatment (together with Cognitive Behavioral Therapy) for PTSD according to the international guidelines. The secondary aims are to evaluate the efficacy of EMDR on the PTSD-associated symptoms of anxiety and depression, and on the patients' quality of life.

RESULTS

The most significant result emerging from this study is that the majority of patients were able to overcome their PTSD diagnosis after 10 therapy sessions. Both treatments seems to be effective in reducing PTSD, and concomitant anxiety and depressive symptoms, and to improve quality of life, even in a limited number of sessions, with an effect that lasts even after 6 months after the end of the psychological treatment, especially for the group treated with EMDR.
It's important to underline that we found a lower prevalence of PTSD (6.9%) than expected. The only research conducted so far was that of Chalfant and collaborators in 2004, which reported a prevalence of PTSD in patients with MS of almost 16-18%. On the basis of these results in the protocol of our study we hypothesized that the administration of the IES-R in approximately 500 patients would allow us to reach the number of 60 patients treated. Instead, we had to expand our catchment group to nearly 1,000 patients with MS. A possible explanation for this discrepancy between the results found by Chalfant and collaborators [2004] and the results of the current research is the use of different questionnaires to reach the diagnosis of PTSD. This different procedure may result in a different capacity to detect the presence of PTSD. In addition, our sample is much broader than that of Chalfant study, and it is therefore possible that our results may represent a more realistic estimate of the actual prevalence of PTSD secondary to MS.

CONCLUSIONS

This research project suggests that in MS patients, EMDR and RT are effective for reducing PTSD symptoms even with a limited number of sessions. EMDR may be more effective than RT, because its effects lasts even six months after the end of treatment and in some cases the results are more visible at a time-distance of some months.
These encouraging results show that it is essential that PTSD symptoms are detected and that brief and cost-effective interventions to reduce PTSD and associated psychological symptoms, were offered to to patients with MS, in order to help these patients to reduce the psychological burden associated with their disease.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Ostacoli L, Carletto S, Borghi M, Cavallo M, Rocci E, Zuffranieri M, Malucchi S, Bertolotto A, Zennaro A, Furlan PM, Picci RL. Prevalence and significant determinants of Post-traumatic Stress Disorder in a large sample of patients with Multiple Sclerosis. Journal of Clinical Psychology in Medical Settings, 2013, 20:240-246

Carletto S. The application of EMDR in medical disorders and depression. Research results.
Convegno Eye Movement doctoral research: Fourth Metz Academic Meeting (MAM),Université de Lorraine, Metz (FR), 8-9 luglio 2014

Borghi M, Bertino G, Boni D, Carletto S, Castaldo M, Marnetto L, Negro M, Zaccarino C, Ostacoli L. L'efficacia dell'EMDR in pazienti con Disturbo Post Traumatico da Stress con diagnosi di Sclerosi Multipla. Uno studio randomizzato controllato. Convegno Nazionale EMDR "Labirinti traumatici: il filo dell'EMDR", Milano, 8-9-10 novembre 2013

Carletto S. The application of EMDR in medical disorders and depression. Current research. Convegno Eye Movement doctoral research: Third Metz Academic Meeting (MAM),Université de Lorraine, Metz (FR), 2-3 luglio 2013

Carletto S, Francone D, Castaldo M, Negro M, Borghi M, Bertino G, Zuffranieri M, Ostacoli L, Furlan PM. L'efficacia dell'Eye Movement Desensitization and Reprocessing (EMDR) in pazienti con Disturbo Post Traumatico da Stress con diagnosi di Sclerosi Multipla. XLI Congresso Nazionale della Società Italiana di Psicoterapia Medica, Sezione della Società Italiana di Psichiatria, "Psicoterapia. Curare con le parole, integrare con il nuovo, dimostrare con le neuroscienze", Centro Didattico Facoltà di Medicina e Chirurgia San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO), 8-10 giugno 2012

Ostacoli L, Borghi M, Carletto S, Cavallo M, Malucchi S, Sguazzotti E, Rocci E, Zuffranieri M, Furlan PM. L'efficacia dell'Eye Movement Desensitization and Reprocessing (EMDR) in pazienti con Disturbo Post Traumatico da Stress con diagnosi di Sclerosi Multipla. Uno studio randomizzato controllato. Convegno Nazionale EMDR "Trauma e Relazione", Roma, 23-24-25 settembre 2011

Borghi M, Carletto S, Rocci E. Il Disturbo Post Traumatico da Stress in soggetti con diagnosi di Sclerosi Multipla. XIII Congresso Nazionale della Sezione di Psicologia Clinica-Dinamica, Associazione Italiana Psicologia (AIP), Catania, 16-18 settembre 2011

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2009 per il periodo di 3 anni e l'ammontare di 52.000 €

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

DISEASE CLASSIFICATION AND DIAGNOSIS

Morena Martucci
DIMES- Laboratorio di Immunologia, Università di Bologna, Bologna, Italia;
Charitè- Institute of Biochemistry, University of Berlin, Berlin, Germany

MENTORE: **Michele Mishto**

Identificazione di biomarcatori infiammatori e dei corrispettivi meccanismi specifici nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'identificazione di biomarcatori immunologici e vie patologiche specifiche nell'insorgenza e progressione della sclerosi multipla (SM) rappresenta una sfida importante per migliorare l'efficienza prognostica e le possibili terapie. Poiché l'immunità adattativa gioca un ruolo rilevante nell'eziopatologia della SM, abbiamo studiato la risposta dei linfociti T verso piccoli frammenti (epitopi) derivati dalla digestione di proteine mieliniche da parte dei proteasomi, complessi di degradazione proteica. In particolare, ci siamo focalizzati su un meccanismo peculiare del proteasoma detto *Proteasome-catalysed peptide Splicing* in grado di legare frammenti di proteine precedentemente tagliate e generare nuovi antigeni. Tale studio è stato condotto in pazienti con forma di SM recidivante remittente (SMRR), persone in cui si è manifestata una foma clinicamente isolata (CIS) e controlli sani, reclutati sia nella popolazione tedesca che italiana e portatori delle varianti genetiche HLA-A*02, HLA-A*03 e HLA-B*07 del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I), le quali rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo della SM. Inoltre abbiamo cercato di isolare le cellule T CD8+ maggiormente reattive verso epitopi mielinici di s*plicing,* per sviluppare cloni da utilizzare in studi *in cellulo* e approfondire l'analisi di tale meccanismo sotteso al sistema immunitario umano. Abbiamo anche caratterizzato lo stato infiammatorio dei donatori misurando nel siero di pazienti e controlli i livelli di Osteopontina e di proteasoma circolante, implicati nel quadro infiammatorio della SM.

RISULTATI

Per l'identificazione di nuovi epitopi derivati dalla degradazione della mielina con il meccanismo di *Proteasome-catalysed peptide Splicing* abbiamo utilizzato due *software* innovativi sviluppati nell'Istituto ospitante, uno bioinformatico predittivo (SpliceMet) e uno di quantificazione (QME), associati a studi *in vitro* di digestione proteica e analisi di spettrometria di massa. Questo metodo combinato ci ha portato all'identificazione di 6 nuovi frammenti proteici di s*plicing*, due dei quali sono stati riconosciuti dai linfociti T CD8+. In particolare: un epitopo legante la variante genetica HLA-A*0201 e appartenente ad una proteina nucleare del virus Epstein-Barr, virus supposto essere coinvolto nell'insorgenza della SM; un epitopo legante la variante HLA-B*07 e appartenente alla proteina basica della mielina. Verso questi epitopi, successivamente abbiamo identificato, in individui sani, linfociti T CD8+ altamente responsivi, che sono stati processati per lo sviluppo di cloni cellulari sebbene senza successo. Infine, abbiamo caratterizzato lo stato infiammatorio di pazienti e controlli sani tramite misura dell'Osteopontina e del proteasoma circolante nel sangue. L'Osteopontina è una molecola pro-infiammatoria che ha un ruolo fondamentale nella SM, il proteasoma circolante è la forma extracellulare dei proteasomi e il suo livello, misurato in vari fluidi biologici, aumenta in condizioni patologiche. Dal nostro studio è emerso che l'Osteopontina e il proteasoma circolante aumentavano nei pazienti con SMRR rispetto ai controlli e i loro livelli erano inversamente correlati. Il proteasoma circolante sembra essere coinvolto nei processi che diminuiscono l'infiammazione, contrariamente all'Osteopontina, suggerendo una possibile interazione tra le due molecole. Questo potrebbe quindi rappresentare un nuovo meccanismo patologico della SM.

CONCLUSIONI

Il meccanismo di *Proteasome-catalysed peptide Splicing* aumenta notevolmente la variabilità delle proteine riconosciute dal nostro sistema immunitario

e quindi rappresenta un punto chiave, finora trascurato, per la comprensione delle reazioni autoimmuni alla base di patologie come la SM. Inoltre le nostre osservazioni potrebbero suggerire nuovi biomarcatori sierici capaci di agevolare il monitoraggio della fase attiva di malattia, ma anche la progressione e la risposta alla terapia con uso di metodi non invasivi per il paziente.

Identification of inflammatory biomarkers related to underlying MS–specific mechanisms

INTRODUCTION AND AIMS

The identification of immunological biomarkers and pathological pathways involved in the onset and progression of multiple sclerosis (MS) is a major challenge to improve prognosis and therapies. Since adaptive immunity plays an important role in the aetiopathology of MS, we studied the response of T lymphocytes against small fragments (epitopes) derived from the digestion of myelin proteins by proteasomes, proteolytic complexes for protein degradation. In particular, we focused on a peculiar mechanism of proteasome activity named *Proteasome-catalysed peptide Splicing,* which is capable to ligate protein fragments previously cut and thus generate new antigens. This study was carried in patients with the relapsing-remitting form of MS (RRMS), people affected by clinically isolated syndrome (CIS) and healthy controls, recruited in the Italian and German population. These individuals carried the genetic variants HLA-A*02, HLA-A*03 and HLA-B*07 of the major histocompatibility complex class I (MHC I), which represent a risk factor for the development of MS. We also tried to isolate the CD8+ T cells highly responsive against myelin *spliced* epitopes, to develop specific clones to use in *in cellulo* studies and analyze in detail one of mechanisms underlying the human immune system. We also analyzed the inflammatory profile of sera patients and controls to characterize the inflammatory status of the donors. To this end we measured the levels of Osteopontin and circulating proteasomes, which are implicated in the inflammatory framework of MS.

RESULTS

In order to identify new epitopes derived from the degradation of myelin protein by the mechanism of *Proteasome-catalysed peptide Splicing* we used two innovative softwares developed in the host Institute: a predictive bioinformatics method (SpliceMet) and a quantification method (QME), associated to *in vitro* studies of protein digestion and mass spectrometry analyses. This combined approach led us to the identification of 6 novel spliced protein fragments, two of which have been recognized by CD8+ T cells. In particular: one HLA-A*0201-binder epitope derived from a nuclear protein of Epstein-Barr virus - virus supposed to be involved in MS onset; an HLA-B*07-binder epitope derived from the myelin basic protein. Towards these epitopes, we subsequently identified in healthy people highly responsive CD8+ T lymphocytes, which were used to develop cell clones although without success. Finally, we characterized the inflammatory status of patients and healthy controls by measuring Osteopontin and circulating proteasome in blood samples. Osteopontin is a pro-inflammatory molecule that plays a key role in MS, while circulating proteasome is the circulating extracellular form of the proteasomes and its level measured in various biological fluids increases in pathological conditions. In our study Osteopontin and circulating proteasome increased in RRMS patients compared to controls and their levels were inversely correlated. The circulating proteasome may be involved in the down regulation of inflammation, contrarily to Osteopontin, suggesting a possible interplay between the two molecules. This might represent a novel pathological mechanism involved in MS.

CONCLUSIONS

Proteasome-catalysed peptide Splicing mechanism notably increases the variability of proteins recognized by our immune system and therefore represents a key mediator, yet neglected, to understanding the autoimmune response underlying diseases like MS. Furthermore, our observations

may suggest new serum biomarkers capable of facilitating the monitoring of the active phase of disease, but also the progression and response to therapy by using non-invasive methods.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Bellavista E; Martucci M; Vasuri F; Santoro A; Mishto M; Kloss A; Capizzi E; Degiovanni A; Lanzarini C; Remondini D; Dazzi A; Pellegrini S; Cescon M; Capri M; Salvioli S; D'Errico-Grigioni A; Dahlmann B; Grazi GL; Franceschi C. "Lifelong maintenance of composition, function and cellular/subcellular distribution of proteasomes in human liver". Mech Ageing Dev. 2014; 141-142C:26-34.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2011 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 58.000 €

Vittorio Martinelli
Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neurologia, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

COLLABORATORI:
Giuseppe De Santis, Annamaria Finardi, Roberto Furlan, Cinthia Farina

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Annamaria Nigro, Università del Salento, Lecce

Caratterizzazione di profili di espressione di geni e di microRNA da cellule di sangue periferico di pazienti affetti da sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una reazione infiammatoria cronica immuno-mediata contro costituenti del sistema nervoso centrale. Le cellule T regolatrici (Treg) giocano un ruolo chiave nel bilanciare risposte autoimmuni e un loro deficit può favorire l'espansione di cloni T auto-reattivi. Recentemente i microRNA (miRNA), molecole che regolano l'espressione genica e perciò le funzioni cellulari, sono state coinvolte nelle malattie autoimmuni. L'assenza di miRNA nelle cellule immunitarie favorisce le malattie autoimmuni sistemiche. In questo progetto abbiamo analizzato l'espressione dei miRNA nelle Treg di pazienti con SM recidivante-remittente e nel sangue di pazienti al loro primo episodio di malattia (CIS).

RISULTATI

Abbiamo misurato il profilo di espressione dei miRNA, usando microarray, nelle Treg di 12 persone con SM recidivante-remittente in condizioni di stabilità di malattia e in 14 controlli sani. Abbiamo identificato le Treg usando i marcatori CD4 e CD25, ma questi marcatori sono espressi anche su cellule effettrici. Perciò abbiamo isolato le Treg dalle T effettrici usando il marcatore CD127, espresso solo dalle T effettrici, come selezione negativa. Le cellule così purificate sono state usate per validare i risultati del microarray e per fare studi funzionali. In parallelo, usando un approccio puramente bioinformatico, abbiamo identificato ulteriori 23 miRNA candidati ad essere differenzialmente espressi nelle Treg dei pazienti con SM. Tra i miRNA alterati, sono stati trovati aumentati i membri del cluster miR-106b-25 in comparazione coi controlli sani. In particolare, il rapporto di questi miRNA tra Treg e T effettrici mostrava un notevole aumento nelle Treg dei pazienti. Abbiamo effettuato studi funzionali dimostrando che miR-106b può promuovere la sopravvivenza delle Treg in soggetti sani. Inoltre, abbiamo anche determinato che lo hsa-miR182 è significativamente aumentato nel sangue periferico di pazienti con la CIS rispetto a tutti gli altri decorsi di malattia e rispetto ai controlli sani.

CONCLUSIONI

Abbiamo trovato che il miR106b è alterato nelle Treg dei pazienti con SM. Questo miRNA è stato dimostrato in precedenza controllare le funzioni del TGFbeta. Il TGFbeta è coinvolto nella differenziazione e maturazione delle Treg. Perciò questo cluster di miRNA può alterare la funzione delle Treg nei pazienti con SM e promuovere la sopravvivenza di cellule T autoreattive. Questi risultati indicano come potenzialmente utili nella terapia della SM i bersagli farmacologici nella via del TGFbeta.
L'identificazione del miR182 come marker specifico delle CIS che convertiranno a SM definita potrebbe diventare un utile biomarcatore a scopo prognostico e per identificare i pazienti meritevoli di trattamento precoce.

Characterization of genes and microRNAs expression profiles from peripheral blood cells in patients affected by multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic inflammatory immune-mediated response against constituents of the central nervous system. Regulatory T cells (Tregs) play a key role in the autoimmune balance and their impairment may facilitate the expansion of auto-aggressive T cell clones. Recently, microRNAs (miRNAs), molecules that regulate gene expression and therefore cell functions, have been involved in autoimmune disorders. The absence of miRNA in immune cells was shown to facilitate systemic autoimmune diseases. In this project we analyzed the miRNA expression profile in Tregs from Relapsing-Remitting MS (MS-RR) and in the whole blood of patients at their first clinical episode (CIS).

RESULTS

We measured miRNA expression profile by microarray analysis on Tregs from 12 Relapsing-Remitting MS patients in stable condition and 14 healthy controls. We identified Tregs using CD4+ and CD25+, but these markers are expressed on both T regulatory cells and T effector cells. Thus, we isolated Tregs from T effector cells by negative selection using the marker CD127, expressed only on T effector cells and we used these cells to validate our microarray results and to perform functional studies. In parallel, using purely bio-informatics, we identified 23 more miRNAs candidates for being differentially expressed in Tregs from MS patients. Among the deregulated miRNAs, members of the miR-106b-25 cluster were found up-regulated in MS patients when compared to healthy donors in Treg cells. More interesting, the ratio between Treg/Teff showed an enrichment of these microRNA in T regulatory cells derived from patients if compared to healthy controls. We performed functional studies demonstrating that miR-106b can promote Treg cell survival in healthy subjects. Furthermore, we found that hsa-miR182 is significantly up-regulated in peripheral whole blood samples from CIS patients compared to all disease courses of MS and Healthy Control (HC).

CONCLUSIONS

We found that miR-106b is disregulated in the Treg of MS patients. This miRNA was previously shown to modulate the TGFbeta signaling pathway. TGF-beta is involved in T regulatory cells differentiation and maturation. Therefore, the deregulation of this miRNA cluster can alter Treg cells activity in course of MS and can promote T cells survival. These results indicate all druggable targets reinforcing the TGF-b pathway as potentially efficacious in MS. The identification of miR-182 as a marker specific for clinically isolated syndrome patients that will convert to definite MS may become a useful biomarker for prognostic purpose and to identify patients that need early treatment.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

De Santis G, Diamantini A, Battistini L, Borsellino G, Martinelli V, Moiola L, Colombo B, Rodegher M, Rossi P, Comi G, Furlan R. Differential miRNAs expression profile between treg-versus t effector cells in course of multiple sclerosis. European Journal of Neurology. 18, 579-579, 2011

De Santis G, Ferracin M, Biondani A, Caniatti L, Tola MR, Castellazzi M, Zagatti B, Battistini L, Borsellino G, Fainardi E, Gavioli R, Negrini M, Furlan R, Granieri E. Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis Journal of neuroimmunology 226 (1), 165-17, 2010

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 60.000 €

Roberta Magliozzi
Dipartimento di Biologia Cellulare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI:
Eleonora Aricò, Barbara Serafini, Barbara Rosicarelli, Maria Stefania Brignone, Carolina Cruciani, Francesca Aloisi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Richard Reynolds, Chris Gardner, Richard Nicholas (Imperial College London, UK)
Owain Howell, (Swansea University, UK)

Studio neuropatologico e molecolare mirato a comprendere la relazione tra processo infiammatorio nelle meningi e danno cerebrale corticale nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La patologia della corteccia cerebrale, o sostanza grigia, ha un ruolo fondamentale nella progressione della sclerosi multipla (SM) a causa del forte impatto sull'accumulo di disabilità neurologica e motoria. Gli studi neuropatologici hanno contribuito a caratterizzare alcuni degli eventi di neurodegenerazione, danno assonale e alterazione delle cellule gliali associati all'attivazione microgliale e alla presenza di infiltrati infiammatori e strutture simil-linfoidi nelle meningi. Tuttavia, la conoscenza dei meccanismi molecolari che sottendono alla formazione delle lesioni corticali è ancora incompleta. In questo progetto abbiamo cercato di comprendere nel dettaglio le alterazioni molecolari associate al danno corticale in campioni di tessuto autoptico cerebrale di pazienti affetti da SM secondariamente progressiva (SMSP), precedentemente analizzati in uno studio neuropatologico delle lesioni corticali. Abbiamo, inoltre, correlato le specifiche caratteristiche neuropatologiche e il profilo di espressione genica delle lesioni corticali con l'espressione genica e i livelli di alcune citochine infiammatorie, rispettivamente, nelle meningi e nel liquido cerebrospinale degli stessi pazienti.

RISULTATI

I dati generati nello studio di espressione genica mediante microarray condotto in precedenza su tessuto corticale cerebrale (corteccia motoria) autoptico da 10 pazienti SMSP con abbondante infiammazione meningea, 10 pazienti SMSP con infiammazione meningea esigua o assente, e 10 controlli sani, sono stati sottoposti a una dettagliata analisi biostatistica e a successiva validazione. L'analisi dei geni differenzialmente espressi nella corteccia cerebrale dei due gruppi di pazienti con SMSP rispetto ai controlli ha consentito di validare le alterazioni corticali cellulari precedentemente evidenziate, quali il marcato danno neuronale e assonale e la presenza di attivazione microgliale. Sono stati, inoltre, identificati e validati numerosi geni e segnali intracellulari che sono risultati alterati in presenza di abbondanti infiltrati meningei. In particolare, è stata evidenziata una disregolazione della risposta infiammatoria intracorticale mediata dal fattore di necrosi tumorale TNF, espresso principalmente dalla microglia attivata. Una stretta associazione è stata riscontrata tra infiammazione meningea e incremento dei segnali pro-apoptotici e necroptotici mediati da uno dei recettori del TNF, il TNFR1. Questo recettore è espresso principalmente nei neuroni e negli oligodendrociti presenti nelle lesioni corticali dei pazienti con maggiore danno corticale e più rapida progressione della malattia. Al contrario, nelle lesioni corticali dei pazienti con minore grado di infiammazione meningea ed estensione del danno corticale e decorso più lento della malattia, è stato riscontrato un incremento significativo di segnali intracellulari legati all'attivazione di un altro recettore del TNF, il TNFR2, quali segnali anti-apoptotici e segnali coinvolti nella risposta anti-infiammatoria e nella sopravvivenza cellulare. La produzione delle molecole pro-infiammatorie TNF e interferone-gamma è stata

rilevata sia nelle meningi (a livello di espressione genica) che nei campioni di liquor (a livello proteico) provenienti degli stessi casi SMSP con elevato grado di infiammazione meningea/danno corticale. Questi risultati suggeriscono che gli infiltrati infiammatori meningei contribuiscono alla produzione delle molecole infiammatorie presenti nel liquor e che tali molecole, diffondendo attraverso la membrana piale, possono promuovere demielinizzazione, neurodegenerazione e attivazione microgliale nelle lesioni corticali sottopiali.
Infine, in un'estesa analisi di tessuto autoptico cerebrale da 44 pazienti con SMSP, abbiamo descritto per la prima volta la presenza di infiltrati infiammatori perivascolari all'interno delle lesioni corticali di una elevata percentuale (42%) dei pazienti con maggiore infiammazione meningea e danno corticale. Tali infiltrati corticali, particolarmente ricchi di linfociti B e plasmablasti/plasmacellule, sono stati approfonditamente studiati per la presenza di proteine sintetizzate durante la fase litica dell'infezione con il virus di Epstein-Barr (EBV), e di interazioni tra cellule infettate con il virus e linfociti T citotossici. I dati ottenuti confermano la presenza di cellule infettate con EBV nel sistema nervoso centrale di pazienti affetti da SM e sostengono l'ipotesi che il perpetuarsi del danno cerebrale nella SM possa essere sostenuto da una risposta immunopatologica.

CONCLUSIONI

Mediante l'utilizzo di un approccio combinato molecolare e neuropatologico questo progetto ha contribuito a chiarire la forte associazione tra patologia corticale e mediatori citotossici prodotti da cellule infiammatorie infiltranti le meningi o gli strati più superficiali della corteccia cerebrale. In particolare, i nostri risultati sostengono l'ipotesi che il microambiente infiammatorio generato nello spazio subaracnoideo delle meningi ha un ruolo fondamentale nella esacerbazione della patologia corticale cerebrale associata con la maggiore gravità della fase progressiva della SM e che il TNF rappresenta uno dei mediatori chiave del danno cerebrale. Il meccanismo sottostante comporterebbe uno sbilanciamento dell'equilibrio recettoriale e delle vie molecolari associate al TNF con conseguente esacerbazione della patologia corticale. Contribuendo a costruire un quadro più dettagliato e completo della patologia corticale nella SM, questi risultati potrebbero facilitare l'identificazione di nuovi biomarcatori della neurodegenerazione nella sostanza grigia e dei processi infiammatori associati al fine di predire e monitorare il decorso della malattia.

A combined neuropathological and molecular study addressing the link between meningeal inflammation and cortical brain damage in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Cortical, or grey matter, cerebral pathology in multiple sclerosis (MS) has a key role in the progression of the disease because of its impact on the accumulation of neurological and motor disability. Neuropathological studies of cortical brain damage in MS contributed to characterize some of the events of neurodegeneration, axonal damage and glial alterations associated with microglial activation and occurrence of inflammation and aberrant lymphoid-like structures in the meninges surrounding the cerebral cortex. However, understanding of the immunopathogenic mechanisms that underlie the formation of cortical lesions is still incomplete. In this project we have tried to understand and better define the molecular alterations associated with cortical damage in post-mortem brain tissue of cases with secondary progressive MS (SPMS), previously analysed through a detailed neuropathological study of cellular alterations in subpial cortical lesions closely associated to meningeal inflammation. We also correlated the specific cortical neuropathological features and transcriptional profiles with pro-inflammatory cytokines expressed in the meninges or detectable in the cerebrospinal fluid of the same post-mortem SPMS cases.

RESULTS

We performed a detailed biostatistics analysis and subsequent validation of the gene expression data previously generated in the microarray study of post-mortem cortical tissue (motor cortex) from 10 SPMS

cases with abundant meningeal inflammation, 10 SPMS cases with negligible or absent meningeal inflammation, and 10 healthy controls. Analysis of genes differentially regulated in the cerebral cortex of cases with high and low meningeal inflammation compared to healthy controls allowed to validate the pathological cell changes observed in SPMS cases with higher degree of meningeal inflammation/cortical damage and more severe disease progression, such as the high level of neuronal and axonal damage and microglia activity. Furthermore, this approach allowed to identify changes in several genes and signalling pathways in association with increased meningeal inflammation, including a significative deregulation of the inflammatory response mediated by intracortical tumour necrosis factor (TNF), a cytokine that is mainly produced by activated microglia. In particular, we detected a strong association between high levels of intrameningeal inflammatory activity and increase in pro-apoptotic and necroptotic signals mediated specifically by one of the TNF receptors, TNFR1. This receptor was found to be mainly expressed in neurons and oligodendrocytes in cortical lesions of SPMS cases with higher cortical damage and more rapidly progressive disease. On the contrary, a significant increase of anti-apoptotic intracellular signals, anti-inflammatory response and cell survival genes, specifically mediated by the TNFR2 receptor, has been detected in cortical lesions of SPMS cases with a lower degree of meningeal inflammation/cortical damage and with less severe disease progression. Furthermore, the pro-inflammatory molecules TNF and interferon-gamma were detected both in the meninges (at the gene expression level) and in CSF samples (at the protein level) from the same post-mortem SPMS cases with high degree of meningeal inflammation/cortical damage, supporting the idea that the cells infiltrating the meninges are the main source of inflammatory molecules that, once released into the CSF, are able to spread from the pial surface toward the adjacent cortex and mediate diffuse demyelination, neurodegeneration and glial alterations in subpial cortical lesions.

Moreover, in an extensive analysis of post-mortem brain samples from 44 cases with SPMS with high and low degree of meningeal inflammation and cortical damage, we observed for the first time the presence of perivascular inflammatory infiltrates in the cerebral cortical lesions of a substantial proportion (42%) of the cases with prominent meningeal inflammation. These intracortical immune infiltrates, particularly enriched in B lymphocytes and plasmablasts/plasma cells, have been extensively studied for the presence of proteins synthesized during the lytic phase of Epstein Barr virus (EBV) infection and for interactions between EBV infected cells and cytotoxic T lymphocytes. The data obtained confirm the presence of cells infected with EBV in the central nervous system of MS patients and support the hypothesis that brain damage in MS may be supported by an immunopathological response.

CONCLUSIONS

Using a combined molecular and neuropathological approach, this project has contributed to clarify the strong association between cortical cell injury and cytotoxic mediators produced by inflammatory cells infiltrating the meninges or the more superficial layers of the cerebral cortex.. In particular, our results support the hypothesis that the inflammatory milieu generated in the subarachnoid space has a fundamental role in the exacerbation of subpial grey matter pathology associated with increased severity of the progressive MS phase and that TNF is one of the key mediators of brain tissue damage. Increased inflammation and presence of aberrant follicle-like structures in the meninges could induce a shift of the TNF receptor balance and its molecular pathways in the cortex, resulting in the exacerbation of neuronal and glia dysfunctions in the cortex. By contributing to build up a more detailed and complete picture of cortical pathology in MS, these findings could facilitate the identification of new biomarkers of inflammatory neurodegeneration useful to predict and monitor the disease course.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Choi S, Howell O, Carassiti D, Magliozzi R, Gveric D, Muraro P, Nicholas R, Roncaroli F, Reynolds R. Meningeal inflammation plays a role n the pathology of primary progressive multiple sclerosis. Brain. 2012 Oct;135(Pt 10):2925-37

Magliozzi R, Serafini B, Rosicarelli B, Chiappetta G, Veroni C, Reynolds R, Aloisi F. B-cell enrichment and Epstein-Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol. 2013 Jan; 72 (1): 29-41

Gardner C, Magliozzi R, Durrenberger P, Howell O, Rundle J And Reynolds R. Cortical grey matter demyelination can be induced by pro-inflammatory cytokines in the subarachnoid space. Brain. 2013 Dec;136(Pt 12):3596-608

Calabrese M, Magliozzi R, Ciccarelli O, Geurts J, Reynolds R and Martin R. Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. Nature Review Neuroscience 2015 Feb 20;16(3):147-58

Nicholas R, Magliozzi R, Campbell G, Mahad D, Reynolds R. Temporal lobe cortical pathology and inhibitory GABA interneuron cell loss are associated with seizures in multiple sclerosis. MultipleSclerosis Journal, accepted March 2015.

Magliozzi R, Durrenberger P, Howell O, Reeves C, Nicholas R, Roncaroli F, Aricò E, Brignone MS, Cruciani C, Reynolds R. The balance of TNF signalling pathways modulates cortical pathology in multiple sclerosis. *Manuscript in preparation*

Magliozzi R, Aricò E, Durremberger P, Roncaroli F, Nicholas R, Aloisi F, Reynolds R. Gene expression profiling of cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. ECTRIMS, Lyon, 10- 13 October 2012

Magliozzi R, Serafini B, Rosicarelli B, Chiappetta G, Veroni C, Reynolds R, Aloisi F. Intracortical inflammation and EBV infection in secondary progressive multiple sclerosis. Oral communication. 114th Meeting of the British Neuropathology Society, London, 13-15 March 2013

Magliozzi R, Durremberger P, Howell O, Roncaroli F, Aricò E, Aloisi A, Reynolds R. A role for TNF signalling in cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. Oral communication. International Conference on Immunology 2013, Milan 22-27 August 2013

Magliozzi R, Durremberger P, Howell O, Roncaroli F, Aricò E, Aloisi A, Reynolds R. A role for TNF signalling in cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. SINS 2013, Rome, October 2013

Magliozzi R, Durremberger P, Howell O, Roncaroli F, Aricò E, Brignone MS, Aloisi A, Reynolds R. Meningeal inflammation affects the balance of TNF signalling in cortical grey matter in progressive multiple sclerosis. ACTRIMS-ECTRIMS, Boston, 10-13 September 2014

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 69.300 €

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

Marco Salvetti
Centre for Experimental Neurological Therapies (CENTERS) Neurologia e Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso, Ospedale S. Andrea Sapienza Università di Roma, Roma

COLLABORATORI:
Rosella Mechelli, Claudia Policano, Viviana Annibali, Renato Umeton, Danila Vittori, Carlo Mattei, Giovanni Ristori

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Graziano Pesole, Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologia e Biofarmaceutica, Università di Bari "Aldo Moro, responsabile dell'unità Pesole-CNRBA
Alberto Faggioni, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma

Caratterizzazione dei genoptipi del virus di Epstein-Barr nella sclerosi multipla attraverso approcci di sequenziamento massivo

PREMESSE E OBIETTIVI

Tra i fattori non ereditari potenzialmente coinvolti nell'insorgenza della sclerosi multipla (SM), il virus di Epstein Barr (EBV) è quello su cui si hanno più informazioni. Tuttavia, è difficile capire come un virus che infetta la quasi totalità della popolazione adulta possa essere associato con una malattia relativamente rara come la SM. Una possibile spiegazione è che un particolare genotipo virale possa essere associato alla malattia. Lo scopo di questo progetto è stato quello di analizzare il genoma di EBV per cercare eventuali genotipi associati con la SM, studiando prima la regione più variabile del DNA virale (Epstein-Barr Antigene nucleare 2-EBNA2) e poi estendendo l'analisi all'intero genoma virale.

RISULTATI

Abbiamo sequenziato una parte del DNA codificante per la proteina EBNA2, nel sangue periferico di soggetti con SM e controlli sani, classificando i genotipi di EBNA2 secondo quanto descritto in letteratura. I nostri risultati hanno dimostrato che il rischio di sviluppare la SM correla significativamente con un eccesso di allele 1.2 e una ridotta presenza dell'allele 1.3B nella popolazione di pazienti. Abbiamo identificato anche nuove varianti genetiche, per lo più associate all'allele 1.2 che risultano anch'esse associate con la SM. Non abbiamo trovato correlazioni tra genotipi di EBV e le caratteristiche cliniche dei pazienti, ad eccezione del fatto che l'allele 1.2 si riscontra tendenzialmente in pazienti con una ridotta durata di malattia.
In collaborazione con il gruppo del Prof. Pesole (Università di Bari) abbiamo utilizzato un approccio di sequenziamento massivo in un sottogruppo di donatori, per mettere in luce eventuali fenomeni di co-infezione e nuove varianti rare associate con la SM. Per quanto riguarda la regione di EBNA2 abbiamo osservato una maggiore frequenza di co-infezioni (forse dovuta a infezioni multiple) ed un aumentato numero di varianti rare nei pazienti rispetto ai sani. Non potendo escludere che altre regioni del complesso genoma di EBV possano essere rilevanti per la SM, abbiamo esplorato l'intero genoma virale. Avendo bisogno di una grande quantità di DNA virale, impossibile da ottenere dai pochi linfociti B infettati da EBV che sono presenti nel circolo periferico, abbiamo istituito un'ampia e caratterizzata banca di linee linfoblastoidi spontanee (linfociti B infettati con il ceppo endogeno di EBV, spLCLs) da pazienti e controlli (collaborazione con il gruppo del Prof. Faggioni – Università di Roma "Sapienza"), per avere una fonte illimitata di DNA virale. Abbiamo arruolato nello studio pazienti liberi da terapie immunomodulatorie da almeno un anno o che non avevano mai fatto terapia. Abbiamo ottenuto linee spLCLs da 20 pazienti sporadici, 10 donatori sani e due coppie di gemelli monozigoti discordanti per

SM. Abbiamo finora sequenziato campioni di DNA virale ottenuti dalle linee di 14 pazienti e otto sani che erano stati sottoposti ad un processo di arricchimento del DNA virale rispetto al cellulare, che nella nostra analisi è un "contaminante". Ora stiamo concludendo l'analisi dei dati per valutare il livello globale di variabilità del genoma di EBV nelle due popolazioni prese in esame e per scoprire eventuali altre varianti associate con la SM.

CONCLUSIONI

Abbiamo mostrato l'adeguatezza delle piattaforme di sequenziamento massivo per studiare il genoma di virus che infettano le cellule del sangue periferico ad una frequenza molto bassa.
Abbiamo evidenziato una forte associazione tra varianti genomiche di EBV e la SM, rafforzando l'idea che EBV contribuisce allo sviluppo della malattia (Mechelli et al Neurology, in stampa). Le varianti virali potrebbero influenzare l'interazione con l'ospite come suggerito da diverse evidenze: a) la regione di EBNA2 che abbiamo studiato interagisce con le proteine cellulari come Nur77 e SMARCB1 che sono state associate con la suscettibilità alla SM e le risposte antivirali; b) EBNA2 è importante per il successo delle strategie che il virus adotta per evitare di essere eliminato dall'organismo; c) la regione dell'mRNA di EBNA2 che abbiamo studiato è bersaglio di micro-RNA umani che possono tenere sotto controllo il virus.
Questi risultati sono interessanti anche alla luce di altri che abbiamo recentemente ottenuto, che dimostrano che una parte della predisposizione genetica alla SM può essere attribuibile alle varianti presenti in geni che interagiscono con EBV. In particolare, le regioni del genoma umano a cui si lega EBNA2 sono risultate significativamente arricchite di varianti geniche associate alla SM (Ricigliano et al. PlosOne, in stampa), suggerendo che una complessa interazione tra varianti geniche sia dell'ospite che del virus può contribuire allo sviluppo della malattia.

Characterization of Epstein-Barr virus genotypes in multiple sclerosis through next generation sequencing approaches

INTRODUCTION AND AIMS

Among the non-heritable causative factors potentially involved in the multiple sclerosis (MS) etiology, Epstein Barr virus (EBV) received the most convincing evidence. Nonetheless, it is difficult to understand how a virus that ubiquitously infects humans can be associated with a disease of relative limited prevalence. One possible explanation is that a particular viral genotype associates with the disease.
The aim of this project was to analyze the EBV genome to look for possible genotypes associated with MS, studying first the most variable region of the viral DNA (Epstein-Barr nuclear antigen 2-EBNA2) and then extending the analysis to the entire viral genome.

RESULTS

We sequenced a region of the DNA coding for EBNA2 protein in peripheral blood of persons with relapsing-remitting multiple sclerosis and control subjects. Our results showed that MS risk significantly correlated with an excess of 1.2 allele and under-representation of 1.3B allele. We identified new genetic variants, mostly 1.2 allele- and MS-associated. We found no correlation between EBV genotypes and clinical characteristics of patients, except for a trend toward lower disease duration in subjects bearing the 1.2 allele.
Together with Pesole's group (University of Bari) we used deep-sequencing approach in a subgroup of donors, to highlight possible co-existence of different viral genome and new rare MS-associated viral variants. Concerning the EBNA2 region we observed a marginally significant higher occurrence of co-existing alleles, possibly deriving from multiple infections, in MS than in controls. We also found a slightly higher prevalence of variant positions in MS with respect to healthy subjects.
Besides EBNA2, we cannot exclude that additional regions of the complex EBV genome may also be relevant for MS. To explore the whole EBV genome using a deep-sequencing approach is necessary a large amount of viral DNA, that is impossible to obtain from the few EBV infected-B lymphocytes pres-

ent in peripheral blood. We established an extensive and characterized repository of spontaneously growing EBV transformed B cell lines (spLCLs) from patients and controls (Collaboration with Faggioni's group – University of Roma "Sapienza"), to use it as an unlimited source of viral DNA. For patients we considered only subjects free from disease-modifying therapy for at one year or who were treatment naive. We obtained spLCLs from 20 sporadic MS patients, 10 healthy donors and two couples of monozygotic twins discordant for MS. In order to proceed with the sequencing, we finalized a method for enrichment of viral compared to the cellular DNA, which in our case is a "contaminant". So far we sequenced samples from 14 MS-derived and eight from HD-derived spLCLs. We are now concluding the data analysis to evaluate the global level of variability of EBV genome in MS and HD, and to highlight possible other variants associated with MS.

CONCLUSIONS

We showed the appropriateness of deep-sequencing platforms to investigate patterns of genetic variation of a virus that latently infects peripheral blood cells at a very low frequency.

Our study unveils a strong association between EBV genomic variants and MS reinforcing the idea that EBV contributes to disease development (Mechelli et al. Neurology, *in press*). Moreover the present work shows that the reported associations between viral variants and other immune-mediated diseases may be true also for MS, through variants with a potentially functional impact on the host: a) the region of EBNA2 we studied interacts with cellular proteins such as Nur77 and SMARCB1 that have been associated with MS susceptibility and antiviral responses; b) the gene region we investigated is important for successful strategies of EBV immune evasion; c) the EBNA2 mRNA, where we found MS-related variants, is target of human micro-RNAs that may serve to keep in check EBV infection.

To strengthen and complement these results we have also shown that a portion of the genetic predisposition to MS is attributable to variants in genes that interact with EBV. Specifically, EBNA2 binding motifs resulted to be significantly enriched in genomic intervals associated with MS (Ricigliano et al. PlosOne, *in press*), suggesting that a complex interplay between both host and viral genetic variants may contribute to disease development.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Mechelli R, Manzari C, Policano C, Annese A, Picardi E, Umeton R, Fornsiero A, D'Erchia AM, Buscarinu MC, Agliardi C, Annibali V, Serafini B, Rosicarelli B, Romano S, Angelini DF, Ricigliano VAG, Buttari F, Battistini L, Centonze D, Guerini FR, D'Alfonso S, Pesole G, Salvetti M, Ristori G. EpsteinBarr virus genetic variants associated with multiple sclerosis. Neurology, 2015 Mar 4. [Epub ahead of print]

Ricigliano VAG, Handel AE, Sandve GK, Annibali V, Ristori G, Mechelli R, Cader MZ, Salvetti M. EBNA2 binds to genomic intervals associated with multiple sclerosis and overlaps with vitamin D receptor occupancy. PlosOne, *in press*

Annibali V.*, Mechelli R.*, Buscarinu M.C., Romano S., Fornasiero A., Umeton R., Ricigliano V.A.G., Orzi F., Coccia E.M., Salvetti M. and Ristori G. IFN-ß and multiple sclerosis: From etiology to therapy and back. Cytokine and Growth Rev 2014 Oct 31.*Equal credit for authorship

Mechelli R, Vittori D, Coarelli G, Aimati L, De Luca O, Romano S, Ricigliano VA, Annibali V, Policano C, Mattei C, Salvetti M, Ristori G. Screening for neurotropic viruses in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. Mult Scler. 2014;20:638

Mechelli R, Umeton R, Policano C, Annibali V, Coarelli G, Ricigliano VA, Vittori D, Fornasiero A, Buscarinu MC; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium,2, Romano S, Salvetti M, Ristori G. A "candidate-interactome" aggregate analysis of genome-wide association data in multiple sclerosis. PLoS One. 2013;8(5):e63300

Coarelli G, Manzari C, Annese A, Anastasiadou E,Policano C, D'Erchia AM, Picardi E, Buscarinu MC, Annibali V, Ricigliano V, Tullo A, Trivedi P, Pesole G, Ristori G, Salvetti M and Mechelli R. Characterization of Epstein-Barr virus genotypes in multiple sclerosis through next generation sequencing approaches" 12 International Congress of Neuroimmunology (ISNI), November 9-13, 2014, Mainz (DE)

Policano C, Mechelli R, Manzari C, Picardi E, Annibali V, Umeton R, Coarelli G, Ricigliano V, D'Erchia AM, Tullo A, Chiara M,. Horner DS, GP, Ristori G and Salvetti M Characterization of Epstein-Barr virus genotypes in multiple sclerosis" 11 International Congress of Neuroimmunology (ISNI), November 4th - 8th, 2012, Boston, MA, USA and XXII AINI Congress, September 26th-29th, Catania, Italy

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per un periodo di 2 anni (prorogato di 9 mesi) e l'ammontare di 149.860 €

Sandra D'Alfonso
Department of Health Sciences, UPO. Università A. Avogadro, Novara

COLLABORATORI:
Nadia Barizzone, Lucia Corrado, Alessandra Bagarotti, Miriam Zuccalà, PROGEMUS

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI (PROGETTO MULTICENTRICO):
Filippo Martinelli Boneschi, Melissa Sorosina, Federica Esposito, Ferdinando Chiarelli, Paola Brambilla, PROGRESSO, Ospedale San Raffaele, Milano (Unità HSR) **Gianluca De Bellis, Roberta Bordoni, Eleonora Mangano, Santosh Anand,** Istituto di Tecnologie Biomediche CNR (Unità CNR-ITB)

Mappatura fine dei loci di suscettibilità alla SM nella popolazione dell'Italia continentale: dai marcatori genetici identificati attraverso studi di associazione genome-wide alle varianti causali

PREMESSE E OBIETTIVI

Studi recenti hanno identificato almeno 101 regioni genomiche coinvolte nella suscettibilità alla sclerosi multipla (SM) oltre alla già nota regione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Questi risultati sono stati ottenuti analizzando ampi gruppi internazionali di persone con SM e persone sane della popolazione prevalentemente di origine nord europea, grazie alla collaborazione nell'ambito del Consorzio Internazionale della Genetica della SM (IMSGC). Il nostro gruppo ha partecipato analizzando un gruppo di pazienti italiani e di controlli sani seguiti da Centri SM appartenenti ai due consorzi italiani PROGEMUS e PROGRESSO. In questi studi la popolazione italiana rappresentava meno del 5% dell'intera casistica, e questa piccola percentuale non permetteva di identificare eventuali fattori genetici associati alla SM specifici della popolazione italiana. Inoltre, per la maggior parte delle regioni genetiche associate alla SM, non è stato ancora identificato il gene specifico o la sequenza genica specifica responsabile dell'associazione e quindi non è stato ancora chiarito il ruolo specifico di questi geni nello sviluppo della malattia.
Scopo di questo progetto è stato identificare, replicare e caratterizzare funzionalmente variazioni di sequenza genica associate al rischio di SM nella popolazione dell'Italia continentale.

Il progetto trae vantaggio da a) partecipazione di due delle Unità (UPO e HSR) agli ampi studi internazionale di associazione su tutto il genoma (GWAS) dell'IMSGC; b) ampia casistica di 4000 pazienti e 4000 persone sane raccolte da UPO e HSR grazie alla collaborazione con i consorzi PROGEMUS e PROGRESSO; e c) l'esperienza consolidata della terza Unità (CNR-ITB) nella tecnica innovativa di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next Generation Sequencing) che permette di determinare la sequenza di molti geni in molte persone in tempi rapidi e a costi sostenibili.

RISULTATI

Abbiamo inizialmente condotto uno studio di associazione su tutto il genoma (GWAS) in 750 pazienti e 1272 controlli, seguito da una replicazione dei segnali più associati in una casistica indipendente di 957 pazienti e 956 controlli. Da questo studio abbiamo selezionato le regioni che mostravano l'associazione più forte nella popolazione italiana che contenevano 100 diversi geni, e le abbiamo sottoposte ad analisi NGS in 576 pazienti e 408 controlli. Per alcune di queste regioni (17 regioni, 27 geni) abbiamo sequenziato, oltre alle regioni che vengono tradotte in proteina (regioni codificanti), anche le sequenze ad esse fiancheggianti che possono contenere elementi di regolazione genica.

Nell'insieme abbiamo identificato 20.308 varianti, 81% delle quali assenti nei database pubblici, che includono 1.545 varianti con possibile conseguenza funzionale. Tra queste, 7.517 erano presenti sia nei pazienti che nei controlli, e solo il 20% erano già state analizzate in precedenti studi, a dimostrazione che il nostro studio permetteva di eseguire una scansione di queste regioni con una risoluzione maggiore rispetto agli studi di associazione già pubblicati. Per 1.503 varianti genetiche la frequenza allelica era significativamente diversa tra pazienti e controlli. Per 33 delle regioni analizzate, almeno una variante identificata in NGS mostrava una associazione più significativa rispetto a quanto osservato nei precedenti studi di associazione. Per 7 dei 100 geni sequenziati abbiamo osservato delle nuove rare varianti funzionali che mostravano una presenza significativamente diversa tra pazienti e controlli, suggerendo che anche le varianti rare possono contribuire alla genetica della SM come riportato per altre malattie multifattoriali.
Nell'insieme questi risultati suggeriscono che il nostro approccio ci permette di condurre un'analisi di associazione a risoluzione maggiore rispetto agli studi pubblicati e a identificare con maggiore precisione qual è la variante funzionale coinvolta nello sviluppo della malattia.
La regione che mostrava l'associazione più forte nella nostra popolazione è stata approfondita con ulteriori esperimenti. Essa contiene il gene TNFSF14 che codifica per una proteina di membrane membro della famiglia dei ligandi del tumor necrosis factor (TNF) che lega il TNFRSF14, un membro della superfamiglia del recettore del TNF.L'analisi NGS ha identificato 172 varianti nel gene TNFSF14, mentre solo 4 erano state analizzate nei precedenti studi pubblicati. Abbiamo genotipizzato gran parte di queste varianti in 1000 pazienti e 1000 controlli indipendenti. I nostri risultati preliminari dimostrano che l'associazione di questo gene con la SM è principalmente determinata da una variante intronica che, pur facendo parte della sequenza che non viene tradotta in proteina, è localizzata in una regione con potenziale funzione regolativa del gene.
Per testare questa ipotesi, abbiamo condotto uno studio funzionale analizzando l'espressione dell'RNA di 83 pazienti non in trattamento farmacologico, e 35 controlli. L'espressione di TNFSF14 era significativamente più bassa nei pazienti rispetto ai controlli ed era più bassa nelle persone (sia pazienti che controlli) che portavano l'allele associato con la suscettività alla SM.
L'insieme delle analisi di associazione e degli esperimenti funzionali suggeriscono che una specifica variante nucleotidica di TNFSF14 è associata ad una bassa espressione del gene e questo a sua volta può causare una predisposizione alla malattia in quanto è più rappresentato nei pazienti con SM rispetto ai controlli sani e poiché l'espressione di questo gene è ridotta nelle persone con SM.

CONCLUSIONI

Questo studio rappresenta un nuovo importante tassello nel complesso processo di identificazione dei fattori genetici che svolgono un ruolo di protagonista nello sviluppo della SM. Per la prima volta è stata condotta una scansione sistematica dei geni coinvolti nell'associazione con la malattia che, almeno per alcuni di essi, ha permesso di identificare la variante genica primariamente responsabile dell'associazione. Questo è il passaggio preliminare ed indispensabile per identificare nuovi meccanismi patogenetici.

Fine-Scale mapping of multiple sclerosis loci in the continental italian population: from tag genetic markers identified in Genome Wide Association studies to causal variants

INTRODUCTION AND AIMS

Recent studies led to the identification of at least 101 genomic regions involved in the genetic susceptibility to multiple sclerosis (MS) besides the well-established major hystocompatibility (MHC) region. These results have been obtained analyzing large group of patients with MS and healthy people (controls) from different countries, mainly of northern European origin, thanks to the collaborative efforts within the International Multiple Sclerosis Genetic Consortium (IMSGC). Our group participated with the analysis of a group of Italian patients

and controls followed by MS centers which are part of the two consortia PROGEMUS and PROGRESSO. In these studies, Italian patients and controls represented less than 5% of the entire population and thus they were not designed to identify possible genetic factors contributing to the disease specifically in the Italian population. Moreover, for the vast majority of the identified MS associated regions, the specific gene and the specific gene function responsible of the detected associated has not been identified yet and thus it has not defined yet the specific role of these genes in the development of the disease.

The aim of the project was to identify, replicate and functionally characterize sequence variations associated with the risk to develop MS in the Italian continental population.

This project takes advantage of: a) the participation of two (UPO and HSR) of the three Units to the large international whole genome association scan (GWAS) studies within the IMSGC; b) a large dataset of 4000 Italian MS patients and 4000 matched controls collected by UPO and HSR thanks to the collaborative support of two Italian consortia PROGEMUS and PROGRESSO and c) the consolidated expertise of the third UNIT (CNR-ITB) in next generation sequencing (NGS), an innovative technique that allows to analyse with a rapid and cost effective approach the DNA sequence of many entire genes in a large number of individuals.

RESULTS

We performed an association study in the Italian population with genetic markers mapping in the whole genome (GWAS) in 750 patients with MS and 1272 controls, followed by a replication analysis of the genetic markers with the strongest association with the disease in the DNA of independent persons (957 patients and 956 controls).From this two-step study, we selected the most associated regions in the Italian population containing a total of 100 genes and performed NGS analysis in 576 MS patients and 408 controls. For some of these regions (N=17 regions, 27 genes) we sequenced, besides the segment of the gene that will be translated into protein (coding sequences), also the sequences surrounding these regions which could contain regulatory elements.

Overall, we identified 20308 variants, 81% absent in databases, including 1545 predicted functional variants (missense, nonsense, splice variants). A total of 7517 variants were present in both patients and controls, only 20% of them were present in previously utilized genotyping platforms, suggesting that our approach allowed us to perform a scan with a more dense and detailed resolution in comparison to the published association studies.

A statistically significant different frequency between MS patients and controls was observed for 1503 variants, 8.5% of them absent in databases. For 33 of the analyzed regions, at least one variant identified from NGS showed a more significant association than that observed with the genomic platforms utilized for published association studies. For seven of the 100 sequenced genes we observed novel rare functional variants whose cumulative presence was significantly different in the patients with MS in comparison with healthy controls (Burden test analysis), indicating that even rare-low frequency variants can contribute to MS genetics, as reported for other complex diseases.

Altogether, these results suggest that our approach allowed to perform a scan with a more dense and detailed resolution compared to GWAS array technology of the published association studies and to identify more precisely which is the predicted gene function involved in the development of the disease.

The region showing the most significant association in the Italian population was selected for a further follow-up and detailed experiments. This includes the TNFSF14 gene encoding for a transmembrane protein which is a member of the tumor necrosis factor (TNF) ligand family and binds TNFRSF14, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily.

Our sequencing approach identified 172 variants in the TNFSF14 gene, while only 4 variants were tested in the association studies published so far. We designed a custom array to genotype a large part of these variants in independent 1000 patients and 1000 controls. Our preliminary results showed that the association with MS of this gene is mainly driven by an intronic variant which, even if it is part of the region of the gene that it is not translated into protein, is located in a potential regulatory region of the gene.

In order to test this hypothesis, we performed a functional analysis in the RNA samples from 83 patients with MS, naïve to treatment, and 35 healthy controls. The expression of TNFSF14 was significantly lower in MS patients in comparison with controls (P= 0.007). A significantly lower TNFSF14 expression (p=0.003) in individuals carrying the MS risk variants (both patients and controls) was also observed.

Altogether, the sequencing, association analysis and functional experiments suggest that a specific single nucleotide variation within the TNFSF14 region is associated with a low expression of the gene and this in turn may cause a predisposition to the

disease since it is more represented in the patients with MS compared to healthy controls and since the expression of this gene is lower in MS patients.

CONCLUSIONS

This study represents a new step towards the complex identification process of the genetic players involved in MS susceptibility. The systematic scanning for the first time of the sequence of a large number of genes associated with MS susceptibility allowed to pinpoint in a subset of these gene the specific genetic variants primarily responsible of the detected association and thus directly involved in the development of the disease. This represents the first step necessary to identify new pathogenic mechanisms.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Goris A, Pauwels I, Gustavsen MW, van Son B, Hilven K, Bos SD, Celius EG, Berg-Hansen P, Aarseth J, Myhr KM, D'Alfonso S, Barizzone N, Leone MA, Martinelli Boneschi F, Sorosina M, Liberatore G, Kockum I, Olsson T, Hillert J, Alfredsson L, Bedri SK, Hemmer B, Buck D, Berthele A, Knier B, Biberacher V, van Pesch V, Sindic C, Bang Oturai A, Søndergaard HB, Sellebjerg F, Jensen PE, Comabella M, Montalban X, Pérez-Boza J, Malhotra S, Lechner-Scott J, Broadley S, Slee M, Taylor B, Kermode AG, Gourraud PA; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Sawcer SJ, Andreassen BK, Dubois B, Harbo HF. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in multiple sclerosis.Brain. 2015 Jan 22. pii: awu405

Giacalone G, Clarelli F, Osiceanu AM, Guaschino C, Brambilla P, Sorosina M, Liberatore G, Zauli A, Esposito F, Rodegher M, Ghezzi A, Galimberti D, Patti F, Barizzone N, Guerini F, Martinelli V, Leone M, Comi G, D'Alfonso S, Martinelli Boneschi F. Identification of genes, pathways and networks involved in disease severity and age at onset in Primary Progressive Multiple Sclerosis. Mult Scler. 2015 Jan 12

Paraboschi EM, Rimoldi V, Soldà G, Tabaglio T, Dall'Osso C, Saba E, Vigliano M, Salviati A, Leone M, Benedetti MD, Fornasari D, Saarela J, De Jager PL, Patsopoulos NA, D''Alfonso S, Gemmati D, Duga S, Asselta R. Functional variations modulating PRKCA expression and alternative splicing predispose to multiple sclerosis. Hum Mol Genet. 2014 Dec 20;23(25):6746-61

Sorosina M, Esposito F, Guaschino C, Clarelli F, Barizzone N, Osiceanu AM, Brambilla P, Elisabetta M, Cavalla P, Gallo P, PROGRESSO, PROGEMUS, Martinelli V, Leone M, Comi G, D'Alfonso S, Martinelli Boneschi F. Inverse correlation of genetic risk score with age at onset in bout-onset and progressive-onset Multiple Sclerosis. Mult Scler. Multiple Sclerosis Journal 2014 Dec 22

Sorosina M, Brambilla P, Clarelli F, Barizzone N, Lupoli S, Guaschino C, Osiceanu AM, Moiola L, Ghezzi A, Coniglio G, Patti F, Mancardi G, Manunta P, Glorioso N, Guerini FR, Bergamaschi R, Perla F; PROGRESSO; PROGEMUS, Martinelli V, Cusi D, Leone M, Comi G, D'Alfonso S, Martinelli-Boneschi F. Genetic burden of common variants in progressive and bout-onset multiple sclerosis. Mult Scler June 2014 vol. 20 no. 7 802-811

Lucenti A, Galimberti S, Barizzone N, Naldi P; PROGEMUS Group; PROGRESSO Group, Comi G, Martinelli Boneschi F, D'Alfonso S, Leone MA. Multiple sclerosis progression is not associated with birth timing in Italy. J Neurol Sci. 2014 Nov 15;346(1-2):194-6

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK et al.
Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat Genet. 2013;45:1353-60

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Network-based multiple sclerosis pathway analysis with GWAS data from 15,000 cases and 30,000 controls. Am J Hum Genet. 2013 Jun 6;92(6):854-65

Barizzone N, Pauwels I, Luciano B, Franckaert D, Guerini FR, Cosemans L, Hilven K, Salviati A, Dooley J, Danso-Abeam D, di Sapio A, Cavalla P, Decallonne B, Mathieu C, Liston A, Leone M, Dubois B, D'Alfonso S*, Goris A*. (*equal contribution) No evidence for arole of rare CYP27B1 functional variations in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2013;73:433-7

Barizzone N*,. Leone MA*, Esposito F, Lucenti A, Harbo HF, Goris A,. Kockum I, Oturai A,. Celius EG, Mero IL,. Dubois B, Olsson T, Søndergaard H,. Cusi D,. Lupoli S,. Guerini F, Galimberti D, Salvetti M,. Liberatore G, Martinelli V,. Naldi P, Myhr K,. Bergamaschi R, Comi G,. Martinelli Boneschi F*, D'Alfonso S*. Association of genetic markers with the presence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the Italian population European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) Congress, Lione 2012 and Società Italiana di Neurologia, Rimini 2012

Barizzone N*, Luciano B*,.Bagarotti A, Guerini FR, Salviati A., di Sapio A, Cavalla P, Leone M, D'Alfonso S. No functional CYP27B1 variants in Italian Multiple Sclerosis patients. XV Congresso Nazionale SIGU, Sorrento, 21-24 Novembre 2012

Barizzone N* Leone MA.*, Esposito F, Lucenti A,. Harbo HF, Goris A, Kockum I, Bang Oturai A, Gulowsen E, Celius, I. Mero, B. Dubois, T. Olsson, H. Bach Søndergaard, D. Cusi, S. Lupoli, B. Kulle Andreassen, the International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, the Wellcome Trust Case Control Consortium 2, K. Myhr F.R. Guerini, the PROGEMUS Group, the PROGRESSO Group, G. Comi, F. Martinelli- Boneschi*, S. D'Alfonso*. Association between genetic variants and a prognostic marker in Multiple Sclerosis. XV Congresso Nazionale SIGU, Sorrento, 21-24 Novembre 2012

D'Alfonso S and Martinelli Boneschi F, for the International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) Deep replication and extensive fine mapping using the Immunochip significantly expands the genetic architecture of multiple sclerosis XV Congresso Nazionale SIGU, Sorrento, 21-24 Novembre 2012

Barizzone N, Sorosina M, Lupoli S, Porcu E, Sonna S, Loi A,. Pitzalis M, Esposito F, Leone M, Lucenti A,. Zoledwieska M, Mulas A, Cocco E, Guerini FR, Brambilla P, Farina, Poddie F, Martinelli V, ComiG. Rosati G,. Frau J, Melis M, the PROGEMUS Group, the PROGRESSO Group, G the IMSGC, M.G. Marrosu, D. Cusi, S. Sanna, F. Cucca, F. Martinelli Boneschi, D'Alfonso S. The combined effect of multiple sclerosis susceptibility variants in continental Italy and Sardinia. XVI Congresso Nazionale SIGU, Roma, 25-28 Settembre 2013. (Premio SIGU "G.Pilia" migliore presentazione orale malattie complesse)

Anand S, Mangano E, Bordoni R, Barizzone N, Corrado L, Sorosina M, Santoro S, MartinelliBoneschi F *, D'Alfonso S*, De Bellis G *. A robust strategy for the calculation of Allele Frequencies from NGS data of pooled DNA samples European Human Genetics Conference, Milano, 31 maggio -3 giugno 2014

Barizzone N, Clarelli F, Sorosina M, Anand S, Mangano E, Bordoni R, Esposito F, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, Raymkulova O, Predebon G, Martinelli V, Comi G, Leone M, De Bellis G*, Martinelli-Boneschi F*, D'Alfonso S*. Target resequencing of regions associated with Multiple Sclerosis in the Italian population. European Human Genetics Conference, Milano, 31 maggio -3 giugno 2014

Barizzone N, Anand S, Sorosina M,. Mangano E, Bordoni R,. Clarelli F, Esposito F, Raymkulova O, Minari N,. Predebon G, Martinelli V, Comi G,. Leone M, De Bellis G*, Martinelli-Boneschi F*, D'Alfonso S*.Target resequencing of regions associated with Multiple Sclerosis in the Italian population. XLV Congresso Società Italiana di Neurologia, Cagliari, Fiera Internazionale della Sardegna, 11-14 Ottobre 2014 and ECTRIMS/ACTRIMS, Boston, 11-14 September 2014

Barizzone N, Anand S, Mangano E, Sorosina M, Bordoni R, Clarelli F, Esposito F, Santoro S, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC,. Raymkulova O, Predebon G, Martinelli V, Comi G, Leone M, De Bellis G *,. Martinelli-Boneschi F*, D'Alfonso S*. Target resequencing of regions associated with Multiple Sclerosis in the Italian population. Il sequenziamento di nuova generazione in genetica umana e medica, Bologna, 30-31 Ottobre 2014

INVITED LECTURESHIPS

Sandra D'Alfonso. Genetica delle malattie autoimmuni: similitudini e specificità "Sclerosi Multipla: oltre il giardino" Orbassano (TO), 17 febbraio 2012 evento formativo ECM

Sandra D'Alfonso. La genetica delle malattie autoimmuni dopo i GWAS. XVI Congresso Nazionale SIGU, Roma, 25-28 Settembre 2013

Sandra D'Alfonso. The genetics of autoimmune diseases.9th International congress on autoimmunity. Nice, March 2014

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 2anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 150.000 €

Laura Bergamaschi
Duke Molecular Physiology Institute, Duke University Durham, NC, USA

MENTORE: **Simon Gregory**

Analisi molecolare dell'espressione allele specifica di IL-7Ralpha e il suo effetto sul segnale mediato da IL-7 in cellule: mDC, CD4+ e CD8+ isolate da pazienti con sclerosi multipla e controlli sani

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune causata dalla perdita di mielina dal sistema nervoso centrale creando gravi disabilità. Diversi studi hanno confermato un'associazione tra il Polimorfismo a Singolo Nucleotide (SNP) nel gene del recettore per l'interleuchina 7 (IL7Rα), rs6897932 (C/T), e il rischio di sviluppare la SM. L'*IL7Rα* è il gene per una proteina localizzata sulla superficie cellulare di diverse cellule del sistema immunitario. Questa proteina, coinvolta nella trasmissione del segnale mediato dall'interleuchina 7 (IL7), ha un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi del sistema immunitario. Lo SNP associato è localizzato nell'esone 6 del gene *IL7Rα*, esone che codifica per il dominio transmembrane della proteina. Questo SNP determina sia il cambio tra l'aminoacido treonina in posizione 244 con l'aminoacido isoleucina, che un incremento dello *splicing* dell'esone 6 dando origine ad una forma di RNA piú corta che genera una forma solubile del recettore (sIL7R).
In base alle caratteristiche autoimmuni della SM e l'importante ruolo dell'IL7R nella regolazione del sistema immunitario, lo scopo del nostro studio è quello di verificare il ruolo funzionale dello SNP associato alla SM nelle differenti subpopulazioni di linfociti T e confermare le osservazioni in linee cellulari transfettate in modo transiente.

RISULTATI

Campioni di plasma e siero, prelevati da persone con SM e controlli, sono stati analizzati per valutare i livelli di sIL7R. Grazie a questi campioni abbiamo confermato che i livelli della proteina solubile dipendono dal genotipo dello SNP associato. Infatti, persone omozigote per l'allele di rischio (CC) possiedono elevati livelli di sIL7R rispetto alle persone omozigote per l'allele protettivo (TT) o eterozigote (CT). Queste differenze sono risultate statisticamente significative nel gruppo dei pazienti.
Analisi in cellule CD4+ *naïve*, CD4+ memoria e CD8+ *naïve* mostrano che lo SNP in IL7R può alterare la trasmissione del segnale mediato da IL7 in linfociti T. Infatti, abbiamo osservato differenti livelli di fosforilazione del fattore trascrizionale STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5)* tra i soggetti omozigoti per l'allele di rischio o per l'allele protettivo. In particolare, la fosforilazione di STAT5 sembra aumentare in pazienti omozigoti CC rispetto ai controlli con lo stesso genotipo. Invece, i pazienti TT presentano ridotta fosforilazione di STAT5. Queste differenze possono dipendere dal cambio aminoacidico (Thr244Ile) nel dominio transmembrana di IL7R, o dai diversi livelli del recettore solubile presenti nel sangue dei pazienti e dei controlli. Per verificare queste ipotesi abbiamo transfettato in modo transiente la linea cellulare *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293) con IL7R e tutte le proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (*Gamma Chain*, STAT5, e *Janus Kinase 3* (JAK3). Stimolando queste cellule con IL7 abbiamo osservato che l'alterazione del segnale è indipendente dal genotipo. Infatti, abbiamo osservato simili livelli di fosforilazione di STAT5 in cellule che esprimevano l'allele di rischio e quelle che esprimevano l'allele protettivo. Al contrario, abbiamo notato che la fosforilazione di STAT5 è alterata dalla presenza di sIL7R nel terreno di coltura.

CONCLUSIONI

Le nostre analisi in persone con SM e controlli hanno mostrato che lo SNP rs6897932 associato ha un effetto nella transduzione del segnale mediato da IL7 nei linfociti T. Infatti, abbiamo osservato differenti livelli di fosforilazione di STAT5 tra persone omozigote per l'allele di rischio e quelle omozigote per l'allele protettivo. Queste differenze possono dipendere

dal cambio aminacidico (Thr244Ile) nel dominio transmembrana della proteina o dall'aumentata produzione del recettore solubile (sIL7R) rispetto al genotipo. Le nostre analisi in linee cellulari transfettate transientemente suggeriscono che l'alterazione del segnale mediata da IL7 e IL7R sia indipendente dal cambio aminoacidico. Al contrario, la trasmissione del segnale è alterata in presenza di sIL7R. Recentemente, è stato mostrato che l'inezione di sIL7R in modelli sperimentali di SM (Encefalite Sperimentale Autoimmune, ESA) rendendo più grave il decorso della malattia. In base ai nostri dati e ai dati presenti in letteratura, stiamo creando linee cellulari che esprimono stabilmente IL7R in modo da valutare l'effetto del recettore solubile in diversi periodi di tempo e capire l'interazione con il recettore presente in membrana. Inoltre, stiamo creando dei modelli murini per studiare *in vivo* il ruolo dello SNP dell'IL7R nello sviluppo di cellule del sistema immunitario e nel contesto ESA.
Sebbene, l'associazione genetica dell'IL7R con la SM da sola non riesca a spiegare interamente la genetica della malattia, far chiarezza sui meccanismi con cui l'espressione allele specifica dell'IL7R possa alterare l'attività delle cellule del sistema immunitario è importante per capire la patogenesi della SM.

Molecular analysis of IL-7Ralpha allele specific expression and IL7 signaling in mDCS, CD4+ and CD8+ T cells from MS patients and controls

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease that is caused by myelin loss in the central nervous system and results in severe disability. Recent genetics studies have confirmed an association between a non-synonymous Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in the interleukin 7 receptor alpha chain (*IL7Rα*) gene, rs6897932 (C/T), and the risk of developing MS. *IL7Rα* encodes a transmembrane protein that is expressed in several immune cell subpopulations. Signaling via the interleukin 7 (IL7) pathway plays a crucial role in the maintenance of immune system homeostasis. The associated SNP occurs within exon 6 of *IL7Rα* that encodes the transmembrane domain of the receptor. The non-synonymous risk allele causes a threonine to isoleucine (Thr244Ile) amino acid change resulting other than a difference amino acid sequence of the full-length protein also in increased skipping of exon 6 and elevated levels of the short RNA isoform that translates to a soluble protein (sIL7R). Based on the autoimmune characteristics of MS and the important role of IL7R in the immune system homeostasis, the aim of our study is to investigate the functional role of the associated SNP in MS pathogenesis in T cell subpopulations and transient transfected cell line models.

RESULTS

We confirmed that the amount of soluble IL7R protein present in plasma or serum of MS patients and controls is depended on the genotype of the associated rs6897932 SNP. We observed that people homozygous for the risk allele (CC) have higher levels of sIL7R in plasma or serum, compared to people homozygous for the protective allele (TT) or heterozygous (CT). These differences are statistically significant in MS patients.
Our analysis in CD4+ naïve, CD4+ memory, CD8+ naïve primary cell culture isolated by MS patients and controls showed that the associated rs6897932 SNP might have an effect on the IL7/IL7R signaling in T lymphocytes. Indeed, we have observed different levels of phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) protein among subjects carrying the risk (C) or the protective (T) allele. Specifically, STAT5 phosphorylation seems to be increased in MS patients carrying the risk allele (C) compared to the genotype matched healthy controls. Conversely, MS patients carrying the protective allele (T) seem to have lower levels of phosphorylated STAT5 in both CD4+ and CD8+ naïve T cells. These differences can be due to either the amino acid change (Thr244Ile) within the transmembrane domain of the full-length IL7R, or the sIL7R protein level produced differentially based on the genotype. To address these questions we have transiently transfected the membrane bound IL7R protein along with all the IL7/IL7R signaling machinery (Gamma Chain, STAT5, and Janus Kinase 3 (JAK3)) in Human Embryonic Kidney 293 (HEK293)

cell line and evaluate the effect of the two alternative alleles in the IL7/IL7R signaling. These data suggest that the alteration in the IL7/IL7R signaling is independent of the amino acid change. Indeed, we have not observed differences in STAT5 phosphorylation based on the IL7R expressed allele. Conversely, the IL7/IL7R signaling is affected in the presence of sIL7R in the culture medium.

CONCLUSIONS

Our analysis in MS patients and controls showed that the associated rs6897932 SNP has an effect on the IL7/IL7R signaling in T cells. Indeed, we have observed different levels of phosphorylated STAT5 among subjects carrying the risk (C) or the protective (T) allele. These differences can be due to either the amino acid change (Thr244Ile) within the transmembrane domain, or the sIL7R protein produced differentially based on the genotype. Our analysis in transiently transfected cell line suggests that the alteration in the IL7/IL7R signaling is independent of the amino acid change. Conversely, the IL7/IL7R signaling is reduced in the presence of sIL7R. Recently, injection of human sIL7R protein has been shown to exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice prolonging the effect of IL7. Based on our data and the one in the literature, we are establishing stable cell lines to better investigate the role of sIL7R in a time dependent model and its interaction with the IL7R complex. We are also creating transgenic mouse models to study the role of IL7R human alleles and sIL7R in immune cell development and in the context of EAE. Although, the genetic association of IL7R with MS does not account for all of the genetic contributions to the disease, elucidating the mechanisms by which the allele specific expression of IL7R alters the activity of different immune cell types will provide very important data for understanding the pathology of MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Gregory SG, Galarza-Muñoz G, Brigs FB, Bergamaschi L, Arvai S, Shao X, Barcelos LF, Garcia-Blanco MA. Functional characterization of a multiple sclerosis associated variant in IL7Ra. American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting. October 18–2, 2014 San Diego, CA, USA

Bergamaschi L, Arvai S, Galarza Munoz G, Skeen M, Kondo M, Garcia-Blanco MA.and Gregory SG. Molecular analysis of IL-7Rα allele specific expression and IL7 signaling in mDCS, CD4+ and CD8+ T cells from MS patients and controls.2014 Carolinas Multiple Sclerosis Researchers Forum, August 23, 2014 Durham, NC, USA

Bergamaschi L, Arvai S, Galarza Munoz G, Skeen M, Kondo M, Garcia-Blanco MA and Gregory SG. Molecular analysis of IL-7Ralpha allele specific expression and IL7 signaling in mDCs, CD4+ and CD8+ T cells from MS patients and controls- Annual Scientific Congress of the Italian MS Society and its Foundations, May 2014, Rome, Italy

Bergamaschi L, Arvai S, Skeen M, Kondo M, Gregory SG. Defining the T-cell effect of the MS associated SNP, rs6897932, on IL7/IL7Ra signaling. National Multiple Sclerosis Society, Carolina's research Symposium, August 2013, Durham, NC, USA

Bergamaschi L, Beaver, Skeen M, Kondo M, Gregory SG. Molecular analysis of IL-7Ralpha allele specific expression and IL7 signaling in mDCs, CD4+ and CD8+ T cells from MS patients and controls- Annual Scientific Congress of the Italian MS Society and its Foundations (May 2013), Rome, Italy

Bergamaschi L, Beaver J, Skeen M, Kondo M, Gregory SG. Defining the t-cell effect of the MS associated SNP, rs6897932, on IL7/IL7Rα signaling. 11th International Congress of Neuroimmunology Nov 4th-8th, 2012 Boston, MA, USA

Bergamaschi L, Beaver J, Skeen M, Kondo M, Gregory SG. Defining the T-cell effect of the MS associated SNP, rs6897932, on IL7/IL7Rα signaling. National Multiple Sclerosis Society, Carolina's research Symposium, August 2012, Durham, NC, USA

Borsa di studio finanziata con il Bando 2011 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 74.000 €

Dario Di Luca
Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara, Ferrara

COLLABORATORI:
Antonella Rotola, Elisabetta Caselli, Roberta Rizzo, Valentina Gentili, Daria Bortolotti, Iva Pivanti

Studio delle alterazioni nelle risposte antivirali dell'immunità innata in pazienti con SM

PREMESSE E OBIETTIVI

L'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa verso le infezioni microbiche, e la sua stimolazione protegge dalle infezioni virali. Risultati ottenuti di recente nel nostro laboratorio mostrano che, in alcune persone con sclerosi multipla (SM), l'immunità innata conferisce una maggiore suscettibilità all'infezione virale. Lo studio di questo fenomeno ci ha portato alla scoperta che questo difetto è associato alla presenza sulle cellule Natural killer (NK) di un particolare recettore, il KIR2DL2. Le cellule NK sono importanti per il controllo dell'infezione virale, e diversi risultati pubblicati suggeriscono che un'alterazione delle cellule NK possa portare allo sviluppo di patologie autoimmuni. Ci proponiamo di studiare per quali motivi le cellule NK di persone con SM hanno queste risposte diverse contro le infezioni virali e le conseguenze che queste disfunzioni possono avere sulla genesi dei meccanismi autoimmuni.

RISULTATI

In questo progetto abbiamo valutato i meccanismi molecolari alla base dell'effetto del recettore KIR2DL2 sull'attivazione delle cellule NK contro l'infezione virale in persone con SM e in controlli. In particolare, abbiamo analizzato l'effetto dell'espressione KIR in cellule NK e le vie che potrebbero essere implicate nella loro modulazione.
Abbiamo osservato, per la prima volta, come l'induzione dell'espressione di KIR2DL2 riduca l'attività citotossica di cellule NK verso cellule bersaglio HLA-C1+ infettate da herpesvirus, e la secrezione di molecole pro-infiammatorie (Interferone-gamma). Abbiamo identificato un sottogruppo di cellule chiamate NK17, in grado di secernere Interleuchina-17, ma non Interferone-gamma, che non sono in grado di attivarsi ed eliminare l'infezione da herpesvirus in pazienti con SM positivi per KIR2DL2. Questi risultati indicano che il sottogruppo di cellule NK17 è dannoso per il controllo virale. La valutazione di altri virus erpetici (HHV-6 e EBV) ha dimostrato un effetto simile di KIR2DL2 nella SM nei confronti dell'eliminazione del virus.

CONCLUSIONI

Riportiamo, per la prima volta, la capacità dell'infezione da herpesvirus di indurre un sottoinsieme di cellule NK17 in persone con SM positive per KIR2DL2, suggerendo un possibile ruolo di queste cellule NK nella maggiore suscettibilità alle infezioni da herpesvirus. Questi dati suggeriscono un' implicazione importante anche in altre malattie infettive e autoimmuni. La valutazione dei meccanismi alla base della minore risposta delle cellule NK17 contro l'infezione da herpesvirus potrebbe portare ad individuare nuove strategie terapeutiche per il controllo della maggiore suscettibilità alle infezioni da herpesvirus in un sottogruppo di persone con SM.

Study of altered antiviral innate immunity responses in MS patients

INTRODUCTION AND AIMS

Innate immunity is the first line of defense against microbial infections, and its stimulation protects against viral infections. Recent results obtained in our laboratory showed that in some patients with MS, innate immunity confers increased susceptibility to herpesvirus infections. The study of this phenomenon has led to the discovery that this defect is associated with the expression of a particular receptor, KIR2DL2, on cells Natural killer (NK). NK cells are important for virus infection control, and several results have been published suggesting an alteration of NK cells in autoimmune diseases. We plan to investigate the reasons for which the NK cells of MS patients have these different responses towards viruses and the consequences that these dysfunctions can have on the genesis of autoimmune mechanisms.

RESULTS

In this project we have evaluated the molecular mechanisms at the basis of KIR2DL2 effect on NK cell activation towards viral infection in MS patients. In particular, we have analyzed the effect of KIR expression in NK cells and the pathways that could be implicated in their modulation. We observed, for the first time, the induction of KIR2DL2 expression that reduced the cytotoxic activity of NK cells towards HLA-C1+ target cells infected by herpesvirus and the secretion of pro-inflammatory molecules (Interferon-gamma). We have identified a subset of NK17 cells, able to secrete Interleukin-17 but not Interferon-gamma and presenting no activation and herpesvirus infection clearance in KIR2DL2 positive MS patients. These results indicate NK17 subset as detrimental for viral control. The evaluation of other herpesviruses (HHV-6 and EBV) supported a similar effect of KIR2DL2 in MS towards virus clearance.

CONCLUSIONS

We report, for the first time, the ability of herpesvirus infection to induce a NK17 cell subset in KIR2DL2 positive MS patients, suggesting a role for these NK cells in the increased susceptibility to herpesvirus infection. These data suggest an important implication also in other infective and autoimmune diseases. The evaluation of the mechanistic basis of the lower responsiveness of NK17 cells to herpesvirus infection could identify new therapeutic strategies in counteracting herpesvirus susceptible in a subset of MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Ben Fredj N, Rizzo R, Bortolotti D, Nefzi F, Chebel S, Rotola A, Frih-Ayed M, Di Luca D, Aouni M. Evaluation of the implication of KIR2DL2 receptor in multiple sclerosis and herpesvirus susceptibility. Journal Of Neuroimmunology, 2014, 271 (1-2), p.30-5.

Bortolotti D, Rotola A, Di Luca D, Rizzo R. KIR2DL2 overexpression influences NK cell response to CpG. Frontiers In Immunology, 2013, p.538, ISSN: 1664-3224

Rizzo R, Gentili V, Casetta I, Caselli E, De Gennaro R, Granieri E, Cassai E., Di Luca D., Rotola A. KIR2DL2 expression alters natural killer cells response to herpesvirus infection in multiple sclerosis patients. Journal of Neuroimmunology, 2012, 253, p. 38-39

Rizzo R, Bortolotti D, Granieri E, Groppo E, Rotola A, Di Luca D. KIR expression influences NK cell response to herpesvirus infection in MS patients. 2nd European Seminar in Virology (EuSeV), Bertinoro (BO, Italy) 13-15 June 2014

Rizzo R, Rotola A, Bortolotti D, Gentili V, Granieri E, Cassai E, Di Luca D. Herpesvirus infection modifies NK17 subset in Multiple Sclerosis patients. "9° Forum SIVIM", Pisa (Italy), 09-10 December 2013

Rizzo R. Assetto genico delle cellule NK e suscettibilità alle infezioni virali. SIVIM Milano, 5-7 Maggio 2010

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni (prorogato di 5 mesi) e l'ammontare di 100.000 €

Silvia Musio
Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "C. Besta", Milano

MENTORE: **Rosetta Pedotti**

Il ruolo dei basofili nella encefalite autoimmune sperimentale, un modello animale di sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'encefalite sperimentale autoimmune (ESA) è il modello di sclerosi multipla (SM) più comunemente usato, è mediato dalle cellule T CD4+ e condivide molte caratteristiche cliniche e istologiche con la patologia umana. L'ESA è indotta dalle cellule T helper (Th) autoreattive che sono in grado di promuovere infiammazione e demielinizzazione del sistema nervoso centrale. Le cellule maggiormente responsabili del danno alla mielina sono le cellule T autoreattive Th1 (che producono IFN-ɣ) e Th17 (che producono IL-17). Tuttavia, noi e altri gruppi abbiamo dimostrato che diversi componenti della risposta Th2, classicamente associata alla risposta allergica, potrebbero essere implicati nello sviluppo dell'ESA. I basofili, i granulociti circolanti meno rappresentati (meno dell'1% dei leucociti), sono cellule coinvolte nella risposta allergica storicamente ignorate sia per la loro scarsa numerosità, sia per le somiglianze con i mastociti. Recentemente, molti gruppi hanno studiato il ruolo dei basofili nelle allergie, dimostrando il ruolo di queste cellule come mediatori, regolatori ed effettori dell'infiammazione di tipo 2. Recentemente i basofili sono stati collegati anche a patologie autoimmuni, come il lupus sistemico eritematoso (LES), mettendo in luce nuovi possibili ruoli di queste cellule. Lo scopo di questo lavoro è quello di studiare il ruolo dei basofili nell'ESA.

RISULTATI

Abbiamo caratterizzato la popolazione dei basofili in topi naïve e in topi con ESA, analizzando la loro frequenza nel sangue periferico, organi linfoidi e nel sistema nervoso centrale. I basofili sono stati definiti come cellule CD3-, CD45/B220-, Cd11b-, Ly6G/Ly6C-, Ly76-, CD49b+, CD200R3+, FcεR1α+, IgE+. Per meglio studiare il ruolo dei basofili nell'ESA, abbiamo utilizzato un anticorpo monoclonale, anti-FcεRIα (MAR-1) che ci ha permesso di ottenere una completa e duratura eliminazione (28 giorni) dei basofili. Il trattamento con MAR-1 non ha influito sulla frequenza degli altri leucociti, fatta eccezione per un leggera modulazione delle cellule dendritiche e delle cellule natural killer. I topi trattati con MAR-1 e i controlli sono stati immunizzati con l'antigene mielinico MOG35-55 per indurre un modello cronico di ESA. Il trattamento con l'anticorpo anti-FcεRIα ha portato ad una ESA più grave, specialmente durante la fase cronica della malattia. L'analisi della risposta immune alla MOG ha evidenziato un aumento di proliferazione e di produzione di citochine pro-infiammatorie (IFN-γ, IL-17, IL-6) nei topi trattati con MAR-1 rispetto ai controlli. Questi risultati sono stati osservati durante l'esordio e la fase acuta della malattia ma non nella fase cronica, quando i livelli di basofili circolanti erano revertiti a valori normali. L'analisi istopatologica del sistema nervoso centrale ha confermato le evidenze sperimentali evidenziando un aumento del numero dei foci infiammatori dei topi trattati con MAR-1 rispetto ai controlli.

CONCLUSIONI

Questi dati suggeriscono che i basofili sono cellule importanti nella patogenesi del modello sperimentale di SM, in particolare il trattamento con l'anticorpo anti-FcεRIα che elimina queste cellule dall'organismo, determina l'aumento delle risposte infiammatorie di tipo Th1 e Th17 contro gli antigeni mielinici e peggiora la malattia nel modello ESA.
Recentemente è stato creato un nuovo modello di topi senza basofili (Mcpt8^{DTR}) che utilizzeremo in uno studio futuro per confermare i nostri dati. Per ottenere un riscontro dei nostri risultati sulla SM umana, in collaborazione con la Dott.ssa Giovanna

Borsellino (Ospedale Santa Lucia, Roma) abbiamo caratterizzato i basofili nel sangue di persone con SM e di controlli sani tramite analisi di citofluorimetria. Inoltre, abbiamo analizzato lo stato di attivazione dei basofili nel sangue periferico umano (persone con SM e controlli) avvalendoci di due specifici marcatori di attivazione (CD203c e CD63). L'analisi di questi dati è attualmente in corso.

The role of basophils in experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model for multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a CD4+ T cell–driven autoimmune disease that shares clinical and histological similarities with MS, thus modeling in mice the human disease. EAE is induced by autoreactive T helper (Th) cells that mediate tissue inflammation and demyelination in the CNS. Autoreactive Th1 cells (IFN-ɣ producing) and Th17 cells (interleukin-17 producing) against myelin antigens have been implicated in the induction of this disease. However, we and other have shown that several components of Th2 response classically associated with allergic diseases might play a role in EAE. Basophils, the least abundant granulocyte population (less than 1% of leukocytes), are cells involved in allergy that have been historically neglected because of this minority status and a phenotype that is similar to mast cells. In recent years, many groups have been investigating the role of these cells in immunology and allergy, providing evidence for a role of these cells as initiators, regulators and effectors of type 2 inflammation. Recently, basophils have been correlated in pathologies with an autoimmune component, such as systemic lupus erythematous (SLE), opening the field to new investigations. The aim of this work was to investigate a possible role for basophils in EAE.

RESULTS

We characterized basophils population in naïve and EAE mice by studying their frequency in circulating blood, primary lymphoid organs and central nervous system (CNS). Basophils were defined as CD3-, CD45/B220-, Cd11b-, Ly6G/Ly6C-, Ly76-, CD49b+, CD200R3+, FcεR1α+, IgE+ cells. We set up a protocol to deplete basophils using anti-FcεRIα antibody (MAR-1), a newly established monoclonal antibody that greatly helped the research on these cells, injected twice/day for three days. Treatment resulted in a long lasting depletion of basophils (28 days). MAR-1 treatment did not affect the frequency of other leukocytes, except for a slight non-significant modulation of dendritic cells and natural killer cells. MAR-1 treated mice and controls were immunized with MOG35-55 to induce a chronic model of EAE. Anti-FcεRIα antibody treatment resulted in exacerbated EAE, especially during the chronic phase. To evaluate the immune response against myelin antigen we analyzed antigen-induced T cell proliferation and cytokine production in LNCs. MAR-1 treated mice proliferate more than controls. Moreover, pro-inflammatory cytokines (IFN-γ, IL-17, IL-6) production was increased in MAR-1 treated mice. These results were observed during onset and acute EAE, but not at later stages of disease (chronic phase) when circulating basophils count was back to normal values. Neuropathological analysis of the CNS revealed an increased number of inflammatory foci in MAR-1 treated mice versus control.

CONCLUSIONS

These data suggest that anti-FcεRIα treatment induces increased Th1 and Th17 responses against myelin antigen and worsens EAE severity. Because a new animal model of systemic basophils deficiency has been established ($Mcpt8^{DTR}$), this model will be used in a future study to confirm our results. Last, in parallel with the experimental model, to evaluate the possible relevance of these findings in human MS, in collaboration with Dr. Giovanna Borsellino (Santa Lucia hospital, Rome) we characterized basophils in peripheral blood of healthy subjects and MS patients by flow cytometry analysis. Moreover, to evaluate the activation state of basophils in MS patients we stimulated these cells from MS patients and controls and checked for activation markers CD203c and CD63. We are presently analyzing the results.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Costanza M, Musio S, Abou-Hamdan M, Binart N, Pedotti R. Prolactin is not required for the development of severe chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol, 2013

Bosticardo M, Musio S, Fontana E, Angiari S, Draghici E, Constantin G, Poliani PL, Pedotti R, Villa A Development of central nervous system autoimmunity is impaired in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein. PlosOne 2014

Musio S, The role of basophils in EAE. XXIII AINI Congress, 1-4 October 2014, Sorrento

Musio S, The role of basophils in EAE Congresso Scientifico Annuale FISM, 28-29 Maggio, 2014, Roma

Musio S, The role of basophils in EAE. Congresso Scientifico Annuale FISM, 29-30 Maggio, 2013, Roma

Musio S, The role of basophils in EAE. XXII AINI Congress, 22 August 2013, MiCo Milano Congressi

Borsa di studio finanziata con il Bando 2011 (prorogata di sei mesi) per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 52.000 €

Liliana Elisa Lucca
Center of Physiopathology of Toulouse-Purpan, Inserm U1043, University Hospital Purpan, Toulouse France

MENTORE: **Roland Liblau**

Linfociti T che co-riconoscono antigeni mielinici e neuronali: tolleranza immunologica e contributo relativo all'autoimmunità del sistema nervoso centrale

PREMESSE E OBIETTIVI

L'identità delle proteine antigeniche che indirizzano l'attacco autoimmune della sclerosi multipla (SM) nel sistema nervoso centrale (SNC) è una delle questioni irrisolte di questa malattia. Sebbene molti antigeni studiati siano proteine della guaina mielinica, è stato proposto che le cellule T nella SM possono riconoscere antigeni neuronali, e quindi contribuire al processo neurodegenerativo che caratterizza la fase progressiva della SM.

Il mio laboratorio ospitante ha descritto, in un modello animale di SM, l'encefalomielite autoimmune sperimentale (ESA), un clone T che riconosce contemporaneamente un antigene mielinico e uno neuronale, la glicoproteina oligodendrocitica della mielina (MOG) e il neurofilamento medio (NFM), con un conseguente aumento della gravità della malattia rispetto a modelli in cui l'attacco è diretto contro un solo antigene. Cellule T che rispondono a più antigeni del self contemporaneamente, sono state isolate anche nella tiroidite autoimmune e in modelli animali di diabete, dove inducono una malattia più grave che le cellule T specifiche per un solo antigene. Le cellule T bispecifiche si ritrovano quindi in diversi contesti di autoimmunità dove contribuiscono alla patologia.

Gli obiettivi del mio progetto sono stati di indagare l'origine delle cellule T bispecifiche e il loro contributo alla malattia nel modello animale più usato di SM, la ESA indotta con MOG_{35-55} in topi C57BL-6.

RISULTATI

Abbiamo riportato che tra le cellule T dei topi C57Bl/6 esistono diversi cloni indipendenti che riconoscono MOG_{35-55} e NFM_{15-35}. Durante il primo anno abbiamo indagato le origini strutturali di tale bi-specificità. Abbiamo trovato che tra il 25% e il 60% delle cellule T specifiche di MOG_{35-55} reagiscono anche contro NFM_{15-35}. Mutando sistematicamente gli aminoacidi del peptide NFM_{15-35}, abbiamo mostrato che le cellule T bispecifiche riconoscono aminoacidi identici in MOG e NFM, secondo un meccanismo di mimetismo tra i due antigeni. Abbiamo poi indagato il perchè la presenza di MOG e NFM non renda le cellule T bi-specifiche tolleranti, un processo che avviene per le proteine del *self* e permette di evitare una risposta autoimmunitaria, ma che appare difettoso nella SM. La MOG è espressa nel timo, l'organo dove le cellule T in via di sviluppo sono rese tolleranti. Riportiamo qui che anche NFM è espressa nel timo, precisamente in una popolazione di cellule epiteliali importante per il processo di tollerizzazione. Per capire se l'espressione dei due antigeni nel timo determini una risposta diminuita contro gli stessi antigeni, abbiamo immunizzato topi in cui l'espressione di MOG, NFM o entrambe è stata eliminata. Abbiamo osservato un effetto dell'espressione di MOG, ma non di NFM, sull'induzione di tolleranza: in assenza di MOG la produzione di molecole infiammatorie associate alla SM è risultata aumentata. Al momento non siamo riusciti a spiegare perchè NFM, benchè espressa nel timo, non tollerizzi le cellule bi-specifiche. L'ipotesi che stiamo indagando è che NFM sia espressa nel timo ma non stabilmente presentata alle cellule T in via di sviluppo.

Durante il secondo anno, ci siamo interessati al contributo delle cellule bispecifiche alla gravità della malattia nell'ESA indotta con MOG_{35-55}.

Abbiamo osservato che l'ESA è meno grave in assenza di NFM, in particolare durante la fase cronica della malattia. Il dato che la frequenza delle cellule T bispecifiche che infiltrano il SNC aumenta durante il corso della malattia suggerisce che tale differenza sia dovuta all'assenza di NFM_{15-35} in quanto bersaglio dell'attacco autoimmune. In topi che non

esprimono NFM, invece, l'accumulo di cellule T bi-specifiche non avviene, a indicare che tali cellule sono attirate dal rilascio di NFM a seguito della distruzione assonale. Infine, per dimostrare che la risposta diretta contro NFM_{15-35} è patogenica, abbiamo eliminato le cellule T specifiche per NFM_{15-35} durante il corso della malattia. In topi trattati all'inizio della fase cronica della malattia abbiamo osservato un recupero quasi completo.
Questi risultati suggeriscono che nella ESA indotta con MOG_{35-55} la transizione verso la fase cronica dipende dalla presenza di cellule T bispecifiche, che riconoscono NFM_{15-35} rilasciato durante la distruzione neuronale.

CONCLUSIONI

In conclusione, i nostri risultati mettono in evidenza il fatto che una risposta diretta contro due antigeni del SNC aggrava l'autoimmunità. Nella SM, le terapie a disposizione reprimono le cellule T indipendentemente dalla specificità, esponendo quindi le persone con SM a un rischio di infezioni e tumori. La difficoltà nel comprendere la specificita antigenica della SM è data dal fatto che essa varia nel corso della malattia e tra individui. Il nostro lavoro mostra che in uno stesso individuo l'attacco autoimmune può essere diretto contro più antigeni contemporaneamente. Inoltre, abbiamo mostrato l'importanza di un antigene neuronale per la cronicità della malattia: questa osservazione potrebbe essere utile per una migliore comprensione della fase neurodegenerativa della SM.

Myelin reactive T-cells that co-recognise a neuronal antigen: immune tolerance and relative contribution to central nervous system autoimmunity

INTRODUCTION AND AIMS

A key question concerning multiple sclerosis (MS) pathogenesis is which antigenic proteins of the central nervous system (CNS) are targeted. While many of the antigens proposed as targets of pathogenic T cells are from the myelin sheath, it has been recognised that these T cells can also be directed against neurons, possibly contributing to the neurodegenerative process that accompanies the secondary progressive phase of the disease.
Using an animal model of MS, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), my host team discovered that a T-cell clone targets simultaneously a myelin and a neuronal antigen, Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) and neurofilament medium (NFM), resulting in increased disease severity. Interestingly, T cells that respond to different self-antigens have also been isolated in autoimmune thyroiditis and in animal models of diabetes, where they drive a more severe disease than T cells with a single specificity. These observations indicate that bispecific T-cells are implicated in autoimmunity where they could determine disease severity. I joined the team with the goals of exploring the origin and contribution to disease of bispecific T cells in the world-wide used EAE model induced with MOG_{35-55} in C57BL-6 mice.

RESULTS

We reported that the T cell compartment of C57Bl/6 mice contains distinct T cell clones that co-recognize MOG_{35-55} and NFM_{15-35}. During the first year, we explored the structural origin of such bispecificity. We established the frequency of bispecific T cells and found that 25 to 60% of all MOG_{35-55}-specific CD4 T cells also recognize NFM_{15-35}. By mutating systematically the aminoacids of the NFM peptide, we showed that bi-specific T cells require the presence of aminoacids that are identical between MOG and NFM, resulting in the two antigens mimicking each other. Next, we investigated why bispecific T cells are not rendered tolerant to the presence of MOG and NF-M, a mechanism that happens for self-proteins but is malfunctioning in MS. MOG is expression in the thymus, the organ where developing T cells are made tolerant. We report that NFM is also expressed in the thymus, specifically by a subset of thymic epithelial cells crucial for induction of tolerance. In order to assess whether presence of the two antigens in the thymus allows for control of the T cell responses directed against these, we immunized mice lacking expression of MOG and NFM or control mice with MOG_{35-55}. Interestingly, we could detect an impact of the expression of MOG,

but not NFM, on immune tolerance. Indeed, in the absence of MOG expression we observed an enhanced production of inflammatory molecules associated with CNS autoimmunity by bi-specific cells. To date, we haven't been able to elucidate why expression of NFM, instead, doesn't result in tolerization of bi-specific T cells. Whether NFM is expressed in the thymus but not stably presented to developing bi-specific T cells is currently being investigated by my host lab.

During the second year, we assessed whether targeting NFM_{15-35} contributes to pathogenicity in MOG_{35-55}-induced EAE. We observed that mice lacking NF-M in the CNS develop a milder EAE, specifically in the chronic phase. To establish if reduced severity was due to the absence of NFM_{15-35} as a target antigen, we analyzed the recruitment of bi-specific T cells to the inflamed CNS. Indeed, we observed a striking increase in the frequency of bispecific T cell clones. Of note, we didn't report the same enrichment of bispecific T cells in the CNS of mice lacking the expression of NF-M, suggesting that these cells persist in the CNS following release of NFM due to neuronal damage. Finally, to prove that recognition of NFM_{15-35} in EAE is pathogenic, we eliminated T cells specific for NFM_{15-35} during the course of the disease. Strikingly, when the treatment was applied to mice entering the chronic phase of EAE, we observed a prompt recovery. Our results suggest thus that in MOG_{35-55}-induced EAE, the transition towards disease chronicity relies on the presence of bispecific T cells, which recognize NFM_{15-35} released during tissue damage.

CONCLUSIONS

In conclusion, our results underline that simultaneous targeting of two CNS antigens can worsen autoimmunity. In MS, existing therapies target T cells regardless of their specificity, thus dampening also protective immune responses and exposing people with MS to infections and cancer. The difficulty in understanding antigen specificity of MS relies on the fact that these antigens may vary between individuals and over time. Our work shows that multiple antigens can be target simultaneously even in a given person. Moreover, we point out the importance of neuronal antigens during the chronic phase of EAE: this observation could hold relevance to the still poorly understood neurodegenerative phase of MS. Altogether, better understanding antigen-specificity of MS could lead to tailored therapies able to target only the T cells involved in the disease.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Lucca LE, Desbois S, Ramadan A, Ben-Nun A, Eisenstein M, Carrié N, Guéry JC, Sette A, Nguyen P, Geiger TL, Mars LT, Liblau RS. Bispecificity for myelin and neuronal self-antigens is a common feature of CD4 T cells in C57BL/6 mice. J Immunol2014, 193(7):3267-77

Ramadan A, Lucca L, Carrié N, Desbois-Beaumel S, Liblau RS, Mars LT. In situ expansion of polyspecific T cells that recognize distinct self-antigens drives the progression of organ-specific autoimmunity. Manuscript in preparation

Lucca LE. Autoreactive T cells specific for both a myelin and a neuronal antigen contribute to EAE 15th International Congress of Immunology, Milan August 24th 2013, selected oral communication

Borsa di studio finanziata con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 56.000 €

Marika Falcone
Dipartimento di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, IRCSS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

COLLABORATORI:
Chiara Sorini, Ilaria Cosorich

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Filippo Canducci, IRCSS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano
Alberto Mariani, Pieralberto Testoni,
Unità di Gastroenterologia, Ospedale San Raffaele, Milano
Kenya Honda, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Japan

Ruolo dei meccanismi immunoregolatori intestinali nella patogenesi della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune causata dalle cellule del sistema immunitario che attaccano la mielina, il rivestimento dei neuroni, provocando così danni a carico di vari distretti del sistema nervoso centrale (cervello e midollo spinale). Negli ultimi 20-30 anni abbiamo assistito ad un drammatico aumento dell'insorgenza di malattie autoimmune come la SM e la comunità scientifica è concorde nel ritenere che alcuni fattori ambientali che sono notevolmente cambiati negli ultimi decenni come la dieta e la maggiore igiene ambientale possano giocare un ruolo essenziale in questo fenomeno. Fino ad oggi non è stato però chiaro il meccanismo attraverso il quale tali fattori ambientali favoriscono l'insorgenza della SM. Negli ultimi anni gli immunologi hanno fatto una scoperta importante: che la flora intestinale regola il funzionamento del nostro sistema immunitario non solo a livello intestinale ma anche in altre parti del nostro organismo. Da qui l'ipotesi che fattori ambientali che agiscono a livello intestinale possano aumentare il rischio di sviluppare SM attivando il sistema immunitario e, in particolare, le cellule immunitarie responsabili dell'attacco al sistema nervoso centrale (SNC). A supporto di tale ipotesi uno studio pubblicato nel 2011 sulla prestigiosa rivista scientifica *Nature* ha dimostrato che la flora batterica intestinale può indurre l'Encefalite Allergica Sperimentale (il modello sperimentale della SM) attivando il sistema immunitario. Lo scopo del nostro studio è stato quello di verificare se anche in individui con SM recidivante remittente (SMRR) è possibile identificare variazioni e attivazione dell'immunità a livello intestinale come conseguenza di variazioni di fattori ambientali che agiscono a livello intestinale modificando la flora (dieta, igiene ambientale, etc). A questo scopo abbiamo raccolto campioni di tessuto intestinale di pazienti che si sottoponevano ad una esofagogastroduodenoscopia per motivi diagnostici (reflusso gastroesofageo, sospetto clinico di celiachia o altro) e da questi tessuti abbiamo estratto ed analizzato le cellule del sistema immunitario.

RISULTATI

Nel nostro progetto originale avevamo proposto di studiare campioni tissutali e di sangue periferico di 10-20 persone con SM-RR e controlli sani. Ad oggi abbiamo analizzato le percentuali relative di diverse sottopopolazioni linfocitarie in campioni tissutali intestinali e di sangue periferico di 23 pazienti affetti da SM e controlli sani. La nostra analisi ha evidenziato che nelle persone con SM c'è uno squilibrio tra la percentuale di linfociti Th17 effettori (che sono responsabili del danno al SNC) e linfociti FoxP3^{+} T regolatori (la cui funzione è quella di "spegnere" l'immunità). Altri linfociti T come i Th1, le cellule regolatorie Tr1 e Th2 sono invece risultati normali nelle persone con SM. I nostri risultati preliminari hanno anche dimostrato che alcuni farmaci immu-

no-modulatori che sono efficaci nella prevenzione delle ricadute SM, come il copolimero e l'interferon-beta, agiscono modulando l'immunità intestinale ripristinando un normale rapporto tra linfociti Th17 effettori e linfociti FoxP3^{+}T regolatori.

CONCLUSIONI

La conclusione del nostro studio è che nelle persone con SM-RR vi è un'alterazione dell'immunità a livello intestinale che potrebbe avere un effetto diretto sulla regolazione dell'autoimmunità e quindi del danno infiammatorio a livello del SNC. Il nostro prossimo obiettivo è quello di verificare se tali variazioni dell'immunità intestinale siano imputabili ad alterazioni della flora batterica intestinale e ad abitudini dietetiche che possono avere un impatto cruciale nella composizione della flora intestinale (dieta con un alto apporto di grassi animali e basso apporto di fibre). Il fine ultimo del nostro studio sarà quello di evidenziare fattori ambientali, ed in particolare specifiche abitudini alimentari, che possano influire negativamente sul rischio di sviluppare ricadute di SM modificando la flora e l'immunità intestinale.

Gut immune regulation in multiple sclerosis patients

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease caused by immune cells that attack and destroy the myelin sheath thus damaging neurons of the Central Nervous System (brain and spinal cord). In the past 20-30 years western countries experienced a dramatic raise in the incidence of autoimmune diseases like MS and there is general agreement that environmental factors that changed in the past decades such as diet and hygiene standards may have played a crucial role in increasing the incidence of MS. However, the mechanisms through which those environmental factors impinge on MS pathogenesis are still largely unknown. Recently, it was discovered that environmental factors acting at the intestinal level such as diet and microbiota modifications have a high impact on the immune system both at the intestinal and systemic level. This finding raised the hypothesis that those environmental factors may affect MS by altering gut immunity and activating T cells responsible for the immune attack to the CNS. In support to that hypothesis, a research study published in 2011 in *Nature* demonstrated that modifications of the intestinal microbiota induced EAE, the experimental model of MS, by altering gut immunity. Our goal was to assess whether in humans affected by RR-MS there are alterations of gut immunity that could be linked to environmental factors acting at the intestinal level by modifying the microbiota such as dietary habits and hygiene standards. To this aim we analyzed gut immune cells in intestinal mucosa samples (and peripheral blood for comparison) of RR-MS patients undergoing EGDS for diagnostic purposes (gastroesophageal reflux, clinical symptoms of celiac disease, etc).

RESULTS

In our proposal we planned to analyzed intestinal mucosal samples and blood samples of 10-20 RR-MS and healthy controls. In the one-year period of this pilot research grant we analyzed samples from 23 RR-MS patients and healthy controls. Our preliminary data indicate that in MS patients there is an alteration of the ratio between Th17 effector T cells (responsible for the immune attack to the myelin sheath) and FoxP3^{+} T regulatory cells (whose function is to suppress T cell immunity and autoimmunity). Other T cell subsets such as Th1 cells, Th2 cells and regulatory Tr1 cells were not altered in MS patients compared to healthy controls. Our preliminary results also showed that some immune modulatory drugs that are effective in preventing MS relapses such as copolymer-1 and interferon beta are capable to affect gut immunity and restore a normal effector/regulatory T cell balance in the intestinal mucosa.

CONCLUSIONS

Our conclusion is that MS patients carry an alteration of gut immune cells that affects autoimmunity at the systemic level and worsen inflammation within the CNS. Our next objective is to verify whether

those alterations of gut immunity in MS patients are due to modifications of the intestinal microbiota and to a dietary regimen that affects microbiota composition (high fat/low fibers diet). Our ultimate goal will be to identify environmental factors and, specifically, dietary habits that can negatively affect the pathogenesis of MS by altering microbiota composition and gut immunity.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Sorini C, Dolpady J, Usuelli V, Messina MJ, Saita D, Canducci F, Mariani A, Honda K, Martinelli V, Falcone M.
Gut immune regulation in multiple sclerosis patients. Congresso Annuale FISM- Roma 29 Maggio, 2014

Messina MJ, Falcone M, Mariani A, Rodegher M, Moiola L, Comi G, Martinelli V.
The role of gut immunity in Multiple Sclerosis patients. Congresso della Società Italiana di Neurologia, Cagliari, 24 Aprile, 2014

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 20.000 €

Serena Martire
Unità di Neurobiologia Clinica, Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri Ottolenghi, Orbassano (TO)

MENTORE: **Simona Perga**

Studio dei meccanismi alla base della deregolazione del gene anti-infiammatorio TNFAIP3 in pazienti con sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'enzima A20, codificato dal gene TNFAIP3, è una molecola chiave nel controllo dell'infiammazione e dell'autoimmunità. In modelli sperimentali è stato dimostrato che l'espressione dell'enzima è necessaria per prevenire l'infiammazione cronica e lo sviluppo di patologie autoimmuni, mentre nell'uomo varianti polimorfiche a singolo nucleotide nella regione del gene TNFAIP3 sono state associate ad un maggior rischio di sviluppare diverse malattie autoimmuni, tra cui la sclerosi multipla (SM). Inoltre, il nostro gruppo di ricerca ha osservato che, rispetto ai controlli, i pazienti con SM mostrano nel sangue periferico una minore espressione di un gruppo di molecole ad azione anti-infiammatoria tra cui TNFAIP3, suggerendo che la SM sia scatenata da un difetto nel controllo negativo dell'infiammazione.
Su queste basi, ci siamo proposti di caratterizzare le popolazioni cellulari responsabili del deficit di espressione di TNFAIP3 e di ricercarne le possibile cause, focalizzandoci sui fattori epigenetici.
Infine, poiché numerosi studi epidemiologici descrivono una maggiore suscettibilità allo sviluppo di malattie autoimmuni da parte dei pazienti che ne sono già affetti, ed in particolare è stata osservata una maggiore incidenza di tiroidite autoimmune di Hashimoto tra i pazienti con SM rispetto alla popolazione generale, abbiamo deciso di confrontare il livello di espressione di TNFAIP3 in pazienti con SM, con tiroidite autoimmune e con entrambe le patologie, oltre che in pazienti con SM a diverso decorso clinico.

RISULTATI

Per indagare le funzioni di TNFAIP3, abbiamo deciso di identificare le popolazioni cellulari del sangue periferico che hanno un ruolo preponderante nel deficit di espressione osservato nei pazienti con SM. A tal proposito abbiamo confrontato i livelli di TNFAIP3 in monociti e linfociti T CD4+ ottenuti da 24 pazienti con SM e 18 controlli sani. Dai risultati è emerso che l'espressione del gene è più bassa nei monociti dei pazienti rispetto a quelli dei controlli, mentre nei linfociti la differenza di espressione non raggiunge risultati significativi.
Inoltre, per approfondire i meccanismi biomolecolari alla base della deregolazione di TNFAIP3, abbiamo deciso di valutare la variabilità epigenetica globale di pazienti e controlli. Abbiamo quindi sequenziato piccoli RNA contenuti nelle microvescicole isolate dal plasma di sei pazienti con SM e sei controlli sani, identificando in questo modo 15 piccoli RNA non codificanti (ncRNA) differentemente espressi nei due gruppi, di cui 9 sotto-espressi e 6 sovra-espressi nei pazienti. Sulla base della letteratura la maggior parte di questi sembra avere un ruolo in diversi tipi di tumori, alcuni sono coinvolti nella malattia di Alzheimer e Parkinson, mentre nessuno è stato ancora descritto nella SM. L'analisi computazionale per individuare i possibili geni bersaglio dei trascritti identificati è ancora in corso.
Infine, abbiamo selezionato diversi gruppi di soggetti per confrontare i livelli di TNFAIP3 tra pazienti con SM e tiroidite autoimmune e tra pazienti con SM a diverso decorso clinico. Ad oggi abbiamo raccolto nella Biobanca del nostro Centro i campioni di 60 pazienti con SM recidivante-remittente (SMRR) senza tiroidite autoimmune, 37 con SMRR e tiroidite, 27 con SM primariamente progressiva, 51 non-SM con tiroidite (21 ipotiroidei e 30 eutiroidei) e 49 controlli sani.

CONCLUSIONI

In conclusione, il nostro studio dimostra che i monociti rivestono un ruolo centrale nel fenomeno dell'alterata espressione di TNFAIP3 osservata precedentemente nel sangue intero dei pazienti con

SM. Abbiamo, inoltre, identificato 15 ncRNA circolanti differentemente espressi nei pazienti rispetto ai controlli, la cui analisi dei possibili geni bersaglio consentirà di evidenziare eventuali interazioni con TNFAIP3 o altri geni del suo *pathway*. Infine, misurare l'espressione del gene nei gruppi di soggetti selezionati consentirà di capire se diversi livelli di TNFAIP3 sono in grado di determinare diversi gradi di autoimmunità.

Nel complesso, i risultati di questo studio ci hanno consentito e consentiranno di approfondire le conoscenze sul ruolo di TNFAIP3 nella SM e più in generale nell'autoimmunità. Dal momento che TNFAIP3 e le molecole che fanno parte del suo *pathway* rappresentano un bersaglio manipolabile per attenuare la componente infiammatoria, ulteriori studi in questo campo potrebbero fornire le basi per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

Deeper insight into the mechanisms underlying the deregulation of the anti-inflammatory gene TNFAIP3 in patients with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The A20 enzyme, codified by the TNFAIP3 gene, is considered a central gatekeeper in inflammation and immunity. In fact, the phenotype of mice with full or conditional A20 deletion shows that A20 expression is essential to prevent chronic inflammation and autoimmune pathologies. Moreover, single nucleotide polymorphisms within the TNFAIP3 genomic locus have been associated with multiple inflammatory and autoimmune disorders, including multiple sclerosis (MS). Recently, our group observed a significant down-regulated expression of a panel of important anti-inflammatory molecules in whole peripheral blood of MS, among which TNFAIP3, suggesting that MS arises from a defective negative feedback control of inflammation.

Based on this ground, we planned to characterize the blood cell populations that may be critically involved in the unbalanced expression of TNFAIP3 in MS and to investigate the causes underlying the TNFAIP3 expression deficit, focusing on epigenetic factors.

Finally, since epidemiological studies showed an increased susceptibility for people with one autoimmune disease to develop another and, specifically, several studies described an increased co-occurrence of MS with Hashimoto's thyroiditis compared to the general population, we decided to evaluate TNFAIP3 expression levels in patients with MS, with autoimmune thyroiditis or both, as well as in patients with different MS clinical course.

RESULTS

To investigate the function of TNFAIP3, we aimed at identifying particular blood cell subpopulations having a pivotal role in its unbalanced expression. To this purpose, we performed real-time PCR experiments on monocytes and CD4+ T cells obtained from 18 healthy controls (HC) and 24 MS patients. Results showed that TNFAIP3 gene expression was lower in monocytes of MS patients than in HC, while in CD4+ T cells the under-expression in MS patients was only approaching statistical significance.

Moreover, in order to deepen insight into the biomolecular mechanisms underlying TNFAIP3 deregulation in MS, we focused on a fine-scale assessment of the epigenetic variability of MS patients compared to HC. Small RNAs extracted from macrovesicles precipitated from plasma of six MS and six HC were sequenced, identifying 15 differentially expressed non-coding RNA (ncRNA). Nine of them resulted down-regulated in MS, while the remaining six showed an up-regulation. In the literature there is no evidence of an involvement of this group of ncRNA in the MS disease, whereas most of them appear to have mainly a role in different types of cancer, and two of them are described to be involved in Alzheimer and Parkinson disease. However, computational analyses for ncRNA target prediction are now underway.

Finally, aiming to compare TNFAIP3 gene expression level in patients with MS, with autoimmune thyroiditis or both, as well as in patients with different MS clinical course, we selected different cohort of subjects. Until now we collected in our Biobank samples from 60 treatment-naïve relapsing-remitting (RRMS) without other autoimmune diseases,

37 treatment-naïve RRMS affected also by autoimmune thyroiditis, 27 primary progressive MS, 51 non-MS patients affected by autoimmune thyroiditis (21 hypothyroid, 30 hyperthyroid) and 49 HC.

CONCLUSIONS

In conclusion, to date this study demonstrated that monocytes play a pivotal role in the unbalanced expression of TNFAIP3 previously described in whole peripheral blood of MS patients. Moreover, we identified 15 ncRNA differentially expressed in MS compared to HC. Subsequent computational analysis for target prediction will allow us to highlight the presence of ncRNA which are able to interact with genes of the TNFAIP3 pathway, influencing their expression level. Finally, the evaluation of TNFAIP3 expression in the selected cohorts of subjects may help to understand if different levels of TNFAIP3 gene expression can predispose to different degrees of autoimmunity.

As a whole, results of the present study allowed and will allow a better understanding of the role of TNFAIP3 in MS and autoimmunity in general. Since TNFAIP3 or molecules in its pathway could be boosted to tone down the inflammatory component of MS, future studies in this field may provide the basis for the development of novel therapeutic strategies.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Navone ND, Perga S, Martire S, Berchialla P, Malucchi S, Bertolotto A. Monocytes and CD4+ T cells contribution to the under-expression of NR4A2 and TNFAIP3 genes in patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2014 Jul 15;272(1-2):99-102

Martire S, Giuliano-Albo A, Perga S, Falvo S, Marnetto F, Reviglione R, Capobianco M, Corpillo D, Bertolotto A. DBP isoforms and ApoE as early prognostic CSF biomarkers of MS aggressiveness. XXIV National AINI Congress, Sorrento (Italy), 1-4 ottobre 2014

Perga S, Martire S, Montarolo F, Spadaro M, Navone ND, Berchialla P, Bertolotto A. Role of single nucleotide polymorphisms and haplotype variants in TNFAIP3 expression modulation in multiple sclerosis patients. XXIV National AINI Congress, Sorrento (Italy), 1-4 ottobre 2014

Martire S, Montarolo F, Perga S, Navone ND, Finardi A, Furlan R, Bertolotto A. Role of NR4A2 in a Multiple Sclerosis mouse model (Experimental Autoimmune Encephalomielitis). 29th Congress of the European Committee for treatment and research in multiple sclerosis. Copenhagen (Denmark), 2-5 ottobre 2013

Borsa di studio finanziata con il Bando 2012 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 22.000 €

Manolo Sambucci
Unità di Neuroimmunologia, Fondazione Santa Lucia, Roma

MENTORE: **Luca Battistini**

Ruolo svolto dalla immunosenescenza nella insorgenza e progressione della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'immunosenescenza viene definita come la fase in cui inizia il declino della immunità cellulo-mediata. In letteratura scientifica è stata ripetutamente correlata l'età del sistema immunitario con lo sviluppo di forme di autoimmunità, e sono stati descritti dei marcatori di senescenza su linfociti T in individui affetti da patologie autoimmuni. Recenti ricerche sul differenziamento linfocitario e senescenza del sistema immunitario hanno imputato un ruolo chiave ad una proteina chiamata p38. La protein chinasi p38 appartiene alla famiglia delle MAP chinasi (MAPK), e quando viene attivata gli eventi di trasduzione del segnale che ne derivano portano ad una regolazione dell'attivazione linfocitaria, della proliferazione e del rilascio delle citochine. A conferma di questa influenza di p38 sullo sviluppo linfocitario è stato dimostrato il suo coinvolgimento, mediante induzione di una risposta di tipo Th17, nello sviluppo e progressione della *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (EAE), il modello sperimentale della sclerosi multipla (SM). Tuttavia, benché ci sia una immunosenescenza prematura nei pazienti affetti da SM, il ruolo della p38 in questo contesto patologico non è stato ancora definito in maniera chiara.
Il nostro progetto si è proposto di chiarire il ruolo svolto dalla immunosenescenza nell'insorgenza e la progressione della SM. Il nostro primo obiettivo è stato correlare lo studio di marcatori di immunosenescenza, attraverso lo studio del fenotipo cellulare e del differenziamento dei linfociti T CD4 e CD8, con l'età e la gravità della patologia in persone con SM recidivante-remittente (SMRR). A questi risultati abbiamo quindi aggiunto lo studio parallelo sulla attivazione di p38.
È importante notare come questo studio evidenzi la possibilità di modulare il signaling di p38 come possibile soluzione per bilanciare gli effetti deleteri, dovuti alla immunosenescenza, nelle persone con SM.

RISULTATI

Il progetto è iniziato dimostrando che le cellule T CD4+, isolate da persone con SMRR, mostrano una reattività alterata di p38. Questo è stato evidenziato mediante citofluorimetria, rilevando un aumento del 36% di p38 nelle cellule CD4 a seguito di stimolazione, mentre in assenza di stimolazione non abbiamo evidenziato differenze nel livello basale di p38. Questo risultato è stato confermato studiando il *rate* di fosforilazione di p38 con la tecnica Western Blot. Per studiare l'impatto di questa aumentata attivazione di p38 è stata valutata la frequenza delle cellule TEMRA, che fenotipicamente rappresentano delle cellule senescenti. I risultati hanno dimostrato come la percentuale di questo subset cellulare sia più alta nei pazienti con SM sia per quanto riguarda le cellule T CD4+ che per le cellule T CD8+. Quindi, nei pazienti SM, ad un aumento della fosforilazione di p38 corrisponde un aumento dell'immunosenescenza
Per valutare l'effetto di p38 nel differenziamento delle cellule Th17, sono stati condotti dei saggi cellulari in presenza di un inibitore specifico di tutte le isoforme di p38 (BIRB796). Linfociti T CD4 naïve (CD4+CD45RA+CD27+) sono stati indotti a polarizzare verso il fenotipo Th17 attraverso l'aggiunta di un cocktail citochinico (TGFbeta, IL1beta, IL6, IL23) con o senza inibitore di p38. Dopo 5 giorni di polarizzazione è stata valutata la produzione di IL17 mediante citofluorimetria ed ELISA. I risultati hanno mostrato un effettivo blocco della polarizzazione verso Th17 in presenza di inibitore di p38, e la produzione di IL17 era significativamente ridotta.

CONCLUSIONI

I nostri dati hanno dimostrato che il signaling di p38 è aumentato nei pazienti SM. Questo favorisce un differenziamento dei linfociti T verso un fenotipo senescente TEMRA, visto che la frequenza di questo fenotipo è maggiore proprio nei pazienti SM. È in-

teressante infine notare come p38 sembra essere coinvolto nel differenziamento delle cellule Th17 sia nei soggetti sani che nei pazienti SM. Avere capito uno dei meccanismi che modulano la senescenza nei linfociti può indirizzare potenziali terapie volte alla modulazione di p38 allo scopo di bilanciare i suoi effetti deleteri sulla funzionalità del sistema immunitario nella SM.

A role for immunosenescence in the onset and progression of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Immunosenescence is defined as a decline in cell-mediated immunity with age. Several evidences suggest that aging of the immune system and onset of autoimmunity may be correlated. As a matter of fact, the incidence of autoimmune diseases appears to be higher in the elderly and an age-inappropriate differentiation and expression of senescence markers has been described in T lymphocytes from patients affected by certain autoimmune diseases. Recent findings indicate that immunosenescence occurs prematurely in patients affected by relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) and other data suggest that p38 MAP-kinase is involved in human lymphocyte differentiation and senescence, and p38 phosphorylation has been shown to be activated in a pro-inflammatory environment. Once sparked, the p38 cascade regulates lymphocyte activation, proliferation and cytokine release. Confirming its central role in shaping the immune response, the p38 MAPK cascade has been shown to be required for the development and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of multiple sclerosis (MS), through the induction of a Th17-mediated autoimmune response. In addition to this, p38 cascade has been shown to be crucial in inducing T cell senescence. Interestingly, premature immunosenescence has been related to autoimmunity in humans. Nevertheless, the contribution of p38 phosphorylation on human Th cell generation and senescence in MS pathogenesis has not been clarified yet.

Therefore, our first objective was to relate the study of immunosenescence markers, through the study of CD4 and CD8 lymphocytes phenotype and differentiation, with age and severity of the disease in patients with relapsing-remitting MS (RRMS). To these results we then added the parallel study on activation of p38.

Our study aims to clarify the role played by immunosenescence in the onset and progression of multiple sclerosis. In addition to this, the understanding of the mechanisms that modulate senescence in lymphocytes will lead to the opportunity to counteract the aging of the immune system and its deleterious effect on the functionality of the immune response in MS.

RESULTS

We first measured by flow cytometry the level of expression of the p38 kinase ex-vivo, and found that there was no difference in the basal level of p38 total protein and phosphorylated protein between donors and MS patients. However, when the levels of p38 phosphorylation were measured in isolated CD4-positive T cells upon stimulation with PMA and ionomycin, we uncovered a completely different situation: CD4 + lymphocytes from RR-MS individuals in fact showed a significantly higher propensity to phosphorylation than their counterparts isolated from healthy donors. After stimulation the fold increase of p38 MFI in CD4 cells was 36% higher in patients than in healthy donors. To validate the results obtained by flow cytometry, we performed the same experiment in western blot.

As p38 pathway has an impact on T cell senescence, the second step of the project was to investigate whether the high activation of this kinase leads to a higher frequency of senescent lymphocytes in MS patients in comparison with healthy donors. A group of RR-MS patients was then recruited and PBMCs were isolated from peripheral blood. The frequency of CD45RA re-expressing cells (TEMRA), known to be senescent-like T cells was analysed by flow cytometry. The results show that the percentage of this cell subset is higher in patients in comparison with healthy donors, and this holds true both for CD8+ and CD4+ T lymphocytes.

To outline the contribution of the p38 signalling pathway on the induction of human Th17 differentiation, we performed a T cell differentiation assay of naïve CD4+CD45RA+CD27+ lymphocytes upon stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 and the appropriate polarizing cytokines (TGFbeta, IL1beta, IL6, IL23), in the presence or absence of the p38 inhibitor BIRB796. BIRB796 was selected for its ability to inhibit with great efficiency all four isoforms of p38 MAPK and for its low toxicity on lymphocytes in culture. After 5 days of culture, cells were stimulated with PMA and ionomycin, and the release of IL17 was assessed by flow cytometry. We were able to detect a sizeable frequency of IL17 positive cells under polarizing conditions, and this frequency appeared to be significantly inhibited in the presence of BIRB796.

Finally, we measured by ELISA the release of IL17 by isolated naive CD4 cells under polarizing conditions in the presence or absence of BIRB after 5 days. While uncommitted CD4 T cells did not release IL17, Th17-polarized lymphocytes secreted significant amounts of the proinflammatory cytokine. IL-17 release was significantly reduced when BIRB796 was used in the differentiation assay, thus confirming the cytofluorimetric data.

Overall our results demonstrated that CD4+ T cells isolated from RR-MS individuals display an altered responsiveness of the p38 cascade, resulting in an increase of p38 phosphorylation upon stimulation. We also showed that the p38 signalling pathway is implicated in the generation of Th17 lymphocytes from human CD4+CD27+CD45RA+ naive T cells, both in healthy donors and in patients affected by the relapsing remitting form of MS (RR-MS). The data obtained also indicates that p38 activation is essential for IL17 release from central memory lymphocytes and committed Th17 cell clones, both in healthy donors and in RR-MS patients. In addition to this, the results obtained show an increased frequency of CD8+ and CD4+ TEMRA cells (CD45RA re-expressig cells) in patients affected by RR-MS in comparison with healthy donors. These subsets of effector T cells actually show markers of T cell senescence and the highest expression of phospho-p38, when compared with other T cell subsets.

CONCLUSIONS

These data suggest that the p38 signalling pathway is upregulated in MS patients. In addition to this, upregulation of the p38 cascade in patients could push T cell differentiation towards a TEMRA-senescent phenotype, as the frequency of this senescent-like subset is higher in the peripheral blood of MS patients. Finally, p38 appears to be involved in the differentiation of Th17 cells both in healthy donors and in RR-MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Di Mitri D, Sambucci M, Loiarro M, De Bardi M, Cencioni MT, Volpe E, Gasperini C, Centonze D, Sette C, Akbar A, Borsellino G, Battistini L. The p38-MNK axis modulates TH17 differentiation and functionality in multiple sclerosis. *Submitted to Immunology*

Borsa di studio finanziata con il Bando 2011 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 64.000 €

Flavia Valtorta
Unità di Neuropsicofarmacologia, Divisione di Neuroscienze, Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI:
Serena Bellani, Fabrizia Guarnieri, Elena Monzani

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Luca Muzio, **Gianvito Martino**, Unità di Neuroimmunologia, Divisione di Neuroscienze, Ospedale San Raffaele, Milano
Davide Pozzi, Lab di Farmacologia e Patologia del Cervello, IRRCS Humanitas, Rozzano (MI)

Ruolo delle citochine pro- e anti-infiammatorie nella modulazione dell'attività e nella composizione presinaptica: nuove prospettive nella ricerca sulla sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è definita come una malattia infiammatoria del sistema nervoso centrale. Le cause alla base della SM sono ancora poco chiare, ma molti studi hanno rivelato che durante lo sviluppo della malattia vi è la progressiva alterazione del funzionamento delle cellule cerebrali, i neuroni, in seguito alla perdita di un componente fondamentale, la mielina, una sostanza che garantisce la corretta comunicazione tra i neuroni permettendo il normale funzionamento del nostro cervello. La perdita della mielina sembra essere imputabile ad un malfunzionamento del sistema immunitario, il quale attacca in modo erroneo alcune proteine della mielina. Alcune ricerche recenti hanno però evidenziato che alcuni sintomi si manifestano prima della perdita di mielina, suggerendo che altri fattori determinino un danno neuronale e siano importanti per l'evolversi della malattia. Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato proprio quello di studiare l'effetto diretto delle molecole rilasciate dal sistema immunitario sul funzionamento dei neuroni, indipendentemente dall'azione sulla mielina, e in particolare sul funzionamento dell'unità strutturale alla base della comunicazione tra neuroni, la sinapsi.

La sinapsi è composta da due compartimenti: un terminale presinaptico, in cui sono accumulate vescicole sinaptiche cariche di neurotrasmettitore, e un compartimento postsinaptico, deputato a ricevere il neurotrasmettitore e mediarne una cascata di segnalazione a seguito dell'attivazione di specifici recettori. Molti lavori recenti si sono occupati di comprendere quale fosse l'effetto di mediatori infiammatori sul compartimento postsinaptico, ma risulta ancora poco studiato il contributo immunomodulatorio nella funzionalità del compartimento presinaptico. Con questo progetto abbiamo voluto approfondire proprio questo aspetto. La comprensione di questi meccanismi, dei quali si conosce molto poco, permetterebbe di ampliare la conoscenza delle cause di questa malattia, aprendo nuove possibili strade per la terapia.

RISULTATI

Per rispondere alla nostra domanda biologica abbiamo utilizzato colture neuronali ippocampali primarie derivate da topo, un modello *in vitro* ben caratterizzato in letteratura. I neuroni cresciuti *in vitro*, una volta maturati, sono stati incubati con citochine pro- e anti-infiammatorie per tempi brevi (5-60 minuti). Sono stati poi eseguiti vari saggi volti a valutare parametri di funzionalità neuronale. Ciò che abbiamo osservato è che l'esposizione a citochine pro-infiammatorie, ma non anti-infiammatorie, determina un aumento dell'eccitabilità dei neuroni, che si manifesta con un aumento del calcio basale intracellulare, un aumento nella frequenza di eventi di rilascio spontaneo di vescicole sinaptiche, un aumento nel numero di vescicole sinaptiche reclutate in seguito a specifici paradigmi di stimolazione elettrica. Questi effetti funzionali si accompagnano ad un aumento della fosforilazione di sinapsina 1 mediato dalla chinasi ERK. Sinapsina 1 è un proteina

in grado di regolare il numero di vescicole sinaptiche disponibili per la fusione, modulando così il rilascio di neurotrasmettitore. Sinapsina potrebbe quindi essere un mediatore cruciale della risposta neuronale a citochine pro-infiammatorie.
Per capire come l'esposizione cronica a un ambiente infiammatorio possa influire sulla funzionalità neuronale, abbiamo incubato i neuroni in coltura con citochine pro-infiammatorie per cinque giorni. Abbiamo così osservato che l'esposizione cronica a citochine infiammatorie determina una riduzione specifica di alcuni marcatori sinaptici, indicando l'attivazione di meccanismi compensatori di rimodellamento delle sinapsi che potrebbero essere volti a un silenziamento delle stesse. Inaspettatamente, in neuroni deleti per sinapsina, questo rimodellamento della composizione sinaptica diventa drammatico.
Ci siamo quindi chiesti se l'assenza di sinapsina potesse modificare il decorso della malattia. Abbiamo quindi indotto l'Encefalite Sperimentale Allergica, un modello sperimentale di SM ampiamente utilizzato, in topi wild-type e topi deleti per il gene Syn1, e monitorato il decorso clinico della patologia per 90 giorni. Ciò che emerge da dati ancora preliminari è che l'assenza di sinapsina 1 non altera l'andamento acuto della patologia, ma ne migliora il decorso cronico. Infatti, i topi senza sinapsina 1 si attestano in fase cronica su un punteggio clinico inferiore, seppur di poco, rispetto ai controlli. Ciò è confermato anche dall'analisi istopatologica delle lesioni presenti a livello del midollo spinale.

CONCLUSIONI

Grazie a questo progetto pilota, appena concluso, abbiamo potuto investigare le conseguenze dirette di una esposizione neuronale a un ambiente pro-infiammatorio e abbiamo identificato la cascata del segnale ERK-sinapsina 1 come mediatore importante della risposta neuronale a citochine. Ciò rappresenta un primo passo verso l'identificazione di un possibile nuovo meccanismo patogenetico e di conseguenza di un nuovo possibile bersaglio farmacologico.

Role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the modulation of presynaptic composition and functioning: new perspectives in multiple sclerosis research

INTRODUCTION AND AIMS

MS is defined as an inflammatory disease of the central nervous system. The causes at the basis of MS are still unclear, but many studies have revealed that during the development of MS there is a progressive alteration of the functioning of neurons, due to the loss of myelin. Myelin is a fundamental component, as it allows a correct communication between neurons and the correct functioning of our brain. The loss of myelin seems to be caused by a malfunctioning of the immune system, which erroneously attacks some myelin proteins. However, recent research underlined that some symptoms arise before the loss of myelin, thus suggesting that other mechanisms determine the neuronal damage.
The aim of this project was to study the direct effect of molecules released from the immune system on neuronal function, independently from the action on myelin, and in particular on the synapse. The synapse is composed of two compartments: a presynaptic terminal where synaptic vesicles filled with neurotransmitter are accumulated, and a postsynaptic compartment, deputed to developing a signal cascade in response to the activation of specific receptors by the neurotransmitter released. Many papers in the literature focused on the effect of inflammatory mediators on the postsynaptic compartment. Less is known about the immunomodulatory contribution on presynaptic functionality. In this project we wanted to deepen this aspect. Indeed, the comprehension of these mechanisms, which are not well understood, would allow us to widen the knowledge of MS causes and to open new routes for therapy.

RESULTS

In order to address our biological question, we used mouse primary hippocampal neuronal cultures, a well-characterized in vitro model. Neurons grown in culture until maturation were incubated with pro- and anti-inflammatory cytokines for brief periods of time (5-60 min). Several assay for the analysis of the neuronal functionality were then performed. We ob-

served that the exposure to inflammatory cytokines causes an increase in neuronal excitability, which manifests through an increase in basal intracellular calcium levels, an increase in the frequency of spontaneous events of vesicle fusion (miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs), an increase in the number of vesicles recruited upon specific paradigms of electrical stimulation. These functional effects are accompanied by an increased phosphorylation of synapsin 1 by the ERK kinase. Synapsin 1 is a protein able to regulate the number of synaptic vesicles available for fusion, thus modulating neurotransmitter release. Therefore, synapsin may be a crucial mediator of the neuronal response to pro-inflammatory cytokines.

We also wanted to understand how a chronic exposure to an inflammatory milieu could influence on neuronal functionality. To this aim, we incubated neurons in culture with pro-inflammatory cytokines for five days. At the end, we observed that the chronic exposure to inflammatory cytokines causes a specific reduction in some synaptic markers, pointing to the possibility that a compensatory remodelling of synapses may be activated in these cells, probably to silence them. Unexpectedly, in neurons deleted for synapsin the synapse remodelling becomes dramatic.

We wanted to investigate whether the absence of synapsin could modify disease progression. To this aim, we induced EAE in wild-type and synapsin 1 knock-out mice, and we followed the clinical outcome for 90 days. Preliminary data indicate that the absence of synapsin 1 does not modify the acute phase of the pathology, but it positively influences the chronic phase. In fact, the knock-out mice stabilize at a lower clinical score with respect to control mice. This is confirmed by the histo-pathological evaluation of the lesions in the spinal cord.

CONCLUSIONS

Thanks to this pilot project, we could investigate the direct consequences of neuronal exposure to an inflammatory milieu, and we identified the ERK-synapsin 1 signalling cascade as an important mediator of the neuronal response to cytokines. This represents a first step towards the identification of a novel possible pathogenic mechanism, and thus of a novel possible pharmacological target.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Guarnieri FC, Bellani S, Pozzi D, Monzani E, Corbetta A, Fornasiero EF, Muzio L, Martino G and Valtorta F. Modulatory effects of pro- and anti-inflammatory cytokines on signalling pathways and molecular composition of nerve terminals. Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma 28-29 Maggio 2014

Monzani E, Guarnieri FC, Bellani S, Pozzi D, Valente MM, Fornasiero EF, Martino G, Muzio L and Valtorta F. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the modulation of presynaptic composition and functioning: new perspectives in multiple sclerosis research. San Raffaele Scientific Retreat, Milano, 29-30Novembre 2013

Guarnieri FC, Bellani S, Pozzi D, Monzani E, Valente MM, Fornasiero EF, Martino G, Muzio L and Valtorta F. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the modulation of presynaptic composition and functioning: new perspectives in multiple sclerosis research. Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma 29-30Maggio 2013

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 30.000 €

Anna Falco
Unità di Adesione Cellulare, Università Vita-Salute e Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

MENTORE: **Ivan de Curtis**

Regolazione degli interneuroni GABAergici da parte delle GTPasi Rac

PREMESSE E OBIETTIVI

Studi *post-mortem* mostrano che gli interneuroni GABAergici positivi per la parvalbumina (PV+) risultano diminuiti nella corteccia motoria di persone con sclerosi multipla (SM). Linee di topi con knockout (KO) neuronale di una o entrambe le GTPasi Rac1 e Rac3 sono state prodotte nel laboratorio di dr. Ivan de Curtis.Dati e mostrano che il numero di interneuroni PV+ cerebrali diminuisce nei topi con knockout (KO) rispetto ai controlli. I due specifici obiettivi del progetto sono stati:

1) Analizzare gli effetti dell'encefalite sperimentale autoimmune (ESA) sulle cellule GABAergiche corticali per studiare il meccanismo che causa la perdita degli interneuroni corticali osservata nelle persone con SM.

2) Analizzare gli effetti della mancanza delle Rac sugli interneuroni spinali inibitori, per identificare difetti in specifiche popolazioni di interneuroni; un punto di partenza per un progetto a lungo termine che veda l'uso di questi modelli animali per l'analisi dei meccanismi che ricadono sugli interneuroni inibitori spinali nelle persone con SM.

RISULTATI

Per quanto riguarda il primo obiettivo del progetto abbiamo osservato gli effetti dell'ESA sugli interneuroni PV+ e calretinina positivi (CR+) nella corteccia motoria primaria di topi. È stata rilevata una significativa riduzione del numero degli interneuroni PV+ ma non dei CR+ nei topi con ESA. La quantificazione degli interneuroni PV+ negli strati II-III della corteccia motoria primaria ha mostrato una riduzione del 30% negli. ($P<0.001$), mentre non sono state osservate differenze nel numero degli interneuroni PV+ negli strati IV-VI della corteccia motoria primaria nei topi con ESA. La riduzione nel numero di interneuroni PV+ è stata osservata soltanto nei topi con un elevato score clinico (2.5-3; 30 dpi). È stato, inoltre, visto uno scarso segnale dei terminali GABAergici (a livello degli strati II-III). La riduzione del numero delle cellule PV+ è risultata accompagnata da una riduzione del segnale del GABA: l'area occupata dallo specifico marcatore è risultata ridotta del ≈50%. La quantificazione nella corteccia motoria ha mostrato una riduzione della colocalizzazione di PV con vGAT a livello dei terminali presinaptici nei topi con ESA. Abbiamo osservato, inoltre, la presenza di cellule CD45+ e cellule apoptotiche (con la tecnicaTUNEL) nella corteccia degli animali con ESA con elevato punteggio clinico (2.5-3); anche il segnale per GFAP è risultato più forte in questi topi rispetto ai quelli con basso score clinico.

Per quanto riguarda il secondo punto del progetto abbiamo effettuato un' analisi sul midollo spinale di topi con doppio knockout (dKO) allo stadio di 13 giorni postnatale (P13).Il transgene SynI-Cre risulta espresso allo stadio di 12,5 giorni embrionali (E12.5),e questo indica che Rac1 viene deleta molto presto nei neuroni del midollo spinale. Sono stati osservati dei cambiamenti nello staining per X-Gal tra l'area dorsale e ventrale della materia grigia tra gli stadi embrionali a E12.5 e quelli postnatali a P13. Il transgene *synI-Cre* è espresso negli interneuroni PV+, CR+, e nei motoneuroni ChAT+. Abbiamo osservato, infatti, una forte colocalizzazione dell'espressione del transgene *synI-Cre* con neuroni PV+ (86%), CR+ (72%), CB+ (82%), and ChAT+ (83%). L'espressione di Rac3 nelle corna ventrali e dorsali, così come nei DRGs vista attraverso *l'ibridazione in situ* è risultata forte agli stadi P0-P7, debole negli stadi P13-P25.Abbiamo visualizzato gli interneuroni attraverso immunofluorescenza su sezioni di midollo spinale da topi dKO e i rispettivi controlli (Rac3KO) nello stadio P13. L'area ventrale lombare del midollo spinale (L1-L4) risulta essere coinvolta nel controllo del movimento delle zampe posteriori e i topi con doppio knockout (dKO) risul-

terebbero atassici e poco coordinati. Il midollo spinale di questi topi risulta essere più piccolo, con una forte diminuzione nel numero degli interneuroni PV+, CR+ and CB+, rispetto ai topi controllo. Le cellule PV+ a livello del midollo spinale risultano, in oltre, essere GABA negative, suggerendo che potrebbero essere glicinergiche.

CONCLUSIONI

I nostri dati dimostrano che il circuito inibitorio risulterebbe affetto nella corteccia motoria primaria dei topi con ESA, e suggeriscono che gli interneuroni PV+ sono vulnerabili in maniera specifica alla patologia durante la progressione del trattamento ESA. La ragione di questa vulnerabilità non è ancora chiara. Poiché gli effetti sulle cellule PV+ sono stati osservati soltanto nei topi con un elevato score clinico, la perdita di queste cellule potrebbe rappresentare un segno degli stadi avanzati della patologia. Con gli studi precedenti che implicano difetti GABAergici in altre aree del cervello durante lo sviluppo della patologia, i nostri risultati supportano l'ipotesi che un rafforzamento del segnale dagli interneuroni GABAergici potrebbe essere una valida alternativa terapeutica per controllare la progressione del danno neuronale nelle persone con SM. Comunque, il dato sullo sviluppo del midollo spinale che risulta essere alterato nei topi con doppio knockout (Rac1/Rac3) è preliminare per studi futuri sui topi con singolo knockout e sui topi conESA e i rispettivi controlli. La comprensione dei meccanismi intracellulari mediati dalle Rac che regolano lo sviluppo degli interneuroni spinali potrebbe essere rilevante per studi futuri indirizzati sugli effetti dell'ESA su queste cellule (Gilmore et al. 2008; Vogt et al. 2009) e nelle persone con SM.

Regulation of cerebral and spinal interneurons by Rac GTPases

INTRODUCTION AND AIMS

Recent post-mortem analysis on brains from patients indicate that parvalbumin-positive (PV+) GABAergic interneurons are decreased in the motor cortex of patients with Multiple Sclerosis (MS). Different mice lines with single or double neuronal knockout (dKO) of the genes for the Rac1 and Rac3 GTPases have been produced in the lab of dr. Ivan de Curtis. The data show that the number of cortical and hippocampal PV+ interneurons is decreased in the KO mice compared to controls. The two specific aims were:

Aim 1. To analyze the effects of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) on cortical GABAergic cells to study the mechanisms causing the loss of cortical interneurons observed in MS patients.

Aim 2. Analysis of the effects of Rac depletion on inhibitory spinal interneurons, to identify defects in specific populations of spinal interneurons; a starting point for a long-term project aiming at the use of these animal models for the analysis of the mechanisms affecting spinal inhibitory interneurons in MS.

RESULTS

Aim 1. We have tested the effects of EAE on PV+ and calretinin(CR)+ interneurons in the primary motor cortex of mice. We found a significant reduction of the number of PV+, but not CR+ interneurons in EAE-treated WT mice. Quantification of PV+ interneurons in layers II-III of the primary motor cortex showed a reduction of 30% in EAE animals ($P<0.001$). No difference were observed for the number of PV+ cells in layers IV-VI of the primary motor cortex of EAE mice. The number of PV+ INs was reduced only in mice with high clinical score (2.5-3; 30 dpi). We found a lower signal of GABAergic terminals (layers II-III) in EAE mice. The reduction of the number of PV+ cells accompanied impaired GABA signaling: the area occupied by either marker was reduced by ≈50%. Interestingly, quantification in the motor cortex showed that colocalization of PV with vGAT at inhibitory presynaptic sites was also decreased in EAE mice. We found more CD45+ cells and apoptotic cells (by TUNEL) in the cortex of EAE mice with high clinical score (2.5-3). Also the signal for GFAP was stronger with respect to mice with low score.

Aim 2. We have started the analysis of spinal cords

in P13 dKO mice. SynI-Cre is expressed at E12.5, indicating that Rac1 was deleted early in spinal cord neurons. A change in X-Gal staining between ventral and dorsal areas of the gray matter was observed between E12.5 and P13. The *synI-Cre* transgene is expressed in the PV+, CR+ and CB+ interneurons, and in ChAT+ motor neurons. There was a strong colocalization of *synI-Cre* transgene expression with PV+ (86%), CR+ (72%), CB+ (82%), and ChAT+ (83%) neurons. Rac3 expression in the ventral and dorsal horns, as well as in DRGs detected by *in situ* hybridization was stronger at P0-P7, weaker at P13-P25. We looked at interneurons by immunofluorescence on sections of spinal cord from P13 dKO and control (Rac3KO) littermates. The ventral lumbar region of the spinal cord (L1-L4) is involved in the control of hindlimbs that are affected in the ataxic and poorly coordinated dKO mice. The spinal cord was smaller in these mice, with a strong decrease in the number of PV+, CR+ and CB+ interneurons compared to controls. Spinal PV+ cells were GABA-negative, suggesting that they may be glycinergic.

CONCLUSIONS

Our data demonstrate that inhibitory circuits are affected in the motor cortex of EAE mice, and suggest that PV+ interneurons are specifically vulnerable to the pathological insult during EAE progression. The reason for this vulnerability is unknown. Since the effects on PV+ cells were only detectable in mice with elevated clinical score, loss of these neurons may be a hallmark of advanced stages of the disease. Together with previous studies implicating a GABAergic defect in other areas of the brain during the development of the disease, our results support the hypothesis that the reinforcement of signaling by GABAergic interneurons may be a valid therapeutic alternative to control the progression of the neuronal damage in MS patients. Moreover, the finding that development of the spinal cord was altered in Rac1/Rac3 dKO mice is preliminary to future studies on single KO mice and on EAE versus WT mice. Understanding the intracellular Rac-mediated mechanisms regulating the development of spinal interneurons will be relevant to future studies addressing the effects of EAE on these cells (Gilmore et al. 2008; Vogt et al. 2009) and in human MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Falco A, Pennucci R, Brambilla E, de Curtis I. Reduction of parvalbumin-positive interneurons and inhibitory input in the cortex of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. Exp Brain Res 2014, 232:2439-49.

Falco A, Montinaro V, Pennucci R, Tonoli D, Brambilla E, Furlan R, de Curtis I. Regulation of GABAergic interneurons by Rac GTPases: implication for Multiple Sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM. Roma, 25-26 maggio 2011.

Falco A, Montinaro V, Pennucci R, Tonoli D, Brambilla E, Furlan R, de Curtis I Regulation of GABAergic interneurons by Rac GTPases: implication for Multiple Sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM. Roma, 30-31 maggio 2012.

Falco A, Montinaro V, Pennucci R, Tonoli D, Brambilla E, Furlan R, de Curtis I Regulation of GABAergic interneurons by Rac GTPases: implication for Multiple Sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM. Roma, maggio 2013.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2011 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 37.000 €

Jonathan Vinet
Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

MENTORE: **Giuseppe Biagini**

Caratterizzazione di un fenotipo microgliale favorevole alla rimielinizzazione

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cellule microgliali, considerate i macrofagi del cervello, giocano un ruolo chiave nella sclerosi multipla (SM). È stato osservato che le cellule microgliali presentano un fenotipo attivato in tutte i tipi di lesione della SM e, per questa ragione, si ritiene che abbiano un ruolo lesivo. Tuttavia, dati recentemente ottenuti da cellule microgliali derivate dal modello del cuprizone, nel topo, suggeriscono che la microglia possa esprimere un fenotipo favorevole alla rimielinizzazione. Per questa ragione abbiamo ipotizzato che i macrofagi, infiltratisi nelle lesioni della SM, possano presentare un fenotipo favorevole alla lesione, mentre la microglia possa intervenire per sostenere la rimielinizzazione dei neuroni. Per verificare questa ipotesi abbiamo proposto lo studio differenziato dei macrofagi e delle cellule microgliali isolate da topi affetti da Encefalite Sperimentale Allergica, ESA, ottenendo tali cellule sia nella fase acuta sia nella fase cronica, per caratterizzare il fenotipo di entrambi i menzionati tipi cellulari dopo averli identificati e separati mediante l'uso di marcatori specifici, in citometria di flusso. Abbiamo anche proposto un esperimento di deplezione della microglia per verificare se fosse possibile ottenere una modulazione dei processi di rimielinizzazione nel modello del cuprizone.

RISULTATI

Nella ESA in fase acuta abbiamo notato che i macrofagi presenti negli infiltrati mostrano un fenotipo proinfiammatorio e, probabilmente, si rendono responsabili della attivazione dei linfociti T. Tuttavia, contrariamente a quanto avevamo ipotizzato, le cellule microgliali non hanno dimostrato di possedere un fenotipo favorevole alla rimielinizzazione. Al contrario, tali cellule sono risultate essere in stato di immunosoppressione, suggerendo la mancanza di un loro ruolo nei fenomeni flogistici in atto nelle lesioni della SM. Di conseguenza, abbiamo deciso di soprassedere all'effettuazione degli esperimenti di deplezione da effettuarsi nel modello del cuprizone. Nella ESA in fase cronica, abbiamo osservato una notevole riduzione del numero di macrofagi presenti nelle aree di infiltrazione e, inoltre, il viraggio della microglia verso un fenotipo simile a quello dei macrofagi.
Questi dati suggeriscono che vi sia una variazione nel fenotipo microgliale quando la malattia si cronicizza.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel nostro progetto indicano che i macrofagi, ma non le cellule microgliali, possono essere le cellule responsabili dei processi flogistici delle lesioni riscontrate nella SM, almeno nelle fasi iniziali della malattia. Questi risultati forniscono nuove conoscenze sul ruolo della microglia e dei macrofagi nella fisiopatologia della SM.

Characterization of a supportive phenotype of microglia toward remyelination

INTRODUCTION AND AIMS

Microglia, the macrophages of the brain, are considered as key players in multiple sclerosis (MS). Indeed, microglia activation is observed in all MS lesions and for this reason, they are considered harmful. However, recent data obtained from isolated microglia in the mouse cuprizone model suggest that microglia display a phenotype that is supportive for remyelination. We thus hypothesized that in MS, infiltrating macrophages may display a harmful phenotype whereas microglia would help the remyelination of neurons. To verify this, we proposed to isolate microglia/macrophages from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice either in the acute or chronic phase and investigate the phenotype of both cell types after differentiating them using flow cytometry cell sorting and specific markers. We also proposed to deplete microglia from the brain and verify whether it would affect remyelination in the cuprizone model.

RESULTS

In acute EAE, we observed that infiltrating macrophages display a pro-inflammatory phenotype and that they are probably responsible for T-cells activation. However, contrary to what we hypothesized, microglia did not express a phenotype supportive of remyelination. Instead, they remained immune suppressed suggesting that they do not participate in the inflammation occurring in MS lesions. Accordingly, we decided to renounce in performing the depletion experiment in the cuprizone model. In chronic EAE, we observed that the number of infiltrating macrophages was notably reduced and that the microglia phenotype was more similar to macrophages. These data suggest that a shift in microglia phenotype occurs when the disease becomes chronic.

CONCLUSIONS

The results derived from our project indicate that macrophages but not microglia might be the cells responsible for the inflammation occurring in MS lesions, at least at the beginning of the disease. This provides new insights on the role of microglia/macrophage in the pathophysiology of MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Vainchtein ID, Vinet J, Brouwer N, Brendecke S, Biagini G, Biber K, Boddeke HW. and Eggen BJ. In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed. *Glia*, 2014; 62(10):1724-35

Vinet J, van Zwam M, Dijkstra IM, Brouwer N, van Weering HR, Watts A, Meijer M, Fokkens MR, Kannan V, Verzijl D, Vischer HF, Smit MJ, Leurs R, Biber K. and Boddeke HW. Inhibition of CXCR3-mediated chemotaxis by the human chemokine receptor-like protein CCX-CKR. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 168(6):1375-87

Vinet J, Vainchtein ID, Brouwer N, Brendecke S, Biagini G, Biber K, Boddeke HWGM. and Eggen BJL. In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, invading macrophages are immune activated whereas microglia remain immune suppressed. *9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, July 2014*

Vainchtein ID, Vinet J, Brouwer N, Brendecke S, Prinz M, Eggen BJL, Boddeke HWGM. The phenotypes of microglia and macrophages during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). XI *Euroglia, Berlin, July 2013*

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

TOWARDS NEW TREATMENTS

Roberto Furlan
Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

COLLABORATORI:
Giacomo Casella, Annamaria Finardi, Chiara Maiorino

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Trevor Owens, University of Odense, Denmark

IL-27 e IL-35 nella encefalomielite autoimmune sperimentale: un affare di famiglia

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia immuno-mediata. Tra le molecole che il sistema immunitario usa per comunicare, due sono state identificate come cruciali per lo sviluppo della malattia: IL-12 e IL-23. Queste molecole sono entrambe pro-infiammatorie e appartengono a una famiglia di molecole che ha altri due membri, entrambi considerati anti-infiammatori: IL-27 e IL-35. Noi abbiamo usato un approccio di terapia genica per somministrare IL-27 e IL-35 direttamente nel sistema nervoso centrale di topi affetti da una malattia neuroinfiammatoria chiamata EAE, considerata un modello di SM. La nostra ipotesi di lavoro era che IL-27 e IL-35, probabilmente in equilibrio omeostatico con i membri pro-infiammatori della famiglia, fossero i loro più efficienti inibitori e perciò una terapia efficace per la SM.

RISULTATI

IL-27 e IL-35 sono molecole costituite da due subunità, perciò difficili da produrre mediante terapia genica. Abbiamo perciò prima generato dei vettori lentivirali capaci di produrre IL-27 e IL-35 e dimostrato la loro corretta attività biologica. In seguito abbiamo somministrato IL-27 e IL-35 nel cervello di topi affetti da EAE. IL-27 si è rivelata efficace, riducendo la severità clinica della malattia, mentre IL-35 si è dimostrata inefficace. Questo è sorprendente perché entrambe IL-27 e IL-35 somministrate nel cervello sono state capaci di convertire le cellule immunitarie del cervello, chiamate microglia, da un profilo pro-infiammatorio ad un profilo anti-infiammatorio.

CONCLUSIONI

Il nostro studio mostra che IL-27, ma non IL-35, inibisce lo sviluppo clinico dell'EAE nei topi ed è perciò una molecola candidata a divenire una terapia per la SM. Per esplorare ulteriormente le potenzialità di sviluppo di IL-27 come trattamento nell'uomo vorremmo dissezionare meglio il meccanismo d'azione terapeutica, che evidentemente non implica necessariamente la modulazione di microglia, per rafforzare il razionale della traslazione all'uomo.

IL-27 and IL-35 in experimental autoimmune encephalomyelitis: a family affair

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disease. Among the molecules the immune system uses to communicate, two have been identified as crucial to develop MS: IL-12 and IL-23. These molecules are both pro-inflammatory mediators and belong to a family of molecules that has two other members both considered to be anti-inflammatory: IL-27 and IL-35. We have used a gene therapy approach to deliver IL-27 and IL-35 directly in the central nervous system of mice affected by a neuroinflammatory disease called EAE, considered a model of MS. Our working hypothesis was that IL-27 and IL-35, because possibly involved in a homeostatic balance with the pro-inflammatory members of the family, would be their most efficient inhibitors, and thus an efficacious therapy for MS.

RESULTS

IL-27 and IL-35 are molecules constituted by two subunits, difficult to produce by gene therapy. So first we generated lentiviral vectors able to produce IL-27 and IL-35 and demonstrated their correct biological activity. Next, we administered IL-27 and IL-35 in the brain of mice affected by EAE. IL-27 was clinically efficacious, reducing significantly clinical severity of the disease, while IL-35 was ineffective. This is surprising since both IL-27 and IL-35 administered in the brain were able to shift the immune cells of the brain, called microglia, from a pro-inflammatory profile, to an anti-inflammatory profile.

CONCLUSIONS

Our study shows that IL-27, but not IL-35, efficiently inhibits the clinical development of EAE in mice and is therefore a candidate molecule for treatment of MS. To further explore the potentiality of IL-27 to be developed as a treatment for the human disease, we would like to better dissect the therapeutic mechanism, that clearly does not necessarily implicate modulation of microglia, to strengthen the rationale for human translation.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Casella G., et al. IL-35 and IL-27 gene therapy in chronic EAE. SFN. Washington, November 15-19 2014

Casella G., et al. IL-27 and IL-35 in chronic EAE. FENS Forum. Milan, July 5-9 2014

Casella G., et al. IL-35 cytokine as gene therapy in chronic EAE SINS, Rome, October 3-5 2013

Casella G., Heterodimeric cytokines as gene therapy in neuroinflammation ICI (AINI) August 22-27, Milan, Italy

Casella G., et al. Microglia modulation by IL-27 and IL-35 is necessary but not sufficient to inhibit chronic EAE. *Manuscript in preparation*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 120.000 €

Stefano Pluchino
Department of Clinical Neurosciences, Wellcome Trust-Medical Research Council Stem Cell Institute
University of Cambridge Clifford Allbutt Building - Cambridge Biosciences Campus, Cambridge UK

COLLABORATORI:
Chiara Cossetti, Nunzio Iraci, Tommaso Leonardi, Diana Breitmaier

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Jose Manuel Garcia-Verdugo, University of Valencia, Spain
Suresh Mathivanan, La Trobe University, Australia
Angela Bachi, IFOM - FIRC Institute of Molecular Oncology, Italy
Anton J. Enright, The EMBL-European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, UK
John S. Mattick, The Garvan Institute, Australia

RNA non codificanti a plasticità terapeutica delle cellule staminali neurali

PREMESSE E OBIETTIVI

Il trapianto di cellule/precursori staminali neurali (NPCs) protegge il sistema nervoso centrale (SNC) da danni di natura infiammatoria. Inoltre, dati recenti dimostrano che alcune delle funzioni delle NPCs – fra cui la loro funzione immunoregolatoria – richiedono complessi e sofisticati meccanismi di comunicazione tra cellule. Se da un lato è noto che questa comunicazione dipende in parte da citochine e/o fattori di crescita secreti dalle NPCs, i nostri studi recenti attribuiscono un ruolo chiave ad un nuovo meccanismo di comunicazione tra cellule, mediato dal rilascio di vescicole extracellulari di membrana (EV) da cellule donatrici a cellule *target*. Con questo progetto abbiamo voluto definire se questo meccanismo di comunicazione tra cellule venga utilizzato anche dalle NPCs e ne abbiamo, inoltre, fornito una caratterizzazione a livello molecolare al fine di aprire la strada ad innovativi approcci terapeutici.

RISULTATI

I dati che abbiamo ottenuto mostrano che le cellule NPCs secernono le EVs, che sono composte prevalentemente da esosomi. Abbiamo, inoltre, osservato l'esistenza di una nuova via di segnale regolata da citochine che indirizza specifiche proteine ed RNA verso le vescicole EV. Utilizzando la tecnica "*Next generation small RNA-Seq*" abbiamo individuato un totale di 39 microRNA (miRNAs) esosomali, di cui una parte è espressa, in risposta a citochine, nelle NPCs e/o nelle vescicole EV. Inoltre, attraverso il test "*dual luciferase reporter assay*" abbiamo anche dimostrato che i miRNA secreti mantengono la loro attività biologica quando sono trasferiti ad altre cellule. In modo analogo abbiamo anche studiato l'espressione di mRNA attraverso la tecnica *next generation long RNA-Seq*, individuando un gruppo (*cluster)* di geni con funzioni legate alla risposta immunitaria, esclusivamente espressi nelle NPCs, nelle vescicole EV e negli esosomi derivati da NPCs precedentemente trattate con citochine di tipo Th1. Questo dato suggerisce che in risposta alla stimolazione con citochine di tipo Th1 le NPCs sono in grado di indirizzare verso le EVs dei componenti di *pathways* specifici attivati dalle citochine.
Inoltre, applicando una serie di approcci bioinformatici, analisi computazionali e tecniche di *imaging* ad alta risoluzione siamo strati in grado di dimostrare che le vescicole EV rilasciate dalle staminali sono in grado di recapitare il complesso IFN- /Ifngr1 a cellule target.
Con questo studio abbiamo confermato la proprietà intrinseca delle EVs di inviare segnali e, allo stesso tempo, abbiamo scoperto che il complesso IFN- /Ifngr1 media un nuovo meccanismo di comunica-

zione tra cellule che le staminali neurali trapiantate potrebbero potenzialmente usare per scambiare segnali con il sistema immunitario.
Infine, abbiamo messo a punto un nuovo approccio terapeutico basato su *RNAi* che è potenzialmente applicabile *in vivo,* in modelli sperimentali di sclerosi multipla. Portando avanti questo studio con il supporto di FISM, con l'obbiettivo di arrivare a nuove terapie per la sclerosi multipla (SM), il mio laboratorio ha anche iniziato ad usare le nanostrutture pRNAs (*packaging RNA nanostructures*) per somministrare direttamente miRNAs o siRNAs, traendo ispirazione dal contenuto terapeutico delle EVs.

CONCLUSIONI

Questo studio ci ha permesso di chiarire un nuovo meccanismo di scambio d'informazione tra cellule, e dimostra che i segnali in risposta alle citochine, mediati da esosomi, sono un importante meccanismo attraverso il quale le NPC possono esercitare le loro funzioni immunoregolatorie. Fornendo una maggiore e più dettagliata comprensione dei meccanismi di scambio d'informazione che le cellule staminali stabiliscono dopo il trapianto, siamo fiduciosi di fare passi avanti verso la completa comprensione alla base della plasticità terapeutica delle cellule staminali, con l'obiettivo di tradurre la conoscenza acquisita in terapie cliniche innovative per la SM.

Noncoding RNAs and therapeutic plasticity of neural stem cells

INTRODUCTION AND AIMS

Neural stem/precursor cell (NPC) transplantation protects the central nervous system from inflammatory damage. Recent evidence demonstrates that some of the NPC functions, including the immune regulation require sophisticated mechanisms of intercellular communication. While some communication is delivered by secreted cytokines and/or growth factors, our recent work suggests that a key role might be attributed to a novel mechanism of intercellular communication through the transfer of secreted extracellular membrane vesicles (EVs) from *donor* to *recipient* cells. Here we have focused on defining whether this form of communication exists for NPCs, and on elucidating its molecular signature and opening new perspectives of therapeutic relevance.

RESULTS

Our current data suggest that NPCs secrete EVs primarily comprised of exosomes and we observe novel cytokine-regulated pathways that sort proteins and RNAs into these vesicles. Small RNAseq has revealed 39 exosomal microRNAs (miRNAs), and we identified a small set of miRNAs whose expression in NPCs and/or secretion within exosomi (EXOs)/EVs responds to cytokine stimulation. Importantly, we demonstrated through dual luciferase reporter assays that secreted miRNAs retain their functional potential when transferred to target cells. On the other hand, long RNA sequencing (RNA-seq) revealed a cluster of pathways related to the *Immune Response* category that is over-represented in Th1 NPCs, Th1 EVs and Th1 EXOs only, thus suggesting that following Th1 stimulation NPCs are able to traffic several cytokine-specific response pathways in EVs.
Furthermore, using a series of bioinformatic techniques, computational analyses and sophisticated high resolution imaging techniques, we have demonstrated that stem cell EVs deliver functional IFN- /Ifngr1 complexes to target cells. While confirming the intrinsic signalling properties of EVs, our study identifies a novel mechanism of intercellular communication regulated by IFN- /IFNGR1 complex, which stem cell grafts may use to signal to the host immune system. Finally we set-up a novel RNAi-based therapeutics potentially able to be used *in vivo* in animal model of multiple sclerosis (MS). As follow up of the knowledge gained under the auspice of FISM in the present project, my lab has started using packaging RNA (pRNA) nanostructures to deliver miRNAs or siRNAs inspired by the contents of therapeutic EVs.

CONCLUSIONS

Our study sheds new light on the mechanisms of transcellular information exchange and demonstrates that cytokine-regulated exosome signalling is an im-

portant pathway by which NPCs may mediate their immune functions. Helping to elucidate and fully define the cellular signaling that stem cells establish after transplantation will support an understanding of the definitive mechanisms underlying stem cell therapeutic plasticity, with the visionary focus of translating the knowledge of basal stem cell functions into innovative high-impact clinical therapeutics for MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Tannahill GM, Iraci N, Gaude E, Frezza C, Pluchino S. Metabolic reprogramming of mononuclear phagocytes and progressive multiple sclerosis. Front Immunol, *in the press* doi:10.3389/fimmu.2015.00106

Giusto E, Donegà M, Cossetti C and Pluchino S. Neuro-immune interactions of neural stem cell transplants: from animal disease models to human trials. *Exp Neurol* 2014 Oct;260:19-32

Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, Pluchino S. The role of immune cells, glia and axons in white and grey matter lesions in multiple sclerosis. Prog Neurobiol. 2015 Mar 21. pii: S0301-0082(15)00019-2. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.02.003. [Epub ahead of print] Review

Cossetti C, Iraci N, Mercer TR, Leonardi T, Alpi E, Drago D, Alfaro-Cervello C, Saini H, Davis M, Schaeffer J, Muller W, Garcia-Verdugo JM, Mathivanan S, Bachi A, Enright A, Mattick JS, Pluchino S. Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN- via Ifngr1 to activate Stat1 signalling in target cells. *Mol Cell* 2014 Oct 23;56(2):193-204

Hermann DM, Peruzzotti-Jametti L, Schlechter J, Bernstock JD, Doeppner TR, Pluchino S. Neural precursor cells in the ischemic brain - integration, cellular crosstalk and consequences for stroke recovery. *Front Cell Neurosci* 2014 Sep 16;8:291

Smith JA, Leonardi T, Huang B, Iraci N, Vega B, Pluchino S. Extracellular vesicles (and their synthetic analogues) in aging and age-associated brain diseases. *Biogerontology.* 2015 Apr;16(2):147-85

Peruzzotti-Jametti L, Donegá M, Giusto E, Mallucci G, Marchetti B, Pluchino S. The role of immune system in central nervous system plasticity after acute injuries. *Neuroscience* 2014 Dec 26;283C:210-221

Donegà M, Giusto E, Cossetti C, Schaeffer J and Pluchino S. Systemic injection of neural stem/progenitor cells in mice with chronic EAE. *J Vis Exp* 2014 Apr 15;(86)

L'Episcopo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, Serapide MF, Pluchino S, Marchetti B. Wnt/ - catenin signalling is required to rescue midbrain dopaminergic progenitors and restore nigrostriatal plasticity in ageing mouse model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2014 Aug;32(8):2147-63

L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Morale MC, Serapide MF, Pluchino S, Marchetti B. Targeting Wnt signaling at the neuroimmune interface in dopaminergic neuroreprotection/repair in Parkinson's disease. *J Mol Cell Biol* 2014 Feb;6(1):13-26

Hill AF, Pegtel DM, Lambertz U, Leonardi T, O'Driscoll L, Pluchino S, Ter-Ovanesyan D, Nolte-'t Hoen ENM. ISEV Position Paper: Extracellular Vesicle RNA analysis and bioinformatics. *J Extracell Vesicles* 2013 Dec 23; 2. doi: 10.3402/jev.v2i0.22859

Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A and Pluchino S. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie* 2013; 95(12): 2271-85 *invited review article

Pluchino S and Cossetti C. How stem cells speak with host immune cells in inflammatory brain diseases.*GLIA* 2013; 61(9): 1379 401 *invited review article and cover image

Marchetti B, L'Episcopo F, Morale MC, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Serapide MF and S Pluchino. Uncovering Novel Actors in Astrocyte-Neuron Crosstalk in Parkinson's Disease: the Wnt/ -Catenin Signaling Cascade as Common Final Pathway for Neuroprotection and Self-Repair. *Eur J Neurosci.* 2013 37(10): 1550-63 *invited review article

L'Episcopo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, Impagnatiello F, Pluchino S, Marchetti B. Aging-Induced Nrf2-ARE Pathway Disruption in the Subventricular Zone Drives Neurogenic Impairment in Parkinsonian Mice via PI3K-Wnt/ -Catenin Dysregulation. *J Neurosci* 2013; 33(4): 1462-148

Marchetti B, Pluchino S. Wnt your brain be inflamed? Yes, it Wnt! *Trends Mol Med* 2013 Mar;19(3):144-56

Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabrielsson S, Gho YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Krämer-Albers EM, Lim SK, Llorente A, Lötvall J, Marcilla A, Mincheva-Nilsson L, Nazarenko I, Nieuwland R, Nolte-'t Hoen EN, Pandey A, Patel T, Piper MG, Pluchino S, Prasad TS, Rajendran L, Raposo G, Record M, Reid GE, Sánchez-Madrid F, Schiffelers RM, Siljander P, Stensballe A, Stoorvogel W, Taylor D, Thery C, Valadi H, van Balkom BW, Vázquez J, Vidal M, Wauben MH, Yáñez-Mó M, Zoeller M, Mathivanan S. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012; 10(12): e1001450

Cossetti C, Alfaro-Cervello C, Donegà M, Tyzack G, Pluchino S. New perspectives of tissue remodeling with neural stem and progenitor cell-based therapies. *Cell Tissue Res*. 2012; 349(1): 321-9

L'Episcopo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, Deleidi M, Serapide MF, Pluchino S, Marchetti B. Plasticity of subventricular zone neuroprogenitors in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine) mouse model of Parkinson's disease involves cross talk between inflammatory and Wnt/ -catenin signaling pathways: functional consequences for neuroprotection and repair. *J Neurosci*. 2012; 32(6): 2062-85

Cusimano M, Biziato D, Brambilla E, Donegà M, Alfaro-Cervello C, Snider S, Salani G, Pucci F, Comi G, Garcia-Verdugo JM, De Palma M, Martino G, Pluchino S. Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord. *Brain*. 2012; 135(Pt 2): 447-60

Cossetti C, Smith JA, Iraci N, Leonardi T, Alfaro-Cervello C, Pluchino S. Extracellular membrane vesicles and immune regulation in the brain. *Front Physiol*. 2012; 3: 117

Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M. Brain regeneration in physiology and pathology: the immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. *Physiol Rev*. 2011; 91(4): 1281-304

L'episcopo F, Serapide MF, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, Pluchino S, Marchetti B. A Wnt1 regulated Frizzled-1/ -Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutical relevance for neuron survival and neuroprotection. *Mol Neurodegener*. 2011; 6: 49

L'Episcopo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, Cossetti C, D'Adamo P, Zardini E, Andreoni L, Ihekwaba AE, Serra PA, Franciotta D, Martino G, Pluchino S, Marchetti B. Reactive astrocytes and Wnt/ - catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2011; 41(2): 508-27

Iraci N, Cossetti C, Mercer T, Leonardi T, Alpi E, Drago D, Alfaro-cervello C, Saini H, Davis M, Schaeffer J, et al. Extracellular vesicles from neural stem cells transfer the IFN-gamma/IFNGR1 complex to activate Stat1-dependent signalling in target cells. Journal of Neuroimmunology. 275: 190-191. 15 Oct 2014

Peruzzotti-jametti L, Mallucci G, Tannahill G, Huang B, Lakes YB, Giusto E, Donega M, Balzarotti B, Edenhofer F, Pluchino S. Injection of next-generation directly-induced neural stem cells (iNSCs) induces recovery in a mouse model of multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology. 275: 193-193. 15 Oct 2014

Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Lakes YB, Giusto E, Donega M, Compston A, Edenhofer F, Pluchino S. Transplantation of next generation directly-induced neural stem cells (iNSCs) in mice with experimental multiple sclerosis. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY. 21: 755-755. May 2014

Pluchino S. How stem cells speak with immune cells. GLIA. 61: S13-S13. Jul 2013

Cossetti C, Mercer TR, Alpi E, Leonardi T, Drago D, Iraci N, Alfaro-Cervello C, Dinger ME, Dietmann S, Crawford J, et al. Neural stem cells sort protein and RNA cargoes for export with exosomes in response to inflammation. Journal of Neuroimmunology. 253: 127-127. 15 Dec 2012

Leonardi T, Cossetti C, Iraci N, Mercer T, Mattick J, Pluchino S. The inflammatory fingerprint of Neural Stem Cells. Journal of Neuroimmunology. 253: 158-159. 15 Dec 2012

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 3 anni e l'ammontare di 105.000 €

Cristina Agresti
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI:
Caterina Veroni, Barbara Rosicarelli, Barbara Serafini, Francesca Aloisi

Studio del ruolo dei recettori del TNF durante i processi di demielinizzazione e rimielinizzazione

PREMESSE E OBIETTIVI

Il Fattore di Necrosi Tumorale (TNF) è un importante mediatore della risposta immunitaria ed è stato implicato nella fisiopatologia di malattie infiammatorie acute e croniche, inclusa la sclerosi multipla (SM). Il TNF agisce attraverso due recettori distinti: il recettore 1 del TNF (TNFR1), che media le attività pro-infiammatorie del TNF, e il TNFR2, che è coinvolto nei processi neuroprotettivi e rimielinizzanti. Il duplice ruolo del TNF potrebbe spiegare il peggioramento della malattia in persone con sclerosi multipla sottoposte ad una terapia che blocca il TNF in maniera non selettiva e ha stimolato lo sviluppo di composti che inibiscono o stimolano in maniera specifica i singoli recettori del TNF. Nonostante la validità di questo potenziale approccio terapeutico sia stata recentemente dimostrata in modelli sperimentali di SM, la regolazione e la funzione di TNFR1 e TNFR2 nelle cellule del sistema nervoso centrale (SNC) in risposta ad un danno non è stata ancora studiata. In uno studio precedente finanziato da FISM abbiamo dimostrato che in cellule della microglia in coltura l'espressione di TNFR2 aumenta in risposta a differenti stimoli pro-infiammatori e che il TNF, attraverso la stimolazione del TNFR2, induce l'espressione di molecole con attività anti-infiammatoria e neuroprotettiva. Al fine di comprendere se la microglia possa essere uno dei bersagli cellulari dei composti in grado di bloccare o attivare selettivamente uno dei due recettori del TNF, abbiamo valutato l'espressione di TNFR1, TNFR2 e molecole di origine macrofagica/microgliale con attività pro- o anti-infiammatoria in un modello *ex vivo* di demielinizzazione e rimielinizzazione del SNC e in tessuto cerebrale post-mortem di pazienti affetti da SM, ottenuto da "UK Multiple Sclerosis Tissue Bank".

RISULTATI

i) Esperimenti effettuati su fettine organotipiche di cervelletto di topo hanno dimostrato che in seguito a demielinizzazione indotta da lisolecitina, l'espressione del gene e della proteina di TNFR2, ma non di TNFR1, viene significativamente stimolata. L'elevata espressione di TNFR2 unitamente a quella di molecole che definiscono un fenotipo prevalentemente anti-infiammatorio della microglia (fenotipo M2), come IL10, arginasi-1, G-CSF e adrenomedullina, persiste anche durante la fase di rimielinizzazione. In questo modello *ex-vivo*, l'attivazione di TNFR2 tramite un anticorpo agonista selettivo è in grado di stimolare il differenziamento degli oligodendrociti e indurre ulteriormente l'espressione delle molecole sopra menzionate.
ii) Studi di immunoistochimica in sezioni di tessuto cerebrale di pazienti affetti da SM hanno rivelato una elevata espressione di TNFR2 nella microglia attivata in aree della sostanza bianca con mielina preservata, e in macrofagi fagocitanti mielina in lesioni acute della sostanza bianca. Combinando tecniche di microdissezione laser con tecniche di RT-PCR quantitativa, sono stati determinati livelli significativamente più elevati di trascritti di TNFR2, ma non di TNFR1, unitamente a quelli dei marcatori di microglia/macrofagi, quali CD68, MHC di classe II e TREM2, in entrambe le aree intraparenchimali rispetto alla sostanza bianca non patologica. L'analisi statistica ha rivelato una forte correlazione tra i trascritti di TNFR2 e quelli di CD68, MHC di classe II e TREM2, sostenendo il coinvolgimento di questo recettore nella risposta funzionale di microglia e macrofagi. Tra i diversi geni pro- e anti-infiammatori analizzati, l'espressione di IL10 risulta significativamente aumentata nelle lesioni acute, mentre un aumento del segnale per IL1-beta è sta-

to trovato sia nelle lesioni acute che nella sostanza bianca preservata ma con diffusa attivazione microgliale.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio dimostrano che l'attivazione di TNFR2 è coinvolta nella risposta neuroprotettiva/anti-infiammatoria della microglia in seguito a demielinizzazione. Questi risultati possono aiutare a comprendere il meccanismo di azione delle nuove terapie che hanno come bersaglio il sistema TNF/TNFR con lo scopo di promuovere la componente pro-rimielinizzante e neuroprotettiva dell'infiammazione.

Studies on TNF receptor signalling during demyelination and remyelination

INTRODUCTION AND AIMS

Tumor necrosis factor (TNF) is a key mediator of the immune response and has been implicated in the pathophysiology of acute and chronic inflammatory diseases, including multiple sclerosis (MS). TNF acts through two distinct receptors: TNF receptor 1 (TNFR1), which mediates the pro-inflammatory activities of TNF, and TNFR2, which has been involved in neuroprotective and remyelinating processes. The dual role of TNF could explain the disease-activating effect of non-selective anti-TNF therapy in MS patients and has stimulated the development of compounds that specifically inhibit or stimulate individual TNFRs. Although the validity of this potentially therapeutic approach has been recently verified in MS-like disease models, the regulation and function of TNFR1 and TNFR2 in specific central nervous system (CNS) cell types in response to injury has not been investigated yet. In a previous study funded by FISM, we demonstrated that cultured microglia up-regulate TNFR2 expression in response to different pro-inflammatory stimuli and that TNF/TNFR2 signaling controls the microglial expression of molecules with anti-inflammatory and neuroprotective function. To verify whether microglia could be one of the cellular targets for TNFR selective compounds, we assessed the expression of TNFR1 and TNFR2 together with that of pro- and anti-inflammatory/neuroprotective molecules in an *ex vivo* model of CNS demyelination/remyelination and in post-mortem brain tissue of MS patients supplied by the UK Multiple Sclerosis Tissue Bank.

RESULTS

i) Experiments in organotypic mouse cerebellar slices showed that TNFR2, but not TNFR1, transcript and protein are markedly up-regulated following lysolecithin-induced demyelination. High expression of TNFR2 persisted also during the remyelination phase, together with that of molecules, such as IL10, arginase-1, G-CSF and adrenomedullin, that mediate the anti-inflammatory/neuroprotective functions of microglia (M2 phenotype). In this *ex-vivo* model, activation of TNFR2 with a selective agonistic antibody promoted oligodendrocyte differentiation and enhanced further the expression of the above mentioned molecules.
ii) Immunohistochemical studies in MS brain sections revealed high expression of TNFR2 in activated ramified microglia in white matter areas with preserved myelin and in foamy macrophages in actively demyelinating white matter lesions. By combining laser capture microdissection with real time RT-PCR, significantly higher levels of TNFR2, but not TNFR1 transcripts, and of the microglia/macrophage markers CD68, MHC class II and TREM2, were detected in both intraparenchymal areas compared to the non-pathological white matter. Statistical analysis revealed a strong correlation between TNFR2 and CD68, MHC class II and TREM2 transcripts, supporting the involvement of this receptor in the functional response of microglia/macrophages. Among several pro- and anti-inflammatory genes analyzed, IL10 was markedly upregulated in actively demyelinating lesions, while an increase in IL1-beta was found in both acute lesions and myelinated white matter with widespread microglia activation.

CONCLUSIONS

Taken together these data demonstrate that TNFR2 activation is involved in the anti-inflammatory/neu-

roprotective response of microglia during demyelination and remyelination. This knowledge may help understand the mechanism of action of new therapies that target the TNF/TNFR system with the aim to promote the pro-remyelinating and neuroprotective components of inflammation.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Veroni C, Eleuteri C, Rosicarelli B, Serafini B, Aloisi F, Agresti C. Regulation of tumor necrosis factor receptors during demyelination and remyelination. 29th Congress of the European Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) and the 18th Annual Conference of Rehabilitation in MS (RIMS) in Copenhagen, Denmark, 2– 5 October, 2013

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per un periodo di 2 anni (prorogato di 2 mesi) e l'ammontare di 117.600 €

Antonio Uccelli

Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica, e Scienze Materno-Infantile, (DINOGMI) - Università degli Studi di Genova, Genova

COLLABORATORI:
Giovanni Ferrara, Sara Morando, Simona Casazza

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Roberto Furlan, Unità di Neuroimmunologia Clinica - Dibit- Istituto Scientifico San Raffaele, Milano
Caterina Bendotti, Dipartimento Neuroscienze, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano
Daniela Virgintino, Dipartimento di Anatomia Umana e Istologia, Università degli Studi di Bari, Bari
Roberto Perris, Dipartimento di Anatomia e Biologia Cellulare, COMT – Centro Molecolare e Traslazionale di Oncologia, Università degli Studi di Parma, Parma

Studio di un modello murino transgenico per la caratterizzazione del proteoglicano NG2/CSPG4 nella patogenesi della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cellule che formano la mielina, i precursori degli oligodendrociti (OPC) e i periciti, cellule coinvolte nella organizzazione della unità neuro-vascolare (UNV), condividono l'espressione di Nerve/glial antigen 2 (NG2), una molecole espressa sulla membrana cellulare. Poiché, le OPC sono indicate come cruciali nei fenomeni di riemielinizzazione e sono attive prevalentemente nelle fasi iniziali della sclerosi multipla (SM) e i periciti sono coinvolti nel mantenimento dell'integrità strutturale della barriera ematoencefalica (BEE) e nel controllo dell'extravasazione delle cellule immunitarie nel sistema nervoso centrale (SNC), noi abbiamo ipotizzato che NG2 potesse essere coinvolto nei meccanismi patogenetici della malattia.
Lo scopo del progetto è quello di esplorare il ruolo di NG2 nello sviluppo della patologia. Pertanto ci siamo proposti di studiare il modello murino di SM, l'Encefalomielite Sperimentale Autoimmune (ESA), indotta in topi geneticamente modificati che non esprimono NG2 (NG2KO) e abbiamo caratterizzato gli aspetti immunitari e gli aspetti generali del SNC. Al fine di analizzare il ruolo di NG2 nella patogenesi dell'ESA, abbiamo caratterizzato i meccanismi attraverso i quali la mancanza di NG2 modifichi il decorso dell'ESA, in particolare i nostri obiettivi erano: indagare la cito-architettura del SNC in topi NG2KO sani e affetti da ESA, concentrandosi in particolare sulla BEE e sulle OPC; valutare il ruolo di NG2 nella risposta immunitaria nei topi NG2KO sani e affetti da ESA.

RISULTATI

I nostri esperimenti hanno dato prova che i topi NG2KO, in cui è stata indotta l'ESA, sviluppano una sintomatologia clinica meno aggressiva rispetto ai topi di controllo, con parametri infiammatori del SNC e danni a carico della mielina ridotti. In termini numerici in condizioni fisiologiche, il numero di OPC tra il topo NG2KO e quello di controllo non differisce, mentre il forte calo apprezzato nei topi controllo affetti da ESA non si è verificato nei topi NG2KO affetti da ESA.
Durante l'ESA nei topi di controllo, la BEE viene a modificarsi; in modo inaspettato, invece, la BEE del topo NG2KO è risultata essere modificata sia nei topi sani che affetti da ESA, in particolare durante le fasi di malattia la BEE del topo NG2KO risulta essere riorganizzata come in un topo sano di control-

lo. Inoltre, abbiamo dimostrato che la BEE, nel topo NG2KO affetto da ESA, modificata strutturalmente assolve alla propria funzione di barriera. Questo, almeno in parte, potrebbe riflettere il grado minore di infiltrazione e infiammazione visto nel SNC dei topi NG2KO affetti da ESA. Abbiamo dimostrato per la prima volta che, in aggiunta ai macrofagi e le cellule dendritiche (DC), NG2 è espresso anche sui linfociti T del topo di controllo. Pertanto, la mancanza di espressione di NG2 potrebbe alterare alcune funzioni delle cellule immunitarie e quindi modificare il decorso dell'ESA nei topi NG2KO. Le cellule dendritiche attivate del topo NG2KO hanno mostrato una minore produzione IL-12, una citochina chiave per l'inizio della risposta immunitaria. Al contrario, la mancanza di NG2 sui macrofagi non ha influenzato il loro stato di attivazione, come dimostrato dall'analisi di alcuni marcatori specifici. Abbiamo invece dimostrato che la mancanza di NG2 sui linfociti T è principalmente associata ad un aumento di produzione di IL-4 e IL-10 e diminuzione della produzione di IFNγ, suggerendo che i linfociti T del topo NG2KO possano avere un profilo pro-infiammatorio minore.
Per analizzare il ruolo di NG2 nella complessa interazione tra il SNC e le cellule immunitarie durante ESA, abbiamo eseguito esperimenti sui topi chimerici, ossia topi in cui il SNC esprime NG2 ma il sistema immunitario no e viceversa. Abbiamo dimostrato che l'assenza di NG2 nel sistema immunitario riflette una sintomatologia clinica più mite rispetto a quando il sistema immunitario esprime NG2, suggerendo quindi un ruolo cruciale di NG2 nel sistema immunitario.

CONCLUSIONI

Il modello animale di SM, ESA è una malattia infiammatoria autoimmune del SNC caratterizzata da una risposta cellulo-mediata di tipo Th1, e l'antigene chiave di malattia viene presentato dalle cellule dendritiche ai linfociti T naive. Una delle molecola più importanti prodotta dalle cellule dendritiche in grado di indirizzare una risposta Th1, è IL-12. Infatti, topi geneticamente modificati che non sono in grado di produrre IL-12 non sviluppano l'ESA, in quanto non sono in grado di evocare una risposta cellulo-mediata di tipo Th1. Pertanto questo meccanismo è cruciale in qualsiasi risposta immunitaria sia nell'ESA, sia in persone con SM.
I nostri risultati, hanno evidenziato che le cellule dendritiche del topo NG2KO, rispetto al topo di controllo, producono livelli ridotti di IL-12, che potrebbero condizionare una minore risposta cellulo-mediata di tipo Th1; inoltre, i linfociti T del topo NG2KO producono livelli aumentati di IL-4 e IL-10 e diminuiti di IFNγ rispetto al topo di controllo. Sulla base dei nostri risultati, suggeriamo che NG2 potrebbe essere parte di un nuovo meccanismo patogenetico e che i sintomi clinici minori dell'ESA riscontrati nel topo NG2KO potrebbero essere interpretati come una minore risposta autoimmunitaria in combinazione con un BEE rinforzata e una maggiore presenze di OPC nel SNC del topo NG2KO.

Exploitation of a transgenic mouse model for the unveiling of the role of proteoglycan NG2/CSPG4 in the pathogenesis of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Nerve/glial antigen 2 (NG2) is a chondroitin sulphate proteoglycan with a large extracellular domain and a short cytoplasmic tail, expressed in a class of cells throughout the developing and adult central nervous system (CNS). In particular, it is expressed predominantly in oligodendrocyte precursor cells (OPC) that serve as the primary source of remyelinating cells in demyelinated lesions, and on pericytes, components of the blood-brain barrier (BBB) that are implicated in the maintenance of its integrity and are likely involved in extravasation of inflammatory cells. Because NG2 expressing OPC have been involved in remyelination occurring after CNS damage and pericytes are implied in the integrity of the blood brain barrier (BBB) which limits CNS infiltration of immune cells, we have hypothesized that the lack of NG2 could influence the outcome of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), a mouse model of MS, possibly impacting in the homing of immune cells into the CNS and the process of demyelination and remyelination. Thus,

this project was aimed to investigate the role of NG2 in the development and progression of EAE through the utilization of the transgenic NG2KO mouse model. In order to dissect the role of NG2 in EAE pathogenesis we addressed the mechanisms through which the lack of this molecule protects mice from EAE and our objectives were: investigate the cytoarchitecture of NG2KO CNS in naïve and EAE-affected mice at the histological level, focusing on the BBB and myelin formation; evaluate the role of NG2 in the immune response in naïve and EAE-affected mice; dissect the different roles of NG2-expressing cells in EAE pathogenesis.

RESULTS

We have demonstrated that NG2KO mice develop milder EAE than their wild-type (WT) counterparts, with reduced inflammation and demyelination. While the number of OPC do not differ between NG2KO and WT mice in physiological conditions, the sharp decrease seen in WT mice affected with EAE did not occur in NG2KO mice, suggesting reduced OPC death in these mice. The BBB was altered in both healthy and EAE affected NG2KO mice, with re-arrangement of brain and spinal cord microvessel molecules and a reversal to the healthy WT profile in EAE-affected NG2KO mice. Interestingly, the BBB was not leaky in naïve or EAE affected NG2KO mice, which might reflect the lower extent of infiltration and inflammation seen in the CNS of the diseased mice. At the immune cell level, we show for the first time that, in addition to macrophages and dendritic cells (DCs), NG2 is also expressed on T cells in naïve WT mice. Thus, lack of NG2 expression might impair some immune cell functions, hence accounting for the milder EAE in NG2KO mice. Activated dendritic cells from NG2KO mice showed impaired production of IL-12, a key cytokine in the antigen presentation process, at mRNA and protein levels. In contrast, the lack of NG2 on NG2KO macrophages did not affect their phenotypic status, as shown by analysis of specific markers upon in vitro M1/M2 polarization of NG2KO. We showed that the lack of NG2 on T cells is associated mainly with a high increase in IL-4 and IL-10 expression after MOG challenge, and decrease in IFNγ expression, suggesting NG2KO T cells have a less pro-inflammatory profile. To analyze the role of NG2 in the complex interplay between CNS and immune cells in EAE, we have performed chimera experiments which have showed milder EAE upon reconstitution of WT mice with NG2KO immune cells, suggesting a role for NG2 in immune cell function.

CONCLUSIONS

EAE is a Th1 cell-mediated, inflammatory disease of the CNS, and the key antigen presenting cells that trigger the activation of naïve T cells efficiently are the DCs. The main cytokine inducer of Th1 differentiation is IL-12 produced by DC and mice knockout for IL-12 are not susceptible to EAE, as they are incapable of eliciting a Th1 autoimmune response. So impairment of IL-12 expression plays a relevant role in tolerance during the autoimmune response in EAE and in MS also. In this project, we demonstrated that DCs from NG2KO mice produce reduced levels of IL-12, which could affect the polarizing signal for naïve T cells toward Th1; accordingly, the lack of NG2 on T cells is associated with an increase in IL-4 and IL-10 production and decrease in IFNγ expression of these cells. So we suggest that the NG2 could be a new actor of a pathogenic mechanism and milder EAE upon active induction of NG2KO immune cells results from a decreased autoimmune response, in combination with a reinforced BBB and reduced OPC death in NG2KO mice.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Ferrara G, Morando S, Girolamo F, Errede M, Boldrin V, Casazza S, Panini N, Erba E, Perris NR, Furlan R, Bendotti C, de Rosbo K, Virgintino D, Uccelli A. Lack of NG2 expression on immune cells skews the immune response towards a less proinflammatory profile, resulting in milder EAE in NG2KO mice. *Manuscript in preparation*

Ferrara G, Morando S, Girolamo F, Errede M, Boldrin V, Casazza S, Panini N, Erba E, Perris NR, Garzetti L, Furlan R, Bendotti C, de Rosbo K, Virgintino D, Uccelli A. Lack of NG2 expression on immune cells and oligodendrocytes progenitor cells modulates EAE phenotype. 12th International Congress of Neuroimmunology, Mainz 9-13 November 2014

Ferrara G, Morando S, Girolamo F, Errede M, Boldrin V, Casazza S, Perris NR,. Furlan R, Bendotti C, de Rosbo K, Virgintino D, Uccelli A. Possible role of nerve-glial antigen 2 (NG2) in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. 15th World's Congress of Immunology (ICI), Milano 22-27 Agosto 2013

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per un periodo di 1 anno (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 30.000 €

Letizia Leocani
INSPE-Istituto Neurologia Sperimentale, Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI:
Roberto Furlan, Annamaria Finardi, Roberto Santangelo, Valerio Castoldi, Loris Camaleonti, Gianvito Martino, Giancarlo Comi

Stimolazione cerebrale transcranica a corrente diretta come terapia immunomodulante nella SM: studio pilota in modelli murini

PREMESSE E OBIETTIVI

La stimolazione transcranica a corrente diretta (tDCS) è una metodica di neuromodulazione non invasiva con effetti immunomodulanti riportati in modelli preclinici di malattie neurologiche. Questa tecnica non invasiva è basata sull'applicazione di una corrente elettrica costante di debole intensità e può essere utilizzata in ambito clinico, in quanto sicura e indolore. Lo scopo del presente progetto è stato valutare gli effetti della tDCS nel modello murino di SM (EAE).

RISULTATI

Abbiamo applicato la tDCS su un totale di 40 topi con EAE suddivisi in 4 gruppi da 10 ciascuno: stimolazione catodica, anodica, *sham* (solo anestesia), più un gruppo aggiuntivo di 10 animali che sono stati unicamente sottoposti a immunizzazione e valutazione del punteggio di gravità clinica, al fine di verificare che la nostra procedura non avesse un impatto negativo sullo sviluppo della EAE. Il punteggio clinico nei topi EAE è stato calcolato fino a 26 giorni dopo l'immunizzazione. L'esperimento è stato suddiviso in due sotto-esperimenti da 20 soggetti ciascuno. Anche se entrambi i gruppi di stimolazione t-DCS hanno mostrato uno punteggio di malattia tendenzialmente più basso rispetto al gruppo *sham*, quest'ultimo con decorso di malattia tendenzialmente più grave del gruppo di controllo, differenze significative rispetto al gruppo *sham* sono state osservate esclusivamente per il gruppo con t-DCS catodica, con un ritardo nell'esordio di malattia ($p=0.0077$ log rank, curva di Kaplan Meyer) e un punteggio di gravità di malattia più basso al giorno 4 dopo l'esordio nel gruppo sham, corrispondente circa al picco di malattia di quest'ultimo ($p=0.0014$; t di student per dati non appaiati).

CONCLUSIONI

Questi risultati promettenti suggeriscono l'opportunità di esplorare ulteriormente l'utilità della tDCS catodica nel ritardare e ridurre la gravità del danno cerebrale autoimmune, come nel caso di persone con SM attiva, con possibili ricadute terapeutiche.

Brain tDCS as a disease-modifying treatment of MS: a pilot study in mice models

INTRODUCTION AND AIMS

Promising immunomodulatory effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) have been reported in preclinical models of neurological diseases. This non-invasive technique is based on the application of a weak, constant direct current to the scalp via two electrodes and can be applied in the clinical setting, being safe and painless. The aim of the present project was to explore the effects of tDCS in the EAE mouse model of MS.

RESULTS

We performed tDCS on a total of 40 mice with the experimental model of MS (EAE) subdivided in 4 groups of 10 subjects each: cathodal, anodal, sham (anesthesia only) stimulation, plus an extra group of 10 animals just undergoing EAE immunization and scoring, to verify that our experimental procedure did not negatively impact on the development of EAE. Clinical EAE scoring was quantified up to 26 days post injection. The experiment was subdivided into two sub-experiments involving 20 animals each. Although both tDCS stimulation groups showed a tendency towards lower EAE score compared with the sham group, the latter with a tendency to a more severe disease compared with the control group, significance on early EAE scores and on EAE onset was found for cathodal tDCS only, being associated with a delay in EAE onset with respect to sham ($p=0.0077$ log rank; kaplan-meyer curve) and a lower EAE score at day 4 post EAE onset, around the disease peak in the sham group (cathodal vs sham: $p=0.0014$; unpaired t).

CONCLUSIONS

These results are promising towards further exploration of the use of cathodal tDCS in reducing brain inflammatory activity after induction of autoimmune brain disease, such as the case of active MS, with a strong therapeutic impact (Proximity to cure).

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €

Loretta Tuosto
Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin, Sapienza Università di Roma, Roma

COLLABORATORI:
Enza Piccolella, Cristina Camperio, Michela Muscolini, Silvana Caristi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Marco Salvetti, Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso, Ospedale Sant'Andrea, Sapienza Università di Roma, Roma
Claudio Gasperini, U.O. Neurologia, Ospedale San Camillo, Roma
Luca Battistini, Laboratorio di Neuroimmunologia, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

Caratterizzazione delle vie di segnalazione del CD28 come bersagli terapeutici nella regolazione della tolleranza immunologica nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie gioca un ruolo fondamentale nella fisiopatologia della sclerosi multipla (SM) compromettendo l'integrità della barriera emato-encefalica, reclutando cellule immunitarie dalla periferia e contribuendo all'attivazione della microglia. Sebbene diverse cellule all'interno del sistema nervoso centrale possono contribuire alla produzione di citochine e chemochine, i linfociti T autoreattivi hanno un ruolo fondamentale nella demielinizzazione infiammatoria. Diversi farmaci terapeutici utilizzati come prima linea di trattamento della SM, come IFN-beta o glatiramer acetato, esercitano alcuni effetti sui linfociti T autoreattivi, ma spesso non riescono a mostrare sufficiente efficacia clinica e sono poco attivi nelle fasi progressive della malattia. Inoltre, la maggior parte delle attuali strategie terapeutiche è finalizzata all'inibizione dei segnali attivati dal recettore T per l'antigene (TCR), compromettendo così la capacità dei linfociti T di combattere le infezioni e/o di controllare lo sviluppo tumorale. Così, l'identificazione di molecole stimolatorie e delle vie di segnalazione associate, diverse dal TCR, che possano contribuire al fenotipo infiammatorio dei linfociti T periferici in pazienti con SM, può essere utile per lo sviluppo di nuove terapie immunosoppressive non antigene-specifiche.
Il CD28 può essere considerato uno dei più importanti recettori costimolatori necessari per la completa attivazione dei linfociti T. Inoltre, il CD28 è anche in grado di regolare la produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie e lo sviluppo e l'omeostasi delle cellule T regolatorie (Treg) con attività soppressiva.
L'obiettivo principale del nostro progetto è stato quello di individuare le vie di segnalazione attivate dal CD28, sia nei linfociti T sia nelle cellule Treg in pazienti con SM, la cui inibizione può spegnere la risposta infiammatoria dei linfociti T e ripristinare la tolleranza immunologica.
In particolare, gli obiettivi specifici del nostro lavoro sono stati quelli di:
- caratterizzare il ruolo della fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K) nelle vie di segnalazione del CD28 che regola l'espressione genica di citochine e chemochine pro-infiammatorie nei linfociti T $CD4^+$;
- caratterizzare le vie di segnalazione PI3K-dipendenti e i bersagli indotti dalla stimolazione del CD28 nei linfociti T $CD4^+$ isolati da pazienti affetti da SM;
- valutare il ruolo del CD28 e della PI3K nelle cellule Treg isolate da pazienti affetti da SM.

RISULTATI

In questo studio, abbiamo valutato il contributo del CD28 nella regolazione delle risposte pro-infiammatorie nella SM recidivante-remittente (SMRR) e abbiamo esaminato le differenze qualitative e/o quantitative tra persone con SMRR e soggetti sani (HD). A tal fine, sono stati arruolati 20 pazienti SMRR, identificati clinicamente secondo i criteri di McDonald, e 10 donatori sani. Abbiamo confrontato il livello di espressione genica e secrezione di citochine e

chemochine pro-infiammatorie nei linfociti T CD4+ isolati dal sangue periferico di pazienti e HD. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la stimolazione del CD28 aumentava fortemente e selettivamente l'espressione di diverse citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-8, IL-21, IL17A) nei linfociti T di pazienti SMRR stabili, rispetto agli HD. È interessante notare che le citochine selettivamente indotte dal CD28 nei linfociti T delle persone SMRR, ma non HD, (IL-6, IL-21 e IL-17A) erano specifiche per il fenotipo delle cellule Th17 e corrispondevano a quelle i cui livelli sono più alti nella SMRR durante le riacutizzazioni o ricadute.
Utilizzando farmaci inibitori selettivi, abbiamo scoperto che il blocco della PI3K di classe 1 inibiva significativamente l'espressione genica di tutte le citochine prodotte. Questi dati suggeriscono fortemente che il complesso CD28/PI3K può regolare quantitativamente e qualitativamente i profili di citochine prodotte dai linfociti T pro-infiammatori in base allo stato fisiopatologico e alla fase della malattia, favorendo così la progressione della malattia stessa.
Per quanto riguarda il ruolo del CD28 nella regolazione delle cellule Treg, nessuna differenza significativa è stata osservata tra SMRR e HD, quindi non abbiamo esplorato ulteriormente questo aspetto.

CONCLUSIONI

I nostri risultati sugli effetti esercitati dagli inibitori della PI3K di classe 1 sulle risposte pro-infiammatorie indotte dalla stimolazione del CD28, suggeriscono la PI3K come valido candidato terapeutico per la SM da testare su un gruppo più ampio di persone con SMRR e anche nelle fasi progressive della malattia. Inoltre, la disponibilità di inibitori di PI3K di classe 1 attivi in forma orale, alcuni dei quali sono attualmente utilizzati in studi clinici per la terapia del cancro, infiammazione e malattia coronarica (ClinicalTrials.Gov, NIH), può anche aggirare gli effetti collaterali (ad esempio l'indurimento della pelle e la lipoatrofia) relativi all'infusione o all'iniezione e può mostrare maggiore aderenza e persistenza a lungo termine.

Characterization of CD28 signalling pathways as therapeutic targets to regulate immune tolerance in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Inflammation is present at all stages of MS and pro-inflammatory cytokine/chemokines play a critical role in the pathophysiology of MS by compromising the blood-brain barrier integrity, recruiting immune cells from the periphery, and activating resident microglia. Although several cells within the central nervous system may contribute to the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, activated autoreactive T cells have a pivotal role in inflammatory demyelination. Several therapeutic drugs used for the first-line treatment of MS, i.e. IFN-beta or galtiramer acetate, exert some effects on self-reactive T lymphocytes, but often fail to exhibit sufficient clinical effectiveness and have very little effects in progressive phases of the disease. Furthermore, most of the current therapeutic strategies focus on the inhibition of TCR-activating signals, thus compromising the ability of T cells to fight infections and/or to control cancer. Thus, the identification of stimulatory molecules and associated signalling pathways different from TCR, which may contribute to the inflammatory phenotype of peripheral T cells in MS patients, may be useful for the development of new antigen non-specific immunosuppressive therapies.
CD28 may be considered one of the most important costimulatory receptor necessary for full T cell activation and for regulating pro-inflammatory cytokine/chemokine production as well as the development and homeostasis of suppressive regulatory T cells (Treg).
The main objective of our project was the identification of the signalling pathways activated by CD28 in both peripheral T lymphocytes and Treg cells in MS patients to dampen the pathogenic inflammatory T-cell responses and restore immune tolerance.
In particular, the specific aims of our work have been to:
- Characterize the role of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) in CD28 signalling pathways regulating pro-inflammatory cytokine/chemokine expression in CD4+ T lymphocytes
- Characterize the PI3K-dependent signalling path-

ways and targets induced by CD28 stimulation in $CD4^+$ T cells isolated from MS patients.
- Evaluate the role of both CD28 and PI3K on Treg cells isolated from MS patients.

RESULTS

In this study, we evaluated the CD28 contribution to pro-inflammatory responses in relapsing-remitting (RR)MS and examined both qualitative and/or quantitative differences between RRMS patients and healthy donors (HD). To this end, twenty patients with a clinically defined MS according to the McDonald criteria were enrolled and ten HD from buffy coats were used as controls. We compared the extent of pro-inflammatory cytokine/chemokine gene expressions and secretion in $CD4^+$ T cells isolated from the peripheral blood of RRMS patients or HD. We found that CD28 stimulation strongly and selectively up-regulated the expression of several pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IL-21, IL17A) in stable RRMS T lymphocytes compared to HD. Interestingly, the cytokines selectively up-regulated by CD28 in T lymphocytes from RRMS patients but not HD (IL-6, IL-21 and IL-17A) were related to the Th17 cell phenotype and corresponded to those specifically found at higher levels in RRMS patients during exacerbations or undergoing a relapse.
Finally, we analyzed the contribution of class 1 PI3K on CD28-induced cytokine expression and production in T cells from RRMS. By using selective inhibitory drug, we found that the blockage of class 1 PI3K activity significantly downregulated the gene expression of all the cytokine analyzed. These data strongly suggest that CD28/PI3K may differentially regulate the cytokine profiles of pro-inflammatory T lymphocytes both quantitatively and qualitatively depending on the patophysiological status and on phase of the disease and may affect the pro-inflammatory activity of T lymphocytes, thus favouring disease progression.
Concerning the role of CD28 in the regulation of Treg cells, no significant differences were observed between RRMS and HD, thus we did not explored this aspect further.

CONCLUSIONS

Our results on the inhibitory effects exerted by class 1 PI3K inhibitors on the pro-inflammatory responses induced by CD28 stimulation, suggest PI3K as a valid therapeutic candidate for MS to be tested on a larger group of RRMS patients and even in the progressive phases of the disease. Moreover, the availability of oral active forms of class 1 PI3K inhibitors, some of which have entered in clinical trials for cancer therapy, inflammation and coronary heart disease (ClinicalTrials.Gov, NIH), may also circumvent the adverse side effects (e.g. skin indurations and lipoatrophy) related to infusion or injection and may exhibit higher adherence and long-term persistence.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Colasanti T, Vomero M, Alessandri C, Barbati C, Maselli A, Camperio C, Conti F, Tinari A, Carlo-Stella C, Tuosto L, Benincasa D, Valesini G, Malorni W, Pierdominici M, Ortona E. Role of alpha-synuclein in autophagy modulation of primary human T lymphocytes. Cell Death Dis. 2014 May 29;5:e1265

Camperio C, Muscolini M., Volpe E, Di Mitri D, Mechelli R, Buscarinu MC, Ruggieri S, Piccolella E, Salvetti M, Gasperini C, Battistini L, Tuosto L. CD28 ligation in the absence of TCR stimulation up-regulates IL-17A and pro-inflammatory cytokines in relapsing-remitting multiple sclerosis T lymphocytes. Immunol Lett 2014, 158(1-2):134-142

Muscolini M, Camperio C, Capuano C, Caristi S, Piccolella E, Galandrini R, Tuosto L. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase activation critically contributes to CD28-dependent signaling responses. J Immunol. 2013, 190:5279-86

Tuosto L, Muscolini M, Camperio C, Volpe E, Mechelli R, Ruggieri S, Salvetti M, Gasperini C, Battistini L. CD28 individual signals amplify pro-inflammatory cytokine production in relapsing-remitting multiple sclerosis T lymphocytes. Front. Immunol. 2013, doi:10.3389/conf.fimmu.2013.02.00627

Tuosto L, Muscolini M, Camperio C, Caristi S, Capuano C, Piccolella E, Galandrini R. The recruitment and activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases critically regulate CD28-dependent signaling responses. Front. Immunol. 2013, doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00628

Camperio C, Muscolini M, Caristi C, Picolella E, Battistini L, Salvetti M, Gasperini C, Tuosto L. Characterization of CD28 signalling pathways as therapeutic targets to regulate immune tolerance in multiple sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM 2014, 28-29 Maggio 2014

Muscolini M, Camperio C, Caristi C, Piccolella E, Battistini L, Salvetti M, Gasperini C, Tuosto L. Characterization of CD28 signalling pathways as therapeutic targets to regulate immune tolerance in multiple sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM 2013, 29-30 Maggio 2013

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 100.000 €

Annalisa Chiocchetti
Dipartimento Scienza della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara

COLLABORATORI:
Elisabetta Orilieri, Giuseppe Cappellano, Elena Boggio, Maria Felicia Soluri, Nausicaa Clemente, Daniele Sblattero, Casimiro Luca Gigliotti, Cristoforo Comi, Sara Buttini

Ruolo di Osteopontina e anticorpi anti-Osteopontina nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Osteopontina (OPN) è una citochina pro-infiammatoria espressa ad alti livelli nelle placche demielinizzanti di pazienti con sclerosi multipla (SM) e di topi con encefalomielite autoimmune sperimentale (EAS), il modello murino della SM. I topi privi di OPN sviluppano un quadro EAS meno severo rispetto ai topi normali e la somministrazione di OPN a tali topi induce una ricaduta immediata con successiva evoluzione verso la forma progressiva. Ciò suggerisce un ruolo importante di OPN nella genesi e nella evoluzione della SM. OPN è prodotta ad alti livelli nella matrice extracellulare della barriera ematoencefalica: in questa sede potrebbe giocare un ruolo nel reclutamento dei linfociti attraverso il legame con un suo recettore, l'integrina α4β1. Tale recettore è il bersaglio del farmaco natalizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato utilizzato nella terapia della SM. OPN è in grado di legare α4β1 solo dopo aver subito un taglio proteolitico ad opera della Trombina, la quale permette la formazione di due porzioni: l'N-terminale che contiene due siti di legame per α4β1 e la C-terminale che contiene un sito di legame per CD44, recettore coinvolto nell'inibizione dell'apoptosi linfocitaria. È noto che il sistema immunitario produca in alcune condizioni anticorpi neutralizzanti anti-citochina, finalizzati a spegnere la risposta infiammatoria. Anticorpi anti-OPN sono stati rilevati in topi con EAS e il loro titolo aumenta in seguito ad immunizzazione con un vaccino a DNA codificante per OPN, con miglioramento del quadro clinico. Lo scopo di questo progetto era quello di valutare la presenza di anticorpi anti-OPN nella SM e studiare il ruolo di OPN e dei suoi frammenti nell'EAS

A tale scopo abbiamo: ricercato la presenza di anticorpi anti OPN nei pazienti con SM, caratterizzato la porzione di OPN legata e la loro associazione con parametri clinici, valutato il ruolo del frammento N- e C-terminale *in vivo* nell'EAS e valutato l'efficacia del vaccino contro OPN nell'EAS.

RISULTATI

Abbiamo ricercato la presenza di anticorpi anti OPN in150 pazienti con SM e 150 soggetti sani di controllo: i pazienti presentano valori di autoanticorpi significativamente superiori rispetto ai controlli. La forma clinica che presenta i livelli maggiori è la forma SM recidivante-remittente rispetto alle forme progressive (primaria e secondaria). I titoli anticorpali più alti si riscontrano in fase di remissione rispetto a quella di ricaduta. Inoltre, tali anticorpi riconoscono principalmente la porzione C-terminale rispetto a quella N-terminale.
Per valutare il ruolo delle due porzioni di OPN (N- e C-terminale) abbiano somministrato tali molecole a topi con EAS durante la fare di remissione. Soltanto OPN intera oppure OPN-C sono in grado di indurre una ricaduta mentre OPN-N oppure OPN mutata in modo tale da non poter subire il taglio proteolitico in N e C, non sono in grado di indurre un peggioramento dei sintomi. Tali esperimenti suggeriscono che sia la porzione OPN-C quella coinvolta nelle ricadute.
Abbiamo quindi prodotto un vaccino con lo scopo di indurre nell'animale una risposta anticorpale anti-OPN e valutare se questa potesse migliorare il decorso della malattia. Il confronto fra la vaccinazione anti-OPN intera, oppure OPN-N o OPN-C ha mostrato che solo con OPN intera o la porzione C-ter-

minale aumenta il titolo anticorpale anti-OPN indotto dal vaccino. I vaccini sono tutti e tre efficaci nel proteggere dalla malattia, rispetto al topo non vaccinato, ma i topi vaccinati con OPN-C, hanno una remissione più veloce e completa rispetto agli altri due. Infine, abbiamo prodotto un anticorpo diretto verso la porzione C di OPN, da usare come farmaco biologico nell'EAS, per valutarne l'efficacia clinica. L'uso di tale farmaco ha indotto una remissione immediata e quasi completa della malattia.

CONCLUSIONI

Mediante questo studio abbiamo identificato un ruolo patogenetico per una porzione di OPN, la C-terminale, coinvolta nella ricaduta e nella remissione della malattia. Strategie di intervento che mirino a bloccare l'azione della porzione C terminale, quali la vaccinazione oppure l'uso di un farmaco biologico diretto verso questa porzione sembrano, nel modello animale, promettenti come terapia per la SM.

Role of Osteopontin and anti Osteopontin antibodies in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Osteopontin (OPN) is a proinflammatory cytokine present at high levels in demyelinating lesions of multiple sclerosis patients and in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), the mouse model of MS. OPN deficient mice develop milder EAE than wild type animals, their administration of rOPN induce a sudden relapse followed by a progressive severe disease leading to death. These evidences suggest that OPN plays an important role in the pathogenesis and progression of MS. OPN is produced at high levels in the extracellular matrix of the blood-brain-barrier: at this site, it may play a role in lymphocyte recruitment into the MS lesion, by binding one of its receptors, the $\alpha 4\beta 1$ integrin. This receptor is the target of Natalizumab, a humanized monoclonal antibody utilized in the anti-MS therapy. OPN binds to $\alpha 4\beta 1$ integrin only upon cleavage by Thrombin which generates two OPN fragments: the N-terminal, that contains two binding sites for $\alpha 4\beta 1$ integrin, and the C-terminal, that contains a binding site for another receptor, CD44, involved in the inhibition of lymphocyte apoptosis.
To counteract to an inflammatory burst the immune system can produce neutralizing antibodies targeting pro-inflammatory cytokines. AutoAbs to OPN have been detected in EAE and their levels are increased by immunization with a plasmid containing the OPN cDNA showing some therapeutic effects. The general aim of this project was to search for autoAbs to OPN in MS patients and evaluate their role in EAE.
We thus searched for auto-Abs to OPN in MS patients and characterized the portion of OPN they bind, we evaluated the role of N- and C-terminal portions of OPN in EAE and evaluated the effect of a vaccine against OPN in EAE.

RESULTS

We searched for auto-Abs to OPN in 150 MS patients and 150 healthy subjects and found that their levels were significantly higher in patients than in controls. Moreover, their levels were higher in relapsing-remitting patients than in progressive one, and the highest titers were in remission compared to the relapse. These antibodies are mainly directed to the C portion than to the N.
To evaluate the role of the N- and C-terminal portion of OPN in vivo, we administrated them to EAE mice in the remission phase. Only the full-length OPN or the C-terminal fragment are able to induce a relapse, whereas the N-terminal fragment of a mutated full-length OPN, that is non-cleavable from Trombin, have no effect.
We thus produce a protein vaccine, aimed to induce an antibody response against OPN and its fragments during EAE, to evaluate its efficacy in preventing/curing EAE. Only the vaccines against the full length or C-terminal fragment induces high levels of antibodies. The three vaccines reduce the disease score compared to the non-vaccinated mice but only mice vaccinated with the OPN-C fragment display a faster and complete remission. At the end we produced a biologic to OPN-C: the administration of this antibody during EAS induced an immediate and almost complete remission.

CONCLUSIONS

Thanks to this investigation we high lightened a new pathogenetic role for the C-terminal fragment of OPN, that is both involved in the relapse and in the remission of the disease. Therapeutic interventions targeting the C-terminal portion of OPN, such as vaccination or biologics, seem to be, in the animal model, a promising therapy for MS.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 70.000 €

Francesca Boscia
Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

COLLABORATORI:
Antonella Casamassa,Valeria de Rosa

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:
Giuseppe Matarese, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Salerno, Baronissi, Salerno

Studio del ruolo dell'isoforma dello scambiatore Na^+/Ca^{2+} NCX3 nelle cellule oligodendrocitarie per individuare nuove strategie terapeutiche per il controllo della demielinizzazione e rimielinizzazione nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La ricerca di terapie innovative per la sclerosi multipla (SM) è incentrata sull'identificazione di nuovi bersagli farmacologici che siano in grado, quando i neuroni non risultano irreversibilmente danneggiati, di promuovere la rimielinizzazione stimolando le cellule progenitrici degli oligodendrociti (OPC) a formare nuova mielina. Nonostante il cervello adulto possieda la capacità di generare oligodendrociti mielinizzanti, il processo di rimielinizzazione nella SM fallisce o è incompleto e, a tutt'oggi, non sono disponibili terapie neuroprotettive nè rimielinizzanti. Recenti studi suggeriscono che le alterazioni delle concentrazioni intracellulari di calcio svolgono un ruolo fondamentale non solo nei processi di differenziamento degli OPC in oligodendrociti maturi ma anche nei processi di mielinizzazione e rimielinizzazione.

Lo scambiatore Na^+/Ca^{2+}, NCX3, recentemente identificato come componente della membrana mielinica, svolge un ruolo fondamentale durante il differenziamento degli OPC. Infatti, in uno studio condotto nei nostri laboratori di ricerca, è stato dimostrato che i segnali intracellulari di calcio mediati da NCX3 sono coinvolti nella maturazione degli oligodendrociti e nella formazione della mielina. Laddove il silenziamento genico di NCX3 nelle cellule OPC preveniva l'aumento dei marcatori degli oligodenrociti maturi CNPase e MBP, la sua over-espressione ne induceva l'aumento. Resta tuttavia da chiarire se alterazioni dell'espressione ed attività di NCX3 possano contribuire alla disfunzione degli OPC durante un insulto demielinizzante e se la sua modulazione possa essere terapeuticamente rilevante.

Scopo principale del presente progetto pilota è stato quello di analizzare il ruolo dello scambiatore NCX3 nei processi di demielinizzazione e rimielinizzazione. Il ruolo di questo mediatore dell'omeostasi del sodio e del calcio è stato investigato nelle risposte fisiopatologiche dei neuroni e degli oligodendrociti del midollo spinale nel modello murino di SM, l'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), indotta mediante immunizzazione con la glicoproteina oligodendrocitica MOG_{35-55}. L'andamento dell'ESA, la risposta neuronale e delle cellule della linea oligodendrocitaria è stata analizzata in topi privi della proteina NCX3.

RISULTATI

Con l'ausilio di studi biochimici e morfologici abbiamo dapprima fornito una analisi dettagliata sulla distribuzione della proteina NCX3 nella sostanza bianca del midollo spinale nei diversi stadi dell'ESA. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i livelli proteici di NCX3 risultano aumentati durante la progressione dell'ESA e questo incremento risulta essere altamente significativo nella fase cronica.

Allo scopo di valutare il coinvolgimento di NCX3 nelle risposte degli OPC all'ESA abbiamo condotto esperimenti quantitativi di co-localizzazione di NCX3 con i marcatori degli OPC (NG2) e degli oligodendrociti più maturi (CNPase, GalC) nei diversi

stadi dell'ESA. I risultati ottenuti hanno dimostrato un concomitante aumento della co-espressione di NCX3 con il marcatore degli OPC durante tutte le fasi dell'ESA, laddove un concomitante aumento della co-espressione dello scambiatore con i marcatori di oligodendrociti più maturi CNPase and GalC, veniva osservato solo nella fase pre-sintomatologica e nella fase cronica dell'ESA. Il numero degli assoni positivi per NCX3 rimaneva invariato durante lo stadio pre-sintomatologico, ma risultava significativamente ridotto nella fase acuta e questa riduzione risultava invariata nella fase cronica dell'ESA. Allo scopo di valutare il ruolo di NCX3 nella risposta neuronale o oligodendrogliale durante un insulto demielinizzante, l'ESA è stato indotto nei topi controllo *wild-type ncx3+/+,* eterozigoti *ncx3+/-* e privi di NCX3 o *ncx3-/-*. I topi *ncx3-/-*, esaminati nella fase cronica dell'ESA, mostravano non solo una riduzione del diametro assonale e del numero di anelli integri di guaina mielinica, ma anche una drammatica riduzione del numero delle cellule OPC ed oligodendrociti premielinizzanti rispetto ai topi *ncx3+/+* ESA. Sia i topi *ncx3 -/-* che *ncx3 +/-* mostravano una precoce comparsa della sintomatologia ESA ed un peggioramento dei sintomi clinici.

CONCLUSIONI

Nel complesso, i nostri risultati dimostrano che l'assenza della proteina NCX3 in topi ESA pregiudica, riducendola significativamente, la risposta delle cellule oligodendrocitarie all'insulto demielinizzante e determina un peggioramento della sintomatologia dell'ESA. Ulteriori studi sono, tuttavia, necessari per comprendere il ruolo dello scambiatore NCX3 durante i processi di rimielinizzazione e se la disfunzione degli oligodendrociti in condizioni demielinizzanti possa essere contrastata dalla sua selettiva modulazione.

Exploring the role of the Na^+/Ca^{2+} exchanger NCX3 in oligodendrocytes to establish new strategies to control demyelination and remyelination in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

A significant current drive in new multiple sclerosis (MS) therapeutics is to identify targets that can be able, when axons are not irreversible damaged, to promote remyelination by boosting endogenous oligodendrocyte precursor cells (OPC) to form new myelin. Yet, despite the ability of the adult brain to generate oligodendrocytes with myelination capacity, remyelination in MS demyelinated lesions failed or is incomplete and no neuroprotective or remyelinating therapies are still available.

It is now becoming increasingly clear that changes in $[Ca^{2+}]_i$ levels not only influence the developmental processes that accompany the transition of OPC into myelinating oligodendrocytes but also intervene in the initiation of myelination and remyelination processes.

The Na^+/Ca^{2+} exchanger NCX3, recently identified as a myelin membrane component, is involved in regulating $[Ca^{2+}]_i$ during oligodendrocyte development. We previously demonstrated that calcium signaling mediated by NCX3 is involved in OPC maturation and myelin formation. Indeed, whereas the knocking-down of NCX3 in OPC prevented the up-regulation of the myelin markers CNPase and MBP, its overexpression induced an up-regulation of both markers. Whether alterations in NCX3 expression and activity might contribute to OPC dysfunction under demyelinating conditions and whether its modulation might be therapeutically relevant still remain unknown. The general aim of this pilote project was to analyze the role of NCX3 exchanger during demyelination and remyelination. The importance of this key mediator of sodium and calcium homeostasis was examined during the pathophysiological responses occurring in neurons and oligodendrocytes in the spinal cord of mice exposed to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG_{35-55})-induced Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The development of EAE disease, the neuronal and OPC responses were assessed in mice lacking *ncx3* gene.

RESULTS

In the present project, by using biochemical and morphological approaches, we first provided a clear picture of NCX3 distribution within the white matter spinal cord at different stages of EAE disease. We

found that NCX3 protein levels were intensely upregulated during EAE progression and this effect was more significant at EAE chronic stage.
To investigate whether NCX3 might be involved in OPC response to EAE insult we performed quantitative analyses of NCX3 colocalization with the oligodendrocyte lineage anti-NG2, anti-GalC, and anti-CNPase antibodies at different time points during EAE disease. We found a concomitant upregulation of the exchanger with the OPC marker NG2 during all stages of EAE disease and with both CNPase and GalC, two markers of more mature oligodendrocytes, only at preonset and chronic EAE stages. Quantification of NCX3 coexpression with the axonal marker NF200 indicated that the number of NCX3-positive axons remained unchanged during the pre-onset EAE stage but they were significantly reduced at peak stage and this reduction remained unchanged at chronic stage. To determine whether NCX3 might have a role in controlling neuronal or oligodendroglial responses under demyelinating conditions, EAE was induced in congenic wild-type *ncx3*+/+, heterozygous *ncx3*+/- and knockout *ncx3*-/- mice. *Ncx3*-/- revealed not only a reduced diameter of axons and number of intact myelin rings but also a dramatic reduction of OPC and pre-myelinating cells in the white matter spinal cord if compared to congenic *ncx3*+/+ mice at chronic EAE stage. Accordingly, *ncx3* -/- and *ncx3* +/- mutants displayed an anticipated development of EAE disease and increased severity of clinical symptoms.

CONCLUSIONS

Taken together our findings demonstrate that knocking out NCX3 exchanger impairs oligodendrocyte lineage responses and worsens clinical symptoms in EAE disease. Our results, by demonstrating a protective role of NCX3 in EAE disease, uncover a novel pharmacological role for this exchanger in oligodendrocyte lineage cells. Further studies are needed to unveil the role of NCX3 during remyelination processes and to understand whether OLG impairment in MS can be overcome by its selective modulation.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Boscia F. Emerging role of the sodium calcium exchanger in microglia and oligodendrocytes. Oral Comunication. XV Congress of the Italian Society for Neuroscience. Roma, 3-5 ottobre, 2013

Casamassa A, Matarese G, Annunziato L, Boscia F. Exploring the role of the Na^{+}/Ca^{+2} exchanger NCX3 in oligodendrocytes to establish new strategies to control demyelination and remyelination in Multiple Sclerosis. XI Congresso FISM, Roma, 28-29 maggio 2014

Casamassa A, La Rocca C, Matarese G, Annunziato L, Boscia F. Knocking out the Na^{+}/Ca^{2+} Exchanger NCX3 impairs oligodendrocyte lineage response and worsens clinical symptoms in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Manuscript submitted*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €

Roberta De Simone
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI:
Luisa Minghetti, Sergio Visentin, Antonietta Bernardo, Maria Antonietta Ajmone-Cat, Chiara De Nuccio

I mitocondri come bersagli e mediatori degli effetti benefici degli agonisti PPARγ nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurologica cronica che colpisce il sistema nervoso centrale (SNC), caratterizzata da demielinizzazione, neuroinfiammazione e neuro-degenerazione. Aspetti tipici della SM sono infatti la perdita della guaina mielinica, da cui dipende la funzionalità delle fibre nervose, e l'attivazione incontrollata della microglia, la principale popolazione di macrofagi nel cervello. La microglia, attraverso il rilascio di diverse sostanze, può contribuire a danneggiare gli oligodendrociti, le cellule che formano la guaina mielinica nel SNC. Studi recenti hanno messo in evidenza come disfunzioni dell'attività dei mitocondri, organelli deputati al controllo metabolico delle cellule, svolgano un ruolo molto importante nella patogenesi di diverse malattie neurologiche, tra cui proprio la SM.
Nostri studi precedenti condotti su colture cellulari purificate di precursori degli oligodendrociti (OP) e microgliali indicano che i glitazoni, agonisti dei recettori nucleari PPARγ (recettori attivati dai proliferatori perossisomiali), sono in grado, da una parte, di proteggere gli oligodendrociti aumentando le loro difese, favorendo la formazione di mielina attraverso meccanismi che coinvolgono proprio i mitocondri, dall'altra di modulare l'attivazione della microglia. Tra essi, il pioglitazone, farmaco in uso per il trattamento del diabete di tipo II, ha dato risultati incoraggianti su un numero limitato di pazienti con SM.
Su queste basi, gli obiettivi del nostro progetto sono stati: 1) approfondire le conoscenze sugli effetti protettivi degli agonisti del PPARγ sugli OP e sui meccanismi che sottendono tale azione, verificando gli effetti di questi farmaci su alcuni parametri mitocondriali, quali il potenziale di membrana, la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), e l'espressione di proteine mitocondriali come la proteina disaccoppiante UCP2, con funzioni anti-ossidanti e protettive, la cui scarsa attività è stata associata ad una maggiore suscettibilità alla SM; 2) valutare espressione, modulazione e funzione dell'UCP2 in differenti stati di attivazione microgliale.

RISULTATI

In relazione all'obiettivo 1, abbiamo valutato gli effetti protettivi degli agonisti naturali e sintetici del PPARγ in precursori di oligodendrociti (OP) utilizzando diversi paradigmi sperimentali. In un primo paradigma abbiamo mimato una condizione di stress infiammatorio stimolando gli OP con il TNFα, una delle più rilevanti citochine coinvolte nella patofisiologia della SM, in grado di arrestare o ritardare il programma differenziativo degli OP. In parallelo all'attesa riduzione del differenziamento degli OP, il TNFα induceva una significativa riduzione del potenziale di membrana mitocondriale (mMP), e un aumento della produzione di superossido mitocondriale, indicando un indebolimento delle funzioni mitocondriali stesse. La presenza dell'agonista del PPARγ pioglitazone preveniva sia l'effetto del TNFα sul differenziamento sia quello sull'mMP e sul superossido. Inoltre, il pioglitazone induceva l'espressione di COX1, una subunità del complesso IV della catena respiratoria, e del PGC1α, un regolatore chiave della biogenesi mitocondriale, rafforzando l'idea che la funzionalità mitocondriale svolga un ruolo centrale nel differenziamento e nella protezione degli oligodendrociti.
In un secondo approccio sperimentale, per indurre un danno mitocondriale negli OP, abbiamo utilizzato il rotenone, un inibitore del primo enzima della catena respiratoria mitocondriale, conosciuto per la sua

capacità di compromettere il differenziamento degli OP. Il trattamento con agonisti del PPARγ riduceva gli effetti inibitori del rotenone, sia sul differenziamento che sulla funzione mitocondriale, suggerendo ulteriormente che l'effetto protettivo degli agonisti PPARγ sia mediato dalla loro modulazione delle funzioni mitocondriali. Similmente al pioglitazone, l'acido grasso poli-insaturo omega 3 docosoesaenoico (DHA), agonista parziale del PPARγ, promuoveva il differenziamento degli OP e contrastava l'arresto della maturazione indotto da TNFα.
Inoltre, abbiamo dimostrato per la prima volta che, oltre alla classica regolazione dell'attività trascrizionale indotta dalla traslocazione nucleare del PPARγ, sia pioglitazone che DHA inducevano il differenziamento degli OP attraverso la fosforilazione (e quindi attivazione) PPARγ-dipendente delle MAP chinasi ERK1/2, enzimi coinvolti nella regolazione degli stadi precoci di maturazione degli OP.
Infine, abbiamo dimostrato che il pioglitazone aumentava l'espressione dell'UCP2 e quella della proteina basica della mielina MBP. Gli effetti positivi del pioglitazone sugli OP sono stati anche confermati in un modello di fettine organotipiche cerebellari, comunemente impiegato negli studi sulla mielinizzazione.
In relazione all'obiettivo 2, abbiamo studiato il ruolo di UCP2 nella reattività microgliale. Abbiamo valutato l'espressione del messaggero e della proteina in colture primarie di microglia in seguito a stimolazione con lipopolisaccaride (LPS), un tipico stimolo pro-infiammatorio. LPS induceva una rapida diminuzione dei livelli di UCP2, seguita da una tardiva induzione. I livelli ridotti di UCP2 erano correlati con un'aumentata produzione di radicali dell'ossigeno (ROS) e con la depolarizzazione dei mitocondri. Per esaminare ulteriormente le conseguenze funzionali della down-regolazione di UCP2 nella risposta infiammatoria, ci siamo avvalsi della tecnica "RNA interference" per ridurre l'espressione della proteina. Con tale approccio abbiamo potuto dimostrare che bassi livelli di UCP2 sono correlati ad un'aumentata risposta a stimoli pro-infiammatori, caratterizzata da una maggior produzione di ROS e di molecole pro-infiammatorie (ossido d'azoto ed interleuchina 6), confermando il ruolo cruciale di UCP2 nella modulazione dell'attivazione microgliale.
Abbiamo inoltre dimostrato che i livelli di UCP2 sono regolati in maniera diversa da agenti anti-infiammatori, come dimostra la persistente up-regolazione di UCP2 da parte delle citochine anti-infiammatorie IL4 e TGFβ. Similmente a queste citochine, e in accordo con la sua capacità di ridurre l'attivazione microgliale, anche il pioglitazone induceva l'espressione di UCP2. In cellule in cui UCP2 era stata silenziata, la risposta microgliale ad IL4 era compromessa, come dimostrato dall'incapacità di IL4 di ridurre l'espressione di molecole pro-infiammatorie e di indurre quella di molecole anti-infiammatorie. Il livello di UCP2 risulta pertanto un regolatore centrale della risposta microgliale, sia a stimoli di natura pro-infiammatoria che di natura anti-infiammatoria.

CONCLUSIONI

In conclusione i nostri dati indicano che agonisti naturali e sintetici del PPARγ, così come l'agonista parziale e composto naturale DHA, oltre a promuovere il differenziamento degli oligodendrociti, sono in grado di proteggere gli OP da insulti che alterino le funzioni mitocondriali, mediante effetti che coinvolgono molto probabilmente la modulazione del PGC1α e di proteine mitocondriali, quali UCP2 e COX1. Inoltre, dimostriamo che UCP2 è un regolatore chiave del processo di attivazione microgliale, individuando in tale proteina un nuovo target terapeutico per il trattamento della SM.
Nel loro insieme i nostri dati supportano un ruolo per sostanze, sia sintetiche come il farmaco antidiabetico pioglitazone, sia di origine naturale come il DHA, in grado di attivare il PPARγ, come promettenti agenti terapeutici capaci di promuovere la mielinizzazione e di regolare la neuroinfiammazione attraverso molteplici meccanismi, coinvolgenti la modulazione delle funzioni mitocondriali.

Mitochondria as targets and mediators of the PPARγ agonist beneficial effects in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic neurological disease of the central nervous system (CNS), characterized by demyelination, neuroinflammation and neurodegeneration. Two hallmarks of MS are loss of myelin sheet, crucial for neuronal transmission, and uncontrolled activation of microglia, the main population of brain macrophages. Microglia, through the release of several substances, can contribute to damage the oligodendrocytes, the myelin-forming cells of CNS. Recent studies showed that dysfunction of mitochondria, organelles deputed to the metabolic control of the cells, play an important role in the pathogenesis of several neurological diseases, including MS.

Our recent studies on purified oligodendrocytes precursors (OPs) and microglia showed that the anti-diabetic drug pioglitazone, agonist of the nuclear receptor PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ), is able on one side to promote the differentiation of oligodendrocytes (OLs), and on the other, to increase OL cellular defences, through mechanisms involving mitochondria, and to modulate microglial activation. In particular, pioglitazone, already in use for the treatment of type II diabetes, has shown promising effects on a limited number of MS patients.

On this rationale, the aims of our project were two-fold: 1) To deepen our knowledge of the protective effects of PPARγ agonists on OPs and of the underlying mechanism, verifying their effects on mitochondrial parameters, such as membrane potential and free radical production (ROS), and the expression of the mitochondrial protein UCP2, a protein with anti-oxidant and protective functions whose low expression has been associated with increased susceptibility to MS; 2) To evaluate the expression, function and modulation of UCP2 in different experimental settings of microglial activation.

RESULTS

In the Aim 1 of the project, we evaluated the protective effects of PPARγ natural and synthetic agonists in OL precursors (OPs), by using two different experimental paradigms. In a first model, we mimicked a condition of inflammatory stress by challenging OPs with TNFα, one of the most relevant cytokines involved in the pathophysiology of MS, known to arrest or delay the differentiation program of OPs. In parallel with the expected reduction of OPs differentiation, TNFα induced a significant decrease of mitochondrial membrane potential (mMP) and an increase in the production of mitochondrial superoxide, indicating an impairment of the mitochondrial functions. The presence of the PPARγ agonist pioglitazione significantly reverted both TNFα-dependent reduction of OP differentiation and mMP and TNFα-dependent increase of superoxide. In addition, pioglitazone induced an increased expression of cytochrome C oxidase subunit 1 (COX1), an enzyme of the respiratory chain and that of PGC1α, a transcriptional coactivator that is a central inducer of mitochondrial biogenesis corroborating the idea that mitochondria functionality play a crucial role in maintaining oligodendrocyte differentiation. In a second model, to induce a mitochondrial impairment, we used rotenone (an inhibitor of the enzymatic complex I of the mitochondrial respiratory chain), known to significantly impair OP differentiation. In pioglitazone-treated OPs the inhibitory effects of rotenone on both mitochondrial functions and OP differentiation were significantly attenuated, further suggesting a protective effect of the PPARγ agonists against the mitochondrial impairment. Similar to pioglitazone, the omega-3 fatty acid and partial PPARγ agonist docosahexaenoic acid (DHA) promoted OP differentiation and counteracted TNFα-induced maturation arrest. Furthermore, we show, for the first time in cells of oligodendroglial lineage, that in addition to the classical transcriptional activity induced by PPARγ nuclear translocation, both pioglitazone and DHA induced OP differentiation through PPARγ-dependent phosphorylation, and hence activation, of the MAP kinases ERK1/2, which are known to control the early stage of OP maturation.

In addition, we found that the PPARγ agonist pioglitazone increased the expression of UCP2 and that of myelin basic protein MBP. The positive effect of pioglitazone on OL differentiation was confirmed in a recognized model for myelination studies (organotypic cerebellar slice cultures).

In the Aim 2 of the project, we investigated the role

of UCP2 in microglial reactivity. We analyzed UCP2 mRNA and protein expression in microglial cultures upon stimulation by LPS, a typical pro-inflammatory stimulus. LPS induced a rapid decrease of UCP2 levels followed by a delayed up-regulation of the protein. The decrease in UCP2 levels was associated to enhanced production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and depolarization of mitochondria. To further examine the functional consequences of UCP2 modulation on the inflammatory response we took advantage of RNA interference technique to down-regulate UCP2. These experiments demonstrated that the low expression of UCP2 is related to an enhanced inflammatory response characterized by an increased production of ROS and pro-inflammatory molecules (NO and IL6), confirming the key role of UCP2 in the modulation of microglial activation.

We have also found that UCP2 levels are differently regulated by anti-inflammatory agents, as indicated by the persistent up-regulation of UCP2 by the anti-inflammatory cytokines TGFβ and IL4. Similar to these anti-inflammatory cytokines, and consistently with its known ability to reduce microglial activation, pioglitazone was found to upregulate the expression of UCP2. In UCP2-silenced cells, microglial response to IL4 was compromised, as demonstrated by the failure of IL4 to reduce the synthesis of pro-inflammatory molecules and to induce that of anti-inflammatory ones. UCP2 level is thus a master regulator of microglial responses to both pro-and anti-inflammatory stimuli.

CONCLUSIONS

In conclusion, our data indicate that synthetic PPARγ agonists, such as the anti-diabetic drug pioglitazone, as well as natural dietary compounds, such as the partial PPARγ agonist docosahexaenoic acid (DHA), in addition to promote OL differentiation, are able to protect OPs against inflammatory insults that impair mitochondrial functions with effects likely involving the modulation of PCG1α and of mitochondrial proteins such as UCP2 and COX1. In addition, we revealed, for the first time, that UCP2 is a master regulator of both pro- and anti-inflammatory microglial responses, pointing to UCP2 as a new therapeutic target for MS. Overall our data support a role for PPARγ natural and synthetic agonists as promising therapeutic agents able to promote myelination and to regulate brain inflammation by means of multiple mechanisms, including the modulation of mitochondrial functions.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Bernardo A, De Simone R, De Nuccio C, Visentin S, Minghetti L. The nuclear receptor peroxisome proliferator activated receptor-γ promotes oligodendrocyte differentiation through mechanisms involving mitochondria and oscillatory Ca2+ waves. Biol. Chem. 2013. 394: 1607–1614

Visentin S, Bernardo A, De Simone R, De Nuccio C, Minghetti L. Oscillatory Ca2+ waves, mitochondria, and nuclear receptors in the differentiation of oligodendrocytes. ABCD Congress, Ravenna, 12-14 Settembre 2013

De Nuccio C., Bernardo A., De Simone R., Visentin S, Minghetti L."Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ agonists protect oligodendrocytes from TNF-alpha-induced damage. Oral presentation, XV Congresso Società Italiana di Neuroscienze (SINS), Roma, 3-5 Ottobre 2013

De Nuccio C, Bernardo A, De Simone R, Visentin S, and Minghetti L. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ agonists and demyelinating disease: effects of pioglitazone on mitochondrial function in oligodendrocytes 36° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia (SIF), Torino, 23-26 Ottobre 2013

De Nuccio C., Cruciani C., Bernardo A., De Simone R., Visentin S. and Minghetti L. Mitochondria are the target of the opposite effects of TNF-α and PPAR-γ agonists in oligodendrocyte progenitors. 9th FENS, Milano, 5-9 Luglio, 2014

Bernardo, A. Giammarco, M.L. De Simone, R. Minghetti L. Docosahexaenoic acid and curcumin promote oligodendrocyte differentiation through mechanisms involving PPAR-γ and ERK1/2 activation. 9th FENS, Milano, 5-9 Luglio 2014

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 61.000 €

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DALLA FISM

FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DALLA FISM 2014

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA

Maria Pia Amato
Dipartimento di NEUROFARBA, Università di Firenze, Firenze
Ruolo della riserva cognitiva nella sclerosi multipla ad esordio pediatrico e impatto della malattia sull'inserimento sociale e lavorativo nell'età adulta
Progetto di ricerca € 250.000 - 2 anni

Marta Bassi
Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche Luigi Sacco, Università degli Studi di Milano, Milano
Il sistema della cura: commisurare la promozione del benessere alle esigenze di persone con sclerosi multipla, caregiver ed operatori sanitari
Progetto di ricerca € 184.000 - 3 anni

Ambra Bisio
Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili, Università degli Studi di Genova, Genova
La riabilitazione della scrittura nella sclerosi multipla: un approccio innovativo per valutare e contrastare il deterioramento della scrittura in pazienti affetti da sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 20.000 - 1 anno

Graziella Filippini
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta (INNCB), Direzione Scientifica, Milano
IN-DEEP - Integrare le esperienze e le preferenze delle persone con SM con i risultati della ricerca per sviluppare informazioni utili per decisioni informate e condivise: i test diagnostici
Progetto di ricerca € 150.000 - 3 anni

Elise Houdayer
Unità di Neurofisiologia Sperimentale, Istituto di Neurologia Sperimentale-INSPE, Fondazione Centro San Raffaele, Milano
Stimolazione magnetica transcranica profonda con H-coil per il trattamento non invasivo del dolore degli arti inferiori nella sclerosi multipla
Borsa di ricerca € 27.000 - 2 anni

Matilde Inglese
Department of Neurology, Radiology and Neuroscience, Icahn School of Medicine Mount Sinai New York, NY, USA
Correlati cerebrali strutturali e funzionali di riabilitazione dell'arto superiore in pazienti con SM progressiva
Progetto di ricerca € 75.000 - 1 anno

Massimiliano Pau
Dipartimento di Ingegneria Meccanica, Chimica e dei Materiali, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari
Sviluppo di una piattaforma hardware-software innovativa per la riabilitazione dell'equilibrio in individui affetti da SM basata sulla Balance Board Nintendo Wii
Progetto di ricerca € 20.000 - 1 anno

Luca Prosperini
Dipartimento Neurologia e Psichiatria, Sapienza Università di Roma, Roma
Studio pilota sull'associazione tra compromissione cognitiva e disturbo dell'equilibrio in pazienti con sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 23.175 - 1 anno

Claudio Solaro
Dipartimento Testa-Collo S.C. Neurologia, Genova Ospedale P.A. Micone ASL3 Genovese, Genova
La funzione dell'arto superiore in SM: creazione di un data-set per ottenere dati normativi di misure soggettive e oggettive e sviluppo di uno strumento di valutazione SM specifico
Progetto di ricerca € 79.800 - 2 anni

Franca Tecchio
Istituto di Scienze e Tecnologie dalla Cognizione (ISTC), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Roma
Alleviare la fatica nella sclerosi multipla mediante l'applicazione domiciliare di un trattamento personalizzato di neuromodulazione
Progetto di ricerca € 40.000 - 2 anni

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

Francesca Aloisi
Dipartimento di Neuroscienze e Biologia Cellulare, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Studio dell'espressione di geni del virus di Epstein Barr e geni cellulari in pazienti con CIS, SM recidivante remittente e SM primaria progressiva: ricerca di biomarcatori diagnostici e prognostici
Progetto di ricerca € 161.753 - 3 anni

Antonio Bertolotto
Neurologia 2, CRESM, AOU San Luigi, Orbassano (TO)
Una banca biologica ed un laboratorio dedicati alla raccolta ed alla distribuzione di campioni biologici di SMPP, la replicazione e la condivisione di dati e la validazione di metodi biologici
Progetto di ricerca € 74.800 - 1 anno

Massimo Filippi
Unità di Neuroimaging Quantitativo, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano
Valutazione delle modifiche longitudinali della rete di connettività funzionale (connectome) nei pazienti con sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 100.000 - 1 anno

Maria Liguori
Istituto di Tecnologie Biomediche (ITB), Sezione di Bari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
Il deterioramento cognitivo nella sclerosi multipla pediatrica: ricerca di biomarcatori predittivi di progressione
Progetto di ricerca € 245.492 - 2 anni

Eleonora Piras
Ninds/Nih, Viral Immunology Section, Bethesda, USA
Monitoraggio dei linfociti T CD8+ EBV-specifici in malattie demielinizzanti in pazienti sottoposti a trials con nuovi farmaci antivirali
Borsa di ricerca € 73.000 - 2 anni

Maria A. Rocca
Fondazione Centro San Raffaele, Milano
La misura dell'atrofia del midollo cervicale come strumento per il monitoraggio della malattia e per la predizione della disabilità a lungo termine in pazienti con sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 75.000 - 1 anno

Silvia Romano
Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS), Università "La Sapienza", Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso (NESMOS), Ospedale Sant'Andrea, Roma
Studio della noise di espressione genica di singola cellula in linee cellulari linfoblastoidi (LCLs) di gemelli monozigoti discordanti per sclerosi multipla, pazienti sporadici e controlli
Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

Alessandra Mallano
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Sviluppo di un anticorpo umano capace di interrompere il pathway mediato dal CD161 allo scopo di definire nuove strategie terapeutiche nella sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Simona Perga
Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri Ottolenghi (NICO), AOU San Luigi Gonzaga, Unità di Neurobiologia Clinica, CReSM, Orbassano (TO)
Il ruolo della deubiquitinasi A20/TNFAIP3 nell'immunopatologia della SM
Progetto di ricerca € 100.000 - 3 anni

Marcello Pinti
Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena
Respirazione e glicolisi nei linfociti di pazienti con diverse forme di sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Manolo Sambucci
Unità di Neuroimmunologia e Citofluorimetria, Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma
Linfociti T regolatori Foxp3+ : Subsets differenti possono spiegare la mancanza di immunoregolazione nella SM?
Borsa di ricerca € 52.000 - 2 anni

Egle Solito
Queen Mary University London, School of Medicine and Dentistry, Translational Medicine and Therapeutics (TMT) - William Harvey Reserach Institute (WHRI), London - UK
Ruolo della annessina A1 nella sclerosi multipla: identificazione di un fattore endogeno che controlla la migrazione di cellule T attraverso la barriera ematoencefalica e la tolleranza immunologica
Progetto di ricerca € 250.000 - 3 anni

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

Cosima Baldari
Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Siena, Siena
L'espressione difettiva di Rai negli astrociti attenua la neurodegenerazione dipendente dai linfociti Th17 encefalitogenici: uno studio meccanicistico delle interazioni tra astrociti e linfociti Th17
Progetto di ricerca € 75.000 - 2 anni

Diego Centonze
Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma
Promuovere la plasticità neuronale per contrastare la progressione clinica nella sclerosi multipla: studio pilota per valutare sicurezza ed efficacia del D-Aspartato
Progetto di ricerca € 71.350 - 1 anno

Alberto Chiarugi
Dipartimento di Scienze della Salute, Sezione di Farmacologia Clinica, Università di Firenze, Firenze
Caratterizzazione delle disfunzioni mitocondriali in modelli di sclerosi multipla progressiva ed effetto di farmaci potenzianti le funzioni mitocondriali
Progetto di ricerca € 86.500 - 2 anni

Alessandro Didonna
Department of Neurology, University of California, San Francisco CA, USA
MicroRNA come nuovi strumenti per modulare il processo di mielinizzazzione nel sistema nervoso
Borsa di ricerca senior € 100.715 - 2 anni

Roberto Furlan
Isituto Scientifico San Raffaele Dipartimento di Neuroscienze, Milano
Microvescicole microgliali come vettore terapeutico per la neuroinfiammazione
Progetto di ricerca € 165.000 - 2 anni

Rosella Mechelli
Sapienza Università di Roma Dipartimento di Neuroscienze, salute mentale e organi di senso, Roma
Approccio di tipo "interattoma-candidato" nella sclerosi multipla: dall'interazione geni-ambiente alla caccia dei bersagli terapeutici
Progetto di ricerca € 81.000 - 2 anni

Simone Patergnani
Università di Ferrara, Dipartimento di morfologia, chirurgia e medicina sperimentale - Sezione di Patologia, Oncologia e Biologia, Ferrara
Utilizzo di agenti modulanti il processo autofagico come nuova terapia per ripristinare la mielinizzazione in modelli di sclerosi multipla
Borsa di ricerca senior € 55.000 - 2 anni

Laura Piccio
Washington University in St. Louis, Neurology, St. Louis, MO, USA
Ruolo immunomodulatorio della adiponectina in modelli sperimentali della sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 79.800 - 2 anni

Stefano Previtali
Fondazione Centro San Raffaele, Istituto di Neurologia Sperimentale (InSpe), Divisione di Neuroscienze, Milano
Ruolo di Jab1 nella differenziazione e sopravvivenza degli oligodendrociti: un nuovo modello murino di progressive demielinizzazione e degenerazione del sistema nervoso centrale
Progetto di ricerca € 74.000 - 1 anno

Roberto Primi
Università degli studi di Milano Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Milano
Modellazione molecolare di GPR17: interazioni con ligandi pro-infiammatori non convenzionali
Borsa di Ricerca € 26.300,00 - 1 anno

Martina Severa
Dipartimento di malattie infettive, parassitarie ed immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Un anticorpo coniugato all'Interferone ß specifico per le cellule B: una nuova immuno-citochina per il trattamento della SM
Progetto di ricerca € 29.978 - 1 anno

PROGETTI SPECIALI 2014

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA

Alessandra Solari
Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano
Studio PeNSAMI Fase 2: Trial Clinico multicentrico randomizzato controllato, in singolo cieco, di fase II/III, sull'efficacia di un programma di cure palliative, domiciliari per le persone con SM grave e i loro caregiver, e studio qualitativo
Progetto speciale € 331.191 - 2 anni

Paolo Riccio
Università della Basilicata Dipartimento di Scienze, Potenza
Valori nutrizionali nella sclerosi multipla: perché sono importanti e come devono essere gestiti
Progetto speciale € 10.000 - 1 anno

FISM, UNIBA
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova - Università degli studi di Bari Aldo Moro, Bari
Registro Italiano Sclerosi Multipla
Progetto speciale € 367.500 - 1 anno

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DALLA FISM 2013

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA

Maura Casadio
Dipartimento di Infomatica Bioingegneria Robotica e Ingegneria dei Sistemi (DIBRIS), Università degli Studi di Genova, Genova
Interfacce corpo-macchina basate sulle sinergie muscolari per riabilitazione neuromotoria personalizzata di persone affette da sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Valerio Chiurchiù
Unità di Neuroimmunologia, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma
Plasticità e polarizzazione dei macrofagi nella sclerosi multipla: in 'ex vivo' veritas
Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Ugo Della Croce
Dipartimento POLCOMING,
Università degli Studi di Sassari, Sassari
Un intervento riabilitativo basato sull'uso di realtà virtuale e treadmill per migliorare il cammino in individui affetti da sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 85.000 - 2 anni

Franca Deriu
Dipartimento di Scienze Biomediche,
Università degli Studi di Sassari, Sassari
Valutazione neurofisiologica, dinamometrica e clinica degli effetti del Cross-Training in pazienti con sclerosi multipla: uno studio pilota
Progetto di ricerca € 29.000 - 1 anno

Luca Ostacoli
Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche,
Università degli Studi di Torino, Orbassano (TO)
L'efficacia di un intervento Mindfulness-based per i sintomi depressivi e la qualità della vita nei pazienti con sclerosi multipla e i loro caregivers.
Uno studio clinico randomizzato controllato
Progetto di ricerca € 60.000 - 3 anni

Nicola Smania
Dipartimento di Scienze Neurologiche, Neuropsicologiche, Morfologiche e Motorie, Università di Verona,
Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona, Verona
Effetti di un trattamento intensivo robot assistito sul recupero funzionale della mano e sull'autonomia nelle ADL in persone con sclerosi multipla: studio randomizzato controllato in singolo cieco
Progetto di ricerca € 75.000 - 2 anni

Eleonora Tavazzi
Unità di Neuroriabilitazione, Centro Sclerosi Multipla,
Istituto IRCCS Santa Maria Nascente,
Fondazione Don Gnocchi, Milano
Effetti della riabilitazione neuromotoria sulla plasticità cerebrale nella sclerosi multipla: studio di RM strutturale e funzionale randomizzato-controllato in doppio cieco
Progetto di ricerca € 30.00 - 1 anno

Enrico Molinari
Dipartimento di Psicologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Milano
Migliorare la qualità di vita di persone con sclerosi multipla e dei loro familiari tramite un intervento di Mindfulness e Telemedicina
Progetto di ricerca € 117.075 - 2 anni

Rosalba Rosato
Dipartimento di Psicologia, Università degli Studi di Torino, Torino
Sviluppo e validazione preliminare della versione abbreviata e computerizzata dell'MSQOL-54
Progetto di ricerca € 110.000 - 2 anni

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

Christian Cordano
MS Center,University of California, San Francisco (UCSF)
San Francisco, CA, USA
Tomografia a coerenza ottica ad altissima risoluzione nell'encefalomielite autoimmune sperimentale - un modello per la comprensione del ruolo clinico dell'OCT nella SM
Borsa di addestramento € 65.000 - 2 anni

Maria Petracca
Estelle and Daniel Maggin Department of Neurology,
Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA
Determinazione delle concentrazioni intra ed extracellullari di sodio a livello encefalico in pazienti affetti da SM mediante l'impiego di RM a 7.0 Tesla
Borsa di ricerca € 80.000 - 2 anni

Dario Seppi
Dipartimento di Biologia cellulare e Neuroscienze,
Istituto Superiore di Sanità, Roma
Tecniche avanzate di analisi molecolare volte all'identificazione di biomarker predittori di progressione di malattia nella sclerosi multipla
Borsa di addestramento € 41.000 - 2 anni

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

Antonio Cattaneo
Fondazione EBRI Rita Levi-Montalcini, Fattori Neurotrofici e Malattie Neurodegenerative, Roma
Correlazione fra sbilanciamento proNGF/NGF e sinaptopatia infiammatoria in un modello animale di sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 53.000 - 1 anno

Francesco Cecconi
Dipartimento di Neuroscienze Sperimentali, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma
Ruolo della proteina adattatrice pro-autofagica AMBRA1 nel destino dei linfociti T e suo coinvolgimento nella sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 180.000 - 3 anni

Maria Teresa Cencioni
Wolfson Neuroscience Laboratory, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Imperial College, London, UK
Ruolo dei linfociti T CD57+CD8+ nel riconoscimento del virus Epstein-Barr e nella sclerosi multipla
Borsa di ricerca € 41.000 - 1 anno

Eliana Marina Coccia
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Analisi dell'INTERFEROME nella SM: alla ricerca di vie di segnale alterate
Progetto di ricerca € 245.000 - 2 anni

Silvia Dusi
Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Sezione Patologia Generale, Università degli Studi di Verona, Verona
Visualizzazione e caratterizzazione della motilità delle cellule T nel sistema nervoso centrale durante l'encefalomielite autoimmune sperimentale
Borsa di addestramento € 37.000 - 2 anni

Fabia Filipello
Laboratorio Farmacologia e Patologia del Sistema Nervoso, Istituto Clinico Humanitas, Roma
Interazione tra astrociti e cellule T nel corso della sclerosi multipla
Borsa di addestramento € 38.000 - 2 anni

Bruno Gran
Division of Clinical Neuroscience, Clinical Neurology Research Group, University of Nottingham, School of Medicine, Nottingham, UK
Ruolo dei recettori TLR2 nell'attivazione dell'infiammazione da parte di infezioni nella SM
Progetto di ricerca € 126.550 - 2 anni

Giuseppe Mameli
Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari
Studio sulla risposta immune di HERV-W e EBV in pazienti sardi con sclerosi multipla e controlli
Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Luca Muzio
Dipartimento di Neuroscienze, INSPE, Fondazione Centro San Raffaele (FCSR), Milano
Acidosi nelle malattie neuroinfiammatorie: il ruolo dei canali Asics
Progetto di ricerca € 163.000 - 2 anni

Barbara Rossi
Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università degli Studi di Verona, Verona
Ruolo delle cellule T regolatorie CD4+CD25+ nella modulazione dell'autoimmunità nel sistema nervoso centrale in corso di encefalomielite sperimentale autoimmune
Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Barbara Serafini
Dipartimento di Biologia Cellualre e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Studio dell'espressione genica degli infiltrati immunitari isolati mediante microdissezione laser da tessuto cerebrale di persone con sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 115.000 - 2 anni

Claudio Sette
Laboratorio di Neuroembriologia, Fondazione Santa Lucia, Roma
Coinvolgimento della via di segnale IL-1ß/MyD88 nel differenziamento delle cellule umane Th17 patogeniche nella sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 95.000 - 2 anni

Ada Maria Tata
Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin, Sapienza Università di Roma, Roma
Relazione tra l'alterazione del sistema colinergico e l'infiammazione nella sclerosi multipla: studi in topi EAE e in pazienti in fase recidivante remittente
Progetto di ricerca € 133.000 - 2 anni

Maria Pia Abbracchio
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano
Strategie rimielinizzanti innovative per la sclerosi multipla: focus su GPR17, nuovo recettore coinvolto nel differenziamento oligodendrocitario
Progetto di ricerca € 170.000 - 2 anni

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

Luca Battistini
Unità di Neuroimmunologia, Fondazione Santa Lucia, Roma
Ruolo delle cellule MAIT nella sclerosi multipla: come la flora intestinale influenza le risposte autoimmuni
Progetto di ricerca € 110.000 - 2 anni

Bruno Bonetti
Dipartimento di Neuroscienze, Università di Verona, Ospedale Policlinico, Verona
Esosomi da cellule staminali mesenchimali adipose: un innovativo approccio terapeutico nell'encefalomielite autoimmune sperimentale
Progetto di ricerca € 120.000 - 2 anni

Erica Butti
Divisione di Neuroscienze, Fondazione Centro San Raffaele, Milano
Ruolo diretto e indiretto dei precursori endogeni neurali nella demielinizzazione e rimielinizzazione dopo danno indotto da cuprizone
Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Giacomo Casella
Unità di Neuroimmunologia, INSPE, Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano
Microvescicole microgliali come vettore terapeutico in neuroinfiammazione
Borsa di addestramento € 40.000 - 2 anni

Emanuela Colombo
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Istituto Scientifico San Raffaele, Milano
Astrociti per la terapia cellulare della sclerosi multipla
Borsa di ricerca € 52.000 - 2 anni

Massimiliano Di Filippo
Clinica Neurologica, Università degli Studi di Perugia, Ospedale S. Maria della Misericordia, Perugia
Inibizione mitocondriale ed encefalomielite autoimmune sperimentale: possibili strategie neuroprotettive
Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Federica Eva Esposito
Dipartimento di Neurologia e Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Fondazione Centro San Raffaele, Milano
Un modello predittivo di risposta a fingolimod: integrazione di clinica, neuroradiologia e genetica
Progetto di ricerca € 175.000 - 2 anni

Giovanni Luigi Mancardi
Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili, Università degli Studi di Genova, Genova
Intensa immunosoppressione seguita da trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche e mesenchimali nella encefalite autoimmune sperimentale e in forme gravi di sclerosi multipla
Progetto di ricerca € 150.000 - 3 anni

Carla Taveggia
Divisione di Neuroscienze e INSPE, Fondazione Centro San Raffaele, Milano
Modulazione dell'attività enzimatica di TACE nella mielinizzazione e nella rimielinizzazione del SNC
Progetto di ricerca € 115.000 - 2 anni

PROGETTI SPECIALI 2013

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

Antonio Bertolotto
Neurologia 2, CRESM, AOU San Luigi, Orbassano (TO)
Biomarcatori di diagnosi e prognosi nella sclerosi multipla: possibile ruolo delle isoforme della Vitamina D Binding Protein
Progetto speciale € 80.000 - 1 anno

Massimo Filippi
Unità di Neuroimaging Quantitativo, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano
Network Italiano di Neuroimaging (INNI) per l'ottimizzazione dell'utilizzo di tecniche avanzate di Risonanza Magnetica in pazienti con SM
Progetto speciale € 450.000 - 2 anni

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

Maria Pia Abbracchio, Ivano Eberini
Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Laboratorio di Famacologia Cellulare e Molecolare della Trasmissione Purinergica, Università degli Studi di Milano, Milano
Sviluppo di un brevetto di nuovi modulatori di GPR17, un recettore chiave nei processi di rimielinizzazione
Progetto speciale € 100.000 - 1 anno

COMITATO SCIENTIFICO FISM 2014

FISM SCIENTIFIC COMMITTEE 2014

BIOMEDICAL RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Luciano Adorini
Chief Scientific Officer - Intercept Pharmaceuticals – MILANO

Clara Ballerini
Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Firenze – FIRENZE

Luca Battistini
IRCCS S. Lucia Neuroimmunology Unit European Centre for Brain Research – ROMA

Diego Centonze
Fondazione Santa Lucia IRCCS e Università di Tor Vergata, Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze – ROMA

Gabriela Constantin
Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università degli Studi di Verona – VERONA

Sandra D'Alfonso
Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale – NOVARA

Peter Goodfellow
Visiting Professor in Biosciences at the University of Kent, UK

Matilde Inglese
Mount Sinai School of Medicine – NEW YORK, USA

Paolo Muraro
Division of Experimental Medicine, Centre for Neuroscience, Imperial College London – LONDON, UK

Stefano Pluchino
Dept. of Clinical Neurosciences, Centre for Brain Repair and Wellcome Trust-MRC Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge – CAMBRIDGE, UK

Marco Salvetti
Neurologia e Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS), Sapienza Università di Roma – ROMA

Carla Taveggia
Unità di Interazioni Neurogliali, Dipartimento di Neuroscienze e INSPE, Ospedale San Raffaele, DIBIT – MILANO

Lawrence Wrabetz
Hunter James Kelly Research Institute (HJKRI), University at Buffalo – Buffalo NY, USA

SOCIAL & BEHAVIOURAL SCIENCE RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Maria Pia Amato
Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Università di Firenze – FIRENZE

Monica Falautano
Dipartimento di Neurologia, Servizio di Psicologia, Ospedale San Raffaele – MILANO

Jürg Kesselring
Kliniken Valens, Rehabilitation Centre Valens, Department of Neurology and Neurorehabilitation VALENS, Switzerland

Letizia Leocani
Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Dipartimento Neurologico – MILANO

Maura Pugliatti
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Sassari, Clinica Neurologica – SASSARI

Marco Rovaris
Fondazione Don Gnocchi, Unità Sclerosi Multipla, IRCCS Santa Maria Nascente – MILANO

Alessandra Solari
Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, – MILANO

DIRETTORE RICERCA SCIENTIFICA

Paola Zaratin
Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Fondazione Italiana Sclerosi Multipla – GENOVA

COMITATO SCIENTIFICO FISM 2013

FISM SCIENTIFIC COMMITTEE 2013

BIOMEDICAL RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Antonio Bertolotto
AOU S. Luigi Gonzaga, Centro di riferimento Regionale Sclerosi Multipla (CReSM) – Orbassano (TO)

Luca Battistini
IRCCS S. Lucia Neuroimmunology Unit European Centre for Brain Research – ROMA

Diego Centonze
Fondazione Santa Lucia IRCCS e Università di Tor Vergata, Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze – ROMA

Gabriela Constantin
Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università degli Studi di Verona – VERONA

Francesco Cucca
Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari – SASSARI

Roberto Furlan
Unità di Neuroimmunologia Clinica, Ospedale San Raffaele, DIBIT – MILANO

Peter Goodfellow
Visiting Professor in Biosciences at the University of Kent, UK

Matilde Inglese
Mount Sinai School of Medicine – NEW YORK, USA

Paolo Muraro
Division of Experimental Medicine, Centre for Neuroscience, Imperial College London – LONDON, UK

Stefano Pluchino
Dept of Clinical Neurosciences, Centre for Brain Repair and Wellcome Trust-MRC Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge – CAMBRIDGE, UK

Lawrence Wrabetz
Hunter James Kelly Research Institute (HJKRI), University at Buffalo – Buffalo NY, USA

SOCIAL & BEHAVIOURAL SCIENCE RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Franco Franchignoni
Fondazione Salvatore Maugeri, Istituto Scientifico di Riabilitazione – VERUNO (NO)

Olga Ciccarelli
Department Brain Repair and Rehabilitation, University College London, Institute of Neurology – LONDON, UK

Monica Falautano
Dipartimento di Neurologia, Servizio di Psicologia, Ospedale San Raffaele – MILANO

Peter Feys
REVAL Rehabilitation Research Center. BIOMED. University of Hasselt – DIEPENBEEK, Belgium

Maura Pugliatti
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Sassari, Clinica Neurologica – SASSARI

Marco Rovaris
Fondazione Don Gnocchi, Unità Sclerosi Multipla, IRCCS Santa Maria Nascente – MILANO

Alessandra Solari
Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta – MILANO

DIRETTORE RICERCA SCIENTIFICA

Paola Zaratin
Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Fondazione Italiana Sclerosi Multipla – GENOVA

LISTA DEGLI AUTORI / LIST OF THE AUTHORS

Agresti Cristina	91	Magliozzi Roberta	43
Bergamaschi Laura	56	Malucchi Simona	31
Boscia Francesca	105	Martinelli Vittorio	41
Bove Marco	22	Martire Serena	70
Chiocchetti Annalisa	102	Martucci Morena	38
D'Alfonso Sandra	51	Musio Silvia	61
De Simone Roberta	108	Pluchino Stefano	87
Di Luca Dario	59	Restivo Domenico Antonio	29
Falco Anna	79	Salvetti Marco	48
Falcone Marika Maria Caterina	67	Sambucci Manolo	73
Filippi Massimo	16, 19	Trompetto Carlo	26
Furlan Pier Maria	34	Tuosto Loretta	99
Furlan Roberto	85	Uccelli Antonio	94
Leocani Letizia	97	Valtorta Flavia	76
Lucca Liliana Elisa	64	Vinet Jonathan	82

Finito di stampare nel mese di maggio 2015
da Arti Grafiche Bicidi srl - Genova