

**SCLE
ROSI
MULTI
IPLA**
ONLUS
associazione
italiana

un mondo
libero dalla SM

LA **RICERCA**
SULLA SCLEROSI
MULTIPLA

**FINANZIATA DALLA FONDAZIONE
ITALIANA SCLEROSI MULTIPLA**

2016

2016

LA RICERCA SULLA SCLEROSI MULTIPLA

Finanziata dalla
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

A cura di
Roberta Guglielmino
Area Ricerca Scientifica AISM-FISM

Coordinamento editoriale
Manuela Capelli
Area Comunicazione e Ufficio Stampa AISM

Progetto grafico
Francesca Massa

Copyright 2016
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 9788871481203

INTRODUZIONE / INTRODUCTION**Mario A. Battaglia** 7

**CON LA NOSTRA RICERCA,
LA SCLEROSI MULTIPLA NON CI FERMA /
WITH OUR RESEARCH,
MULTIPLE SCLEROSIS WILL NOT STOP US**
Paola Zaratin 11

**NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ
DELLA VITA / NEUROREHABILITATION
AND QUALITY OF LIFE**

Franca Deriu 16

Valutazione neurofisiologica, dinamometrica e clinica degli effetti del Cross-Training in pazienti con SM: uno studio pilota

Neurophysiologic, dynamometric and clinical assessment of the cross-training effect in patients with MS: a pilot study

Patrizia Pantano 19

Plasticità strutturale in pazienti con SM e atassia: variazioni longitudinali della microarchitettura della sostanza bianca associate con il training propriocettivo

Structural plasticity in MS patients with ataxia: longitudinal changes in white matter microarchitecture associated with proprioceptive training

Giorgio Sandrini 22

Effetto della stimolazione spinale a corrente continua sul dolore nella SM: valutazione clinica, neurofisiologica e dell'attività del sistema endocannabinoide

Spinal direct current stimulation effects on pain in MS: clinical and neurophysiological assessment and evaluation of endocannabinoid system activity

Maria Assunta Rocca 25

Effetti della action observation therapy sulla riabilitazio-

ne dei deficit motori dell'arto superiore destro dominante nei pazienti con SM: uno studio esplorativo con RM strutturale e funzionale

Effects of action observation therapy on rehabilitation of motor deficits of the dominant right upper limb in patients with MS: an exploratory study with structural and functional MRI

Eleonora Tavazzi 29

Effetti della riabilitazione neuromotoria sulla plasticità cerebrale nella SM: studio di RM strutturale e funzionale randomizzato-controllato in doppio cieco

Using structural and functional MRI to assess the effects of motor rehabilitation on brain plasticity in MS: a double-blind, randomized, controlled study

**CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA
MALATTIA / DISEASE CLASSIFICATION
AND DIAGNOSIS**

Laura Bonzano 32

Performance motoria della mano come nuovo endpoint clinico quantitativo nella SM: valutazione longitudinale su pazienti CIS e correlazione con accumulo di disabilità e integrità tissutale alla RM

Hand motor performance as a new quantitative clinical endpoint in MS: longitudinal evaluation in patients with CIS and correlation with accumulation of disability and tissue integrity at MRI

Costanza Gianni 35

Tecniche multimodali di neuro-immagini per lo studio della patologia corticale nella SM

Multimodal imaging of cortical pathology in MS

Claudia Verderio 38

Potenziale patogenico e diagnostico delle microvesicole rilasciate dalla microglia nella SM

Pathogenic and diagnostic potential of microvesicles derived from microglia in MS

- Andrea Cossarizza** 42
 Fenotipo e polifunzionalità delle cellule iNKT periferiche come marcatore immunologico delle diverse forme di SM e dopo diverse terapie immunomodulatorie
 Phenotype and polyfunctionality of peripheral blood iNKT cells as an immunological marker for different forms of MS and following different immunomodulatory treatments
- Maria di Ioia** 45
 Sviluppo di metodi di estrazione dei lipidi liquorali ed applicazione di tecniche di spettrometria di massa per la caratterizzazione del profilo lipidico e dei livelli di neurosteroidi nei pazienti SM
 Development of methods for lipid extraction from CSF and application of mass spectrometry techniques for the characterization of the lipid profile and of neurosteroids levels in MS patients
- PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / PATHOGENESIS AND RISK FACTORS**
- Francesco Cucca** 49
 Approccio razionale per la ricerca di composti per la cura della SM basato sull'analisi dei target biologici individuati dagli studi di associazione sull'intero genoma in Sardegna
 Rational design of new candidate compounds for MS treatment based on analysis of biological targets identified through genome wide association studies in Sardinia
- Linda Ottoboni** 52
 Approccio traslazionale per studiare il ruolo del gene ZFP36L1 nella sclerosi multipla: nesso tra stomaco e cervello
 A translational approach to dissect the functional role of ZFP36L1 in MS: connection between brain and gut
- Maria Teresa Cencioni** 55
 Studio dei linfociti CD8+CD57+ nella risposta al virus Epstein Barr ed il loro ruolo nella SM
 CD8+CD57+T cells in response to Epstein Barr Virus and in MS
- Giuseppe Mameli** 57
 Studio sulla risposta immune di HERV-W e EBV in pazienti sardi con SM e controlli
 Study on HERV-W and EBV humoral- immunity response in MS sardinian patients and healthy control
- Massimiliano Di Filippo** 60
 Inibizione mitocondriale ed encefalomielite autoimmune sperimentale: possibili strategie neuroprotettive
 Mitochondrial inhibition and experimental autoimmune encephalomyelitis: possible neuroprotective strategies
- Cinthia Farina** 63
 Un ruolo per gli astrociti nell'infiammazione e demielinizzazione del sistema nervoso centrale
 A role for astrocytes in central nervous system inflammation and demyelination
- Roberta Brambilla** 66
 L'effetto di rimielinizzazione del Tumor Necrosis Factor di membrana: studio specifico del ruolo del Tumor Necrosis Factor Receptor 2
 The pro-remyelination effect of transmembrane Tumor Necrosis Factor: investigation into the role of Tumor Necrosis Factor Receptor 2
- Fabrizia Claudia Guarnieri** 69
 Effetti modulatori di citochine pro- e anti-infiammatorie sulle vie di trasduzione e sulla composizione molecolare delle terminazioni nervose
 Modulatory effects of pro- and anti-inflammatory cytokines on signalling pathways and molecular composition of nerve terminals
- Antonino Cattaneo** 72
 Correlazione fra sbilanciamento proNGF/NGF e sinaptopatia infiammatoria in un modello animale di SM
 Linking proNGF\NGF imbalance to the inflammatory synaptopathy in a mouse model of MS
- Silvia Dusi** 75
 Visualizzazione e caratterizzazione delle dinamiche delle cellule T nel sistema nervoso centrale in corso di encefalomielite autoimmune sperimentale
 Visualization and characterization of T cell dynamics in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis

Barbara Rossi 78

Ruolo delle cellule T regolatorie CD4+CD25+ nella modulazione dell'autoimmunità nel sistema nervoso centrale in corso di encefalomielite sperimentale autoimmune
 Role of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the modulation of autoimmunity in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis

Valerio Chiurchiù 81

Plasticità e polarizzazione dei macrofagi nella SM: in "ex vivo" veritas
 Macrophage plasticity and polarization in MS: in "ex vivo" veritas

**VERSO NUOVI TRATTAMENTI /
 TOWARDS NEW TREATMENTS**

Rosetta Pedotti 85

Le prokineticine nelle malattie demielinizzanti autoimmuni del sistema nervoso centrale: possibili nuovi target di terapia per la SM
 Prokineticins in autoimmune demyelinating disease of the central nervous system: possible novel targets of therapy for MS

Erica Butti 88

Ruolo diretto e indiretto dei precursori endogeni neurali nella demielinizzazione e remielinizzazione dopo danno indotto da cuprizone
 Direct and indirect role of endogenous neural precursor cells in demyelination and remyelination after cuprizone-induced injury

Claudia Cantoni 91

Ruolo del miR-223 nella SM e nel suo modello animale
 Role of miR-223 in MS and its animal model

Diego Fresegna 94

Il potenziale coinvolgimento dell'interleuchina-1beta nelle alterazioni dell'umore in un modello animale di SM
 Potential involvement of interleukin-1beta in mood alteration in a mouse model of MS

Miriam Mattoscio 97

Rilevanza clinica del diverso effetto della terapia con anticorpo monoclonale anti alfa-4 integrina sulla mobilitazione di cellule staminali ematopoietiche in pazienti con SM
 Clinical relevance of the differential increase of circulating haematopoietic stem cells following therapeutic alpha 4-integrin blockade in MS

Claudia Minici 101

Caratterizzazione strutturale e biochimica della peptidil-arginina deiminasi 2, una proteina coinvolta nella destabilizzazione della guaina mielinica nella SM
 Structural and biochemical characterization of peptidyl-arginine deiminase 2, a protein that contributes to the destabilization of the myelin sheath in MS

Simone Patergnani 104

Analisi della funzionalità e dell'energetica mitocondriale come caratteristiche principali del differenziamento oligodendrocitario
 Quality and dynamics of mitochondria as key features of oligodendrocyte differentiation

**PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO
 FINANZIATI DALLA FISM /**

**FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS
 AND FELLOWSHIPS**

2015, 2014 110-114

COMITATO SCIENTIFICO FISM /

FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

2015, 2014 120-124

LISTA DEGLI AUTORI /

LIST OF THE AUTHORS

126



Introduzione

Il primo seme di AISM è nato da una riunione tenutasi il 16 dicembre 1967 in casa del dottor Giorgio Valente e della moglie Bianca Maria Merini, che aveva la SM, insieme a *“un gruppo di pazienti di sclerosi multipla, i loro parenti, neurologi, assistenti sociali e altre persone interessate ai grandi problemi medici e sociali posti da questa malattia”*, racconta il verbale di quel primo incontro.

All'inizio di un percorso che dura da quasi 50 anni c'è dunque l'incontro tra la medicina, le persone con SM e “un gruppo” di volontari e di professionisti socio-sanitari. E c'è l'intenzione chiara di “risolvere problemi” reali, di “cambiare lo stato delle cose” perché non fosse più ovvio che avere la sclerosi multipla dovesse significare rinunciare a vivere la propria vita.

Allora si parlava ancora di “pazienti”, ma nel 1988 la relazione annuale dell'allora Consiglio Direttivo sottolineò che “l'Associazione è l'insieme delle persone con SM e di tutti coloro che vogliono dare loro una mano”.

Questa è AISM: un insieme grande, un organismo vitale dove le persone con sclerosi multipla - come soggetti attivi e non come passivi e pazienti fruitori delle scelte altrui - sono il cuore, gli azionisti di maggioranza, il punto di partenza e di arrivo di ogni iniziativa e progetto, che non sono mai l'azione e il progetto di un singolo, per quanto importante, ma sempre una conquista collettiva di tanti per tutti.

Per questo, da allora, AISM ha finanziato 374 ricercatori, investendo sino ad oggi un totale di 56,8 milioni di euro in ricerca.

Per questo oggi l'Associazione nata da quel piccolo seme ha 100 Sezioni territoriali, 17 Coordinamenti Regionali, 10.163 volontari e 263 dipendenti e collaboratori.

Per lo stesso motivo nel 2014 (ultimo dato disponibile) 133.139 italiani hanno indicato la Fondazione di AISM come destinataria del proprio cinque per mille.

Per questo, ancora, AISM nel 2015 è stata a parlare di SM in Senato ed è stata protagonista della definizione di Percorsi Diagnostico Terapeutico Assistenziali specifici per la SM in 8 regioni [1]: perché la risposta ai problemi sociali e sanitari della SM viene solo da un grande movimento di persone che contribuiscono allo stesso obiettivo, ognuno con il proprio apporto, unico, prezioso e insostituibile.

Dentro questa lunga scia di conquiste e scelte concrete, l'Associazione ha scritto e diffuso tra Istituzioni e cittadini la Carta dei Diritti delle persone con sclerosi multipla, firmata nel 2014 anche da tutti i ricercatori legati alla Fondazione di AISM.

Per questo poi, nel 2015, è stata presentata e condivisa l'Agenda della Sclerosi Multipla 2020, che chiede una ricerca di eccellenza e sinergie nazionali e internazionali, ma anche percorsi personalizzati di presa in carico, una rete di Centri clinici riconosciuta e rispondente ad adeguati standard sanitari e assistenziali, la garanzia dell'accesso immediato ed equo a tutti i farmaci necessari, la certezza di percorsi di riabilitazione personalizzati, valutazioni adeguate dell'invalidità, l'effettività dell'inserimento lavorativo, la garanzia di un'informazione completa e sicura, il potenziamento dell'inclusione sociale delle persone con SM.

E quest'anno, a completamento del percorso iniziato con la Carta dei Diritti e con l'Agenda della SM 2020, AISM presenta ufficialmente il primo Barometro della Sclerosi Multipla, la fotografia dell'oggi e una serie di indicatori attraverso cui misurare l'impatto reale delle politiche sociali e sanitarie e delle risorse investite nel cambiare in meglio la vita delle oltre 100.000 persone con SM e dei loro familiari che si stima vivano in Italia.

Anzi, è giunto il momento di passare da questa stima di prevalenza della SM a un dato di dettaglio reale. AISM già nel 1975 propose al Ministero della Sanità la prima indagine epidemiologica in Italia sulla sclerosi multipla: quest'anno la Fondazione di AISM è stata l'anima del nuovo Progetto di ricerca dedicato alla co-

stituzione del Registro Italiano di Sclerosi Multipla, per mettere a fuoco, con l'apporto di tutti i Centri clinici SM, una fotografia nitida della realtà della malattia in tutti i suoi aspetti. Sapere quanti siamo sarà una delle prime conquiste prodotte dal nuovo Barometro della SM, la base per tante altre scelte di politica sanitaria e sociale.

Sempre con l'impulso del nuovo Barometro intendiamo anche misurare i costi sanitari e sociali della SM, le risorse necessarie a massimizzarne l'efficacia, l'impatto delle politiche di welfare, il valore dei Centri clinici rispetto alle attese delle persone, l'effettivo cambiamento generato dall'accesso ai farmaci, anche sintomatici, alla riabilitazione, ai servizi territoriali, al lavoro, a una vita sociale attiva. Così intendiamo lavorare con tutti gli attori coinvolti per colmare le criticità e rispondere alle domande ancora prive di risposta delle persone con sclerosi multipla.

In questa impegnativa sfida, che vogliamo vincere entro il 2020, il mondo della ricerca scientifica ha un ruolo fondamentale.

Come ha scritto Rita Levi - Montalcini, amato Presidente onorario di AISM "ci muove l'enorme passione per i problemi scientifici e sociali. La scienza, che ha come obiettivo la ricerca della verità, ha un fondamento etico. La scienza è per l'uomo e non viceversa. La regola che noi scienziati dobbiamo sempre avere è quella dell'impegno civile" [2].

L'impegno della ricerca e quello civile, le soluzioni dei problemi scientifici e di quelli sociali vanno sempre di pari passo.

Se dunque lavoriamo insieme, come abbiamo sempre fatto, giorno dopo giorno, senza isolarci ciascuno nella propria sede istituzionale, nel proprio scopo individuale, ma tenendo aperto l'impegno intelligente a ogni possibile collaborazione nazionale e internazionale, con tutti gli attori impegnati ad affrontare a ogni livello la sclerosi multipla, allora ci accorgeremo che questa malattia complessa non può fermare nessuna vita.

E nel 2020 toccheremo tutti con mano quel mondo che la Carta dei Diritti, l'Agenda della Sclerosi Multipla e il Barometro della SM hanno delineato con visione e concretezza.

Mario Alberto Battaglia

Presidente Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

¹ Fonte : Bilancio Sociale AISM 2015

² Rita Levi Montalcini, La clessidra della vita, Baldini Dalai Castoldi, 2009 pag. 84-86

Introduction

The Italian Multiple Sclerosis Society (AISM, *Associazione Italiana Sclerosi Multipla*) originated from a meeting that took place on December 16th, 1967 at the home of Dr. Giorgio Valente and his wife Bianca Maria Merini' house, who had multiple sclerosis (MS), together with *“a group of MS patients, their families, neurologists, social workers and other people interested in the significant medical and social problems caused by this disease”*, according to the memorandum of that first meeting.

Therefore, at the beginning of a nearly 50-year journey, there was a meeting between the medical profession, people with MS and “a group” of volunteers and healthcare professionals. And there was a clear intention to “solve real problems”, to “change the state of things”, so that having multiple sclerosis would not necessarily mean giving up on living one's own life.

Then, we still talked about “patients”, but in 1988 the annual report of the then Board stressed that “the Society is made up of people with MS and all those who want to help them”.

This is AISM: a great group, a vibrant organisation where people with multiple sclerosis (as active rather than passive people or patients who benefit from someone else's choices) are the heart of the group, the majority shareholders, the starting and end points of each initiative and project, which are never the result of action and planning by an individual, however important, but always the collective achievement of everyone for everybody.

For this reason, since then, AISM has funded 374 researchers, investing, to date, 56.8 million euros into research.

For this reason, the Society that originated from that first meeting now has 100 regional MS Branches, 17 Regional Coordination Offices, 10,163 volunteers and 263 employees and partners.

For the same reason, in 2014 (latest available data) 133,139 Italians decided to assign 5% of their income tax to the AISM Foundation.

For this reason, again, AISM in 2015 addressed the Italian Parliament on the topic of MS and was prominent in formulating the definition of Diagnostic-Therapeutic Healthcare Procedures specific to MS in 8 regions [1]: because the answer to social and healthcare problems related to MS comes from a large movement of people who contribute to the same goal, each person with his own unique, precious and irreplaceable contribution.

In the context of this long list of achievements and concrete choices, the Society has written and circulated among institutions and citizens the Bill of Rights for people with multiple sclerosis, signed in 2014 including by all the researchers connected to the AISM Foundation.

Moreover, therefore, in 2015, the 2020 Multiple Sclerosis Agenda was presented and agreed, calling for high quality research and national and international synergies, but also personalized care management plans, a recognized network of clinical centres adhering to adequate healthcare and welfare standards, the guarantee of the immediate and fair access to all necessary medicines, the certainty of personalized rehabilitation programmes, adequate disability assessments, effective integration into the labour market, the guarantee of complete and safe information, and the enhancement of social inclusion for people with MS.

And this year, to complete the process that began with the Bill of Rights and the 2020 MS Agenda, AISM officially presents the first Multiple Sclerosis Barometer, a picture of the present situation and a series of indicators through which it is possible to measure the real impact of social and healthcare policies and of the resources invested in improving the lives of over 100,000 people with MS who are estimated to live in Italy and their families.

Indeed, the time has come to move from this estimate of MS prevalence towards actual detailed data. As far back as 1975, AISM suggested to the Ministry of Health that the first epidemiological survey in Italy on multiple sclerosis be performed: this year the AISM Foundation has been the soul of the new research project dedicated to the establishment of the Italian Register of Multiple Sclerosis, to obtain, with the contribution of all MS clinical centres, a clear picture of the reality of the disease in all its aspects. One of the first achievements produced by the new MS Barometer, will be to reveal the number of people with MS, the basis for many other healthcare and social policy choices.

Using the new Barometer we also aim to measure the healthcare and social costs of MS, the necessary resources to maximize effectiveness, the impact of welfare policies, the value of clinical centres compared to people's expectations, the real change generated by access to medicines, including symptomatic ones, to rehabilitation, to local services, to work and to an active social life. This is how we aim to work, with all the parties involved to resolve critical problems and respond to the still unanswered questions of people with multiple sclerosis.

In this demanding challenge, which we want to achieve by 2020, the world of scientific research plays a vital role.

As written by Rita Levi - Montalcini, the much loved Honorary President of AISM, "we are driven by an enormous passion for scientific and social problems. Science, which has the purpose of searching for truth, has an ethical foundation. Science is for man and not vice versa. The rule that we scientists must always respect is social commitment" [2].

Research and social commitment, and solutions to scientific and social problems go hand in hand.

Therefore, if we work together, as we have always done, day after day, without isolating ourselves in separate institutional forums, for our individual purposes, but engaging with the intelligent commitment to any possible national and international cooperation, with all the participants committed to combatting multiple sclerosis at every level, then we will realize that this complex disease cannot stop anyone's life.

And in 2020 we will see that world outlined with vision and concreteness by the Charter of Rights, the MS Agenda and the MS Barometer.

Mario Alberto Battaglia

President of the Italian Multiple Sclerosis Foundation

¹ Source: AISM Social Report 2015

² Rita Levi Montalcini, *La clessidra della vita*, Baldini Dalai Castoldi, 2009 pgs. 84-86

Con la nostra ricerca, la sclerosi multipla non ci ferma

«**C**on la nostra ricerca, la sclerosi multipla non ci ferma», questo è il tema della Giornata Mondiale e della Settimana Nazionale della SM 2016.

Forse nessuna malattia come la sclerosi multipla ha ricevuto risposte innovative e rivoluzionarie negli ultimi 25 anni. Per poche altre malattie la ricerca ha compiuto passi da gigante come per questa.

Questo Compendio è un esempio dei passi della ricerca verso una classificazione, una diagnosi e un monitoraggio dell'andamento di malattia sempre più appropriati, efficaci e personalizzati, una comprensione sempre più puntuale della patogenesi e dei fattori di rischio, il tenace lavoro per valutare se i fattori individuati possono diventare bersaglio di nuovi trattamenti terapeutici, l'identificazione di nuovi percorsi di neuro riabilitazione, che dimostrano l'impatto della riabilitazione sulle funzionalità e sulla struttura del sistema nervoso centrale e sulla qualità di vita.

Ritroviamo dunque attraverso le presentazioni 29 ricercatori, 18 Progetti di ricerca e 11 Borse di Studio, riportate in questo Compendio, la fotografia di una ricerca di base innovativa e di eccellenza che si costruisce in sinergia stretta con una ricerca traslazionale e clinica.

Siamo dunque protagonisti attivi del mondo della ricerca che, a livello nazionale e internazionale, lavora in sinergia per costruire un futuro immediato e migliore per la SM.

E questo è già tanto.

Eppure non è abbastanza.

Per questo, già da domani mattina, dobbiamo imparare meglio a misurare l'impatto della ricerca sulla persona con SM.

Non ci basta più sapere e fare sapere che la ricerca finanziata da AISM nel 2015 ha prodotto 133 pubblicazioni sulle principali riviste internazionali con un *impact factor* medio di 6.01: non conta sapere solo su quali riviste abbiamo scritto e quanti altri ricercatori citano e utilizzano i nostri studi, vogliamo riconoscere come ognuna delle nostre ricerche scrive un futuro diverso per ciascuna persona con SM.

Lo dobbiamo e lo vogliamo fare perché l'abbiamo promesso in modo programmatico nella Carta dei Diritti, che tutti i ricercatori della comunità scientifica della SM hanno firmato: «Tutte le persone con SM hanno diritto a una ricerca scientifica rigorosa, innovativa e di eccellenza, orientata a scoprire le cause, comprendere i meccanismi di progressione e le potenzialità di riparazione del danno, individuare e valutare i possibili trattamenti specifici, con ricadute concrete per una vita di qualità in ogni fase della malattia»³.

Lo dobbiamo e lo vogliamo fare perché questo impegno programmatico ha generato l'Agenda SM 2020 che recepisce le priorità dell'Agenda Internazionale della ricerca e identifica le attività strategiche per declinarle nel contesto nazionale in modo da promuovere l'impatto collettivo della ricerca sulla persona: impegno pubblico, coinvolgimento di tutti gli stakeholder, investimenti adeguati per le strutture funzionali alla ricerca, formazione e carriera dei ricercatori e risorse adeguate per una promozione diversificata della ricerca. In linea con la nostra mappa strategica di promozione della ricerca, attraverso i nostri progetti speciali ci siamo preparati a vincere questa sfida. Il consistente impegno internazionale nella Progressive Multiple SclerosisMS Alliance (PMSA) per il **trattamento delle forme progressive di malattia; velocizzare l'accesso a nuovi farmaci** (repurposing); la condivisione dei dati clinici attraverso il Registro Italiano della SM e l'Italian Network of Neuro Imaging -INNI per una **diagnosi della malattia e trattamenti sempre più mirati**; lo sviluppo di **nuove scale scientifiche che misurano la prospettiva della persona con SM** riguardo all'efficacia dei trattamenti farmacologici e riabilitativi a cui sceglie di aderire; la creazione di una rete di ricercatori dedicati ad assicurare la qualità dei dati scientifici sono alcune delle iniziative che già rispondono alle priorità dell'Agenda SM.

Nel 2016 il Movimento AISM si dota del Barometro della SM che si propone di essere uno strumento fondamentale per misurare nel tempo l'impatto dell'Agenda SM sulla persona. La prossima sfida che ci aspetta è identificare nuovi strumenti per misurare l'impatto collettivo delle nostre ricerche sulla persona. Perché questo sia possibile le persone con SM parteciperanno attivamente alle scelte, ai processi ed ai percorsi di ricerca scientifica, saranno i primi a fare sentire la propria voce presso istituzioni e industria perché raccolgano i risultati prodotti dagli sforzi della comunità scientifica della SM e massimizzino l'impatto collettivo che la ricerca può avere sul sistema complessivo della presa in carico.

Paola Zarin

Direttore Ricerca Scientifica Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

³ Carta dei Diritti delle Persone con Sclerosi Multipla, pag. 3

With our research, multiple sclerosis will not stop us

«With our research, multiple sclerosis will not stop us», this is the theme of the World MS Day and National MS Week 2016.

Perhaps no other disease such as multiple sclerosis has received as many innovative and revolutionary solutions in the last 25 years. Research has made such great strides only for a few other diseases.

This Compendium is an example of the research steps towards better and personalized classification, a diagnosis and monitoring of the disease, an increasingly accurate understanding of the pathogenesis and risk factors, the hard work to assess whether the factors identified can become the target of new therapeutic treatments, the identification of new neurorehabilitation programmes, which demonstrate the impact of rehabilitation on the functions and structure of the central nervous system and on the quality of life.

Therefore, through the presentation of 29 researchers, 18 research projects and 11 fellowships, provided in this Compendium, we can see innovative and excellent basic research, which is built in close collaboration with clinical and translational research.

Therefore, we are active participants in the world of research, which, at national and international levels, works together to build a better near future for MS.

And this is already a great achievement.

However, it is not enough.

For this reason, starting from tomorrow morning, we must better learn how to measure the impact of research on people with MS.

It is no longer enough to know and share that the research funded by AISM in 2015 produced 133 publications in leading international journals with an average *impact factor* of 6.01: it is not important only to know in which journals we have published and how many other researchers cite and use our studies, we want to establish how each of our research activities contributes towards a different future for each person with MS.

We must and we want to do this because we have promised it systematically in the Bill of Rights, which all researchers of the MS scientific community have signed: “All people with MS are entitled to rigorous, innovative and excellent scientific research, oriented to discover the causes, understand the mechanisms of progression and the potential repair of the damage, identify and evaluate the possible specific treatments, with concrete implications for a quality life at every stage of the disease”.

We must do this and we want to do this because this systematic commitment generated the 2020 MS Agenda which takes the International Research Agenda priorities into account and identifies strategic activities to adapt them to the national context in order to promote the collective impact of research on the person: public commitment, involvement of all stakeholders, adequate investment for functional structures for research, researcher training and career opportunities and adequate resources for diversified research promotion. In line with our strategic map for promoting research, through our special projects we have prepared to meet this challenge. The substantial international commitment in the Progressive Multiple Sclerosis Alliance (PMSA) for the **treatment of progressive forms of the disease; speeding up access to new treatments** (repurposing); sharing clinical data through the Italian MS Register and the Italian Network of Neuro Imaging -INNI for a more targeted **diagnosis and treatments; the development of new scientific scales that measure the prospects of the person with MS** in relation to the effectiveness of pharmacological and rehabilitative treatments to which he/she decides to receive; and the creation of a researcher network dedicated to ensure the quality of the scientific data, are some of the initiatives that already meet the priorities of the MS Agenda.

In 2016, the AISM Movement is equipped with the MS Barometer, which aims to be a key tool in measuring the impact of the MS Agenda on the person over time. The next challenge we have to meet is the identification of new tools to measure the collective impact of our research activities on the person. In order to achieve this purpose, people with MS will actively participate in the choices, processes and scientific research programmes and will be the first to make their voices heard by institutions and industry, so that the results produced by the efforts of the MS scientific community can be collected and the collective impact that research can have on the overall care management system can be maximised.

Paola Zaratini

Director of Scientific Research for the Italian Multiple Sclerosis Foundation

³ Charter of Rights for People with Multiple Sclerosis, pg. 3



NEURORIABILITAZIONE
E QUALITÀ DELLA VITA

NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Franca Deriu

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Sassari

COLLABORATORI:

Andrea Manca, Maria Paola Cabboi, Enzo Ortu, Francesco Pisanu, Francesca Ginatempo, Giovanni Mureddu, Maura Pugliatti, Roberto Zarbo, John C. Rothwell, Daniele Dragone

Valutazione neurofisiologica, dinamometrica e clinica degli effetti del cross-training in pazienti con sclerosi multipla: uno studio pilota

PREMESSE E OBIETTIVI

La debolezza muscolare è una grave disabilità che riduce marcatamente la qualità di vita (QoL) delle persone con sclerosi multipla (SM). La ricerca scientifica ha dimostrato che il training standard (ST) ha effetti benefici significativi sulle attività della vita quotidiana delle persone con SM, portando ad un aumento della QoL. Quando il deficit di forza è prevalentemente lateralizzato ad un arto, il training è comunemente indirizzato al lato più debole per bilanciare il deficit. Tuttavia, questo ST non è sempre applicabile ad un arto gravemente indebolito e troppo compromesso per sostenerlo. Per questi pazienti, ipotizziamo che il training dell'arto meno affetto con un Cross-Training (CST) possa superare il problema evitando, tra l'altro, frustrazione per il paziente con conseguente abbandono del programma riabilitativo. Per CST si intende un fenomeno inter-arto per cui l'esercizio di un arto può indurre un trasferimento di forza o abilità all'arto controlaterale non allenato.

L'obiettivo di questo studio pilota era quello di comparare in due gruppi omogenei di persone con SM con una marcata asimmetria di forza agli arti inferiori, gli effetti indotti su parametri dinamometrici, neurofisiologici e clinico-funzionali da un CST dell'arto meno affetto (gruppo CST) rispetto agli effetti indotti da un ST dell'arto più affetto (gruppo ST).

A tale scopo, 20 pazienti con SM recidivante-remitte (17F:3M; 41.3 ± 11.4 anni; 61.7 ± 13.4 kg; EDSS mediano 3.5; durata di malattia 152.8 ± 104.4 mesi) con un deficit di forza prevalentemente unilaterale dei muscoli dorsiflessori della caviglia sono stati randomizzati in due gruppi: CST (n=10) e ST (n=10), sottoposti a 6 settimane di allenamento isocinetico/concentrico unilaterale (3 volte/sett., a velocità

angolari di $45^\circ/s$ e $10^\circ/s$) rispettivamente dell'arto meno affetto e dell'arto più affetto. Prima (PRE) e dopo (POST) il training sono stati valutati bilateralmente il picco di forza massima, la resistenza alla fatica e la performance del cammino (6-Minute-Walking-Test: 6MWT; Timed-Up-and-Go: TUG; 10 Meter-Walk-Test: 10MWT). Infine, dopo 12 settimane dalla fine del training, sono stati rivalutati i parametri dinamometrici e clinico-funzionali.

RISULTATI

Dopo 6 settimane di training, l'arto più affetto del gruppo CST ha mostrato incrementi significativi del picco di forza massimale ($+22.3\%$ a $45^\circ/s$; $+24.2\%$ a $10^\circ/s$) mentre il gruppo ST ha mostrato solamente una tendenza all'incremento di forza ($45^\circ/s$ $+8\%$; $10^\circ/s$ $+6.5\%$). La faticabilità muscolare era significativamente aumentata nel gruppo CST, con un trend di peggioramento nel gruppo ST, come indicato dai valori di forza media (CT $+107\%$; ST -7.3%) e lavoro totale (CST $+101\%$; ST -18.4%) effettuato durante il test di resistenza alla fatica. Dal PRE al POST, solo il gruppo CST è migliorato significativamente al 6MWT ($+8\%$) mentre entrambe i gruppi sono migliorati al TUG (CST -11.3% ; ST -19.2%) e al 10MWT (CST -9.7% ; ST -14.9%). Le registrazioni neurofisiologiche hanno dimostrato che l'eccitabilità intracorticale non è cambiata, dopo il training, in entrambe i gruppi, mentre nel gruppo CST la durata del periodo silente corticale (cSP) tendeva a diminuire nell'emisfero non allenato. Al follow-up, solo il gruppo CST mostrava ancora nell'arto più debole i miglioramenti della performance muscolare e della resistenza alla fatica.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio pilota suggeriscono che, in

persone con SM, il training diretto dell'arto più compromesso, che viene tradizionalmente utilizzato in riabilitazione è inefficace se non dannoso, dal momento che ha determinato un peggioramento di performance causato probabilmente da intolleranza all'esercizio. Al contrario, il gruppo CST ha mostrato un significativo miglioramento della forza non solo immediatamente dopo la fine del training, ma anche al follow-up. I dati neurofisiologici, ottenuti in questa fase dello studio, non sono conclusivi sia per la piccola dimensione del campione, sia per il fatto che nel 15% dei pazienti non è stato possibile eseguire i test neurofisiologici. Tuttavia, la tendenza ad un decremento della durata del cSP nell'emisfero non allenato indica che l'effetto del CST può essere sotteso da un incremento dell'eccitabilità corticale e del co-

mando discendente cortico-spinale ai muscoli dorsiflessori della caviglia.

In conclusione, questi dati preliminari mostrano per la prima volta che l'effetto CST si verifica in persone con SM che presentano una ipostenia degli arti inferiori prevalentemente unilaterale. Il training dell'arto meno affetto (CST) ha indotto un significativo trasferimento di forza all'arto più debole, che si è associato ad un miglioramento della performance nel cammino e ad un parallelo aumento dell'eccitabilità cortico-spinale.

Degno di nota è il fatto che il training indiretto dell'arto più affetto ha indotto un effetto marcato sulla fatica in termini di aumentata resistenza nel produrre lavoro muscolare durante uno sforzo muscolare sostenuto e prolungato.

Neurophysiologic, dynamometric and clinical assessment of the cross-training effect in patients with multiple sclerosis: a pilot study

INTRODUCTION AND AIMS

Muscle weakness is a major disability that is responsible for deeply reducing the overall quality of life (QoL) in people with multiple sclerosis (PwMS). Research has shown that strength training (ST) has a significant positive effect on the performance of daily living activities in PwMS, resulting in an increased QoL. When strength impairment is prominently lateralized to one limb, training is commonly addressed to the weaker side in order to balance the deficit. However, such ST may not always be applicable to a severely weakened limb that is too compromised to sustain it. For these selected patients we hypothesize that training the less affected limb with a Cross Training (CST) approach may overcome the problem, also avoiding patients' frustration and potential withdrawals from rehabilitation programs. CST refers to an inter-limb phenomenon whereby exercise on one limb can induce a transfer of strength or skills to the contralateral untrained limb.

The objective of this pilot project was to investigate and compare in two homogeneous groups of PwMS with a marked asymmetry in lower limb strength, the effects induced on dynamometric, neurophysiological, clinical and functional outcomes by a CST of the less-impaired leg (CST

group) compared to a ST of the more-impaired leg (ST group).

To this aim, 20 patients with relapsing-remittent MS (17F:3M; 41.3±11.4 years old; 61.7±13.4 kg; median EDSS 3.5; illness duration 152.8±104.4 months) with a predominant unilateral strength impairment of ankle dorsiflexion muscles were randomized in two groups: CST (n=10) and ST (n=10), who underwent a 6-week unilateral isokinetic/concentric training (3 times/week, at angular velocities of 45°/s and 10°/s) of the less-affected and more-affected limbs, respectively. Maximal-strength, fatigue endurance and functional measures (6-Minute-Walking-Test: 6MWT; Timed-Up-and-Go: TUG; 10 Meter-Walk-Test: 10MWT) and neurophysiological recordings were bilaterally performed before (PRE) and after (POST) training. A follow-up evaluation of strength and of clinic-functional outcomes was done after 12 weeks from the end of the training.

RESULTS

After the 6-week training, the more-affected limb of the CST group showed significant increases in maximal-strength (+22.3% at 45°/s; +24.2% at 10°/s) while the ST group only showed a trend of increase (45°/s: +8%; 10°/s: +6.5%). Muscle fatigability significantly improved in the CST, with a trend of

worsening in the ST, as indicated by mean torque values (CST: +107%; ST: -7.3%) and total work (CST: +101%; ST -18.4%) performed throughout the endurance test. From PRE to POST, only the CST group performed significantly better at the 6MWT (+8%) while both groups improved significantly at the TUG (CST: -11.3%; ST: -19.2%) and 10MWT (CST: -9.7%; ST: -14.9%). Neurophysiological recordings showed that intracortical excitability did not change in both groups, while the duration of the cortical silent period (cSP) tended to decrease in the untrained hemisphere of CST group. At the follow-up assessment of muscle performance and endurance improvements observed in the weaker limb were significantly retained only in the CST group.

CONCLUSIONS

The results of this pilot study strongly suggest that, in individuals with MS, where fatigue represents a serious concern, the conventionally employed direct training of a compromised limb might prove ineffective or even result in a worsening of muscle performance, possibly due to exercise intolerance. By contrast, the CST group showed significant im-

provements in strength, fatigability and functional tests not only immediately after the end of the training, but also at the follow-up.

At this stage of the study, neurophysiological data are not conclusive, partly due to the small sample size and to a 15% missing rate of patients who were not able to undergo neurophysiological protocols. However, the tendency to decrease of the cSP duration in the hemisphere innervating the untrained tibialis anterior indicates that the CT effect may be underpinned by an increase in cortical excitability leading to enhancement of the cortico-spinal drive to ankle dorsiflexor muscles.

In conclusion, these preliminary data show for the first time that the CST-effect occurs in PwMS presenting a prevalent unilateral hyposthenia of the lower limbs. The exercise training of the less affected limb (CST) induced a significant strength transfer to the weaker limb, which was associated to an improvement of walking performance and was paralleled by an increase in cortico-spinal excitability. Notably, the indirect training of the more-affected limb, via CST, induced a remarkable effect on fatigue in terms of its increased endurance in producing muscle work during a sustained motor task.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Manca A, Cabboi MP, Ortu E, Ginatempo F, Dragone D, Zarbo IR, De Natale ER, Mureddu G, Bua G, Deriu F. The Effect of Contralateral Strength Training on Muscle Weakness in People With Multiple Sclerosis: A Proof-of-Concept Case Series. *Phys Ther*. 2015 Dec 4. [Epub ahead of print] PMID: 266376451.

Manca A, Solinas G, Dragone D, Dvir Z, Deriu F. Characterization of ankle dorsiflexors performance in healthy subjects following maximal-intensity isokinetic resistance training. *J Electromyogr Kinesiol*. 2015 Oct;25(5):773-81.

Manca A, Pisanu F, Ortu E, De Natale ER, Ginatempo F, Dragone D, Tolu E, Deriu F. A comprehensive assessment of the cross-training effect in ankle dorsiflexors of healthy subjects: A randomized controlled study. *Gait Posture*. 2015 Jun;42(1):1-6.

Manca A, Pisanu F, Ortu E, De Natale ER, Ginatempo F, Dragone D, Tranquilli Lelai P, Deriu F. Isokinetic cross-training effect in foot drop following common peroneal nerve injury. *Isokinetics and Exercise Science* 2015, p. 17-20.

Manca A, Ortu E, Ginatempo F, Pisanu F, Tolu E, Deriu F. Does cross-training balance strength asymmetry in healthy subjects? A proof-of-concept trial. *Clinical neurophysiology*, (2014) vol. 125, p. S111-S112, ISSN: 1388-2457.

Manca A, Ortu E, Ginatempo F, De Natale ER, Pisanu F, Deriu F. Rehabilitation of drop-foot with maximal isokinetic cross-training: a case report. *Clinical Neurophysiology*, (2014) vol. 125, p. S113, ISSN: 1388-2457.

Manca A, Cabboi MP, Zarbo R, Ortu E, Dragone D, De Natale E, Mureddu G, Bua G, Pugliatti M, Deriu F. First evidence of the cross-training effect in multiple sclerosis. *Neurological sciences*, (2014) vol. 35, p. S12, ISSN: 1590-3478.

Manca A, Ortu E, Pisanu F, Ginatempo F, Mercante B, Dragone D, Tolu E, Deriu F. A comprehensive evaluation of the cross-training effect in ankle dorsiflexor muscles of healthy subjects. In: *Atti del convegno (2014) 1st Clinical Movement Analysis World Conference - 15th SIAMOC - 23rd ESMAC*. Roma, Italy, 29th September - 4th October 2014. Oral Presentation. Awarded as the Best Clinical Paper.

Manca A, Cabboi MP, Ortu E, Dragone D, Peruzzi A, Cereatti A, Mureddu G, Bua A, Deriu F. The cross-training effect on muscle performance in patient with multiple sclerosis: a pilot study. In: *Atti del convegno (2014) 1st Clinical Movement Analysis World Conference - 15th SIAMOC - 23rd ESMAC*. Roma, Italy, 29th September - 4th October 2014.

D'Angeli V, Cereatti A, Peruzzi A, Paolini G, Manca A, Deriu F, Bua G, Della Croce U. Kinematic and kinetic analysis of the effects of high intensity cross-training on gait in patients with multiple sclerosis. In: *Atti del convegno (2014) 1st Clinical Movement Analysis World Conference - 15th SIAMOC - 23rd ESMAC*. Roma, Italy, 29th September - 4th October 2014.

Mureddu G, Manca, Dragone D, Bua G and Deriu F. Time-course study on strength training In Multiple Sclerosis. 4th National Congress of the Italian Society of Physiotherapy – Florence, Italy, May 24-25, 2014.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2013, per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 29.000 €

Patrizia Pantano

Dipartimento di Neurologia e Psichiatria, Sapienza Università di Roma, Roma

COLLABORATORI:

Luca Prosperini, Nikolaos Petsas, Emilia Sbardella, Francesca Tona, Eytan Raz, Deborah Fortuna, Carlo Pozzilli

Plasticità strutturale in pazienti con SM e atassia: variazioni longitudinali della microarchitettura della sostanza bianca associate con il training propriocettivo

PREMESSE E OBIETTIVI

Il disturbo dell'equilibrio è un sintomo molto frequente nei pazienti con sclerosi multipla, ed è molto invalidante. Se da una parte, purtroppo, non esistono interventi farmacologici in grado di contrastare efficacemente questo disturbo, dall'altra esistono recenti evidenze cliniche che indicano un miglioramento dopo un adeguato programma di training propriocettivo. Il danno della sostanza bianca, così diffuso nei pazienti con sclerosi multipla, può alterare ed interrompere la connettività tra regioni cerebrali deputate all'integrazione di informazioni visive, vestibolari e somatosensoriali con gli effettori motori ed essere in questo modo alla base del disturbo.

L'imaging con il tensore di diffusione (DTI) permette di studiare non solo l'anatomia della sostanza bianca e la connettività strutturale, ma anche il rimodellamento di tratti di sostanza bianca. Noi pensiamo che questa tecnica possa rivelare sia le anomalie focali della sostanza bianca correlate con il disturbo dell'equilibrio sia le modificazioni focali nella microarchitettura della sostanza bianca associate con il miglioramento clinico ottenuto con il programma di training propriocettivo.

Questo è stato uno studio pilota prospettico, randomizzato, volto ad indagare l'efficacia di un training per migliorare l'equilibrio in persone con sclerosi multipla, della durata di 12 settimane, svolto presso il proprio domicilio con un sistema video-gioco-balance board (WBBS).

RISULTATI

I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi (A e B). Il gruppo A ha iniziato un periodo di 12 settimane con il training WBBS (periodo di intervento), seguito da un periodo di 12 settimane libero da

qualsiasi intervento riabilitativo (periodo di osservazione). Al gruppo B è stato dato il trattamento in ordine inverso.

Durante il periodo attivo di 12 settimane, ogni paziente ha eseguito cinque sedute settimanali di 30 minuti di allenamento ognuna, a domicilio con il WBBS. Il protocollo di allenamento consisteva nella ripetizione di diversi giochi (selezionati dal pacchetto Wii Fit Plus, Nintendo).

I pazienti sono stati testati mediante valutazione clinica, e sottoposti a posturografia e a una risonanza magnetica (RM) che includeva lo studio del tensore di diffusione (DTI) con magnete da 3T al basale (T0), alla fine del primo periodo di 12 settimane (T1), e, infine, alla fine dello studio di 24 settimane (T2).

I dati DTI sono stati analizzati con il pacchetto MedINRIA 1.9.0 (Asclepios Research Team, Sophia Antipolis Cedex, Francia, <http://www-sop.inria.fr/asclepios>) che ha permesso di ricostruire i peduncoli cerebellari inferiore, medio e superiore, il fascio fronto-occipitale, il fascicolo longitudinale inferiore, il corpo calloso, la capsula interna e la corona radiata. Su ogni tratto della sostanza bianca sono stati calcolati quattro parametri DTI: anisotropia frazionaria (FA), media diffusività (MD), diffusività radiale (RD) e diffusività assiale (AD).

Ventisette pazienti (13 randomizzati al sottogruppo A e 14 randomizzati al sottogruppo B) hanno completato il protocollo di RM cerebrale di serie. Non sono state osservate differenze nelle caratteristiche cliniche e radiologiche tra i pazienti del gruppo A o B.

L'analisi della varianza per misure ripetute ha mostrato effetti significativi del tempo, del gruppo e dell'interazione tempo x gruppo della FA peduncolo cerebellare superiore di sinistra e di destra ($F_{2,23} = 5.555$, $p = 0,036$; e $F_{2,23} = 4,198$, $p = 0,047$, rispet-

tivamente). È stato anche osservato un effetto significativo dell'interazione tempo x gruppo della RD del peduncolo cerebellare superiore sinistro ($F_{2,23} = 5,014$, $p = 0,042$) e un effetto marginale dell'interazione tempo x gruppo della RD del peduncolo cerebellare superiore destro ($F_{2,23} = 3.450$, $p = 0,088$). Inoltre, abbiamo osservato correlazioni significative tra il miglioramento alla posturografia e la FA del peduncolo cerebellare superiore (a sinistra: $r = 0,401$, $p = 0,038$; a destra: $r = 0.395$, $p = 0,042$). Al contrario, non vi era alcun effetto significativo di tempo, gruppo, e interazione tempo x gruppo dei parametri DTI sia dei peduncoli cerebellari medio e

inferiore, sia del corpo calloso, corona radiata, fascio fronto-occipitale e fascicolo longitudinale inferiore di ambo i lati. Lo studio ha soddisfatto gli obiettivi di partenza del progetto finanziato.

CONCLUSIONI

Il miglioramento clinico osservato dopo il training potrebbe essere mediato da processi avanzati di rimielinizzazione delle fibre dei peduncoli cerebellari superiori; questi dati suggeriscono che esercizi specifici svolti ad alta intensità possono indurre cambiamenti microstrutturali nel cervello di persone con sclerosi multipla.

Structural plasticity in MS patients with ataxia: longitudinal changes in white matter microarchitecture associated with proprioceptive training

INTRODUCTION AND AIMS

Balance impairment, which is frequently observed in patients with multiple sclerosis (MS), is one of the most disabling symptoms of this disease. While pharmacological interventions aimed at improving balance disturbances in MS patients have proved ineffective, there is recent clinical evidence that MS patients with ataxia can improve their balance through proprioceptive training. Diffuse white matter (WM) damage may affect the connectivity between cerebral regions deputed to the integration of visual, vestibular and somatosensory information with motor effectors. Diffusion Tensor Imaging (DTI) allows us to study WM anatomy and structural connectivity, as well as the remodeling of WM tracts. We are confident that DTI can reveal both focal WM abnormalities significantly correlated with balance disturbance and focal WM changes associated with clinical improvement after proprioceptive training in patients with MS and ataxia.

This was a prospective study of an independent, randomized, two-period crossover pilot study to investigate the effectiveness and safety of 12-week home-based balance training with a video game balance board system (WBBS), as detected at static posturography.

RESULTS

Patients were randomly assigned to two groups (A and B). Group A started a 12-week period of home-

based WBBS training (intervention period), followed by a 12-week period without any intervention or specific training (observation period). Group B was given the treatment in reverse order.

During the 12-week active period, each patient committed to five weekly 30-minute sessions of home-based training with the WBBS. Training protocol consisted of repetitions of several games (selected from the Wii Fit Plus package, Nintendo).

Patients were tested by means of clinical evaluation, and underwent static posturography and brain 3T MR imaging (including diffusion tensor imaging-DTI) at baseline (T0), at the end of the first 12-week period (T1), and finally, at the end of the 24-week study period (T2). DTI data were analysed by using MedINRIA package 1.9.0 (Asclepios Research Team, Sophia Antipolis Cedex, France, <http://www-sop.inria.fr/asclepios>) that has dissected the left and right inferior, middle, and superior cerebellar peduncles, the fronto-occipital and inferior longitudinal fasciculi, the corpus callosum and left and right internal capsules and corona radiata. On each white matter tracts four DTI parameters were calculated: fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), radial diffusivity (RD) and axial diffusivity (AD).

Twenty-seven patients (13 randomized to group A and 14 randomized to group B) completed the serial brain MR imaging protocol. There were no differences in clinical and radiological characteristics between patients randomized to groups A or B.

Repeated measures analyses of variance showed significant effects of time by group interaction on FA of the left and right superior cerebellar peduncles ($F_{2,23} = 5.555$, $p = .036$; and $F_{2,23} = 4.198$, $p = .047$, respectively). There was also a significant effect of time by group interaction on RD of the left superior cerebellar peduncle ($F_{2,23} = 5.014$, $p = .042$) and a marginal effect of time by group interaction on RD of the right superior cerebellar peduncle ($F_{2,23} = 3.450$, $p = .088$).

Moreover, there were strong correlations between changes in postural sway and in FA of superior cerebellar peduncles (left: $r = 0.401$, $p = .038$; right: $r = 0.395$, $p = .042$).

Conversely, there was no significant effect of time,

group, and time by group interaction on DTI parameters either of the middle and inferior cerebellar peduncles or the corpus callosum, corona radiata, fronto-occipital fasciculi, inferior longitudinal fasciculi.

All the objectives of the financed project have been satisfied.

CONCLUSIONS

The clinical improvement observed after WBBS training might be mediated by enhanced myelination-related processes on superior cerebellar pedunculus, suggesting that high-intensity, task-oriented exercises could induce microstructural changes into the brain of patients with MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Prosperini L, Fanelli F, Petsas N, Sbardella E, Tona F, Raz E, Fortuna D, De Angelis F, Pozzilli C, Pantano P. Multiple sclerosis: changes in microarchitecture of white matter tracts after training with a video game balance board. *Radiology*. 2014 Nov; 273(2):529-38. doi: 10.1148/radiol.14140168. Epub 2014 Aug 26.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di due anni e l'ammontare di 50.000 €

Giorgio Sandrini

Dipartimento di Scienze Nervose e del Comportamento, Fondazione Istituto Neurologico Nazionale IRCCS C. Mondino, e Università degli Studi di Pavia, Pavia

COLLABORATORI:

Elena Alvisi, Mariangela Berlangieri, Eliana Berra, Ilaria Callegari, Mauro Fresia, Marina Ranzani, Roberto Bergamaschi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Maria Grazia Anastasio, Armando Perrotta,
IRCCS Neuromed Istituto Neurologico Mediterraneo, Pozzilli (IS)
Maria Grazia Grasso, Augusto Fusco, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma
Marco Rovaris, Giovanna Pinardi, Fondazione Don Gnocchi, Centro IRCCS S. Maria Nascente, Milano

Effetto della stimolazione spinale a corrente continua sul dolore nella sclerosi multipla: valutazione clinica, neurofisiologica e dell'attività del sistema endocannabinoide

PREMESSE E OBIETTIVI

Il dolore rappresenta un sintomo molto frequente nel paziente affetto da sclerosi multipla (SM), spesso sottostimato e non adeguatamente trattato, la cui prevalenza nella malattia può raggiungere l'86%. Il dolore neuropatico centrale ne rappresenta una delle forme più frequenti e si configura come una sfida terapeutica per la scarsa risposta ai comuni trattamenti. La stimolazione a corrente continua (Direct Current Stimulation – DCS) è un trattamento basato sull'applicazione di un flusso di corrente elettrica di bassa intensità mediante elettrodi di superficie che ha suscitato negli ultimi anni grande interesse nelle diverse patologie neurologiche in merito alla sua elevata potenzialità di neuro modulazione e della semplicità di applicazione. Diverse evidenze provenienti da studi sull'animale, ma anche clinici e neurofisiologici sull'uomo, hanno sottolineato l'enorme potenzialità di applicazione di questo trattamento nelle forme di dolore neuropatico centrale.

In questo contesto, un paradigma di stimolazione spinale di DCS ha evidenziato la possibilità di modulare il riflesso nocicettivo di flessione (Nociceptive Withdrawal Reflex-NWR), considerato un mezzo sensibile e specifico per indagare il processamento nocicettivo a livello del sistema nervoso centrale (SNC).

Sessanta persone affette da SM sono state assegnate con randomizzazione a due gruppi di trattamento in modalità doppio cieco: GRUPPO A (DCS-A): 30 pazienti trattamento Anodico/ GRUPPO Sham (DCS-S): 30 pazienti comparabili per età, sesso e gravità di malattia trattamento sham. Il trattamento con sDCS è stato effettuato con un ciclo di 10 sedute per una durata complessiva di 2 settimane. Tutti i pazienti arruolati hanno effettuato tre prelievi ematici per dosaggio di anandamide e PEA mentre non è stato effettuato il dosaggio della Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) nelle piastrine per problemi laboratoristici. Il primo prelievo è stato eseguito prima dell'inizio del trattamento, il secondo al termine delle 10 sedute di trattamento e il terzo un mese dopo il termine del trattamento. La valutazione dell'attività di PEA ed anandamide su siero è al momento in fase di valutazione presso l'Istituto Italiano di Tecnologia, Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development Department, di Genova.

RISULTATI

Sono stati analizzati 60 pazienti di cui 33 provenienti dall'Istituto Mondino, 10 dal Neuromed di Pozzilli, 10 dalla Fondazione Santa Lucia e 7 dalla Fondazione don Gnocchi di Milano. Trenta pazienti di età 55 ± 10 anni con EDSS media di 5.9 ± 1.8 sono stati

sottoposti a trattamento DCS-A e 30 a trattamento DCS-S. In prevalenza i pazienti reclutati con dolore neuropatico centrale presentavano una forma di SM secondariamente progressiva (SP). L'età dei pazienti correlava con la tipologia della sclerosi multipla (più frequentemente SP) e con il punteggio alto ottenuto alla EDSS. Nel gruppo t-DCS è risultata migliorata la scala NPSI tra T0 e T1 e tra T0 e T2, mentre non si evidenzia alcuna variazione significativa nel gruppo sham. Non sono evidenti altre modificazioni nelle altre scale cliniche esaminate, né a livello neurofisiologico. È stata riscontrata una correlazione significativa tra l'innalzamento percentuale tra T0 e T1 della soglia del riflesso evocato con singolo stimolo (Rth) e la riduzione percentuale tra T0 e T1 dell'NPSI, sia considerando tutta la popolazione di studio che

nel solo gruppo trattato con t-DCS; tale correlazione non si riscontra nel gruppo sham considerato singolarmente. Il risultato dei prelievi relativi ai dosaggi degli endocannabinoidi sono in corso.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dal nostro studio evidenziano l'efficacia del trattamento con ts-DCS sulla percezione soggettiva del dolore neuropatico centrale nelle persone affette da SM, come dimostrato dalla riduzione della scala NPSI nel corso del trattamento e dalla correlazione di questa riduzione con l'aumento della soglia del riflesso nocicettivo di flessione. Resta ancora da valutare l'effetto di tale metodica sugli endocannabinoidi, il cui dosaggio è attualmente in corso.

Effect of spinal direct current stimulation on pain in multiple sclerosis: clinical, neurophysiological and endocannabinoid system activity evaluation

INTRODUCTION AND AIMS

Pain is a very common symptom in multiple sclerosis (MS) patients, often underestimated and inadequately treated, whose prevalence in this disease can reach 86%. The central neuropathic pain represents one of the most frequent forms of pain in MS and manifests itself as a therapeutic challenge for the poor response to common treatments. Direct Current Stimulation – DCS- is a treatment based on the application of a flow of electrical current of low intensity by means of surface electrodes which has aroused great interest in recent years in various neurological diseases about its high potential neuromodulation, easily application, excellent tolerability and low equipment costs. Different evidences from animal studies, but also from clinical and neurophysiological human studies, stressed the enormous potential of applying this treatment in the forms of central neuropathic pain. In this context, spinal stimulation paradigm of DCS has highlighted the possibility to modulate the nociceptive flexion reflex (Nociceptive Withdrawal Reflex-NWR), considered a sensitive and specific tool to investigate the nociceptive processing at the level of the central nervous system (CNS).

60 patients affected by MS were randomly assigned to two treatment groups in a double-blind study:

GROUP A (DCS-A) : 30 patients anodic treatment / Sham GROUP (DCS-S): 30 patients matched for age, sex and severity of disease sham treatment (i.e. no treatment). sDCS treatment was performed with a 10 sessions for a total duration of 2 week cycle. All patients enrolled will carry out three blood samples for the evaluation of PEA and anandamide dosage whereas Fatty acid amide hydrolase (FAAH) in platelets was not determined due to laboratory problems. The first dosage was performed before the start of treatment, re-sampled at the end of 10 sessions of treatment and the third sampling a month after the end of treatment. The evaluation of PEA and anandamide in serum is currently being evaluated at the 'Italian Institute of Technology, Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development Department, Genoa.

RESULTS

Sixty patients, of which 33 are from the National Neurological Institute C. Mondino, 10 from Neuromed Pozzilli, 10 from Saint Lucia Foundation-Rome and 7 by Don Gnocchi Foundation in Milan, were enrolled in the study. Thirty patients aged 55 ± 10 years with EDSS average of 5.9 ± 1.8 were subjected to DCS-A treatment and 30 patients to DCS-S treatment. Mostly recruited patients with central neuropathic pain had a secondary progres-

sive MS (SP) type of disease. The age of the patients correlates with the type of multiple sclerosis (most frequently SP) and the highest score EDSS. In DCS-A group NPSI scale improves between T0 and T1 and between T0 and T2, while it does not show any significant change in the sham group. No other changes are evident in other examined clinical scales or neurophysiological level. A significant correlation was found between the percentage T0 and T1 increase relatively to NWR threshold evoked with single stimulus (Rth) and NPSI percentage reduction between T0 and T1 both considering the entire study population than in the group treated only with t-DCS; this correlation is not found in the sham

group when considered individually. The result of withdrawals related to the endocannabinoid dosages are in progress.

CONCLUSIONS

The results from our study indicate a recurrence of ts-DCS treatment on the subjective perception of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis as measured by decrease of NPSI scale during treatment and by the correlation of this reduction with increased reflex threshold nociceptive flexion. It remains to assess the impact of this method on endocannabinoids (dosage are in progress).

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Alvisi E, Berra E, Berlangieri M, Romani A, Tassorelli C, Fresia M, Piomellid, Reggiani A, Rovaris M, Grasso MG. Spinal Direct Current Stimulation effects on pain in multiple sclerosis: clinical and neurophysiological assessment and evaluation of endocannabinoid system activity- Congresso Scientifico Annuale FISM 27-29 Maggio 2015- Roma, Italy.

Berra E, Berlangieri M, Avenali M, Alvisi E, De Icco R, Fresia M, Bergamaschi R, Tassorelli C, Sandrini G. Spinal Direct Current Stimulation. Clinical effects on pain in multiple sclerosis – ECNR European Congress of Neurorehabilitation 2015, Vienna, Austria.

Alvisi E, Berra E, Berlangieri M, Perrotta A, Fresia M, Alfonsi E, Tassorelli C, Sandrini G. Transcutaneous Spinal Direct Current Stimulation (TS-DCS) and modulation of temporal processing of the nociceptive stimuli in normal subjects and multiple sclerosis. ECNR European Congress of Neurorehabilitation 2015- Vienna, Austria.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 54.000 €

Maria Assunta Rocca

Neuroimaging Research Unit, Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milano

COLLABORATORI:

Massimo Filippi, Mauro Comola, Roberto Gatti, Andrea Falini, Giancarlo Comi

Effetti dell'action observation therapy sulla riabilitazione di deficit motori dell'arto destro dominante nei pazienti con SM: studio esplorativo con RM strutturale e funzionale

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una patologia cronica e invalidante del sistema nervoso centrale che colpisce giovani adulti. La riabilitazione rappresenta una delle strategie terapeutiche più importanti per i pazienti con SM. Benché i meccanismi alla base dei processi riabilitativi non siano ancora completamente compresi, la plasticità cerebrale sembra avere un ruolo importante nel miglioramento funzionale in seguito alla riabilitazione. L'Action Observation Therapy (AOT) è una nuova tecnica riabilitativa che consiste nell'esecuzione di un'azione dopo la sua osservazione e agirebbe mediante la modulazione del sistema dei "neuroni mirror" (MNS), un sistema che mette in relazione l'osservazione e l'esecuzione di azioni. L'AOT potrebbe quindi dimostrarsi utile nella riabilitazione di deficit motori nei pazienti con SM. Tuttavia, la funzione del MNS nella SM e il suo ruolo nella riabilitazione non sono stati adeguatamente valutati. L'applicazione della risonanza magnetica (RM), che fornisce misure oggettive per monitorare l'evoluzione della SM e l'efficacia dei trattamenti, potrebbe migliorare la comprensione dei meccanismi associati ad un favorevole outcome riabilitativo.

Applicando l'AOT in pazienti con SM destrimani con una compromissione motoria alla mano destra, questo progetto ha valutato:

- a) se l'AOT, unita alla riabilitazione convenzionale, determini un miglioramento clinico dei deficit motori;
- b) le variazioni dell'attivazione del network motorio e del MNS dopo la riabilitazione convenzionale e l'AOT;
- c) le variazioni regionali dei volumi di sostanza grigia (SG) e dell'architettura della sostanza bianca (SB) dell'encefalo dopo la riabilitazione convenzionale e l'AOT;

d) le correlazioni tra le variazioni rilevate con la RM e il miglioramento delle performance cliniche.

A tale scopo abbiamo randomizzato i pazienti con SM e i soggetti sani (HC) in due gruppi sperimentali (SM-AOT e HC-AOT) che visionavano filmati di azioni quotidiane e poi dovevano eseguire i compiti precedentemente rappresentati nei filmati, ed in due gruppi di controllo (SM-C and HC-C) che eseguivano le stesse azioni dei gruppi sperimentali, ma guardavano video di paesaggi. Prima (t0) e dopo le due settimane di allenamento (w2) sono state eseguite la RM e le valutazioni cliniche e funzionali.

RISULTATI

I principali risultati dello studio sono stati:

- a) Alla w2 tutte le persone reclutate sono migliorate nelle misure funzionali e di disabilità clinica.
- b) Alla w2, utilizzando la RM funzionale durante la manipolazione di oggetti con la mano destra, entrambi i gruppi AOT hanno mostrato modifiche di attivazione in aree sensori-motorie. Il gruppo HC-AOT ha mostrato anche un aumento del reclutamento di aree del MNS. Entrambi i gruppi di controllo hanno mostrato cambiamenti nell'attivazione di aree tempo-occipitali coinvolte nel controllo visivo. Rispetto al gruppo SM-C, il gruppo SM-AOT ha mostrato infine un aumento di attivazione del giro occipitale medio sinistro.

Alla w2, utilizzando la RM funzionale a riposo, rispetto al gruppo HC-C, il gruppo HC-AOT ha presentato un aumento di connettività funzionale del giro frontale inferiore (IFG) sinistro; il gruppo SM-AOT ha presentato un aumento di connettività funzionale del giro temporale medio sinistro rispetto al gruppo SM-C e del giro precentrale rispetto al gruppo HC-AOT.

- c) Alla w2 in tutti i gruppi si è osservato un aumento

di volume di SG nel cervelletto. Nei gruppi HC-C e HC-AOT abbiamo osservato un aumento di volume di SG anche del giro sopramarginale destro e del lobo parietale inferiore (IPL) sinistro, mentre nel gruppo SM-AOT anche del giro sopramarginale destro, nel IPL sinistro e nella corteccia calcarina di sinistra. I quattro gruppi hanno mostrato anche una riduzione di volume di SG in diverse regioni temporo-parieto-occipitali e nei gangli basali bilateralmente.

Alla w2, utilizzando la RM pesata in diffusione, non è stata rilevata nessuna modifica dell'architettura di SB nei vari gruppi studiati.

d) Alla w2, il miglioramento nelle misure cliniche è risultato correlato con le misure di RM funzionale e strutturale nei gruppi AOT.

CONCLUSIONI

L'AOT, combinata con la riabilitazione convenzionale, ha migliorato la performance motoria e ha influenzato la riorganizzazione funzionale e strutturale della SG, suggerendo una parziale conservazione della plasticità funzionale e strutturale nei pazienti con SM. Questi risultati potrebbero contribuire a comprendere i meccanismi dei diversi training motori, a definire un approccio riabilitativo ottimale e a migliorare la gestione riabilitativa individuale dei pazienti con SM in funzione sia della disabilità clinica che dei cambiamenti della plasticità funzionale e strutturale che seguono questi trattamenti.

Effects of action observation therapy on rehabilitation of motor deficits of the dominant right upper limb in patients with MS: an exploratory study with structural and functional MRI

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common disabling diseases of the central nervous system (CNS) affecting young adults. Rehabilitation is an important treatment strategy for MS patients. The mechanisms associated with a positive clinical outcome following rehabilitation are still largely unknown, even if brain plasticity has been supposed to play an important role. Action observation therapy (AOT) is a novel rehabilitative approach consisting in action execution after its observation and based on the modulation of the mirror neuron system (MNS), an observation-execution matching system. AOT might represent an effective rehabilitation intervention for regaining motor function in MS patients. Despite this, the role of MNS in MS and its potential role in rehabilitative strategies have not been fully investigated so far.

The application of magnetic resonance imaging (MRI), which provides objective measures to monitor MS evolution and treatment effects, might increase our understanding of the mechanisms responsible for a favorable clinical outcome in patients undergoing rehabilitation.

Against this background, the aim of this project was to apply an AOT in right-handed MS patients with motor impairment of their right hand to assess:

a) whether this strategy, in addition to a standard

rehabilitative treatment, may lead to a clinical improvement of motor deficits;

b) the modifications of recruitment of the motor network and MNS following conventional rehabilitative treatment and AOT;

c) the variation of regional gray matter (GM) volumes and white matter (WM) architecture of the brain following conventional rehabilitative treatment and AOT;

d) the correlations between detected MRI changes and improvement at motor functional scales.

In order to achieve our goals we randomized MS patients and healthy subjects (HC) in two experimental groups (MS-AOT and HC-AOT) and in two control groups (MS-C and HC-C). During the rehabilitative sessions, subjects included in the AOT group watched video sequences containing daily life hand and arm actions. The control groups (C) watched movies, showing neutral environments. After watching the videos, subjects of both groups were asked to perform the same actions showed in the videos observed by the experimental group. Before (t0) and after the two weeks of training (w2) MRI was acquired and clinical and functional measures were assessed.

RESULTS

The main results of the study were:

a) At w2, all subjects improved in clinical and functional measures.

b) At w2, using functional MRI during manipulation with the right hand, both experimental groups showed modifications of activation of sensorimotor areas. The HC-AOT also had an increased recruitment of MNS areas. Control groups showed changes of activation of temporal and occipital areas involved in visual control. Compared to HC-C, HC-AOT showed an increased activation of MNS areas and a reduced recruitment of temporal areas. Compared to SM-C, SM-AOT had increased activation of the left middle occipital gyrus. At w2 the HC-AOT group also showed an increased resting state functional connectivity (RS FC) of the left inferior frontal gyrus (IFG) compared to HC-C. The SM-AOT group had an increased RS FC of the left middle temporal gyrus compared to SM-C and an increased RS FC of the precentral gyrus compared to HC-AOT.

c) At w2, both HC groups had increased GM volume of the cerebellum, right supramarginal gyrus and left inferior parietal lobule (IPL). MS-AOT had increased GM volume of the right supramarginal gyrus and cerebellum, left IPL and calcarine cortex. The

SM-C group had increased GM volume of the left cerebellum. All groups also experienced a reduction of GM volume of several temporo-parieto-occipital regions and basal ganglia, bilaterally.

At w2, using diffusion-tensor imaging, no modifications of WM architecture were detected.

d) At w2, all groups showed a better performance in clinical measures which were correlated with fMRI and structural MRI modifications in AOT groups only.

CONCLUSIONS

AOT, combined with conventional rehabilitative approaches, yielded a better motor performance and influenced functional and structural GM brain reorganization in HC and MS, suggesting a partial preservation of functional and structural plasticity in these patients. Overall, these findings might contribute to better understand the mechanisms of different motor training strategies and to optimize rehabilitative approaches. The results of this research project might help optimizing the rehabilitative management of individual MS patients according to their clinical disability.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Messina R, Rocca MA, Gatti R; Meani A, Preziosa P, Salini G, Fumagalli S, Falini A, Comi G, Filippi M. Effects of action observation therapy on functional brain plasticity in healthy adult individuals. *Neurol Sci* 2013; 34 (Suppl October 2013): S328.

Preziosa P, Rocca MA, Gatti R, Petrolini M, Messina R, Salini G, Fumagalli S, Falini A, Comi G, Filippi M. Action observation therapy modifies structural brain plasticity in healthy adult individuals. *Neurol Sci* 2013; 34 (Suppl October 2013): S328.

Preziosa P, Rocca MA, Gatti R, Petrolini M, Messina R, Salini G, Fumagalli S, Falini A, Comi G, Filippi M. Action observation therapy modifies structural brain plasticity in healthy adult individuals. *Neurology* 2014; 82 (10 Suppl): P3.058.

Preziosa P, Rocca MA, Gatti R, Petrolini M, Messina R, Salini G, Fumagalli S, Falini A, Comi G, Filippi M. Action observation therapy modifies structural brain plasticity in healthy adult individuals. *J Neurol* 2014; 261 (Suppl 1): S58.

Messina R, Rocca MA, Gatti R, Meani A, Preziosa P, Salini G, Fumagalli S, Falini A, Comi G, Filippi M. Effects of action observation therapy on functional brain plasticity in healthy adult individuals. *J Neurol* 2014; 261 (Suppl 1): S164.

Preziosa P, Rocca MA, Gatti R, Petrolini M, Messina R, Salini G, Fumagalli S, Falini A, Comi G, Filippi M. Action observation therapy modifies structural brain plasticity in healthy adult individuals. *Eur J Neurol* 2014; 21 (Suppl 1): 79.

Messina R, Rocca MA, Gatti R, Meani A, Preziosa P, Salini G, Fumagalli S, Falini A, Comi G, Filippi M. Effects of action observation therapy on functional brain plasticity in healthy adult individuals. *Eur J Neurol* 2014; 21 (Suppl 1): 238.

Fumagalli S, Rocca MA, Gatti R, Filippi M. Action observation and mirror neuron system recruitment: effect of type of task on motor facilitation. *Neurology* 2015; 84 (14 Supplement): P7.196.

Gatti R, Rocca MA, Fumagalli S, Cattrysse E, Kerckhofs E, Filippi M. Mirror neuron system recruitment during observation and simultaneous observation and execution of tasks with different characteristics. *Physiotherapy* 2015; 101: e445-e446.

Gatti R, Rocca MA, Preziosa P, Fumagalli S, Pagani E, Messina R, Filippi M. Structural brain plasticity modified by action observation training in healthy subjects. *Physiotherapy* 2015; 101: e446-e447.

Fumagalli S, Rocca MA, Premoli S, Alfieri N, Preziosa P, Martinelli-Boneschi F, Comola M, Pagani E, Petrolini M, Falini A, Comi G, Gatti R, Filippi M. Structural brain plasticity changes following an action observation therapy training of the dominant right upper limb in healthy subjects and patients with multiple sclerosis. *Mult Scler J* 2015; 21: 493.

Fumagalli S, Rocca MA, Premoli S, Alfieri N, Preziosa P, Martinelli-Boneschi F, Comola M, Pagani E, Petrolini M, Falini A, Comi G, Gatti R, Filippi M. Modifications of brain patterns of cortical activation and functional connectivity in healthy subjects and MS patients after action observation training of the right upper limb. *Mult Scler J* 2015; 21: 493.

Fumagalli S, Rocca MA, Gatti R, Filippi M. Action observation and motor neuron system recruitment: effect of type of task on motor facilitation. *Mult Scler J* 2015; 21: 494.

Fumagalli S, Rocca MA, Gatti R, Filippi M. Action observation and mirror neuron system recruitment : effect of type of task on motor facilitation. *Eur J Neurol* 2015; 22 (Suppl 1): 668.

Fumagalli S, Rocca MA, Gatti R, Filippi M. Action observation and mirror neuron system recruitment: effect of type of task on motor facilitation. *Neurol Sci* 2015; 36 (suppl October): S42.

Rocca MA, Fumagalli S, Preziosa P, Gatti R, Messina R, Martinelli-Boneschi F, Pavan G, Comola M, Comi G, Filippi M. Effects of action observation therapy on rehabilitation of motor deficits of the dominant right upper limb in patients with MS: an exploratory study with structural and functional MRI. *Neurol Sci* 2015; 36 (suppl October): S409-S410.

Preziosa P, Rocca MA, Fumagalli S, Pagani E, Gatti R, Riccitelli G, Comi G, Falini A, Filippi M. Action observation training modifies brain gray matter structure in healthy adult individuals. *Neurologie & Rehabilitation* 2015; 6.

Preziosa P, Rocca MA, Fumagalli S, Gatti R, Messina R, Martinelli-Boneschi F, Pavan G, Comola M, Comi G, Filippi M. Effects of action observation therapy on rehabilitation of motor deficits of the dominant right upper limb in patients with MS: an exploratory study with functional MRI. *Neurologie & Rehabilitation* 2015; 6.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 183.200 €

Eleonora Tavazzi

Centro SM, IRCCS Istituto Santa Maria Nascente, Fondazione Don Gnocchi, Milano

COLLABORATORI:

Niels Bergsland, Maria Marcella Laganà, Cristina Grosso, Davide Cattaneo, Elisa Gervasoni, Ottavia Di Pasquale, Francesca Lea Saibene, Francesca Baglio, Marco Rovaris

Effetti della riabilitazione neuromotoria sulla plasticità cerebrale nella sclerosi multipla: studio di RM strutturale e funzionale randomizzato-controllato

PREMESSE E OBIETTIVI

I pazienti affetti da sclerosi multipla (SM) possono essere limitati in una serie di funzioni della vita quotidiana. Le terapie attualmente disponibili sono perlopiù efficaci sulle ricadute acute; la fisioterapia è quindi un trattamento essenziale nel mantenimento/recupero della mobilità e possibilmente nel prevenire l'accumulo di disabilità. Abbiamo pianificato questo studio con lo scopo di analizzare l'effetto della riabilitazione neuromotoria sulla plasticità cerebrale in pazienti affetti da SM e sottoposti a valutazione clinica, e risonanza magnetica (RM) con tecniche convenzionali ed avanzate prima e dopo trattamento riabilitativo intensivo. Una migliore comprensione dei meccanismi che mediano il recupero funzionale correlato alla fisioterapia permetterebbe di ottimizzare l'intervento riabilitativo, determinando un miglioramento globale della qualità di vita dei pazienti.

RISULTATI

Sono stati arruolati nello studio 29 pazienti affetti da SM, di cui 26 hanno completato le analisi al tempo basale (T0) e al termine del ciclo riabilitativo (T1) mostrando un miglioramento significativo dell'equilibrio, della resistenza e della fatica percepita dai pazienti. Rispetto ai dati di RM, non si sono eviden-

ziate differenze significative rispetto allo spessore corticale o ai parametri relativi all'imaging di diffusione tra T0 e T1, mentre si è riscontrato un significativo miglioramento della connettività funzionale nelle aree della corteccia motoria primaria e somatosensitiva e una maggior focalizzazione dell'attivazione cerebrale in risposta a task motorio.

CONCLUSIONI

I dati sinora ottenuti suggeriscono un effetto positivo della riabilitazione neuromotoria nell'immediato, con il miglioramento di vari parametri relativi a resistenza, equilibrio, fatica. L'analisi della connettività funzionale mediante fMRI sembra supportare l'ipotesi che nonostante uno stato di malattia relativamente avanzato, la fisioterapia può agire sulla plasticità cerebrale. Questo dato parrebbe confermato dalla attivazione più focale delle aree motorie alla RM funzionale con task motorio dopo trattamento riabilitativo intensivo. I dati clinici raccolti tre mesi dopo il termine del trattamento fisioterapico non hanno mostrato una persistenza del miglioramento mostrato in precedenza. La presenza di una ridotta dimensione campionaria con un numero relativamente alto di *drop out* e le difficoltà mostrate dai pazienti nell'eseguire il task motorio possono aver influenzato negativamente i risultati.

Using structural and functional MRI to assess the effects of motor rehabilitation on brain plasticity in multiple sclerosis: a randomized, controlled study

INTRODUCTION AND AIMS

Daily life activities related to mobility are affected in multiple sclerosis (MS). To date, available therapies are mostly effective in reducing the occurrence of neurological relapses, but quite unsatisfactory in preventing disability. Thus, alternative interventions improving the level of activity in MS patients, such as physiotherapy, are essential. Therefore, we planned this study to analyze the impact of neuromotor rehabilitation on brain plasticity, by acquiring clinical, conventional and advanced MRI data in a group of MS patients before and after intensive neuromotor rehabilitation. A better understanding of rehabilitation-mediated recovery mechanisms would help identifying the best physiotherapy approach, leading to a higher quality of life for patients.

RESULTS

The clinical parameters acquired on the 26 patients that completed T0 and T1 showed a significant improvement of balance, physical endurance and functioning and a significant reduction of the fatigue.

Regarding MRI results, no changes were observed

with respect to cortical thickness or diffusion parameters between time points whereas a significant improvement of functional connectivity was shown in motor and somatosensory areas, as well as a more focal activation in motor areas in response to motor task.

CONCLUSIONS

The preliminary data of this pilot study suggest an immediate positive effect of intensive neuromotor rehabilitation at a clinical level, with the improvement of several parameters related to endurance, balance and fatigue. The improvement of functional connectivity supports the notion that despite the relatively advanced stage of the disease, physiotherapy intervention might have an impact on brain plasticity. This is also supported by the more focal activation of the motor areas at the task fMRI after rehabilitation. Clinical data in the small group of patients that completed all the time points did not show a persistence of the improvement. It should be noted that the limitations of this study (small sample size, the high number of dropouts, motor task related difficulties) may prevent us from drawing firm conclusions.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Bergsland N, Tavazzi E, Cattaneo D, Gervasoni E, Laganà MM, Grosso C, Saibene FL, Dipasquale O, Baglio F, Rovaris M. Effects of gait training on brain plasticity in multiple sclerosis: a functional MRI study. Abstract release date: Sep 23, 2015 ECTRIMS Online Library; 116678. Bergsland N. Young Investigators' Awards: ECTRIMS Oct 9 2015 Barcelona, Spain.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2013 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €



CLASSIFICAZIONE
E DIAGNOSI DELLA
MALATTIA

DISEASE CLASSIFICATION AND DIAGNOSIS

Laura Bonzano

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

COLLABORATORI:

Laura Avanzino, Marco Bove, Alice Laroni, Margit Müller, Matteo Pardini, Antonio Uccelli, Luca Roccatagliata, Maria Pia Sormani

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Claudio Solaro, Dipartimento di Neurologia ASL3 Genovese, Genova

Performance motoria della mano come nuovo endpoint clinico quantitativo nella SM: valutazione longitudinale su pazienti CIS e correlazione con accumulo di disabilità e integrità tissutale alla RM

PREMESSE E OBIETTIVI

Uno dei problemi aperti nella ricerca clinica sulla sclerosi multipla (SM) è la definizione di obiettivi clinici oggettivi, quantitativi, riproducibili e sensibili ai cambiamenti, che forniscono informazioni sull'accumulo di disabilità permanente, l'indice con maggiore impatto sulla qualità di vita in pazienti con SM (PwMS). La scala di disabilità usualmente adottata (EDSS) si basa primariamente sulla valutazione dell'arto inferiore; ciò costituisce un limite rilevante per la fattibilità e l'interpretazione degli studi clinici nella SM.

Recentemente un guanto ingegnerizzato è stato usato in soggetti sani e PwMS per indagare la strategia adottata durante movimenti di opposizione delle dita.

Danni nel corpo calloso (CC) misurati con imaging con tensore di diffusione (DTI) sono stati associati ad un'alterazione nell'esecuzione di compiti che richiedono il trasferimento interemisferico di informazioni sensorimotorie.

Abbiamo valutato la potenzialità di un'analisi quantitativa delle prestazioni motorie per rilevare la disabilità in fase precoce di malattia e comprendere il ruolo e il valore prognostico del danno in aree cerebrali rilevanti per la performance motoria, con particolare attenzione all'integrità del CC, che è stata dimostrata influenzare la coordinazione bimanuale.

RISULTATI

Inizialmente abbiamo testato la riproducibilità dello

strumento proposto e la sua capacità di distinguere un gruppo di 40 PwMS da 80 controlli sani (HC). I parametri motori sono risultati riproducibili e hanno mostrato differenze significative tra HC e PwMS anche con EDSS=0, indicando elevata sensibilità nel rilevare una compromissione subclinica non dimostrata dall'EDSS.

Questi risultati sottolineano l'importanza di valutare la compromissione motoria in PwMS anche per l'arto superiore; questo strumento sembra fornire una misura semplice, quantitativa e oggettiva di movimenti di opposizione delle dita e di coordinazione bimanuale, consentendo di individuare anche i PwMS con lieve disabilità. Questa sensibilità può essere importante per il monitoraggio del decorso della malattia e degli effetti del trattamento nei PwMS all'esordio, quando le variazioni dell'EDSS sono piccole o assenti, supportando l'idea del progetto di monitorare la disabilità del paziente dal primo episodio suggestivo di SM.

Quindi, 30 pazienti con sindrome clinicamente isolata (PwCIS) sono stati sottoposti a differenti valutazioni strumentali con follow-up (punti temporali: 0, 6, 12, 18, 24 mesi), per integrare questa metodologia con informazioni ottenute da scale cliniche, misure neurofisiologiche e di neuroimmagini.

La RM è stata eseguita a 1,5 T con sequenze DTI (gradienti di diffusione in 15 direzioni, $b=1000$ sec/mm²).

Movimenti fini delle dita sono stati valutati come nello studio preliminare.

La stimolazione magnetica transcranica (TMS) è stata utilizzata per valutare il tempo di conduzione centrale e l'inibizione transcallosale.

Dai dati DTI abbiamo ottenuto mappe parametriche di anisotropia frazionaria (FA), diffusività assiale (AX), i.e., diffusività dell'acqua parallela alle fibre assonali, diffusività radiale (RAD), i.e., diffusività dell'acqua perpendicolare alle fibre assonali, e diffusività media (MD). Tutti i parametri hanno mostrato variazioni significative nel corso del tempo, indicando una progressione del danno nel CC; in particolare l'FA è diminuita.

Dai dati TMS abbiamo valutato il periodo silente ipsilaterale (ISP), considerato marker specifico di inibizione motoria transcallosale, e calcolato area e durata dell'ISP per entrambe le mani; questi parametri sono aumentati nel tempo.

Dalle misure comportamentali è risultato che l'intervallo temporale tra le mani (IHI) è significativamente aumentato nel corso del tempo, indicando un peggioramento nella coordinazione bimanuale.

I soggetti sono stati poi analizzati separatamente sulla base del loro tempo di conversione a SM. Venti dei 30 soggetti hanno ricevuto diagnosi di SM du-

rante il periodo di studio.

Le variabili analizzate hanno rivelato un peggioramento nel gruppo di PwCIS convertiti a SM. In particolare, nel CC FA è diminuita e RAD aumentata progressivamente dal mese 0 al 24 nel gruppo che ha avuto conversione a SM, mentre i due parametri sono rimasti stabili nel gruppo senza conversione. In relazione a questo, IHI è aumentato nel gruppo con conversione, indicando una difficoltà nel coordinare semplici movimenti delle dita con le due mani, mentre i PwCIS senza conversione hanno mantenuto le loro capacità. Anche i parametri TMS mostravano differenze tra i due gruppi di pazienti: area e durata dell'ISP sono aumentate solo nel gruppo con conversione a SM.

CONCLUSIONI

Le metodologie adottate sono in grado di distinguere i PwCIS con conversione ad SM dai PwCIS non convertiti. Tuttavia, per definire i migliori parametri in grado di prevedere la conversione si ritiene necessario un campione più ampio in modo da aumentare il numero di PwCIS con conversione a SM ai diversi punti temporali.

Hand motor performance as a new quantitative clinical endpoint in MS: longitudinal evaluation in patients with CIS and correlation with accumulation of disability and tissue integrity at MRI

INTRODUCTION AND AIMS

One of the most pressing open issues in clinical research on multiple sclerosis (MS) is the definition of clinical endpoints that are objective, quantitative, reproducible and sensitive to changes giving information on the accumulation of permanent disability, which is the outcome with greatest impact on the quality of life of patients with MS (PwMS). The scale of disability commonly adopted in these patients (EDSS) is mainly based on lower limb assessment and this constitutes an important limitation in the feasibility and interpretation of clinical trials in MS. Recently a tool based on an engineered glove has been used in healthy subjects and PwMS to investigate the adopted strategy during finger opposition movements.

PwMS damage in the corpus callosum (CC) measu-

red with diffusion tensor imaging (DTI) has been associated with an alteration in the execution of tasks requiring the transfer of sensorimotor information between the cerebral hemispheres.

We aimed at evaluating the potentiality of quantitative analysis of motor performance to detect subclinical disability in early disease phases and to understand the role and the prognostic value of the damage in brain areas relevant to motor performance, with specific focus on CC integrity that has been demonstrated to influence bimanual coordination.

RESULTS

We preliminarily assessed the reproducibility of the proposed tool and its ability to discriminate a group of 40 PwMS from 80 healthy controls (HC).

The motor parameters were reproducible and sho-

wed significant differences between HC and PwMS with EDSS=0, indicating high sensitivity in detecting subclinical impairment not revealed by the EDSS. These findings underline the relevance of evaluating motor impairment in PwMS also in the upper limb, and this methodology seems to provide simple, quantitative and objective measure related to finger motor performance and bimanual coordination allowing to discriminate even mildly disabled MS patients from HC. This sensitivity could be of crucial importance for monitoring the disease course and the treatment effects in early PwMS, when changes in the EDSS are small or absent, strongly supporting the idea of the present project to monitor patient's disability starting from the first episode suggestive of MS. Then, we enrolled 30 patients with Clinically Isolated Syndrome (PwCIS), who underwent different instrumental evaluations within a follow-up study (time-points: 0, 6, 12, 18, 24 months), in order to integrate this methodology with information obtained from clinical scales, neurophysiological and neuroimaging measures.

MRI was performed on a 1.5 T scanner and included axial single-shot spin-echo echo-planar DTI, with diffusion gradients applied in 15 non collinear directions ($b=1000 \text{ sec/mm}^2$).

Finger motor performance was evaluated as indicated in the sub-study protocol described before.

A transcranial magnetic stimulation (TMS) protocol was also implemented to evaluate central conduction time and transcallosal inhibition.

From DTI data we obtained parametric maps of fractional anisotropy (FA), axial diffusivity (AX), i.e., the water diffusivity parallel to the axonal fibers, radial diffusivity (RAD), i.e., the water diffusivity perpendicular to the axonal fibers, and mean diffusivity (MD). All the analyzed parameters showed significant

changes over time indicating damage progression in the CC; particularly FA decreased over time.

From TMS data we evaluated the ipsilateral silent period (iSP), which is considered a specific marker of transcallosal motor inhibition, and calculated iSP area and duration for both hands; these parameters increased over time.

From behavioral measurements we found that inter-hand interval (IHI) significantly increased over time, indicating worsening in bimanual coordination.

Subjects were then analyzed separately on the basis of their time to conversion to MS.

Twenty out of 30 subjects received the diagnosis of MS (relapsing-remitting) during the study period.

The analyzed variables revealed significant worsening in the group of PwCIS which converted to MS. In particular, in the CC FA decreased and RAD increased progressively from month 0 to month 24 in the group of MS converters, whilst the two parameters remained stable in the group of MS non-converters. Related to this finding, IHI increased in the group of MS converters, indicating the occurrence of impairment in coordinating simple bimanual finger movements, whilst the MS non-converters maintained their abilities. Also the TMS parameters showed differences between the two groups of patients: iSP area and duration increased only in the group of MS converters.

CONCLUSIONS

The adopted methodologies are able to discriminate the group of MS converters from the group of MS non-converters. However, in order to define the best parameters able to predict conversion we think that a larger sample should be required in order to increase the number of PwCIS converting to PwMS at the different time-points.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Bonzano L, Sormani MP, Tacchino A, Abate L, Lapucci C, Mancardi GL, Uccelli A, Bove M, Quantitative Assessment of Finger Motor Impairment in Multiple Sclerosis. PLoS ONE (2013), 8(5): e65225.

Bonzano L, Bove M, Gallo F, Laroni A, Mancardi GL, Mueller M, Pardini M, Roccatagliata L, Solaro C, Sormani MP, Uccelli A. Hand motor performance as a new quantitative clinical endpoint in MS: longitudinal evaluation in patients with CIS and correlation with accumulation of disability and tissue integrity at MRI. ECTRIMS, 29th congress of the European committee for research and treatment in multiple sclerosis, Copenhagen, Denmark, 2013.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 3 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 145.900 €

Costanza Gianni

Dipartimento di Neurologia e Psichiatria, Università Sapienza, Roma

Athinoula A. Martinos Center for Biomedical Imaging, Department of Radiology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA. Harvard Medical School, Boston, MA, USA

MENTORE: **Caterina Mainero**

Tecniche multimodali di neuro-immagini per lo studio della patologia corticale nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Sebbene tradizionalmente considerata una patologia della sostanza bianca, la presenza di lesioni corticali focali, di danno diffuso e di degenerazione della corteccia e della sostanza grigia profonda è stata ampiamente dimostrata nella sclerosi multipla (SM) da studi di patologia, ed è stata messa in relazione con un decorso clinico più aggressivo e una maggiore disabilità fisica e cognitiva. Tuttavia, i meccanismi alla base del danno della sostanza grigia sono ancora oggetto di studio. Rispetto alla Risonanza Magnetica (RM) convenzionale, la RM ad elevatissimo campo magnetico (7 Tesla) ha recentemente reso possibile, *in vivo*, lo studio approfondito della patologia corticale. Inoltre, alcuni studi anatomopatologici hanno messo in relazione, soprattutto in persone con SM secondariamente progressiva (SP), il danno corticale e della sostanza bianca apparentemente sana (non colpita dalle lesioni visibili, ma considerata sede di danno diffuso) con la presenza di un'elevata concentrazione di microglia attivata (le cellule infiammatorie residenti nel cervello). L'attivazione di quest'ultima in risposta ad un danno ha ruolo protettivo e riparativo mentre una sua attivazione cronica sembra essere nociva; tuttavia, il suo ruolo nella SM è ancora oggetto di dibattito. La presenza di questo tipo di infiammazione può essere studiata con la tomografia ad emissione di positroni (PET) con un radiotracciante che lega la microglia attivata. Obiettivi del nostro studio sono stati verificare, sottoponendo un gruppo di persone con SM recidivante remittente con elevata attività di malattia o con SMSP alla RM a 7 Tesla e alla PET-Risonanza (PET-RM): 1) la presenza di infiammazione nelle diverse strutture cerebrali, 2) la sua influenza nel determinare lesioni e poi neurodegenerazione corticale e infine

3) cercare l'eventuale relazione tra infiammazione e disabilità fisica e cognitiva.

RISULTATI

Nel nostro gruppo di persone con SM in diverse fasi di malattia, abbiamo dimostrato la presenza di un'infiammazione diffusa nella sostanza grigia; in particolare, abbiamo rilevato microglia attivata in quantità superiore, rispetto ai soggetti sani di controllo, a livello della corteccia cerebrale ed in misura ancora maggiore, in corrispondenza delle lesioni corticali individuate con la RM a 7 Tesla; un'elevata concentrazione di microglia attivata era, inoltre, presente nelle strutture della sostanza grigia profonda quali il talamo, l'ippocampo e i nuclei della base e nella sostanza bianca apparentemente sana.

I pazienti hanno mostrato, inoltre, un diminuito spessore corticale (atrofia) rispetto ai controlli, e abbiamo individuato una relazione statistica tra questo danno strutturale diffuso della corteccia cerebrale e la presenza di infiammazione corticale e a livello del talamo e dell'ippocampo.

L'aumentata concentrazione di microglia attivata nella corteccia cerebrale, nella sostanza grigia profonda e nella sostanza bianca apparentemente sana ha mostrato una correlazione con l'Expanded Disability Status Scale (EDSS), la scala clinica che permette di determinare il grado di disabilità fisica, e con il Symbol Digit Modality Test (SDMT), un test neuropsicologico che esamina alcune funzioni cognitive come la memoria a breve termine e la velocità di processazione delle informazioni, dimostrando che l'entità dell'infiammazione individuata con la PET-RM è associata alla disabilità fisica e al deterioramento cognitivo, anche indipendentemente dal danno strutturale individuato con la RM convenzionale.

CONCLUSIONI

In questo studio, abbiamo dimostrato, utilizzando tecniche avanzate di neuroimmagini, la presenza di infiammazione in diverse strutture cerebrali in un gruppo di persone con SM con elevata attività di malattia o in fase progressiva; in particolare, abbiamo misurato la componente neuroinfiammatoria corticale e delle strutture della sostanza grigia profonda, ed evidenziato una sua correlazione con il danno strutturale e con il grado di disabilità fisica e cognitiva. Questi risultati, oltre a confermare per la prima volta *in vivo* risultati precedentemente ottenuti solo da studi di patologia, sono importanti per comprendere i meccanismi patogenetici alla base del danno delle diverse strutture cerebrali nella SM.

In particolare, il nostro studio fornisce nuove informazioni sulla microglia attivata, ponendo le basi per futuri studi longitudinali, che coinvolgano anche persone con SM in fase iniziale, con l'obiettivo di definire il ruolo della microglia attivata, individuando una potenziale finestra terapeutica durante la quale l'attivazione della microglia di significato riparativo/protettivo diventa invece dannosa. Proprio in virtù di questi obiettivi, la fase longitudinale di rivalutazione con RM e l'arruolamento di nuovi pazienti nello studio sono tuttora in corso per estendere i risultati ad un gruppo più ampio di persone e valutare gli effetti a lungo termine della neuroinfiammazione sull'accumulo di danno strutturale e di disabilità.

Multimodal imaging of cortical pathology in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Although traditionally considered a white matter (WM) pathology, both focal and diffused demyelination and degeneration in the cortex and deep grey matter (DGM) structures have been extensively demonstrated from histopathological studies in MS; these alterations have been also correlated to a more aggressive disease course and higher physical disability and cognitive impairment. However, pathological mechanisms of GM damage in MS are still controversial. Accurate *in vivo* visualization and characterization of cortical pathology have been recently allowed from ultra-high field 7 Tesla Magnetic Resonance Imaging (7 T-MRI). Additionally, neuropathological findings have suggested a relation between alterations in the cortex and in the normal appearing WM (NAWM) and the presence of activated microglia (the brain resident inflammatory cells), especially in patients with Secondary Progressive MS (SPMS). Acute microglial activation seems to display a protective/beneficial effect whereas a chronic activation seems to turn into a deleterious one; however its exact role in MS pathology is still debated. This kind of neuroinflammation can be imaged with the Positron Emission Tomography (PET), using a radiotracer which binds the activated microglia, *in vivo*. We performed 7 T-MRI and MR-PET in a group of patients with highly active relapsing-

remitting MS (RRMS) and SPMS aiming to 1) assess the presence of neuroinflammation in various brain structures, 2) determine whether there is a correlation between neuroinflammation and cortical lesions and 3) explore correlations between inflammation and both physical and cognitive impairment.

RESULTS

We demonstrated the presence of a diffused neuroinflammation in gray matter of our group of Patients at various stages of the disease, compared to healthy subjects. Specifically, we showed increased microglial activation in cerebral cortex, even higher in correspondence of cortical demyelinating lesions visualized at 7 T-MRI; additional areas of increased inflammation were also DGM structures (thalamus, hippocampus and basal ganglia) and the NAWM. Patients showed a decreased cortical thickness (atrophy) compared to healthy subjects and this diffused structural damage has found to be statistically correlated to the presence of inflammation in the cortex, thalamus and hippocampus. Increased levels of activated microglia in the cortex, DGM and NAWM were correlated with the Expanded Disability Status Scale (EDSS), the clinical scale which quantifies the physical disability and Symbol Digit Modality Test (SDMT), a neuropsychological test which evaluates cognitive

functions as short-term memory and information processing speed; we thus showed that the extent of inflammation, as measured by MR-PET imaging, is associated with physical disability and poor cognitive performance, independently of structural conventional MRI metrics.

CONCLUSIONS

In this study we assessed the presence of inflammation in various brain structures in a cohort of Patients with highly active or progressive MS using advanced neuroimaging techniques. Specifically, we measured the neuroinflammatory component of the cortex and DGM structures, also showing a correlation with the structural damage and disability. Our results not only confirm for the first time *in vivo*

previously reported histopathological findings, but also shed light on physiopathological mechanisms of damage in MS. Moreover, our study provides new information on activated microglia in MS, suggesting hypothesis for future longitudinal studies targeted to the earlier stages of MS, which can be designed to address the dual role of microglia and ultimately determine whether we can target the therapeutic window when microglia activation turns from a beneficial function into a deleterious one. According to this, longitudinal re-scans with MRI and enrolment of other Patients are still ongoing to extend our results to a larger group of people with MS and to better evaluate long-term effects of neuroinflammation on structural brain damage and disability accumulation.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Herranz E*, Gianni C*, Louapre C, Treaba CA, Govindarajan ST, Mangeat G, Ouellette R, Loggia M, Ward N, Klawiter EC, Sloane JA, Catana C, Hooker JM, Kinkel RP, Mainero C. The neuroinflammatory component of gray matter pathology in multiple sclerosis by *in vivo* combined ¹¹C-PBR28 MR-PET and 7T imaging. *These authors equally contributed to this work. (Paper submitted).

Gianni C, Fan AP, Govindarajan ST, Loggia M, Wimmer NZ, Catana C, Hooker J, Tinelli E, Louapre C, Anderson TA, Kinkel RP, and Mainero C. *In vivo* characterization of inflammation by combined [¹¹C]-PBR28 PET imaging and 7 Tesla MRI in multiple sclerosis. ISMRM Milan, Italy, 2014.

Gianni C, Govindarajan ST, Fan AP, Louapre C, Loggia M, Catana C, Tinelli E, Hooker J, Sloane J, Kinkel RP, Mainero C. [¹¹C]-PBR288 MR-PET imaging detects *in vivo* inflammation in normal appearing white matter and cortical sulci in multiple sclerosis. ECTRIMS Boston, USA, 2014.

Herranz E, Gianni C, Louapre C, Mangeat G, Loggia M, Treaba CA, Govindarajan ST, Ward N, Sloane JA, Klawiter EC, Ouellette R, Catana C, Hooker JM, Kinkel RP, Mainero C. ¹¹C-PBR28 MR-PET imaging detects *in vivo* diffuse inflammation in cortex, deep gray, and normal appearing white matter associated with neurodegeneration and clinical outcome. ECTRIMS Barcelona, Spain, 2015.

Herranz E, Gianni C, Louapre C, Treaba CA, Govindarajan ST, Mangeat G, Ouellette R, Loggia M, Ward N, Klawiter EC, Sloane JA, Catana C, Hooker JM, Kinkel RP, Mainero C. The neuroinflammatory component of gray matter pathology in multiple sclerosis by *in vivo* combined ¹¹C-PBR28 MR-PET and 7T imaging. ISMRM Singapore, 2016.

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

Claudia Verderio

Istituto di Neuroscienze del CNR, Milano

COLLABORATORI:

Loredana Riganti, Ilaria Prada, Pooja Joshi, Marta Lombardi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Roberto Furlan, Annamaria Finardi, Federico Colombo,

Ospedale San Raffaele, Milano

Marta Fumagalli, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano

Potenziale patogenico e diagnostico delle microvescicole rilasciate dalla microglia nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cellule microgliali, le cellule immunocompetenti del sistema nervoso, controllano la risposta infiammatoria che può avere sia effetti benefici che dannosi sulle cellule nervose, in particolare gli oligodendrociti ed i neuroni. Al momento non esistono dei metodi per seguire nei soggetti con sclerosi multipla lo stato di attivazione delle cellule microgliali nel corso della malattia e per valutare, la risposta al trattamento farmacologico. In questo progetto abbiamo proposto di valutare il grado di attivazione ed il fenotipo (benefico o dannoso) della microglia tramite analisi delle microvescicole che vengono rilasciate dalle cellule microgliali stesse negli spazi extracellulari e che sono presenti nel liquido cerebrospinale. Obiettivo primario del progetto è stato verificare, in una vasta coorte di persone con sclerosi multipla, se le microvescicole microgliali presenti nel liquido cerebrospinale rappresentano un marcatore d'attivazione microgliale e riflettano il fenotipo benefico o dannoso acquisito della microglia.

RISULTATI

Abbiamo raggiunto il primo obiettivo del progetto dimostrando che i soggetti con sclerosi multipla in fase attiva o all'esordio della malattia (soggetti con sindrome clinicamente isolata, CIS) hanno nel liquido cerebrospinale una concentrazione di microvescicole microgliali più elevata rispetto ai soggetti con altre patologie neurologiche non infiammatorie. Abbiamo anche dimostrato che i soggetti che svi-

luppano entro un anno la sclerosi multipla hanno, all'esordio, un numero di microvescicole più elevato rispetto a quanti non sviluppano la malattia. Questi risultati sottolineano il valore diagnostico e prognostico della quantificazione delle microvescicole microgliali.

Il secondo obiettivo è stato raggiunto analizzando il contenuto delle microvescicole microgliali rilasciate da cellule coltivate *in vitro*. Abbiamo identificato otto molecole (microRNAs) maggiormente espresse in microvescicole rilasciate da cellule microgliali caratterizzate da fenotipo infiammatorio piuttosto che benefico. Tali molecole, se riscontrate in maggior quantità nelle microvescicole microgliali di persone in fase acuta di malattia, aumenteranno ulteriormente il potenziale diagnostico delle microvescicole, consentendo di valutare la risposta microgliale al trattamento farmacologico nelle persone con sclerosi multipla.

Il terzo obiettivo è stato raggiunto caratterizzando funzionalmente il fenotipo delle cellule microgliali *in vitro*. Sono stati analizzati gli effetti che le microvescicole rilasciate da cellule microgliali, esposte a diverse sostanze in grado di modificarne il fenotipo, esercitano sulla proliferazione, sul differenziamento e sulla deposizione di mielina da parte dei precursori degli oligodendrociti, le cellule gliali maggiormente danneggiate nel corso della sclerosi multipla. I risultati ottenuti indicano che le microvescicole microgliali giocano un ruolo fondamentale nella segnalazione microglia-neurone e che lo stato di attivazione della microglia influenzi notevolmente

l'attività pro-rigenerativa dei progenitori degli oligodendrociti. Pertanto, reindirizzare lo stato di attivazione microgliale verso funzioni benefiche sembra rappresentare una strategia promettente per il trattamento delle sclerosi multipla, anche delle forme progressive della malattia, caratterizzate da graduale perdita degli oligodendrociti.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio hanno una ricaduta im-

mediata sulle persone con sclerosi multipla, in quanto dimostrano che la quantificazione delle microvescicole microgliali nel liquido cerebrospinale rende più accurata la diagnosi e la prognosi della malattia. Inoltre, se le molecole identificate nelle microvescicole *in vitro* risulteranno espresse maggiormente nelle microvescicole di persone con sclerosi multipla, si aprirà la possibilità di seguire lo stato di attivazione della microglia nel corso della malattia e in risposta alla terapia.

Pathogenic and diagnostic potential of microvesicles derived from microglia in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Microglia, the immune brain cells, orchestrate brain inflammatory response and exert both beneficial and detrimental functions on oligodendrocytes and neurons. However, there are no methods available to monitor *in vivo* the activation state of microglia in the course of multiple sclerosis and to evaluate response to therapy in subjects with the disease. In this project we aimed at evaluating the activation state and the phenotype of microglia through the analysis of microvesicles they release into the extracellular space, and which reach the cerebrospinal fluid. Primary goal of the project was to investigate in a large cohort of subjects with multiple sclerosis whether microglial microvesicles are biomarkers of microglia activation, reflecting detrimental or beneficial microglia phenotypes.

RESULTS

The first objective has been accomplished by demonstrating that the concentration of microglial microvesicles in the cerebrospinal fluid is higher in relapsing and CIS subjects as compared to non-inflammatory neurological controls. In addition we found that CIS patients converting to MS within one year display significantly higher microvesicle levels compared to non converters and healthy subjects. These data indicate a diagnostic and prognostic value of microvesicle quantification in the disease. The second objective has been achieved by analyzing the content of microvesicles released by cultured microglia. We identified eight molecules (microRNAs)

which are upregulated in microvesicles derived from microglia characterized by detrimental versus beneficial phenotype. Such molecules, if expressed in microglia microvesicles isolated from the cerebrospinal fluid of relapsing MS subjects, will further increase the diagnostic potential of microvesicles, by allowing monitoring of microglia response to pharmacological treatment in subjects with the disease.

The third objective has been reached through functional characterization of microglia phenotypes *in vitro*, i.e. by the analysis of the action of microvesicles released by microglia exposed to different polarizing agents on proliferation, differentiation and myelin deposition by oligodendrocyte precursor cells, the glial cell type more strongly damaged in multiple sclerosis. Our data indicate that microglia microvesicles play a key role in microglia-oligodendrocyte crosstalk and that the activation state of microglia greatly impact the pro-regenerative function of oligodendrocyte precursor cells. These data suggest that redirecting microglia towards a protective phenotype may hold a therapeutic potential for multiple sclerosis, including progressive forms of the disease which are characterized by progressive loss of oligodendrocytes.

CONCLUSIONS

Results from this project have an immediate impact on subjects with multiple sclerosis, as they provide a novel tool (microvesicle quantification) to improve the disease diagnosis and prognosis. In addition, if molecules identified in microvesicles produced by

pro-inflammatory versus pro-regenerative microglia are upregulated in microvesicles isolated from relapsing subjects, the possibility will open to extrap-

olate the phenotype acquired in vivo by microglia in the course of the disease or in response to treatments by the analysis of microvesicle content.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Zanier ER, Pischiutta F, Riganti L, Marchesi F, Turola E, Fumagalli S, Perego C, Parotto E, Vinci P, Veglianesi P, D'Amico G, Verderio C and De Simoni MG Bone marrow mesenchymal stromal cells drive protective M2 microglia polarization after brain trauma. *Neurotherapeutics* 2014, 11: 679-695.

Gabrielli M, Battista N, Riganti L, Prada I, Antonucci F, Matteoli M, Maccarrone M, Verderio C. Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Rep* 2015; 16(2):213-20.

Prada I, Amin L, Legname G, Furlan R., Verderio C., Cojoc D. A new approach to follow single extracellular vesicle-cell interaction using optical tweezers, *Biotechniques*, 60:35-41.

Morini R, Ghirardini E, Butti E, Verderio C, Martino G, Matteoli M. Subventricular zone neural progenitors reverse TNF-alpha effects in cortical neurons. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6(1): 166.

Riganti L, Antonucci F, Gabrielli M, Giussani P, Menna E, Matteoli M, Verderio C. Sphingosine-1 phosphate impacts presynaptic functions by regulating synapsin I localization in the presynaptic compartment, under revision *Journal of Neuroscience*.

Invited lectureships at International Meetings:

Role of microglia-derived microvesicles in neuron-glia communication. XI European Meeting in health and Disease, July3-6 2013 Berlin, Germany.

Pathogenic role of microglia-derived microvesicles in neuroinflammation and neurodegeneration. XV SINS Congress, Rome, Italy, 5 October 2013.

Pathogenic role of microglia-derived microvesicles in neuroinflammatory diseases. Nutrition and Neuroinflammation Symposium, Bordeaux, France, 6th December 2013.

Extracellular microvesicles as novel mediators of astrocyte-to-neuron communication. 45th Annual ASN Meeting, Long Beach, CA, March 8-12 2014.

Pathogenic role of microglia-derived microvesicles in neuroinflammation and neurodegeneration. 2014 EMBL Conference: Microglia: Guardians of the Brain, 26 - 29 March 2014.

Role of microvesicles in microglia-to-neuron communication in neuroinflammation. Presented at 5th PF2MUC Symposium zoom in microglia, satellite meeting of the XVIII Congress of the Portuguese Biochemical Society, December 17th 2014, Coimbra, Portugal.

ME-HAD EV training course. Siena March 26-28 2015. Round table Present and future for clinical implications of extracellular vesicles. Special guest.

Glia-to-neuron shuttling of mir146a via extracellular vesicles regulates synaptotagmin I translation in neurons. 17th International Neuroscience Winter Conference, Sölden, 7-11 April 2015, Austria.

Pathogenic role of microglia-derived extracellular vesicles in neurodegeneration. 6th Joint German-Italian Purine Meeting, July 2015 Hamburg, Germany.

Role of microvesicles in microglia-neurons communications 25th ISN Meeting, August 23-27th 2015 Cairns, Australia.

Pathogenic role of microglia-derived extracellular vesicles in neurodegeneration. 1st Australian Neurodegeneration and Dementia Conference, 20-21th August 2015 Melbourne, Australia.

Role of P2X7-dependent production of extracellular vesicles in cell-to-cell communication between microglia and brain cells. Cost Action BM1406, Ion channels and immune response, 24-25th September, Warsaw, Poland.

Driving microglia metabolism towards remyelination and restoration of brain damage in multiple Sclerosis. 2015 GMSI award ceremony, ECTRIMS Barcelona, Spain, 8th October.

Pathogenic role of microglial microvesicles in neuroinflammation and neurodegeneration. Symposium, microglia, key player in neurodegenerative diseases. Toulouse, France, 25th November.

September 2013, La notte Bianca dei Ricercatori, moderator Dr Luigi Ripamonti, under the sponsorship of Fondazione Umberto Veronesi.

November 2013 La mente che non funziona. Inauguration of the city of Science, Naples, moderator Alessandro Cecchi Paone, under the sponsorship of Fondazione Umberto Veronesi.

Poster presentations, oral communications:

Gabrielli M, Battista N, Riganti L, Prada I, Antonucci F, Cantone L, Lombardi M, Matteoli M, Maccarrone M, Verderio C. Active endocannabinoids are secreted on the surface of microglial microvesicles. Oral presentation at National Meeting of PhD student in Neuroscience, February 26th, 2015, Naples, Italy.

Lombardi M, Elisabetta Bonfanti E, Abbraccio MP, Fumagalli M, Verderio C. Microglia-derived extracellular vesicles regulate oligodendrocyte differentiation. *Frontiers in regenerative medicine*, 18-20 February 2015, Turin, Italy.

Fumagalli M, Lombardi M, Bonfanti E, Boda E, Buffo A, Abbraccio MP, Verderio C. Microglia-derived extracellular vesicles regulate the proliferation and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. 12th European Meeting on Glial Cells 2015, Bilbao, Spain.

Prada I, Turola E, Amin L, Gabrielli M, Drago F, Franck J, Legname G, Furlan R, Vizioli J, Cojoc D, Peruzzi F, Verderio C. Glia-to-neuron shuttling of miR-146a via extracellular microvesicles modulates synaptotagmin1 translation in neurons - 12th European Meeting on Glial Cells, 2015 Bilbao, Spain.

Ilaria Prada, Elena Turola, Giulia D'Arrigo, Marta Lombardi, Francesca Peruzzi, Claudia Verderio Astrocyte-to-neuron shuttling of mi-R146a via extracellular microvesicles regulated protein translation in neurons" - 9th FENS Forum of Neuroscience - July 2014, Milan, Italy.

Riganti L, M. Gabrielli, F. Antonucci, E. Menna, P. Giussani, P. Viani, M. Matteoli, C. Verderio. Sphingosine-1-phosphate (s1p) impacts presynaptic function by regulating synapsin I localization in the presynaptic compartment. 9th FENS Forum of Neuroscience, July 2014, Milan, Italy.

Gabrielli M, Battista N, Riganti L, Prada I, Antonucci F, Lombardi M, Matteoli M, Maccarrone M, Verderio C. Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles produced by microglia. FENS Forum 2014, July 5-9th, Milan, Italy.

Gabrielli M, Battista N, Riganti L, Prada I, Antonucci F, Cantone L, Lombardi M, Matteoli M, Maccarrone M, Verderio C. Active endocannabinoids are secreted on microglial microvesicles poster presentation at International Winter Conference 2015, April 7-11th, Solden, Austria.

Gabrielli M, Battista N, Riganti L, Prada I, Antonucci F, Cantone L, Lombardi M, Matteoli M, Maccarrone M, Verderio C. Active endocannabinoids are secreted on the surface of microglial microvesicles. Oral presentation selected for ESN Young Member Symposia at European Society of Neurochemistry Conference 2015 'Molecular Mechanisms of Regulation of Nervous System', June 14-17th, Tartu, Estonia.

Lombardi M, Fumagalli M, Bonfanti E, Boda E, Buffo A, Abbraccio MP, Verderio C. Microglia-derived extracellular vesicles regulate the proliferation and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. 2015 GLIUSYN- Astrocytes and microglia, key partners in synaptic transmission, September 30-October 2, Bordeaux, France.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 3 anni e l'ammontare di 170.000 €

Andrea Cossarizza

Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico e di Scienze Morfologiche,
Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

COLLABORATORI:

Sara De Biasi, Milena Nasi, Elena Bianchini, Marcello Pinti, Lara Gibellini

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Anna Maria Simone, Diana Ferraro, Francesca Vitetta, Patrizia Sola,
Centro per la Sclerosi Multipla, Clinica Neurologica, Nuovo Ospedale Civile Sant'Agostino
Estense (NOCSAE), Modena

Fenotipo e polifunzionalità delle cellule iNKT periferiche come marcatore immunologico delle diverse forme di sclerosi multipla e dopo diverse terapie immunomodulatorie

PREMESSE E OBIETTIVI

Negli ultimi anni, alcuni studi hanno analizzato il ruolo e l'attività delle cellule T Natural Killer (NKT) e del loro sottogruppo "invariante" (i)NKT nella sclerosi multipla (SM). Le cellule NKT sono una sottopopolazione di linfociti che esprime il classico recettore dei linfociti T insieme a marcatori tipici delle cellule NK, e che presenta caratteristiche funzionali proprie sia dell'immunità innata, sia adattiva. Le cellule iNKT sono caratterizzate dall'espressione di un recettore T invariante (che monta catene $V\alpha 24-J\alpha 18$) e sono capaci di regolare l'immunità attraverso il rapido rilascio di elevate quantità di citochine. Nel circolo sanguigno, queste cellule sono molto rare (tipicamente <1% delle cellule T), producono IL-4 e /o IFN-gamma, e vengono attivate da molecole di natura lipidica o glicolipidica come l'alfa-galattosylceramide (α -GalCer), solo se presentate dal recettore CD1d.

Le cellule iNKT sono state principalmente studiate nei pazienti con SM recidivante remittente (SMRR), o in pazienti trattati con IFN-beta. Esistono dati contrastanti su possibili difetti funzionali delle cellule iNKT nella SM, probabilmente a causa di problemi metodologici che sono collegati alla eterogeneità delle analisi, fatte durante diverse fasi della malattia, del basso numero di pazienti valutati, o di problemi tecnici anche legati alla scarsità di queste cellule, che richiede l'analisi citometrica di un gran numero di eventi, o ad un diverso uso dei vari marcatori di superficie disponibili. Infine, pochi studi hanno esa-

minato l'espressione della glicoproteina di membrana CD161, espressa su circa il 15% dei linfociti T umani, nonché sulle cellule iNKT, e che identifica le cellule con potenziale pro-infiammatorio. Per chiarire meglio il ruolo delle cellule iNKT nella SM era perciò necessaria una dettagliata caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule iNKT e delle loro sottopopolazioni. Pertanto, lo scopo del progetto è stato lo studio delle modificazioni a carico del fenotipo e della funzionalità delle cellule iNKT durante le fasi di ricaduta e di remissione della patologia.

RISULTATI

Sono stati arruolati un totale di 165 pazienti: 121 pazienti con SMRR (31 trattati con interferone beta-1a, 25 con natalizumab, 29 con glatiramer acetato, 17 di nuova diagnosi, non in terapia e 19 non in terapia con una forma non-attiva della malattia) e 44 pazienti con una forma progressiva di SM (20 con una forma primariamente progressiva e 24 con una secondariamente progressiva). Inoltre, come controllo, sono stati arruolati 55 volontari sani comparabili per sesso ed età ai pazienti. Il fenotipo delle cellule iNKT è stato caratterizzato utilizzando una metodica basata sulla citofluorimetria policromatica ad alta velocità, mentre la capacità delle cellule iNKT di produrre contemporaneamente fino a 4 citochine (IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-4) è stata analizzata su 57 pazienti e 26 controlli. I pazienti con diverse forme di SM o trattati con terapie differenti mostrano livelli paragonabili cellule iNKT. Tuttavia, i pazien-

ti, rispetto ai soggetti sani, presentano una risposta polifunzionale delle cellule iNKT caratterizzata principalmente da una produzione di citochine Th1 e Th17. Nei pazienti con forma secondariamente progressiva, le cellule iNKT che esprimono il CD4 e il CD8 producono livelli più alti di IL-17. Infine, i pazienti trattati con Natalizumab mostrano una percentuale minore di cellule iNKT che producono IL-17, TNF- α e IFN- γ rispetto a quelli sottoposti ad altri trattamenti terapeutici.

CONCLUSIONI

Il presente studio mostra, per la prima volta, che i

pazienti con forma secondariamente progressiva della malattia sono caratterizzati da cellule iNKT che presentano un' aumentata produzione di citochine di tipo Th1 e Th17. Il fatto che questi pazienti siano caratterizzati, dal punto di vista clinico, da alti livelli di infiammazione e neurodegenerazione, suggerisce che la fase progressiva della malattia possa essere caratterizzata dall'attivazione permanente proprio delle cellule iNKT che mostrano un fenotipo infiammatorio. Infine, lo studio rivela anche che i farmaci biologici quali il natalizumab possono agire su queste cellule, mostrando una attività anti-infiammatoria.

Phenotype and polyfunctionality of peripheral blood iNKT cells as an immunological marker for different forms of multiple sclerosis and following different immunomodulatory treatments

INTRODUCTION AND AIMS

In the last years, few studies have analyzed the role and functionality of NKT and iNKT cells during multiple sclerosis (MS). NKT cells are a population of T lymphocytes that bear NK receptors and link innate and adaptive immunity. A subgroup named "invariant NKT-cells" (iNKT, expressing a V α 24-J α 18 T-cell receptor) is a potent source of cytokine and can regulate autoimmunity. iNKT-cells are very rare in peripheral blood (typically, <1% of T cells), produce IL-4 and/or IFN-gamma, are activated by lipids such as alpha-galactosylceramide (α -GalCer) presented by CD1d. They were mainly studied in patients with relapsing remitting (RR) MS, or assuming IFN- β therapy. Contrasting data exist on iNKT cell defects in MS, probably due to the different phases of disease analyzed, number of patients, or to technical problems due to the paucity of such cells (that requires the cytometric analysis of a huge number of cells) and to the use of different surface markers. Concerning iNKT cells, almost no studies have investigated the expression of CD161 molecule, the killer cell lectin-like receptor subfamily B-member 1, which is expressed on about 15% of human T cells as well as on iNKT lymphocytes, and identifies cells with pro-inflammatory potential. A detailed phenotypic and functional characterization of iNKT cell subsets was needed to better clarify their role in MS, particularly during the relapse and remission

phases of disease. Thus, the main aim of our project was to show the presence of changes in their phenotype and function.

RESULTS

We studied a total of 165 patients: 121 patients with RR MS (31 treated with beta-interferon-1a, 25 with natalizumab, 29 with glatiramer acetate, 17 were untreated and had a newly-diagnosed active disease, and 19 were untreated with a not-active form of the disease) and 44 patients with progressive MS (20 with a primary progressive and 24 with a secondary progressive form). Healthy controls were 55 age and sex-matched subjects. By using high-speed polychromatic flow cytometry, we characterized iNKT cells. Moreover, in 57 patients and 26 controls, we could analyze the ability of iNKT cells to produce simultaneously up to 4 cytokines (IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-4). No gross differences were found in the amount of iNKT and their subsets among groups of patients with different forms or during different treatments. However, in MS patients, the polyfunctional response of iNKT cells mainly showed Th1 and Th17 profiles. In particular, in secondary progressive MS patients, iNKT cells expressing CD4+ or CD8+ produced significantly high levels of IL-17. Concerning treatments, patients treated with natalizumab displayed lower levels of iNKT cells producing IL-17, TNF- α and IFN- γ compared to other therapies.

CONCLUSIONS

This study reports the first data demonstrating that iNKT cells from MS patients with secondary progressive form, who are characterized by high levels of inflammation and neurodegeneration, exhibit a sustained increase in the production of Th1 and

Th17 cytokines. As a whole, this could suggest that the progressive phase of the disease is characterized by permanent iNKT activation and a skewing towards an inflammatory phenotype. Finally, the study also demonstrates that disease modifying drugs can modulate iNKT cell function.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Ferraro D, Federzoni L, Vitetta F, Simone A, Cossarizza A, Nichelli P, Sola P. Frequent early multiple sclerosis relapses during treatment with Fingolimod: a paradoxical effect? *Multiple Sclerosis* 19(11): 1950, 2013.

Ferraro D, De Biasi S, Vitetta F, Simone AM, Federzoni L, Borghi V, Cossarizza A, Nichelli PF, Sola P. Recurrent Varicella following Steroids and Fingolimod in a Multiple Sclerosis Patient. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Dec;8(5):1059-61.

Cossarizza A, Cousins D. Overcoming challenges in cellular analysis: Multiparameter analysis of rare cells. *Science*, 23 January 2015; 347 (6220), 443 [DOI:10.1126/science.347.6220.443-c].

De Biasi S, Simone AM, Nasi M, Bianchini E, Ferraro D, Vitetta F, Gibellini L, Pinti M, Del Giovane C, Sola P, Cossarizza A. Invariant Natural Killer T cells in secondary progressive multiple sclerosis patients display pro-inflammatory profiles. Submitted.

De Biasi S., Nasi M., Simone AM., Ferraro D., Vitetta F., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Sola P., Cossarizza A. Complex changes in invariant Natural Killer T (iNKT) cells in patients with different clinical forms and treatments of Multiple Sclerosis. *Cyto 2013*, San Diego, USA.

De Biasi S., Nasi M., Simone AM., Ferraro D., Vitetta F., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Sola P., Cossarizza A. Complex changes in invariant Natural Killer T (iNKT) cells in patients with different clinical forms and treatments of Multiple Sclerosis. *ICI 2013*, Milan, Italy.

Vitetta F, De Biasi S., Simone AM., Ferraro D., Nasi M., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Sola P., Cossarizza A. Complex changes in invariant Natural Killer T (iNKT) cells in patients with different clinical forms and treatments of Multiple Sclerosis. *ECTRIMS October*, 2-5, 2013, Copenhagen, Denmark.

De Biasi S., Nasi M., Simone AM., Ferraro D., Vitetta F., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Sola P., Cossarizza A. Fine tuning of Treg and iNKT cells after treatment with Fingolimod in Multiple Sclerosis patients. *Cyto 2014*, Fort Lauderdale, Florida, USA.

De Biasi S., Nasi M., Simone AM., Ferraro D., Vitetta F., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Sola P., Cossarizza A. Principal Component Analysis allows to cluster patients with Multiple Sclerosis on the basis of different subsets of CD8+ and iNKT cells. *Cyto 2014*, Fort Lauderdale, Florida, USA.

Ferraro D., Simone A.M., Vitetta F., De Biasi S., Nasi M., Bianchini E., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Cossarizza A., Sola P. Fine tuning of Treg and iNKT cells after treatment with Fingolimod in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis patients. *XLV congresso della Società Italiana di Neurologia (SIN)*, Cagliari, Italy, 2014.

Simone A.M., Ferraro D., Vitetta F., De Biasi S., Nasi M., Bianchini E., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Cossarizza A., Sola P. Principal Component Analysis allows to cluster patients with Multiple Sclerosis on the basis of different subsets of CD8+ and iNKT cells. *XLV congresso della Società Italiana di Neurologia (SIN)*, Cagliari, Italy, 2014.

Simone A.M., Ferraro D., Vitetta F., De Biasi S., Nasi M., Bianchini E., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Cossarizza A., Sola P. Principal Component Analysis allows to cluster patients with multiple sclerosis on the basis of different subsets of CD8+ and iNKT cells. *American and European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ACTRIMS/ECTRIMS)*, Boston, USA, 2014.

Ferraro D., Simone A.M., Vitetta F., De Biasi S., Nasi M., Bianchini E., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Cossarizza A., Sola P. Fine tuning of Treg and iNKT cells after treatment with Fingolimod in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis patients. *American and European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ACTRIMS/ECTRIMS)*, Boston, USA, 2014.

De Biasi S., Nasi M., Bianchini E., Ferraro D., Simone A.M., Vitetta F., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Cossarizza A., Sola P. Fine tuning of Treg and iNKT cells after treatment with Fingolimod in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis patients. *Italian Association of Neuroimmunology (AINI)*, Sorrento, Italy, 2014.

De Biasi S., Nasi M., Bianchini E., Ferraro D., Simone A.M., Vitetta F., Gibellini L., Pinti M., Del Giovane C., Cossarizza A., Sola P. Clustering patients with Multiple Sclerosis on the basis of different subsets of CD8+ and iNKT cells by using principal component analysis. *Italian Association of Neuroimmunology (AINI)*, Sorrento, Italy, 2014.

De Biasi S, Nasi M, Bianchini E, Ferraro D, Simone AM, Vitetta F, Gibellini L, Pinti M, Del Giovane C, Sola P, Cossarizza A. Polyfunctional Response of Invariant Natural Killer T Cells in Patients Affected by Multiple Sclerosis Displays Th-1 and Th-17 Profiles. *Cyto 2015*, Glasgow, UK.

De Biasi S, Nasi M, Bianchini E, Ferraro D, Simone AM, Vitetta F, Gibellini L, Pinti M, Del Giovane C, Sola P, Cossarizza A. Polyfunctional Response of Invariant Natural Killer T Cells in Patients Affected by Multiple Sclerosis Displays Th-1 and Th-17 Profiles. *ESCCA 2015*, Taormina, Italy.

De Biasi S. Multiparameter Analysis of rare cells. *ESCCA*. Taormina, Italy, 2015.

Ferraro D, Simone AM, Vitetta F, De Biasi S, Nasi M, Bianchini E, Gibellini L, Pinti M, Del Giovane C, Sola P, Cossarizza A. Modulation of Tregs and invariant Natural Killer T cells by Fingolimod in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis patients. *ACTRIMS/ECTRIMS 2015*.

Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, De Biasi S, Nasi M, Bianchini E, Gibellini L, Pinti M, Del Giovane C, Cossarizza A, Sola P. Polyfunctionality of peripheral blood iNKT cells as an immunological marker of different forms of Multiple Sclerosis and following different immunomodulatory treatments. *ACTRIMS/ECTRIMS 2015*.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni (prorogato di 2 mesi) e l'ammontare di 172.000 €

Maria di Ioia

Dipartimento di Neuroscienze, Imaging e Scienze cliniche, Università G. d'Annunzio di Chieti-Pescara, Chieti

MENTORE: **Piero Del Boccio**

Sviluppo di metodi di estrazione dei lipidi liquorali ed applicazione di tecniche di spettrometria di massa per la caratterizzazione del profilo lipidico e dei livelli di neurosteroidi nei pazienti SM

PREMESSE E OBIETTIVI

Da molti anni la ricerca nell'ambito della sclerosi multipla (SM) è finalizzata all'identificazione di nuovi biomarcatori che permettano di comprendere meglio i meccanismi eziopatogenetici di base di questa complessa malattia e di giungere ad una diagnosi più precoce possibile. Questo programma di addestramento prevede l'impiego di varie tecniche di spettrometria di massa e l'uso di una vasta strumentazione all'avanguardia per poter realizzare studi di metabonomica su campioni biologici di pazienti con SM. Gli obiettivi che si proponeva il presente progetto di ricerca erano lo studio dei livelli di neurosteroidi e la caratterizzazione dei lipidi nel liquido cefalo-rachidiano (LCR) dei pazienti con SM, al fine di evidenziare il ruolo di queste biomolecole nel determinare la malattia ed eventuali differenze di espressione fenotipica tra i sessi. È noto infatti che il sesso femminile è più colpito e che la gravidanza svolge un ruolo protettivo nei confronti di possibili ricadute, probabilmente attraverso gli ormoni sessuali. L'individuazione di nuovi biomarcatori di malattia potrà essere utile per la sperimentazione di nuovi trattamenti farmacologici, possibilmente individualizzati in base alle caratteristiche molecolari, di aggressività e di decorso di ogni singolo paziente.

RISULTATI

I metodi per l'estrazione dei lipidi sono stati svilup-

pati partendo dall'esperienza e dai risultati degli studi precedenti. Un'analisi altamente sensibile che utilizza la tecnologia di spettrometria di massa MALDI-TOF ha portato all'identificazione di molecole note e non. In particolare sono state ottenute 36 acilcarnitine, 19 amminoacidi e centinaia di picchi associati a specie lipidiche. Di questi metaboliti 10 sono stati trovati diversamente espressi nei pazienti con e senza SM e sono possibili biomarcatori di SM. Inoltre, è in corso di sviluppo un metodo per l'identificazione degli steroidi sessuali nel siero e nel LCR ma sono necessari ulteriori esperimenti.

CONCLUSIONI

I risultati più rilevanti di questo studio sono stati gli elevati livelli di lisofosfolipidi circolanti e di glutammato nel LCR dei pazienti con SM. Questi risultati aiuteranno a chiarire i meccanismi patogenetici responsabili della malattia. In particolare, devono essere approfonditi il ruolo della fosfolipasi A2 (l'enzima responsabile della scissione delle fosfatidilcoline dalle membrane) nella fase acuta della malattia ed il coinvolgimento dei lipidi nella risposta infiammatoria autoimmune. Queste molecole potrebbero diventare il target di nuovi farmaci e potrebbero essere usati per stabilire il tipo di decorso al fine di personalizzare la terapia.

Development of methods for lipid extraction from CSF and application of mass spectrometry technique for the characterization of the lipid profile and of neurosteroids levels in MS patients

INTRODUCTION AND AIMS

For many years, research in the field of multiple sclerosis (MS) aims at the identification of new biomarkers that allow a better understanding of the pathogenetic mechanisms of this complex disease and to reach an earlier diagnosis. This training program provides for the use of various mass spectrometric techniques and of an advanced instrumentation to realize metabolomics studies on biological samples of MS patients. The aims of this research project were the study of the levels of neurosteroids and the characterization of lipids in cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients, in order to highlight the role of these biomolecules in determining the disease and possible differences in expression phenotype between the sexes. It is known that the female sex is most affected and that pregnancy plays a protective role against possible relapses, probably through sex hormones. The identification of new biomarkers of disease can be useful to test new drugs, to individualize therapy based on the molecular characteristics and on course of each patient.

RESULTS

Methods for lipids extraction have been developed starting from experience and results of previous

studies. A highly sensitive analysis using MALDI-TOF mass spectrometry technology led to the identification of known and unknown compounds. In particular 36 acyl carnitines, 19 amino acids species and hundreds of peaks associated to lipid species were obtained. Of these metabolites 10 were significantly different between MS and non-MS patients and are candidate biomarkers of MS. In addition a method for detection of serum and CSF sexual steroids is under development but further experiments are needed.

CONCLUSIONS

The most relevant results of this study were high levels of circulating Lyso-phosphatidylcholines and of glutamate in CSF of MS patients. These results will help to clarify the pathogenetic mechanisms responsible of the disease. In particular the role of Phospholipase A2 (the enzyme responsible of cutting phosphatidylcholines from membranes) in the acute phase of the disease and the involvement of lipids in autoimmune and inflammatory response have to be further investigated. These molecules may become the target of new drugs and may be used to establish the type of disease's course in order to personalize the therapy.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Pieragostino D, D'Alessandro M, di Ioa M, Rossi C, Zucchelli M, Urbani A, Di Ilio C, Lugaresi A, Sacchetta P, Del Boccio P. An integrated metabolomics approach for the research of new cerebrospinal fluid biomarkers of multiple sclerosis. *Mol Biosyst.* 2015 May 19;11(6):1563-72. doi: 10.1039/c4mb00700j.

Pieragostino D, D'Alessandro M, di Ioa M, Di Ilio C, Sacchetta P, Del Boccio P. Unraveling the molecular repertoire of tears as a source of biomarkers: beyond ocular diseases. *Proteomics Clin Appl.* 2015 Feb;9(1-2):169-86. doi: 10.1002/prca.201400084. Epub 2015 Jan 12.

Totaro R, Lugaresi A, Bellantonio P, et al; Natalizumab Long-Term Treatment Study group. Natalizumab treatment in multiple sclerosis patients: a multicenter experience in clinical practice in Italy. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2014 Apr-Jun;27(2):147-54.

Kalincik T, Buzzard K, Jokubaitis V, et al MSBase Study Group. Risk of relapse phenotype recurrence in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014 Oct;20(11):1511-22. doi: 10.1177/1352458514528762. Epub 2014 Apr 28.

Bertolotto A, Capobianco M, Amato MP, et al, Italian Multiple Sclerosis Study group. Guidelines on the clinical use for the detection of neutralizing antibodies (NAbs) to IFN beta in multiple sclerosis therapy: report from the Italian Multiple Sclerosis Study group. *Neurol Sci.* 2014 Feb;35(2):307-16. doi: 10.1007/s10072-013-1616-1. Epub 2013 Dec 29.

Hughes SE, Spelman T, Gray OM, et al, MSBase study group. Predictors and dynamics of postpartum relapses in women with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014 May;20(6):739-46. doi: 10.1177/1352458513507816. Epub 2013 Oct 9.

Lugaresi A, di Ioa M, Travaglini D, Pietrolongo E, Pucci E, Onofri M Risk-benefit considerations in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2013;9:893-914. doi: 10.2147/NDT.S45144. Epub 2013 Jun 24.

Ghezzi A, Pozzilli C, Grimaldi LM, Moiola L, Brescia-Morra V, Lugaresi A, Lus G, Rinaldi F, Rocca MA, Trojano M, Bianchi A, Comi G, Filippi M; Italian MS Study Group. Natalizumab in pediatric multiple sclerosis: results of a cohort of 55 cases. *Mult Scler.* 2013 Jul;19(8):1106-12. doi: 10.1177/1352458512471878. Epub 2013 Feb 11.

Pieragostino D, Del Boccio P, Di Ioa M, Pieroni L, Greco V, De Luca G, D'Aguanno S, Rossi C, Franciotta D, Centonze D, Sacchetta P, Di Ilio C, Lugaresi A, Urbani A. Oxidative modifications of cerebral transthyretin are associated with multiple sclerosis. *Proteomics.* 2013 Mar;13(6):1002-9. doi: 10.1002/pmic.201200395. Epub 2013 Feb 15.

Kalincik T, Vivek V, Jokubaitis V, et al, MSBase Study Group. Sex as a determinant of relapse incidence and progressive course of multiple sclerosis. *Brain.* 2013 Dec;136(Pt 12):3609-17. doi: 10.1093/brain/awt281. Epub 2013 Oct 18.

di Ioa M., Travaglini D, Di Tommaso V, Mancinelli L, Pietrolongo E, De Luca G, Farina D, Lugaresi A. Teriflunomide for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: the Chieti experience. 31stECTRIMS (Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis). Barcelona, Spain, 7-10 October 2015 (EP 1446).

Pieragostino D, Cicalini I, D'Alessandro M, di Ioa M, A. Lugaresi, Urbani A, Sacchetta P, Del Boccio P. TLC-MALDI-Imaging approach for lipidomics studies in cerebrospinal fluid reveals low levels of sphingomyelin in multiple sclerosis patients. 31stECTRIMS (Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis). Barcelona, Spain, 7-10 October 2015 (EP1491).

di Ioa M, Pieragostino D, Rossi C, Zucchelli M, D'Alessandro M, Lugaresi A, Travaglini D, Farina D, Sacchetta P, Del Boccio P. Developments of method for lipid extraction from CSF and application of mass spectrometry techniques for the characterization of the lipid profile and of neurosteroids levels in MS patients. XLV SIN CONGRESS, Cagliari, Italy, 11-14 October 2014 (S 335).

D. Pieragostino, M. D'Alessandro, M. di Ioa, M. Zucchelli, A. Lugaresi, P. Sacchetta, P. Del Boccio. Lipidomics analysis reveals low levels of phosphatidylcholines and sphingomyelins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting (MS Boston 2014), Boston (MA, USA), 10-13 Sept 2014 (P273).

Di Ioa M, Pieragostino D, D'Alessandro M, Rossi C, Zucchelli M, Lugaresi A, Di Tommaso V, Farina D, Travaglini D, Sacchetta P, Del Boccio P. Metabolomics analysis of cerebrospinal fluid reveals a distinctive biochemical alteration associated with multiple sclerosis. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting (MS Boston 2014), Boston (MA, USA), 10-13 Sept 2014 (P275).

Di Ioa M, Pieragostino D, Rossi C., Zucchelli M, Di Ilio C, Lugaresi A, De Luca G, Farina D, Sacchetta P, Urbani A, Del Boccio P. Mass spectrometry based metabolomics of the cerebrospinal fluid highlights a correlation between polar lipids, carnitines, aminoacids levels and clinical data in multiple sclerosis patients. 21st annual meeting of the "European Charcot Foundation" Baveno (Verbania-Cusio-Ossola), Italy, 28-30 Novembre 2013.

Di Ioa M, Pieragostino D, Rossi C., Zucchelli M, Di Ilio C, Lugaresi A, De Luca G, Farina D, Sacchetta P, Urbani A, Del Boccio P. Mass spectrometry based metabolomics of the cerebrospinal fluid highlights a correlation between polar lipids, carnitines, aminoacids levels and clinical data in multiple sclerosis patients" XLIV- SIN CONGRESS Milan, Italy, 2-5 Novembre 2013.

Di Ioa M, Di Giacomo R, Mancinelli L, Farina D, Capasso M., Lugaresi A. Primary progressive multiple sclerosis and ocular Myasthenia Gravis: chance or underlying predisposition to autoimmunity? XLIV SIN CONGRESS Milan, Italy, 2-5 Novembre 2013.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 40.000 €



PATOGENESI E
FATTORI DI RISCHIO

PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

Francesco Cucca

Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB), CNR, Monserrato (CA)

COLLABORATORI:

Maristella Steri, Magdalena Zoledziewska, Serena Sanna, Maristella Pitzalis, Edoardo Fiorillo, Valeria Orrù, Francesca Deidda, Michael Whalen, Stefania Olla, Alessandra Meloni, Valeria Faà, Isadora Asunis, Maria Laura Idda, Mauro Pala

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Matteo Floris, Ilenia Zara, Centro di Ricerca, Sviluppo e Studi Superiori in Sardegna, CRS4, Pula (CA)

Approccio razionale per la ricerca di composti per la cura della sclerosi multipla basato sull'analisi dei target biologici individuati dagli studi di associazione sull'intero genoma in Sardegna

PREMESSE E OBIETTIVI

Negli ultimi anni le conoscenze sulla componente genetica della sclerosi multipla (SM) sono state enormemente ampliate. Grazie agli studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) oltre 110 loci sono stati associati alla SM. Tuttavia i loci fin qui individuati non spiegano tutta la variabilità genetica. L'obiettivo della ricerca è stato quello di identificare nuovi bersagli terapeutici per la SM mediante uno studio genetico integrato che ha sfruttato le peculiarità della popolazione sarda. Infatti, la Sardegna mostra un'elevata incidenza di pazienti con SM, inoltre la sua struttura genetica è definita da un'ampia variabilità che ben rappresenta quella europea, ma con la presenza di varianti molto frequenti che sono rare o assenti in altre popolazioni.

Abbiamo sviluppato la ricerca creando un contesto di studio unico che ha previsto una vasta genotipizzazione con *chip* commerciali di 3.000 pazienti con SM, 4.000 donatori di sangue e di 7.000 individui afferenti al progetto SardiNIA/ProgeNIA.

Nella coorte SardiNIA/ProgeNIA sono stati studiati, mediante citometria a flusso, i livelli quantitativi di cellule immunitarie per un totale di 272 immunofenotipi insieme ai livelli di alcune citochine e immunoglobuline di differenti classi. Parallelamente sono state condotte analisi di associazione sull'intero genoma sia per la SM che per ciascun tratto quantitativo misurato. In tutti gli studi sono stati testati per

associazione oltre 19 milioni di varianti direttamente genotipizzate o imputate mediante sequenze a bassa copertura di 2,120 individui sardi. Infine, tutti i dati sono stati incrociati per la ricerca di associazioni coincidenti tra varianti di malattia e impatto di funzione sul sistema immunitario. Questo metodo è stato in grado di individuare percorsi fisiologici che vengono alterati nell'autoimmunità suggerendo bersagli molecolari utilizzabili ai fini terapeutici. Di seguito lo studio prevedeva la ricerca di molecole farmacologiche attive sul bersaglio terapeutico individuato dal nostro studio.

RISULTATI

L'approccio utilizzato ha permesso di individuare una nuova variante associata al rischio di sviluppare la SM (OR=1.27; p-value=1.58 x 10⁻⁹). Tale variante è localizzata nel gene *TNFSF13B*, codificante per la citochina BAFF che esercita la sua attività nei confronti dei linfociti B.

L'associazione con la malattia è stata replicata in una casistica di 2.292 casi e 2.553 controlli provenienti dall'Italia continentale (p-value=0.0098; MAF=5.7%).

La stessa variante associata alla SM, incrementa i livelli della proteina solubile di BAFF (sBAFF) (p-value=8.5 x 10⁻¹⁵⁰), incrementa il numero dei linfociti B (p-value=9.36 x 10⁻²³), incrementa le IgG (p-value=1.68 x 10⁻¹²), IgA (p-value=7.64 x 10⁻⁹), IgM

(p -value= 4.7×10^{-8}) e riduce il numero dei monociti circolanti (p -value= 9.07×10^{-13}).

Questa variante mostra una differente frequenza nelle popolazioni mondiali; è molto comune in Sardegna (MAF= 26.5%), comune in Sud Europa, molto rara in Nord Europa e in Asia e completamente assente in Africa. I nostri dati, basati su dati di sequenziamento, sono a supporto di una selezione positiva di questa variante in Sud Europa, con impatto particolarmente forte in Sardegna.

La variante crea un nuovo sito di poliadenilazione, associato alla formazione di un prodotto più corto, valutato sul trascrittoma in leucociti circolanti di 606 individui sardi (p -value= 8.34×10^{-86}).

Terapie con anticorpi monoclonali che agiscono sulla deplezione delle cellule B sono già oggetto di studi clinici per la SM e altre patologie autoimmuni, tuttavia non esistono delle *small molecules* descritte che hanno come bersaglio la citochina BAFF. Per sele-

zionare le *small molecules* attive abbiamo condotto esperimenti di dinamica molecolare che ci hanno consentito di progettare un modello farmacoforo da inserire in un protocollo di screening virtuale.

CONCLUSIONI

I nostri risultati confermano la potenza del metodo proposto per individuare varianti geniche implicate nella malattia e comprendere il loro ruolo fisiopatologico, ad esempio riaffermando il ruolo della disregolazione dell'attività delle cellule B nella SM.

I risultati emersi hanno implicazioni terapeutiche immediate per la SM. I pazienti portatori della variante hanno probabilità di rispondere in maniera diversa alle terapie di deplezione delle cellule B rispetto non portatori. Questa informazione è clinicamente molto rilevante per la scelta della terapia nei pazienti con SM, rappresentando un punto di partenza per ulteriori studi.

Rational design of new candidate compounds for multiple sclerosis treatment based on analysis of biological targets identified through genome wide association studies in Sardinia

INTRODUCTION AND AIMS

In recent years knowledge about the genetic components of multiple sclerosis (MS) have expanded greatly. Thanks to genome-wide association studies (GWAS), over 110 loci have been associated with MS. However the loci identified thus far do not explain all the genetic variability. The aim of this research was to identify new therapeutic targets for MS by means of an integrated genetic study using the peculiarities of Sardinian population. Indeed, the Sardinian population shows an unusually high incidence of MS and its genetic structure is defined by a large variability, with the presence of very frequent variants that are rare or absent in other populations. We developed the project by assembling for the research a unique effort that involved genome wide genotyping, with the commercial arrays, of 3,000 patients with MS, 4,000 blood donors and 7,000 individuals involved in the Sardinia/ProgeNIA project. The Sardinia/ProgeNIA cohort studied, by flow cytometry, the quantitative levels of immune cells for a total of 272 immunophenotypes, and also levels of selected cytokines as well as the levels of immunoglobulins of different classes. We conducted

the genome-wide association scan for both MS and each quantitative trait measured. In the all analyses over 19 million variants directly genotyped or imputed by the low coverage sequences of 2,120 individuals Sardinians were tested for association. All data were finally crossed to search for coincident associations of disease variants and their impact on the function of immune system. In contrast to simple GWAS studies, this method was able to detect physiological pathways that are altered in autoimmunity, suggesting molecular targets usable for therapy. Continuing in this fashion, another aim of our study was to identify drug molecules active in the therapeutic target identified.

RESULTS

Our approach identified a new variant associated with risk of developing MS (OR=1.27; p -value= 1.58×10^{-9}). This variant is located in the *TNFSF13B* gene, encoding the BAFF cytokine that exerts its activity against B lymphocytes.

The disease association was replicated in the 2,292 cases and 2,553 controls from Continental Italy (p -value= 0.0098; MAF = 5.7%).

The same variant associated with MS, was associated with increasing the levels of soluble BAFF (sBAFF) (p-value = 8.5×10^{-150}), increasing the number of B cells (p-value = 9.36×10^{-23}), increased IgG (p-value = 1.68×10^{-12}), IgA (p-value = 7.64×10^{-9}), IgM (p-value = 4.7×10^{-8}) and reduced numbers of circulating monocytes (p-value = 9.07×10^{-13}).

This variant shows a different frequency in populations worldwide; it is very common in Sardinia (MAF = 26.5%), fairly common in Southern Europe, very rare in Northern Europe and in Asia, and absent in Africa. Our data also support the idea of a positive selection pressure common in Southern Europe and extremely prevalent in Sardinia. The variant creates a new polyadenylation site associated with the formation of a shorter transcription product, and was evaluated the transcriptome of circulating leukocytes of 606 individuals Sardinians (p-value = 8.34×10^{-86}). Therapies with monoclonal antibodies that act on

the B-cell depletion are already object of clinical trials for MS and other autoimmune diseases, however there are no small molecules described that target the BAFF cytokine directly. To select active small molecules, we conducted experiments of molecular dynamics that have enabled us to design a pharmacophore model to be included in a virtual screening protocol.

CONCLUSIONS

Our results confirm the strength of the proposed method to identify gene variants linked to disease and understand their pathophysiological role, as well as to reaffirm the role of the dysregulation of B cells in MS. The findings have immediate therapeutic implications. Patients with the variant are likely to respond differently to B-cell depletion treatment than non-carriers. This information is relevant for the choice of therapy in patients with MS, although further studies are still needed.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Cucca F et al. Evolutionary selection of higher BAFF cytokine levels at the expense of increased risk of autoimmunity. Submitted for publication.

Orrù V, Steri M, Sole G, et al. Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease. *Cell*. 2013 Sep 26;155(1):242-56.

Cucca F. Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease. (Lecture). Aging and Immunity III, Siena, Italy, January 2016.

Cucca F. High resolution genetic analysis to detect variants associated with quantitative traits and diseases in the founder Sardinian population. (Lecture). ESHG, Milan, Italy, June 2014.

Cucca F. Combined analysis of quantitative & qualitative traits as a tool for the dissection of etiopathogenetic mechanisms of multifactorial diseases. (Lecture). SIGU, Rome, Italy, September 2013.

Cucca F. Finding genetic factors affecting both levels of immune cells and molecules and autoimmune disease risk. (Lecture). RCI International Summer School Program 2013 c/o Research Center for Allergy and Immunology (RIKEN)-Yokoama, Japan, June 2013.

Cucca F. Searching for causal factors in genetic associations with Multiple Sclerosis. (Lecture) 11th International Society of Neuro-Immunology (ISNI) Congress Boston, USA, November 2012.

Cucca F. Genetic variants associated with immune traits and diseases in the Sardinian founder population. (Seminar) RIKEN Institute- Yokoama, Japan, October 2012.

Cucca F. An analysis of genetic factors influencing immunity and autoimmunity in the founder Sardinian population. (Lecture). 16 Course on Molecular and Statistical Genetics of Consanguinity, European School of Genetic Medicine. Ronzano, Bologna, Italy, May 2012.

Cucca F. The nexus of genetic factors in immunity-autoimmunity: new entry points for intervention in MS and other autoimmune diseases. (Lecture). Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden, May 2012.

Cucca F. The nexus of genetic factors in immunity-autoimmunity: new entry points for intervention in MS and other autoimmune diseases. (Lecture). International Progressive MS Collaborative: Research strategy and prioritization discussion involving the Steering Committee and Working Group representatives, London, UK, April 2012.

Cucca F. An integrated approach to study quantitative traits and diseases in Sardinia (Lecture). V International meeting on complex traits and genetic isolates. CBM Biomedicine Research Cluster, Trieste, Italy, March 2012.

Cucca F. An integrated approach to study quantitative traits and diseases in Sardinia. (Seminar). XI Supplementary Course in Clinical Genetics. Gaslini Pediatric Institute, Genoa, Italy, March 2012.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 3 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 300.000 €

Linda Ottoboni

Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe), Ospedale San Raffaele, Milano

MENTORE: **Gianvito Martino**

Approccio traslazionale per studiare il ruolo del gene ZFP36L1 nella sclerosi multipla: nesso tra stomaco e cervello

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune del sistema nervoso centrale (SNC). Mutazioni genetiche, i fattori ambientali e le nuove abitudini di vita contribuiscono a spiegare la sua diffusione. Abbiamo voluto chiarire le conseguenze funzionali della variante genetica di rischio SM nel *locus* ZFP36L1, che codifica per una proteina legante e degradante l'RNA.

Nel sistema immunitario periferico ZFP36L1 è principalmente coinvolto nella degradazione di molecole infiammatorie e citochine (TNF α , VEGF α , PGE2 IL6). È anche coinvolto nel controllo dell'espressione di STAT5, fattore di trascrizione cruciale per la maturazione delle cellule dendritiche (DC). Pertanto, il gene probabilmente modula il differenziamento di cellule immunitarie. Nelle SNC, ZFP36L1 agisce su VEGF α , che svolge un ruolo importante nella neuroprotezione, nell'angiogenesi e nella neurogenesi ed è prodotto principalmente da astrociti, per cui può modulare questi processi nel cervello SM. L'espressione di ZFP36L1 può essere modulata dal trattamento con butirrato di sodio, un prodotto di fermentazione della flora intestinale e un inibitore dell'istone deacetilasi (HDACi). Questa evidenza delinea un collegamento tra le conseguenze immunologiche della varianti genetiche SM e le condizioni igieniche mutate nei paesi sviluppati in cui la sclerosi multipla si sta diffondendo.

Gli obiettivi di questa proposta sono stati i seguenti: Obiettivo 1a: valutare se esiste un'associazione genotipica a livello di mRNA e di livello proteico nelle cellule umane mononucleari di sangue periferico (PBMC) con la variante associata a SM.

Obiettivo 1b: identificare trascritti di mRNA sotto controllo post-trascrizionale di ZFP36L1.

Obiettivo 2a: quantificare l'espressione COX2 e la produzione di PGE2 in PBMC e DC di individui ge-

notipizzati in correlazione con la frequenza di cellule immunitarie.

Obiettivo 2b: quantificare l'espansione delle cellule Th17 DC-dipendente in individui genotipizzati.

Obiettivo 3: investigare l'effetto del trattamento con sodio butirrato *in vitro/ex vivo* su cellule dendritiche derivate da soggetti sani e sull'espansione di cellule Th17 così come *in vivo* durante encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA) indotta in topi Zfp36l1^{flox/+} xCD11cCre.

Obiettivo 4: studiare l'effetto di ZFP36L1 in astrociti differenziati da cellule umane pluripotenti indotte ottenute da controlli sani e soggetti con SM.

RISULTATI

Abbiamo iniziato analizzando ZFP36L1 nel sistema immunitario periferico. Non siamo stati in grado di identificare una associazione molecolare tra la frequenza della variante allele-suscettibile e il suo RNA in condizioni basali. Tuttavia, la correlazione genetica emerge dopo stimolazione, come recentemente riportato (Fairfax BP et al, Science 2014; Raj T et al, Science 2014). Abbiamo tentato mediante un approccio riduzionista di biologia molecolare *in vitro*, clonando la porzione 3' UTR del gene, di individuare le differenze strutturali nel legame con la variante di suscettibilità. Purtroppo non siamo riusciti a trovare una correlazione, suggerendo che vanno considerati altri siti modulatori di cromatina. Con esperimenti *ex vivo* su sangue raccolto da volontari sani genotipizzati, abbiamo individuato un'interessante correlazione tra la frequenza delle principali sottopopolazioni di cellule immunitarie (cellule dendritiche e T regolatrici) e la frequenza dell'allele di suscettibilità, in linea con i risultati riportati nel lavoro di Orru et al (Cell 2013). Inoltre, dato che TNF α , è un noto, convalidato RNA-bersaglio trascrizionale di ZFP36L1, abbiamo testato la capacità, genotipo associata, dei

monociti di modulare il livello proteico dopo stimolazione dose-dipendente con lipopolisaccaride (LPS). Non abbiamo trovato associazioni genetiche derivanti da variazioni nel livello di RNA tradotto in proteina. Per individuare i target molecolari di ZFP36L1, abbiamo implementato vettori lentivirali con siRNA per misurare in tutto il genoma la variazione di espressione genica in un tipo di cellula specifica. L'infezione di cellule immunitarie periferiche comporta delle difficoltà e richiede ulteriori miglioramenti. Visti i limitati risultati significativi raccolti nel compartimento immunitario, abbiamo escluso di portare avanti i lavori previsti *in vivo* nel modello animale. Piuttosto, abbiamo deciso di studiare ZFP36L1 nelle cellule del sistema nervoso centrale, sfruttando le competenze di recente acquisite dal borsista con le cellule staminali pluripotenti indotte e con i suoi derivati. Abbiamo migliorato i protocolli di differenziazione verso astrociti per avere una cultura pulita da contaminanti e abbiamo testato il sistema di trasduzione lentivirale sugli astrociti, che sono più sensibili alle infezioni. Il passo successivo è quello di misurare le conseguenze del *knock-down*

di ZFP36L1 con interesse primario su geni che sono noti target predetti di ZFP36L1 e che hanno un ruolo noto nella SM, cioè VEGFa.

CONCLUSIONI

I risultati che abbiamo finora raccolto supportano l'ipotesi che ci sia una correlazione tra il genotipo SM associato su ZFP36L1 e l'espansione nel sistema immunitario di cellule dendritiche proinfiammatorie, sostenendo l'idea che la modulazione farmacologica delle cellule dendritiche dovrebbe essere sfruttata con approcci immunoterapeutici sulla produzione di citochine o sulla capacità di presentare l'antigene. ZFP36L1 gioca un doppio ruolo sia nel sistema immunitario periferico che nel sistema nervoso centrale, pertanto l'intervento farmacologico potrebbe quindi esercitare risultati efficaci su due fronti. Ad ora non possiamo ancora considerare ZFP36L1 come un obiettivo di intervento farmacologico (possibilità di diventare un target farmacologico, specificità, selettività...), ma continueremo a studiare il suo ruolo attraverso esperimenti di 'loss of function' soprattutto nel sistema nervoso centrale.

A translational approach to dissect the functional role of ZFP36L1 in multiple sclerosis: connection between brain and gut

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Genetic mutations, environmental factors and new living habits contribute to explain its spread.

We wanted to elucidate the functional consequences of the MS risk variant in the ZFP36L1 locus, which encodes for a RNA-binding and degrading protein. In the peripheral immune system ZFP36L1 is primarily involved in degrading inflammatory molecules and cytokines (TNFa, VEGFa, PGE2 IL6). It is involved also in controlling the expression of STAT5, crucial for dendritic cells maturation. Thus, the gene likely modulates immune commitment. In cells of the CNS, ZFP36L1 targets VEGFA that plays an important role in neuroprotection, angiogenesis and neurogenesis and is produced mainly by astrocytes, thus modulate those outcomes in compromised MS brains. ZFP36L1 ex-

pression is affected by sodium butyrate treatment, a fermentation product of the gut flora and a histone deacetylase inhibitor (HDACi). This evidence outlines a link between the immunological consequences of MS genetic variants and the changed hygienic conditions in developed countries where MS has been spreading.

The goal of this proposal were as following:

Aim 1a: Assess whether there is genotypic association at mRNA and protein level in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with the MS associated variant.

Aim1b: Identify mRNA transcripts under post-transcriptional control of ZFP36L1.

Aim 2a: Quantify COX2 expression and PGE₂ production in PBMC and DCs of genotyped individuals in correlation with the frequency of immune cells.

Aim 2b: Quantify Th17 cell expansion DC-dependent in genotyped individuals.

Aim 3: Investigate the effect of sodium butyrate treatment *in vitro/ex vivo* on healthy subject-derived DCs and on Th17 expansion as well as *in vivo* in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced in Zfp36l1^{flox/+}xCD11cCre mice.

Aim 4: Study the effect of ZFP36L1 in human induced pluripotent derived-astrocytes from HC and MS patients.

RESULTS

We started interrogating ZFP36L1 in the peripheral immune system. We were not able to identify a molecular association between frequency of the susceptible allele variant and its RNA at baseline. Nevertheless, the genetic correlation emerges upon stimulation, as recently reported (Fairfax BP et al, Science 2014; Raj T et al, Science 2014). We attempted by means of a reductionist *in vitro* molecular biology approach, based on cloning the 3' UTR portion of the gene, to pinpoint structural differences in linkage with the known susceptible variant. Unfortunately we did not succeed to find a correlation, suggesting that other chromatin modulator sites are involved. Moving to *ex vivo* work on blood collected from recruited and genotyped healthy control individuals, we found a suggestive correlation between the frequency of major immune cell subsets (dendritic and T regulatory cells) and allele frequency, in line with the results reported from a large dataset by Orru et al (Cell 2013). Further, owing to the fact that TNF α is a known validated RNA target transcript of ZFP36L1, we tested monocytes for genotypic ability to modulate its protein level upon dose dependent stimulation with lipopolysaccharide (LPS). We did not find genetic associations derived from RNA changes translated into protein level. To properly assess the targets of ZFP36L1,

we implemented a knock down lentiviral strategy using siRNA to measure at whole genome level changes in gene expression in a specific cell type. Infection of peripheral immune cells was difficult and requires further improvements. Given the limited significant findings collected in the immune compartment, we reconsidered the work planned *in vivo* in mice. Rather, we decided to study ZFP36L1 in cells of the CNS, leveraging the recently established expertise of the fellow with induced pluripotent stem cells and its derivatives. We improved the protocols for astrocyte differentiation to have culture with high yield of astrocytes and tested the lentiviral transduction system on them, more sensitive to infection. The next step consists of measuring the consequences of ZFP36L1 knock down with primary interest on genes that are its predicted targets and with known role in MS, namely VEGF α .

CONCLUSIONS

As of now the findings we have collected support the hypothesis that there is a correlation between ZFP36L1 genotype and immune skewing of the proinflammatory dendritic compartment in carriers of the susceptible variant, supporting the idea that pharmacological modulation of dendritic cells should be exploited with immunotherapeutic approaches targeting their cell cytokine production or antigen presentation capacity.

ZFP36L1 is likely to play a dual role in both peripheral immune and CNS, thus pharmacological intervention could exert effective outcomes in two folds. So far, we cannot point yet at ZFP36L1 as a target of pharmacological intervention (druggability, specificity, selectivity...), nonetheless we will continue investigating its role by means of knock down experiments primarily in the CNS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Ottoboni L*, De Feo D*, Merlini A*, Martino G. Commonalities in immune modulation between mesenchymal stem cells (MSCs) and neural stem/precursor cells (NPCs). * equal contribution. Immunol Lett. 2015, Dec 68(2):228-39.

Esposito F, Sorosina M, Ottoboni L, Lim ET, Replogle JM, Raj T, Brambilla P, Liberatore G, Guaschino C, Romeo M, Pertel T, Stankiewicz JM, Martinelli V, Rodegher M, Weiner HL, Brassat D, Benoist C, Patsopoulos NA, Comi G, Elyaman W, Martinelli Boneschi F, De Jager PL. A pharmacogenetic study implicates SLC9A9 in multiple sclerosis disease activity.. Ann Neurol. 2015 Jul;78(1):115-27.

Martinelli GB, Olivari D, Re Cecconi A, Talamini L, Ottoboni L, Lecker S, Stretch C, Baracos V, Bathe O, Resovi A, Giavazzi A, Cervo L, Piccirillo R. Activation of the SDF1/CXCR4 pathway retards muscle atrophy during cancer cachexia. Oncogene, in press.

Replogle JM, Ottoboni L, Raj T, Patsopoulos NA, De Jager PL. eQTL discovery in MS patients elucidates functional mechanisms associated with disease susceptibility and treatment. ECTRIMS, Boston, USA, 2014.

Ottoboni L, Raddasi K, De Jager PL, Comi G, Farina C, Martino G. Characterization of ZFP36L1 in the context of multiple sclerosis and functional immunological consequences associated with the susceptibility to the disease. ISNI, Mainz, Germany 2014.

Laterza C, Pinzani L, Ottoboni L, Ruffini F, De Ceglia R, Martino G. Generation and characterization of iPSC-derived neurons from multiple sclerosis patients. ISSCR, Stockholm, Sweden, 2015.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 72.000 €

Maria Teresa Cencioni

Department of Medicine - Imperial College London, UK

MENTORE: **Paolo Muraro**

Studio dei linfociti CD8+CD57+ nella risposta al virus Epstein Barr ed il loro ruolo nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune con enorme variabilità nel decorso clinico tra individui nelle stesse condizioni. Le basi molecolari di questa eterogeneità non sono ancora conosciute e capirne il meccanismo potrebbe portare a un rilevante miglioramento nel trattamento della malattia. Differenti scoperte indicano che infezione da Virus Epstein Barr (EBV) potrebbe essere la causa scatenante la SM e che un difetto nella risposta al virus potrebbe essere la causa della persistente infiammazione nel sistema nervoso centrale di pazienti con sclerosi multipla con alto rischio di ricadute. In questo progetto abbiamo studiato la risposta al virus Epstein Barr mediata dai linfociti CD8+CD57+ e se questa risposta è differenzialmente modulata nei pazienti con SM stabile o in attività di malattia. A questo scopo differenti punti sono stati investigati. Primo, abbiamo definito il profilo citotossico e citochinico dei linfociti CD8+CD57+ testando un pannello di citochine e granuli citotossici. Abbiamo valutato se questa popolazione è in grado di riconoscere ed uccidere cellule autologhe infettate dal EBV. Inoltre, abbiamo valutato l'espressione di recettori inibitori come Programmed Death 1 (PD-1) and Ig-like transcript 2 (ILT2) sulla popolazione CD8+CD57+ e la loro abilità nel sopprimere il rilascio di citochine, degranulazione e capacità ad uccidere cellule infettate da EBV. Inoltre abbiamo valutato la resistenza della popolazione CD8+CD57+ alla morte cellulare da dopo attivazione.

RISULTATI

Abbiamo evidenziato che la popolazione CD8+CD57+ sono cellule effettrici citotossiche capaci di uccidere cellule infettate da EBV. Inoltre

l'espressione del recettore PD-1 modula la funzione effettrice riducendo rilascio di citochine, degranulazione e citotossicità in donatori sani. Abbiamo inoltre osservato significativa espressione del recettore PD-1 sui linfociti CD8+CD57+ in pazienti con sclerosi multipla in remissione di malattia rispetto a donatori sani e pazienti con sclerosi multipla in ricaduta.

Nei pazienti in remissione di malattia i linfociti CD8+CD57+ mostrano ridotta capacità effettrice dopo attivazione rispetto alla popolazione CD8+CD57+ nei donatori sani e in pazienti con sclerosi multipla in ricaduta. Inoltre in entrambi i gruppi di pazienti la popolazione CD8+CD57+ mostra resistenza a morte cellulare dopo attivazione.

In conclusione, i nostri risultati mostrano che pazienti con sclerosi multipla in remissione di malattia hanno una ridotta capacità a rispondere e controllare il virus EBV associata ad una alterata risposta effettrice citotossica della popolazione linfocitaria CD8+CD57+.

CONCLUSIONI

Questi risultati sono importanti nella comprensione del meccanismo immuno-patologico che è alla base della SM e per il disegno di una ulteriore terapia. Un'alterata risposta al virus in remissione della malattia da noi osservata potrebbe spiegare la conseguente riattivazione del virus EBV e persistente infiammazione nel sistema nervoso centrale con conseguente ricaduta. Questo supporterebbe anche una recente scoperta che mostra come durante l'attività di malattia la popolazione CD8+ specifica per gli antigeni della fase litica del virus EBV aumenti nel sangue periferico, confermando una correlazione tra replicazione del virus e attività di malattia.

CD8+CD57+T cells in response to Epstein Barr Virus and in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease with great variability in the clinical course between individuals with the same conditions. The molecular basis for this heterogeneity is still unknown and to understanding the mechanisms could lead to significant improvement in the treatment of the disease. Several findings indicate that the Epstein Barr Virus (EBV) infection is the trigger of MS and a defective response to the virus could be the cause of persistent inflammation in the CNS of MS patients with high risk of relapse. In this project we have investigated the CD8+CD57+T response to EBV and whether this response is differently modulated in patients with MS in relapsing disease and in clinical outcome.

For this purpose several points were investigated. First, we have defined a cytotoxic and cytokines profile of CD8+CD57+T cells evaluating a panel of cytokines and cytotoxic granules upon TCR stimulation. We have also tested CD8+CD57+T cells in recognizing and killing autologous EBV infected cells. Moreover, the expression of inhibitory receptors as Programmed Death 1 (PD-1) and Ig-like transcript 2 (ILT2) were characterized on CD8+CD57+T cells and their ability in suppressing effector function was evaluated in term of cytokine, cytotoxic degranulation and cytotoxicity to EBV infected cells. Also, we evaluated the apoptotic resistance to CD8+CD57+T cells upon TCR stimulation.

RESULTS

We have observed that CD8+CD57+T cells have a cytotoxic and effector phenotype with a strong ability to recognize and to kill EBV infected cells. Moreover, the expression of PD-1 receptor modulates the release of cytokines and degranulation of cytotoxic granules on CD8+CD57+T cells. Blocking of PD-1 receptor restores the effector phenotype on

CD8+CD57+T cells and the cytotoxicity to autologous EBV B cell lines in healthy donors. Interesting, we have observed significant up-expression of PD-1 receptor on CD8+CD57+T cells in patients with MS (pwMS) in clinical outcome compared to healthy donors and pwMS in relapsing disease. Also CD8+CD57+T cells in this cohort of patients show exhausted phenotype with poor release of IFN gamma and granzyme degranulation upon TCR activation. Further, not significant up regulation of PD-1 receptor has been observed in CD8+CD57+T cells in pwMS in relapsing MS compared to pwMS in stable disease or healthy donors. The CD8+CD57+T cells in this group of pwMS show an effector and cytotoxic phenotype with significant release of cytokines and cytotoxic granules compared to pwMS in stable disease. We have also observed that CD8+CD57+T cells in both groups of pwMS show apoptotic resistance to activation induced cell death (AICD). In conclusion, our results show that pwMS in remitting of the disease show an exhaustion phenotype of effector and cytotoxic CD8+CD57+T cells characterized by decreasing release of IFN and granzyme degranulation upon TCR stimulation supposing an impaired response and control of EBV.

CONCLUSIONS

This result is important to understand the underlying immunopathological mechanism of MS and to design an further therapies. An impaired response to virus in remission of the disease allows the reactivation of the virus and persistent inflammation in the CNS with consequent relapses. This result supports a recent evidence that shows as CD8 T response to EBV lytic antigens increases in peripheral blood of pwMS during a relapse confirming a close association between replication of the EBV and activity of the disease.

Giuseppe Mameli

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Sassari

COLLABORATORI:

Marilù Biggio, Tiziana Figus

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Leonardo Antonio Sechi, Davide Cossu,

Dipartimento Scienze Biomediche, Università di Sassari, Sassari

Maria Giovanna Marrosu, Eleonora Cocco, Jessica Frau,

Centro Sclerosi Multipla, Università di Cagliari, Cagliari

Studio sulla risposta immune di HERV-W e EBV in pazienti sardi con sclerosi multipla e controlli

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale con vari gradi di patologia assonale e una progressiva disabilità neurologica. Vari studi dimostrano una associazione con la malattia di alcuni herpesvirus, come il virus di Epstein Bar (EBV) e retrovirus endogeni umani (HERVs) della famiglia W. Il meccanismo con cui questi virus e ad altri potenziali candidati potrebbero avviare, esacerbare e perpetuare la malattia, tuttavia, sono ben lungi dall'essere compresi. Ci siamo proposti di capire se questi fattori virali siano correlati con la patologia della sclerosi multipla, in Sardegna, una regione a elevato rischio per la SM. Abbiamo condotto uno studio sulla risposta umorale e contro antigeni di HERV-W e EBV e in particolare abbiamo valutato i titoli degli anticorpi (Abs) contro l'antigene nucleare-1 (EBNA-1) e l'antigene virale del capsido (VCA) in pazienti con SM senza la terapia, rispetto ai controlli sani (HC). Individuati i peptidi di HERV-W ENV, li abbiamo testati in tutte le persone analizzate. I risultati ottenuti, potrebbero aiutare a capire il possibile ruolo di HERV-w ed EBV nella SM.

RISULTATI

In questo studio per la prima volta abbiamo analizzato la risposta umorale contro proteine e il peptide di HERV-W e EBV nel plasma di pazienti con SM e controlli sani in una regione con alto rischio per la SM, come la Sardegna. Abbiamo valutato IgG spe-

cifiche contro peptidi di env HERV-W che hanno mostrato proprietà antigeniche (Herv-W unità di superficie env: 73-88, 109-123, 140-160,191-205 e da regione intracellulare 228-242) su una coorte di persone con SM sarda, dimostrando che questi anticorpi sono altamente prevalenti nei i pazienti rispetto ai controlli sani. Inoltre, una maggiore prevalenza di siero di EBNA IgG-1 era presente nelle persone con SM senza terapia rispetto ai soggetti sani.

Lo scopo del nostro progetto è stato ampliato per esplorare la risposta immunitaria EBV nel liquido cerebrospinale di persone con SM e con altre malattie neurodegenerative (OND). Il test ELISA con peptidi di EBV e omologhi umani come il MBP₈₅₋₉₈ e IRF5₄₂₄₋₄₃₄ hanno evidenziato una risposta IgG maggiore nei pazienti con SM rispetto ai controlli OND sia in fluido cerebrospinale che nel siero.

Abbiamo, inoltre, valutato la risposta umorale contro diversi peptidi: HERV-Wenv₇₃₋₈₈, EBNA1₄₀₀₋₄₁₃ e l'omologo umano MBP₈₅₋₉₈, in una coorte di pazienti con SM trattati con natalizumab. I risultati hanno mostrato una differenza statisticamente significativa nella riduzione della risposta anticorpale IgG contro il peptide HERV-W nei pazienti con SM, dopo due anni di trattamento con natalizumab. Un'altra parte del nostro studio ha mostrato una più alta prevalenza nel siero di EBNA-1 IgG in pazienti con SM con alti livelli di miRNA-155. La terapia con natalizumab ha indotto una diminuzione dei titoli di EBNA-1 IgG solo nel gruppo SM che esprimeva più alti livelli di miRNA-155.

Lo studio è stato condotto soltanto su metà della coorte ipotizzata nel progetto a causa della difficoltà nel reperire altri campioni. Il progetto ha però analizzato altri aspetti molto importanti della risposta umorale di EBV e HERV-W.

CONCLUSIONI

Questi dati suggeriscono che EBV e HERV-W possono essere in grado di indurre la produzione di an-

ticorpi. In conclusione, la rilevazione di anticorpi anti-EBV e anti-HERV-W IgG in pazienti con SM ha fornito ulteriori prove del possibile ruolo sinergico di questi virus per indurre la malattia. Pertanto, l'individuazione di anticorpi contro EBV e HERV-W in pazienti con sclerosi multipla può essere considerata come un criterio aggiuntivo (parametro immunologico) fondamentale per capire meglio l'eziopatogenesi della SM.

Study on HERV-W and EBV humoral immunity response in multiple sclerosis sardinian patients and healthy control

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS), with various degrees of axonal pathology and episodic or progressive neurological disability. Consistent studies for a potential role in the disease exist for some herpesviruses, such as the Epstein Barr virus (EBV) and human endogenous retroviruses (HERVs) of the W family. The mechanisms by which these viruses and other potential candidates might initiate, exacerbate, and perpetuate the disease are, however, far from understood. We have tried to understand if EBV and HERV-W antibody titers are risk factors for multiple sclerosis (MS) in Sardinia, an Italian region with high-risk for MS. The overall goals of this project was: to assess the antibodies (Abs) titers against nuclear antigen-1 (EBNA-1) and viral-capsid-antigen (VCA) in both MS patients at free with therapy compared to healthy controls (HCs); after identifying peptides HERV-W Env peptides to screen the sera of MS and HCs. In relation to the results obtained, we have tried to get deeper in elucidating if HERV-w and EBV have a play in MS aetiology and if there is any synergism of these viruses.

RESULTS

In this study for the first time we made humoral-immunity response against the HERV-W and EBV proteins in plasma of patients and Healthy controls in a region with high-risk for MS, such as Sardinia. In this first part of my project we searched for antibodies against the Herv-W env peptides that showed antigenic properties (Herv-W env surface unit: 73-88,

109-123, 140-160,191-205 and from intracellular region 228-242) on a MS Sardinian cohort, showing that these antibodies are highly prevalent among MS patients compared to healthy controls. We report also a higher serum prevalence of EBNA-1 IgG in free therapy MS patients compared to HCs Sardinian subjects. These results confirm others epidemiological reports stating that MS patients have higher sero-prevalence of anti-EBV Abs as compared to HCs.

The aim of our project was expanded to explore the EBV immune response in Cerebral Spinal Fluid (CSF) of MS patients and Others Neurological Disease (OND). We study peptides from EBV and human homologues peptides such as MBP₈₅₋₉₈ and IRF5₄₂₄₋₄₃₄. We found higher IgG response in MS patients than in OND controls in both CSF and serum. We evaluated the humoral response against different peptides: the human endogenous retrovirus HERV-Wenv₇₃₋₈₈, EBNA1₄₀₀₋₄₁₃ from EBV and the homologous human peptide MBP₈₅₋₉₈ in a cohort of MS patients treated with natalizumab. Results showed a statistically significant reduction of antibody IgG responses against HERV-W peptide in MS patients after two years of natalizumab treatment. Another part of our study showed we reported a higher serum prevalence of EBNA-1 IgG in MS patients with high levels of miRNA-155. Natalizumab therapy induced a down-regulation of EBNA-1 IgG titres only in the MS group which over-expressed miRNA-155. The initial objectives were partially made. The study was conducted only in half of the samples cohort assumed in the project, because of the difficulties to finding other samples.

The study, however, analysed other very important aspects of the humoral immune response to EBV and HERV-W.

CONCLUSIONS

This data suggest that EBV and HERV-W may be capable of inducing the production of autoantibodies.

In conclusion the detection of anti-EBV and anti-HERV-W IgG in MS patients provided additional evidence of the possible synergistic role of these viruses to induce the pathology. Thus, the detection of Abs against EBV and HERV-W in MS patients can be considered as an additional criterion (immunological parameter) crucial to better understand MS pathology.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Mameli G, Cossu D, Cocco E, Frau J, Marrosu MG, Niegowska M, Sechi LA, Epitopes of HERV-Wenv induce antigen-specific humoral immunity in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2015 Mar 15;280:66-8.

Mameli G, Cocco E, Frau J, Marrosu MG, and Sechi LA, Epstein Barr Virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis peptides are recognized in sera and cerebrospinal fluid of MS patients. *Sci Rep.* 2016 Mar 9;6:22401. doi:10.1038/srep22401.

Mameli G, Arru G, Caggiu E, Niewgoska M, Leoni S, Madeddu G, Babudieri S, Sechi GP, Sechi LA, MiR-155 and miR-26a are modulated during natalizumab therapy and might be involved in the proinflammatory cytokine and anti-EBNA1 humoral response in MS patients. (Submitted 2016).

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2013 per il periodo di 1 anno (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Massimiliano Di Filippo

Clinica Neurologica, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Perugia, Perugia

COLLABORATORI:

Paolo Calabresi, Michela Tantucci, Antonio de Iure, Alessandro Tozzi, Andrea Mancini, Valentina Durante, Petra Mazzocchetti, Cristiano Spaccatini

Inibizione mitocondriale ed encefalomielite autoimmune sperimentale: possibili strategie neuroprotettive

PREMESSE E OBIETTIVI

La stretta associazione esistente tra infiammazione e neurodegenerazione in corso di sclerosi multipla (SM), ha portato ad ipotizzare che il sistema immunitario possa influenzare ed addirittura determinare degenerazione neuronale e progressione di malattia. In tale associazione, la disfunzione mitocondriale è considerata avere un ruolo patogenetico fondamentale. I mitocondri rappresentano la principale fonte energetica cellulare ed una loro disfunzione è in grado di determinare una riduzione delle riserve energetiche cellulari, con conseguente danno neuronale. Ad oggi sono numerose le evidenze che sottolineano un profondo coinvolgimento mitocondriale in corso di SM. Lo scopo principale del nostro lavoro è stato di valutare se la neuroinfiammazione presente in corso di encefalite autoimmune sperimentale (EAS), il più diffuso modello sperimentale di SM, sia in grado di influenzare la degenerazione neuronale indotta da inibitori dei principali enzimi mitocondriali, i quattro complessi della catena respiratoria. Tale studio mira ad identificare una specifica via patogenetica implicata nella relazione tra infiammazione, disfunzione mitocondriale e neurodegenerazione, aprendo così potenziali strade allo studio di terapie farmacologiche atte a contrastare la perdita neuronale in corso di SM.

RISULTATI

Grazie all'utilizzo di tecniche di registrazione elettrofisiologica, abbiamo valutato l'effetto di diversi inibitori dei complessi mitocondriali su popolazioni neuronali del nucleo striato, una struttura cerebrale interessata da neuro-degenerazione in corso di SM. Tali esperimenti sono stati effettuati sia in condizioni di controllo che durante la fase infiammatoria acuta

dell'EAS. Come risultato, abbiamo evidenziato che la neuro-infiammazione è in grado di potenziare l'effetto tossico neuronale degli inibitori mitocondriali testati, in particolare di rotenone e sodio azide, inibitori rispettivamente del I e IV complesso mitocondriale. Per indagare la patogenesi di tale effetto sinergico sulla disfunzione neuronale, abbiamo ipotizzato che l'ossido nitrico (NO) potesse avere un ruolo chiave, essendo un prodotto dell'infiammazione in grado di determinare disfunzione mitocondriale diretta ed indiretta. Per verificare tale ipotesi, abbiamo utilizzato farmaci inibitori della sintesi di NO o della sua via enzimatica intracellulare, nel tentativo di contrastare la disfunzione neuronale indotta da sodio azide in corso di neuro-infiammazione. Come risultato, la tossicità neuronale si è dimostrata significativamente ridotta, confermando l'ipotesi che il NO abbia un ruolo patogenetico fondamentale in tale processo. Partendo da queste evidenze, il passo successivo è stato quello di cercare di imitare l'effetto della neuro-infiammazione sulla tossicità neuronale da sodio-azide, mediante l'esposizione a composti donatori di NO, farmaci attivanti la sua via enzimatica, o altri mediatori infiammatori (come IL-1, IL-17, TNF- α). Da tali esperimenti è emerso che il complesso processo patogenetico presente in corso di neuroinfiammazione acuta non può essere imitato dalla applicazione isolata dei singoli mediatori infiammatori ma verosimilmente richiede tutte le modificazioni del microambiente cerebrale che avvengono in corso di EAS.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano che il processo patologico associato all'EAS è in grado di potenziare la sofferenza neuronale indotta dall'esposizione ad inibitori

dei complessi mitocondriali. Questa evidenza rappresenta una conferma del potenziale ruolo dei mitocondri nella neuro-degenerazione indotta dai processi infiammatori. Dai nostri esperimenti è emerso che l'inibizione del IV complesso mitocondriale è particolarmente dannosa per il tessuto nervoso interessato da infiammazione acuta, sottolineando una particolare vulnerabilità di tale complesso in corso di neuroinfiammazione. Come responsabili di tale effetto sono state ipotizzate le molecole rilasciate in corso di neuroinfiammazione. In particolare, i nostri esperimenti suggeriscono che il NO sia coinvolto in tale processo, dal momento che l'inibizione farmacologica della sin-

tesi di NO, o della sua via enzimatica intracellulare, si è dimostrata in grado di contrastare efficacemente l'effetto potenziante dell'infiammazione sulla morte neuronale indotta da sodio azide. Quest'ultimo dato evidenzia come tale via enzimatica rappresenti un promettente target per terapie farmacologiche mirate a contrastare la perdita neuronale in corso di neuroinfiammazione. Una migliore comprensione di come le vie intracellulari attivate dal NO esercitino un ruolo nell'associazione tra infiammazione e disfunzione mitocondriale potrebbe infatti rappresentare la base per lo sviluppo di terapie neuro-protettive efficaci per le persone affette da SM.

Mitochondrial inhibition and experimental autoimmune encephalomyelitis: possible neuroprotective strategies

INTRODUCTION AND AIMS

The close link that has been demonstrated to occur between inflammation and neurodegeneration during multiple sclerosis (MS) led to the hypothesis that immune mechanisms may control and even promote neuronal degeneration and irreversible progression of the disease. A potential pathogenic role in linking these processes has been proposed for mitochondrial dysfunction. Mitochondria are the main cellular energy source and their dysfunction can lead to neuronal energy failure and eventually to cellular death. Interestingly, mitochondrial impairment has been demonstrated in people with MS. The main aim of the present project was to investigate whether the neuroinflammatory process associated with an experimental model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), may increase neuronal vulnerability to mitochondrial impairment induced by specific inhibitors of the mitochondrial key energetic enzymes, the four electron chain complexes. The detection of a specific pathogenic pathway linking inflammation and mitochondrial dysfunction could lead to the discovery of possible pharmacological protective strategies, aimed at counteracting neuronal irreversible damage during the course of the disease.

RESULTS

We tested, in a brain structure involved in neuro-degeneration during MS, the nucleus striatum, utilizing

electrophysiological techniques, the effect of specific inhibitors of each mitochondrial complex, in control conditions and during the acute phase of EAE. We found that acute inflammation enhanced neuronal toxicity caused by exposure to rotenone and to sodium azide, respectively inhibitors of mitochondrial complex I and IV. These results are in line with the evidence of a mitochondrial complex IV dysfunction during MS. In order to test possible protective strategies, we investigated which pathogenic mechanism might link inflammation to the enhanced toxicity of sodium azide. Among the different soluble inflammatory products, nitric oxide (NO) and its intracellular pathway are thought to play an important role during both inflammation and neurodegeneration. Thus, we tried to counteract the enhancing effect of inflammation on sodium azide neuronal toxicity by using inhibitors of NO synthesis and its intracellular pathways, or conversely to mimic the effect of inflammation by using donors of NO or agonists of its intracellular pathways. We obtained the interesting result that the inhibition of NO-related pathway is able to markedly reduce neuronal toxicity induced by sodium azide during inflammation, demonstrating that NO and its downstream pathway play a crucial role in the synergistic detrimental effect of EAE and mitochondrial dysfunction on neuronal viability. The application of NO-donors or NO-pathway agonists alone was not able to mimic the detrimental effect of inflammation

on mitochondrial dysfunction, neither it was the isolated or combined application of other soluble products of inflammation (like IL-1, IL-17, TNF- α).

CONCLUSIONS

In conclusion, the obtained results demonstrate that the pathologic process associated with EAE is able to enhance neuronal toxicity caused by exposure to specific mitochondrial complexes inhibitors. This is a demonstration of the central role potentially played by mitochondria in linking inflammation and neuronal degeneration. Interestingly, the inhibition of mitochondrial complex IV seems to be particularly harmful for neurons during acute demyelination. This is in line with the evidence of a reduced complex IV activity during human MS, pointing to a major vulnerability of this complex during inflammation. This dysfunction seems to be related to the ef-

fect of soluble products of inflammation, since it has been described an inverse correlation between complex IV activity and macrophage/microglial density. Our results suggest that NO and its intracellular pathway are deeply involved in this process. Pharmacological inhibition of NO synthesis or the use of antagonists of NO-activated enzymes, significantly reduced neuronal death induced by complex IV dysfunction during inflammation. This is of particular interest because this NO-centered pathogenic pathway could represent a promising target for neuro-protective strategies, aimed at counteracting axonal and neuronal loss during the course of MS. A better understanding of how the NO-associated pathway links inflammation and neuronal death, could represent the basis for the development of effective therapies against neuro-degeneration for MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Di Filippo M, Tantucci M, Mancini A, Mazzocchetti P, de Iure A, Durante V, Tozzi A, Calabresi P Neuronal toxicity induced by mitochondrial complex IV inhibition is enhanced during experimental multiple sclerosis: possible neuroprotection through the nitric oxide pathway (manuscript in preparation).

Mancini A, Tantucci M, Di Gregorio M, Gaetani L, Sarchielli P, Calabresi P, Di Filippo M. Mitochondrial dysfunction and neuro-axonal degeneration in multiple sclerosis (Review) (manuscript in preparation).

Comunicazioni su invito

Di Filippo M. Inflammation and synaptopathies Terzo Workshop internazionale "Biomarkers in the early diagnosis of neurodegenerative disorders", 21-23 Maggio 2015, Assisi, Italy.

Di Filippo M. Infiammazione e sistema nervoso centrale. Congresso "Le Neuroscienze in Umbria: dalle evidenze sperimentali alle nuove implicazioni cliniche", 24 Ottobre 2014, Perugia, Italy.

Di Filippo M. Meccanismi di neurodegenerazione nella SM" Convegno "SM Next" 24-25 Novembre 2015, Roma, Italy.

Di Filippo M. Neurodegenerazione nelle forme recidivanti-remittenti". Congresso "Sclerosi multipla: una sola malattia?", 19-20 Novembre 2015, Milano, Italy.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2013 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €

Cinthia Farina

Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Divisione di Neuroscienze,
Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

COLLABORATORI:

Emanuela Colombo, Marco Di Dario, Daniela Triolo, Sundararajan Srinivasan

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Roberto Furlan, Gianvito Martino, Carla Taveggia, Angelo Quattrini,

INSPE, Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Jia Newcombe, Neuroresource, University College London Institute of Neurology,
London

Un ruolo per gli astrociti nell'infiammazione e demielinizzazione del sistema nervoso centrale

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla è una malattia demielinizante del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata da cambiamenti significativi nella reattività delle cellule gliali residenti. Gli astrociti sono le cellule gliali più abbondanti nel SNC e sono fondamentali per la struttura e la funzione del cervello. Svolgono infatti un'importante azione trofica sui neuroni, regolano la trasmissione sinaptica, sono rilevanti per i processi di mielinizzazione, costituiscono la barriera ematoencefalica e contribuiscono alla sorveglianza immunologica del SNC.

L'alterato funzionamento di questa cellula gliale può quindi avere effetti deleteri ad ampio spettro e portare a neurodegenerazione, infiammazione e demielinizzazione, tre processi patogenetici nella sclerosi multipla. Scopo del progetto è stato di acquisire nuove conoscenze di base sull'interazione tra l'astrocita e il neurone, la cellula immunitaria o l'oligodendrocita, e di identificare quei tratti astrocitari che regolano processi patogenetici nella sclerosi multipla.

RISULTATI

Il primo obiettivo del progetto era di valutare l'interazione tra gli astrociti e le cellule immunitarie. Una serie di studi *in vitro* hanno dimostrato l'azione ambivalente dell'astrocita, che ha il potenziale sia di promuovere che di inibire l'attivazione dei linfociti T. Viceversa, gli astrociti sono sensibili agli stimoli ri-

lasciati dalle cellule immunitarie. Le nostre indagini *in vitro* hanno messo in evidenza come gli astrociti rispondano alle citochine infiammatorie IL1 e IL17 producendo ossido nitrico.

Questo fenomeno ha importanti implicazioni patologiche, in quanto abbiamo rilevato che le colture neuronali spinali degenerano quando esposte ai fattori rilasciati dalle cellule gliali attivate. Per rispondere alle citochine però gli astrociti hanno bisogno dell'attivazione della via di trasduzione del segnale della sfingosina-1-fosfato (S1P). Infatti, il farmaco fingolimod, bloccando i recettori di S1P, inibisce anche l'attivazione evocata dalle citochine infiammatorie e il conseguente rilascio di ossido nitrico da parte dell'astrocita sia *in vitro* che *in vivo* nel modello animale. Questo nuovo processo patogenetico è rilevante per l'uomo, in quanto l'indagine istologica delle placche demielinizzate da persone con sclerosi multipla ha messo in evidenza un'aumentata e coordinata espressione dei recettori per IL1, IL17 ed S1P sugli astrociti, dimostrando l'utilizzo di queste vie di trasduzione del segnale nell'astrocita in condizioni patologiche. Questa scoperta avvalorava l'ipotesi di un effetto neuroprotettivo degli antagonisti di S1P nel sistema nervoso centrale che si esplica però non direttamente sul neurone ma tramite la modulazione dell'attività dell'astrocita.

Al fine di identificare nuove possibili vie patogenetiche dovute all'attività dell'astrocita in condizioni

infiammatorie, come pianificato, abbiamo eseguito studi di genomica funzionale sui trascritti isolati dagli astrociti esposti ai fattori rilasciati da linfociti T specifici per la mielina con fenotipo Th1, Th2 o Th17. Questo esperimento ha messo in luce una serie di geni la cui espressione cambia nell'astrocita quando attivato dai fattori derivati dai linfociti T autoreattivi e la cui rilevanza funzionale per la neuroinfiammazione potrà essere investigata in studi futuri. L'altro obiettivo del progetto era di studiare l'interazione tra gli astrociti e le cellule che formano la mielina. Grazie a un precedente finanziamento FISM abbiamo recentemente dimostrato che l'espressione del recettore TrkB delle neurotrofine sugli astrociti supporta la neuroinfiammazione e neurodegenerazione. Per verificare il potenziale coinvolgimento del TrkB astrocitario nella demielinizzazione, abbiamo sottoposto a due modelli distinti di demielinizzazio-

ne topi transgenici privi dell'espressione di questo recettore sugli astrociti. Approfondite analisi istologiche hanno evidenziato come la perdita di mielina fosse di gran lunga inferiore negli animali transgenici rispetto ai controlli, dimostrando un ruolo determinante per l'attività astrocitaria innescata da TrkB nella demielinizzazione.

CONCLUSIONI

Durante questo progetto abbiamo quindi identificato nuovi processi patogenetici che coinvolgono l'astrocita e determinano neurodegenerazione e demielinizzazione. La conoscenza di questi eventi patogenetici ci ha consentito di verificare se gli attuali farmaci in uso per la SM siano efficaci nell'interferire con l'attivazione della cellula gliale e ci permetterà di sviluppare terapie più mirate a bloccare i processi neurodegenerativi e demielinizzanti.

A role for astrocytes in CNS inflammation and demyelination

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis is a demyelinating disorder of the central nervous system (CNS) characterized by significant changes in the reactivity of resident glia cells. Astrocytes are the most abundant glia cells in the CNS and are fundamental for the structure and function of the brain. They play an important trophic action on neurons, regulate synaptic transmission, are relevant in myelination, constitute the blood brain barrier and contribute to immune surveillance in the CNS.

Clearly, dysfunction of this glia cell may cause a broad range of detrimental effects and lead to neurodegeneration, inflammation and demyelination, three pathogenic processes in multiple sclerosis. Goal of the project was to acquire novel knowledge about the crosstalk between the astrocyte and the neuron, immune cell or oligodendrocyte, and to identify those astrocytic features that rule pathogenic processes in multiple sclerosis.

RESULTS

The first objective of the project has been about evaluating the crosstalk between astrocytes and immune cells. A series of in vitro studies have shown

the dual action of the astrocyte, as it has the potential to promote or inhibit the activation of T lymphocytes. On the other hand, astrocytes are sensitive to the stimuli released by immune cells. Our in vitro investigations have highlighted that astrocytes respond to the inflammatory cytokines IL1 and IL17 with nitric oxide production.

This phenomenon has important pathological implications, as we have noted that spinal neuron cultures degenerate when exposed to the media released by the activated glia cells. Notably, astrocytes need the activation of the sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling pathway to respond to the inflammatory cytokines. In fact, the drug fingolimod, which blocks S1P receptors, also inhibits cytokine-evoked activation and the consequent release of nitric oxide by the astrocyte in vitro and in vivo in the animal model of multiple sclerosis. This novel pathogenic process is relevant in human, as histological investigations have shown the robust and coordinated expression of the receptors for IL1, IL17 and S1P on astrocytes in multiple sclerosis lesions, thus demonstrating the usage of these signal transduction pathways by the astrocyte under pathological conditions. This discovery supports

the hypothesis of a neuroprotective role for S1P antagonists in the CNS, which is however not exerted directly on the neuron but via the modulation of astrocyte activity.

To identify novel candidate pathogenic pathways supported by astrocyte responses under neuroinflammation, as planned we have performed functional genomics studies on the transcripts isolated from astrocytes stimulated with factors released by myelin-reactive T lymphocytes with a skewed Th1, Th2 or Th17 phenotype. This experiment has highlighted a series of genes, whose expression changes in the astrocytes when exposed to T cell derived media and whose functional relevance for neuroinflammation may be investigated in future studies.

The other objective of this project has regarded the crosstalk between the astrocytes and the myelin-forming cells. Thanks to a previous FISM grant we have recently demonstrated that the expression of

the neurotrophin receptor TrkB on astrocytes supports neuroinflammation and neurodegeneration. To verify the potential involvement of astrocyte TrkB in demyelination, we have applied two demyelination models to transgenic mice deficient for TrkB expression on astrocytes. In-depth histological analysis have highlighted that myelin loss is greatly reduced in transgenic animals compared to controls, demonstrating a crucial role for astrocyte TrkB in demyelination.

CONCLUSIONS

With this project we have identified novel pathogenic processes which involve the astrocyte and determine neurodegeneration and demyelination. The knowledge of these pathogenic events has allowed us to verify whether current MS drugs are effective in modulating astrocyte activation, and will help in developing therapies targeting the neurodegenerative and demyelinating processes.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Colombo E, Di Dario M, Capitolo E, Chaabane L, Newcombe J, Martino G and Farina C. Fingolimod may support neuroprotection via blockade of astrocyte nitric oxide. *Annals Neurol.* 76, 325-337, 2014.

Mohan H, Friese A, Albrecht S, Krumbholz M, Elliott CL, Arthur A, Menon R, Farina C, Junker A, Stadelmann C, Barnett SC, Huitinga I, Wekerle H, Hohlfeld R, Lassmann H, Kuhlmann T, Linington C, Meinl E. Transcript profiling of different types of multiple sclerosis lesions yields FGF1 as a promoter of remyelination. *Acta Neuropathol Commun* 2:168, 2014.

Colombo E, Finardi A, Garzetti L, Triolo D, Furlan R and Farina C. Astrocytes regulate immune cell activation during CNS Neuroinflammation. 6th Milan meets Immunology Meeting, Milan, Italy, February 16th 2016.

Colombo E, Di Dario M, Triolo D, Dina G, Fredrickx E, Finardi A, Garzetti L, Newcombe J, Furlan R, Taveggia C, Quattrini A and Farina C. A role for astrocytes in inflammatory and demyelinating processes in multiple sclerosis. XXV AINI Congress, Lecce, Italy, 11-14 May 2016.

Farina C. Astrocyte signaling in neuroinflammation. 3rd International Workshop of Neuroimmunology, Varadero, Cuba, June 14-19 2015.

Colombo E, Di Dario M, Dina G, Fredrickx E, Finardi A, Garzetti L, Triolo D, Furlan R, Taveggia C, Quattrini A, Farina C. Astrocytes regulate immune cell activation and demyelination during CNS neuroinflammation. The Joint Israeli-Greek-Italian Neuroimmunology Meeting. Crete, June 11-14 2015.

Colombo E, Di Dario M, Capitolo E, Chaabane L, Newcombe J, Martino G and Farina C. Fingolimod may prevent neurodegeneration induced by astrocyte S1P and cytokine signalling cascades during CNS inflammation. XXIV Congress of Italian Society of Neuroimmunology, Sorrento, Italy, October 1-4 2014.

Colombo E, Di Dario M, Capitolo E, Linda Chaabane L, Newcombe J, Martino G and Farina C. Fingolimod may support neuroprotection via blockade of astrocyte S1P and cytokine signaling cascades in Multiple Sclerosis. XII International Congress of Neuroimmunology, Mainz, Germany, November 9th-13th 2014.

Farina C. Astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. XV Congress of the Italian Society of Neuroscience, Symposium "From immune to nervous system and back", Rome, Italy, Oct 3-5 2013.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni (prorogato di 10 mesi) e l'ammontare di 155.000 €

Roberta Brambilla

The Miami Project To Cure Paralysis, Department of Neurological Surgery,
University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL, USA

COLLABORATORI:

Pernille M. Madsen, Shaffiat Karmally, Han Gao, Mehran Taherian

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Kate L. Lambertsen, Department of Neurobiology Research, Institute of Molecular
Medicine, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

L'effetto di rimielinizzazione del Tumor Necrosis Factor di membrana: studio specifico del ruolo del Tumor Necrosis Factor Receptor 2

PREMESSE E OBIETTIVI

Il Tumor Necrosis Factor (TNF) è associato allo sviluppo di varie patologie neurologiche tra cui la sclerosi multipla (SM). TNF esiste in due forme, di membrana (tmTNF), che agisce tramite l'attivazione dei recettori TNFR1 e TNFR2, e solubile (solTNF), che agisce via attivazione del TNFR1. La SM è associata agli effetti negativi del solTNF, mentre il tmTNF promuove processi riparativi e di rimielinizzazione. Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato che l'inibizione selettiva del solTNF è protettiva nella ESA, un modello di SM. Topi trattati con XPro1595, un composto che blocca il solTNF senza interferire con il tmTNF, mostrano recupero funzionale con riduzione di paralisi e danno assonale, dimostrando che il tmTNF svolge un ruolo di neuroprotezione e mantenimento di integrità mielinica. Su questa base, la nostra ipotesi è che le funzioni riparative del tmTNF siano dipendenti dal TNFR2 espresso dagli oligodendrociti. Per valutare questa ipotesi abbiamo perseguito due obiettivi distinti. Innanzitutto, abbiamo valutato il ruolo del tmTNF-TNFR2 *signaling* oligodendrocitario nel mantenimento di integrità mielinica e rimielinizzazione al seguito di ESA. A questo scopo abbiamo adottato un approccio genetico e generato topi *conditional knockout* (CNP-cre:TNFR2^{fl/fl}) con ablazione selettiva del TNFR2 dagli oligodendrociti. In secondo luogo abbiamo investigato i meccanismi tramite i quali il TNFR2 modula il differenziamento oligodendrocitario e la rimielinizzazione, focalizzando su segnali epigenetici, tra cui i microRNA, che

di recente sono stati identificati quali molecole indispensabili nella regolazione di questi processi cellulari.

RISULTATI

Abbiamo dimostrato che il TNFR2 oligodendrocitario media gli effetti protettivi del tmTNF nell'ESA. Topi CNP-cre:TNFR2^{fl/fl} con ablazione di TNFR2 dagli oligodendrociti mostrano un peggioramento dei sintomi di ESA rispetto ai topi controllo. Questo è associato ad aumento della patologia assonale e mielinica, ridotta rimielinizzazione e riduzione del numero di progenitori oligodendrocitari (OPC), e di oligodendrociti maturi. Nei topi CNP-cre:TNFR2^{fl/fl} il trattamento con XPro1595 non promuove recupero funzionale al seguito di ESA, dimostrando che la presenza del TNFR2 oligodendrocitario è necessaria perché il tmTNF possa svolgere i suoi effetti benefici. Con esperimenti *in vitro* abbiamo dimostrato che TNFR2 promuove il differenziamento degli OPC, ma non la loro proliferazione o sopravvivenza. Infine, l'ablazione di TNFR2 causa una disregolazione dell'espressione di microRNA coinvolti in differenziamento oligodendrocitario e infiammazione, tra cui miR-7a.

CONCLUSIONI

I nostri dati forniscono la prima dimostrazione diretta *in vivo* che il TNFR2 oligodendrocitario è importante per il differenziamento degli oligodendrociti, mediando gli effetti riparativi del tmTNF nell'ESA. Pertanto, questi studi identificano il TNFR2 nel si-

stema nervoso centrale come un promettente *target* molecolare per lo sviluppo di agenti rimielinizzanti,

rispondendo ad una delle necessità più pressanti nella terapia della SM.

The pro-remyelination effect of transmembrane Tumor Necrosis Factor: investigation into the role of Tumor Necrosis Factor Receptor 2

INTRODUCTION AND AIMS

Tumor necrosis factor (TNF) is associated with the pathophysiology of various neurological disorders, including multiple sclerosis (MS). TNF exists as a transmembrane form (tmTNF), signaling via tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) and tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2), and a soluble form (solTNF), signaling via TNFR1. MS is associated with the detrimental effects of solTNF acting through TNFR1, while tmTNF promotes repair and remyelination. Previous studies from our group have shown that selective blockade of solTNF, without affecting tmTNF, is therapeutic in EAE and promotes remyelination. On this basis, we hypothesized that the pro-remyelination and reparative functions of tmTNF are carried out by oligodendroglial TNFR2. We tested this hypothesis by pursuing two specific aims. First, we assessed the role of tmTNF-oligodendroglial TNFR2 signaling in the maintenance of myelin integrity and remyelination following EAE. We employed a genetic approach and generated CNP-cre:TNFR2^{fl/fl} conditional knockout mice with selective ablation of TNFR2 from the oligodendrocyte lineage. Second, we investigated the mechanisms by which TNFR2 modulates oligodendrocyte differentiation and remyelination focusing on epigenetic signals, namely microRNAs, which have emerged in recent years as crucial regulators of these processes.

RESULTS

We demonstrated that oligodendroglial TNFR2 is a key mediator of tmTNF-dependent protection in EAE. Indeed, CNP-cre:TNFR2^{fl/fl} mice with TNFR2 ablation in oligodendrocytes showed disease exacerbation, associated with increased axon and myelin pathology and reduced remyelination. This was accompanied by increased loss of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) and mature oligodendrocytes. The clinical course of EAE was not improved by the solTNF inhibitor XPro1595 in CNP-cre:TNFR2^{fl/fl} mice, indicating that for tmTNF to promote recovery TNFR2 in oligodendrocytes is required. With an *in vitro* approach, we demonstrated that TNFR2 drives differentiation of OPCs, but not their proliferation or survival. Finally, TNFR2 ablation lead to dysregulated expression of microRNAs, among which are regulators of oligodendrocyte differentiation and inflammation, including miR-7a.

CONCLUSIONS

Our data provide the first direct *in vivo* evidence that TNFR2 in oligodendrocytes is important for oligodendrocyte differentiation, thereby sustaining tmTNF-dependent repair in neuroimmune disease. Our studies identify TNFR2 in the central nervous system as a molecular target for the development of remyelinating agents, addressing the most pressing need in multiple sclerosis therapy nowadays.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Madsen PM, Motti M, Karmally S, Szymkowski DE, Lambertsen KL, Bethea JR, and Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 mediates membrane TNF-dependent repair in experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting oligodendrocyte differentiation and remyelination. *J Neurosci*, in press.

Madsen PM, Karmally S, Szymkowski DE, Bethea JR, and Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 is a mediator of the protective effects of TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis. ECTRIMS 2013, October 2-5, 2013, Copenhagen, Denmark.

Madsen PM, Motti D, Szymkowski DE, Bethea JR, and Brambilla R. The pro-remyelination effect of transmembrane Tumor Necrosis Factor: investigation into the role of Tumor Necrosis Factor Receptor 2. Congresso Scientifico Annuale FISM, Rome, Italy, 2014.

Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 is a mediator of the protective effects of TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis. "Translational neuroimmunology: from mechanisms to therapeutics". FASEB Summer Conference, July 13-18, 2014, Big Sky, Montana, USA. Invited speaker and session chairperson.

Madsen PM, Patel S, Gao H, Szymkowski DE, Bethea JR, and Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 mediates the protective effects of transmembrane tumor necrosis factor by promoting remyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis. Annual Meeting of the American Society for Neuroscience, November 15-19, 2014, Washington D.C., USA.

Madsen PM, Motti D, Szymkowski DE, Bethea JR, and Brambilla R. The pro-remyelination effect of transmembrane Tumor Necrosis Factor: investigation into the role of Tumor Necrosis Factor Receptor 2. Congresso Scientifico Annuale FISM, Rome, Italy, 2015.

Madsen PM, Motti D, Szymkowski DE, Bethea JR, and Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 mediates transmembrane TNF-dependent repair in experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting oligodendrocyte differentiation. XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, July 15-18, 2015, Bilbao, Spain.

Madsen PM, Motti D, Szymkowski DE, Lambertsen KL, Bethea JR, and Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 mediates membrane TNF-dependent repair in neuroimmune disease by promoting oligodendrocyte differentiation and remyelination. Annual Meeting of the American Society for Neuroscience, October 16-21, 2015, Chicago, IL, USA.

Madsen PM, Motti D, Szymkowski DE, Lambertsen KL, Bethea JR, and Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 promotes oligodendrocyte differentiation and regulates inflammation in neuroimmune disease. Inflammation, Miami Winter Symposium 2016, January 24-27, 2016, Miami, FL, USA.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 3 anni e l'ammontare di 236.000 €

Fabrizia Claudia Guarnieri

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

MENTORE: **Flavia Valtorta**

Effetti modulatori di citochine pro- e anti-infiammatorie sulle vie di trasduzione e sulla composizione molecolare delle terminazioni nervosa

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è definita come una malattia infiammatoria del sistema nervoso centrale, le cui cause sono ancora non completamente chiare. Decenni di studi hanno rivelato che alla base dei sintomi motori e cognitivi che compromettono la qualità della vita delle persone con SM vi è la progressiva alterazione del funzionamento dei neuroni. Si ritiene che queste cellule risultino danneggiate in seguito alla perdita di una guaina di protezione, la mielina, che garantisce la corretta comunicazione tra i neuroni. La perdita della mielina sembra essere imputabile ad un malfunzionamento del sistema immunitario, il quale attacca in modo erroneo alcune proteine della mielina stessa. Recenti ricerche 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 SM.

Scopo di questo progetto è stato lo studio degli effetti 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 recenti lavori di letteratura si sono occupati di comprendere quale fosse l'effetto di mediatori infiammatori sul compartimento postsinaptico, ma ancora poco è noto riguardo al 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, permetterà 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). 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 e un aumento nella frequenza di eventi di rilascio spontaneo di vescicole sinaptiche. 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 po-

tesse modificare il decorso della malattia. Abbiamo quindi indotto il modello di ESA in topi wild-type e topi deleti per il gene *Syn1* e monitorato il decorso clinico della patologia. Abbiamo osservato che l'assenza di sinapsina 1 non altera l'andamento acuto della patologia, ma ne migliora il decorso cronico. Infatti, i topi deleti si attestano in fase cronica su un punteggio clinico significativamente inferiore rispetto ai controlli. Ciò è confermato anche dall'analisi istopatologica delle lesioni presenti a livello del midollo spinale.

CONCLUSIONI

Grazie a questa borsa di studio ho potuto investigare le conseguenze dirette dell'esposizione neuronale a un ambiente pro-infiammatorio, identificando la cascata del segnale ERK-sinapsina 1 come mediatore importante della risposta neuronale a citochine. I dati ottenuti sul modello ESA generato in topi deleti per sinapsina 1 indicano che i nostri risultati potrebbero rappresentare un primo passo verso l'identificazione di un possibile nuovo meccanismo patogenetico e di conseguenza di una nuova strategia neuroprotettiva.

Modulatory effects of pro- and anti-inflammatory cytokines on signalling pathways and molecular composition of nerve terminals

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 assays for the analysis of the neuronal functionality were then performed. We observed that the exposure to inflammatory cytokines causes an increase in neuronal excitability, which manifests through an increase in basal intracellular calcium levels and an increase in the frequency of spontaneous events of vesicle fusion (miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs). 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 1 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 neuronal functionality. To this aim, we incubated neurons in culture with pro-inflammatory cytokines for five days. 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 1 the synapse remodelling becomes dramatic.

We wanted to investigate whether the absence of synapsin 1 could modify disease progression. To this aim, we induced EAE in wild-type and *Syn1* knock-out mice and followed the clinical outcome. We observed 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 significantly lower clinical score with respect to control mice. This is con-

firmed by the histo-pathological evaluation of the lesions in the spinal cord.

CONCLUSIONS

Thanks to this fellowship, I could investigate the direct consequences of neuronal exposure to an inflammatory milieu. This allowed us to identify the ERK-synapsin 1 signalling cascade as an important mediator of the neuronal response to cytokines. Our *in vivo* data on the EAE model induced in *Syn1* knock-out mice indicate that our results may represent a first step towards the identification of a novel possible pathogenic mechanism, and thus of a novel possible neuroprotective strategy.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

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. Presented at the Annual Scientific Congress of the Italian Association for Multiple Sclerosis, Rome, Italy. May 29-30, 2013.

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. Presented at San Raffaele Scientific Retreat 2013, Milan, Italy. Nov. 29-30, 2013.

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. Presented at the Annual Scientific Congress of the Italian Association for Multiple Sclerosis, Rome, Italy. May 28-29, 2014.

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. Presented at the Annual Scientific Congress of the Italian Association for Multiple Sclerosis, Rome, Italy. May 27-29, 2015.

Guarnieri FC, Cervigni RI, Bellani S, Pozzi D, Monzani E, Fornasiero EF, Martino G, Muzio L and Valtorta F. Presynaptic mechanisms in multiple sclerosis: studies in neuronal cultures and in experimental autoimmune encephalomyelitis. Presented at San Raffaele Scientific Retreat 2016, Stresa (VCO), Italy. Mar 18-20, 2016.

Guarnieri FC, Cervigni RI, Bellani S, Pozzi D, Monzani E, Fornasiero EF, Martino G, Muzio L and Valtorta F. Presynaptic mechanisms in multiple sclerosis: studies in neuronal cultures and in experimental autoimmune encephalomyelitis. Presented at the 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, Copenhagen, Denmark July 2-6, 2016.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 38.000 €

Antonino Cattaneo

Laboratorio fattori neurotrofici e malattie neurodegenerative, Fondazione EBRI "Rita Levi-Montalcini", Roma

COLLABORATORI:

Mara D'Onofrio, Luisa Fasulo, Gianluca Amato, Francesca Malerba, Ivan Arisi, Federico La Regina, Rossella Brandi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Georgia Mandolesi, Silvia Bullitta, Alessandra Musella, Antonietta Gentile, Helena Sepman, Diego Freseigna, Diego Centonze, CERC/Fondazione Santa Lucia, Roma

Simona Capsoni, Scuola Normale Superiore, Pisa

Correlazione fra sbilanciamento proNGF/NGF e sinaptopatia infiammatoria in un modello animale di sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Il Fattore di Crescita Nervoso (NGF) è una proteina appartenente alla famiglia delle neurotrofine, messaggeri extracellulari coinvolti nel normale sviluppo e mantenimento dell'integrità e funzionalità dei neuroni del sistema nervoso. Legandosi a specifici recettori (TrkA e p75) sulla superficie cellulare, NGF è in grado di svolgere un ruolo neuroprotettivo, ma anche di modulazione delle cellule immunitarie. Per questo NGF è considerato un importante candidato per il trattamento di patologie infiammatorie del sistema nervoso centrale (SNC), inclusa la sclerosi multipla (SM). Elevati livelli di NGF sono stati riscontrati nel *liquor* di pazienti con SM e nel cervello di topi con encefalite sperimentale autoimmune (ESA), modello sperimentale di SM, suggerendo un suo ruolo neuroprotettivo ed antinfiammatorio. Tuttavia, le misure fino ad ora effettuate dei livelli di NGF non hanno tenuto conto del precursore proNGF. NGF viene sintetizzato dalle cellule sotto forma di proNGF, che si lega ai recettori TrkA e p75, comportandosi come molecola biologicamente attiva. Abbiamo osservato che l'equilibrio tra i livelli di proNGF e NGF e relativi segnali cellulari è essenziale per l'omeostasi del cervello, in quanto la sua alterazione porta a neurodegenerazione, neuroinfiammazione ed allo sbilanciamento tra attività sinaptica eccitatoria ed inibitoria, come osservato nel modello TgproNGF (topo transgenico che sovra-esprime proNGF).

Lo scopo del progetto è stato verificare se un alterato equilibrio proNGF/NGF potesse essere coinvolto nella sinaptopatia infiammatoria che caratterizza la SM. Recenti ricerche hanno, infatti, evidenziato un danno/disfunzione nel compartimento sinaptico a carico del sistema eccitatorio (mediato dal glutammato) ed inibitorio (mediato dal GABA) in diverse aree del cervello con ESA e dei pazienti con SM, probabile causa della patologia neuronale nella SM. Nell'ambito di questo progetto abbiamo focalizzato l'attenzione sulla trasmissione sinaptica eccitatoria ed inibitoria nel cervelletto del modello ESA e della linea transgenica TgproNGF.

In particolare, gli obiettivi del progetto sono stati: i) caratterizzare l'espressione di NGF, proNGF, e loro recettori e ii) studiare l'effetto di NGF e proNGF sulla trasmissione sinaptica mediata da GABA e glutammato.

La comprensione di un coinvolgimento del sistema NGF/proNGF nella sinaptopatia infiammatoria permetterebbe di ampliare la conoscenza dei meccanismi patogenetici di questa malattia, importanti per lo sviluppo di interventi farmacologici selettivi.

RISULTATI

Abbiamo riscontrato livelli ridotti di NGF nel cervelletto di topi ESA, durante la fase acuta della malattia, a carico sia di RNA messaggero che della proteina. Degno di nota è il fatto che NGF sembra avere una

localizzazione specifica negli interneuroni inibitori che contattano le cellule del Purkinje. La nostra ipotesi è che la degenerazione immuno-mediata di questa popolazione neuronale che regola il tono inibitorio in ESA sia responsabile dei ridotti livelli di NGF nel cervelletto.

Misurazioni biochimiche suggeriscono che i livelli di proNGF siano molto bassi nel cervelletto di controllo e nei topi EAE. Il proNGF sembra essere localizzato nel corpo cellulare delle Purkinje e lungo l'albero dendritico in giustapposizione a terminali sinaptici. Di contro, l'espressione degli RNA messaggeri e delle relative proteine recettoriali che legano proNGF/NGF è significativamente aumentata nel cervelletto ESA. Per studiare il ruolo del sistema proNGF/NGF nella sinaptopatia cerebellare abbiamo effettuato esperimenti di elettrofisiologia su fettine di cervelletto di topo controllo e di topo ESA pre-incubate con ciascuna neurotrofina. I risultati ottenuti suggeriscono che NGF non abbia alcun effetto sulla trasmissione GABA-ergica mentre proNGF sembra avere un ruolo protettivo con un parziale recupero della trasmissione GABAergica in ESA. Infine, en-

trambe le neurotrofine non attenuano, né esacerbano, la trasmissione glutammatergica cerebellare. Tali risultati includono anche esperimenti condotti in presenza di linfociti CD3⁺ derivanti da ESA, nonostante i linfociti siano noti rispondere alle neurotrofine.

Non è stato possibile completare lo studio dell'effetto dell'ESA sui topi proNGF a causa dell'alta mortalità riscontrata alla nascita, una volta cambiato il background genetico.

CONCLUSIONI

Nel complesso i risultati ottenuti suggeriscono un coinvolgimento del sistema proNGF/NGF nella sinaptopatia cerebellare nel modello ESA. Lo sbilanciamento tra NGF e proNGF, cui contribuisce anche l'aumentata espressione dei recettori, ha un ruolo potenzialmente benefico nel controllo a breve termine della trasmissione sinaptica GABA-ergica cerebellare. Sebbene ulteriori studi siano necessari, le osservazioni riportate potrebbero essere utili per una migliore comprensione degli eventi neurodegenerativi mediati da uno sbilanciamento proNGF/NGF che coinvolgono il compartimento sinaptico nella SM.

Linking proNGF/NGF imbalance to the inflammatory synaptopathy in a mouse model of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The Nerve Growth Factor NGF is a small protein that belongs to the neurotrophin family, an important class of extracellular messengers involved in normal development of the nervous system and into the proper maintenance of neuronal integrity and function. NGF, by binding to specific receptors located on the cellular surface (TrkA and p75), plays a neuroprotective role, being also able to act on immune cells, modulating their function. NGF has been always considered an important candidate for the treatments of inflammatory pathologies affecting the central nervous system (CNS), as multiple sclerosis (MS). High levels of NGF have been measured in the *liquor* deriving from MS and in the brain of mice with experimental autoimmune encephalitis (EAE), the experimental animal model for the disease, suggesting a neuroprotective and anti-inflammatory role for this neurotrophin. NGF is synthesized as proNGF intracellularly and then processed to the mature form.

ProNGF, binding the same receptors, is a biologically active molecule too. We observed that the balance between proNGF and NGF levels, and the relative evocated cellular signals, is indeed essential for brain homeostasis, since its alteration leads to neurodegeneration, neuroinflammation and imbalance between excitatory and inhibitory synaptic activity, as observed in TgproNGF mice (transgenic mouse overexpressing proNGF).

The purpose of this project has been to verify whether an altered proNGF/NGF balance could be involved in the inflammatory synaptopathy peculiar of MS pathology. Recent evidence highlights a dysfunction of the excitatory (glutamate mediated) and inhibitory (GABA mediated) system in the synaptic compartment in several areas of EAE brain and in patients with MS. A persistent increase in glutamate in the CNS, along with a reduction in the GABAergic tone, builds a high risk of excitotoxic damage, probable driver of the neuronal pathology in MS. In

this project we focused our attention on the excitatory and inhibitory synaptic transmission in cerebellum, in EAE and transgenic line TgproNGF, as model of proNGF/NGF imbalance. The objectives of the project have been: i) to characterize NGF, proNGF and their receptors expression and ii) to study NGF and proNGF effects onto GABA and glutamate-mediated synaptic transmission.

A deeper comprehension of the involvement of proNGF/NGF system in the inflammatory synaptopathy would certainly allow to grow our knowledge of pathogenetic mechanisms of the disease towards novel selective pharmacological intervention.

RESULTS

NGF is reduced in EAE cerebellum during the acute phase of the disease, as shown by the mRNA and protein levels. Of note, NGF is localized specifically in inhibitory interneurons which make synaptic contact with Purkinje cells. Our hypothesis is that NGF downregulation is caused by a immune mediated degeneration in this specific neuronal population. Biochemical measures suggest low proNGF levels both in EAE and control mice, in particular it seems to be localized in PCs soma and along the dendritic tree.

The expression of proNGF/NGF receptors panel was markedly increased in EAE (mRNA and protein

levels). To study the role of the proNGF/NGF system on EAE cerebellar synaptopathy, we explored the effect of exogenous administration of each neurotrophins on EAE and control slices. Regarding NGF, exogenous NGF did not recover GABA-ergic dysfunction in EAE, suggesting that its downregulation was not responsible of this synaptic defect. Regarding proNGF, we unexpectedly observed a significant protective role on GABAergic synaptic dysfunction. Regarding their effect on glutamatergic transmission, both neurotrophins did not attenuate or exacerbate the synaptic transmission.

These results include also experiments in the presence of CD3+ lymphocytes derived from EAE which are responsive to neurotrophins.

It has not been possible to completely understand the effect of the EAE induction on the TgproNGF mice because of the short life-span of the mice after birth, due to the changed genetic background.

CONCLUSIONS

In conclusion, the results of the present pilot project clearly indicate that the proNGF/NGF system is compromised in EAE model, in particular in the cerebellum. Further experiments will be necessary to clarify either the cellular and molecular mechanisms at the basis of the proNGF/NGF imbalance in EAE, either the potential therapeutic effect.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Arisi I, D'Onofrio M, Brandi R, Cattaneo A, Bertolazzi P, Cumbo F, Felici G, Guerra C. Time dynamics of protein complexes in the AD11 transgenic mouse model for Alzheimer's disease like pathology. *BMC Neurosci.* 2015 Apr 29;16:28.

Fasulo L, Brandi R, Arisi I, Piccinin S, La Regina F, Amato G, Florenzano F, Storti A E, Turturro S, Carucci N, Capsoni S, Berretta N, Nisticò R, D'Onofrio M, Cattaneo A. "ProNGF drives parvalbumin interneuron depletion in the dentate gyrus of transgenic mice", submitted.

Mandolesi G, Fasulo L, Malerba F, Musella A, Sepman H, Bullitta S, Gentile A, Fresegna D, Brandi R, Turturro S, La Regina F, Arisi I, D'Onofrio M, Centonze D, Cattaneo A. Linking ProNGF/NGF imbalance to the inflammatory synaptopathy in a mouse model of multiple sclerosis. *Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, Italy, 27-29 maggio 2015.*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2013 per il periodo di un anno e l'ammontare di 53.000 €

Silvia Dusi

Dipartimento di Medicina, sezione di Patologia Generale, Università degli Studi di Verona, Verona

MENTORE: **Gabriela Constantin**

Visualizzazione e caratterizzazione delle dinamiche delle cellule T nel sistema nervoso centrale in corso di encefalomielite autoimmune sperimentale

PREMESSE E OBIETTIVI

La maggioranza degli studi di neuroimmunologia sulla sclerosi multipla (SM) vede come principali mediatori e regolatori della patologia i linfociti T auto-reattivi CD4+. Tuttavia, alcuni dati suggeriscono che anche i linfociti T auto-reattivi CD8+ possano giocare un ruolo importante nella patogenesi della malattia. La migrazione e la riattivazione dei linfociti T nel sistema nervoso centrale (SNC) rappresentano eventi critici nella patogenesi della SM e del suo modello animale più comunemente usato, l'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA).

Lo scopo principale di questo progetto è stato caratterizzare le dinamiche delle cellule T autoreattive CD4+ e CD8+ nel SNC in corso di ESA mediante l'utilizzo della Microscopia Laser a Due Fotoni (MLDF) che permette la diretta osservazione delle cellule in movimento nel tessuto del SNC *in vivo*.

RISULTATI

Abbiamo innanzitutto caratterizzato la distribuzione e la dinamica delle cellule T auto-reattive CD4+ e CD8+ nel parenchima del midollo spinale durante la fase pre-clinica, al picco e in fase cronica di ESA. Avendo riscontrato un massivo infiltrato di linfociti T al picco di malattia rispetto alle altre fasi analizzate, abbiamo considerato questa fase come una finestra temporale cruciale per indagare le dinamiche delle cellule T auto-reattive e i meccanismi molecolari che regolano il loro movimento all'interno del midollo spinale in corso d'infiammazione. Alla luce della maggiore presenza di cellule CD4+ rispetto alle CD8+ trovate al picco di ESA, abbiamo deciso di caratterizzare più approfonditamente il comportamento intraparenchimale di due sottoclassi di cellule pro-infiammatorie CD4+, in particolare le T *helper* Th1 e Th17.

Abbiamo osservato due differenti motilità nel paren-

chima midollare al picco di malattia: le Th1 seguivano un movimento rettilineo e direzionato verso uno stimolo chemottatico, mentre le Th17 presentavano un movimento più stocastico. Le integrine sono molecole d'adesione cruciali nella migrazione delle cellule T autoreattive nel SNC attraverso la barriera emato-encefalica in corso di ESA. Tuttavia, il loro ruolo nella motilità delle cellule T autoreattive all'interno del parenchima del SNC non è ancora stato chiarito.

Allo scopo di investigare il ruolo delle integrine nel traffico delle cellule T autoreattive nel parenchima del SNC durante ESA, abbiamo effettuato esperimenti di MLDF utilizzando anticorpi bloccanti. In particolare, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'integrina LFA-1. Il blocco di LFA-1 ha portato a una netta riduzione della velocità delle Th1 interferendo con il loro movimento rettilineo e a una drastica riduzione della velocità delle Th17 fino al loro arresto. Un'efficiente motilità delle cellule T nel parenchima del SNC è importante per la loro funzionalità e riattivazione. Abbiamo quindi ipotizzato che interferire con le dinamiche delle cellule T auto-reattive all'interno del SNC potesse limitare la loro patogenicità ed influenzare, di conseguenza, l'andamento clinico in corso di ESA. Per testare questa ipotesi abbiamo eseguito un trattamento terapeutico il giorno seguente alla comparsa dei sintomi clinici e quattro giorni dopo, somministrando localmente per via intratecale un anticorpo bloccante l'integrina LFA-1. I risultati hanno mostrato una significativa inibizione nello sviluppo della patologia se comparata con il gruppo di animali controllo. L'analisi istopatologica ha confermato le osservazioni cliniche associando un minore infiltrato infiammatorio ad una ridotta demielinizzazione e ad una riduzione dello stato di attivazione della microglia. Alla luce dei risultati ottenuti in questi due anni sul ruolo dell'integrina LFA-1 nelle

dinamiche delle cellule auto-reattive Th1 e Th17 rimane da esplorare un potenziale ruolo delle integrine nella motilità delle cellule T CD8+ all'interno del parenchima del midollo spinale nel contesto ESA.

CONCLUSIONI

Questi studi di microscopia a due fotoni hanno evidenziato per la prima volta il forte impatto dell'inibizione dell'integrina LFA-1 sulla motilità di entrambe le popolazioni pro-infiammatorie Th1 e Th17 nel parenchima midollare durante l'ESA. Il

blocco *in situ* di LFA-1 dopo l'esordio della patologia ne limita la progressione, suggerendo che interferire con specifici meccanismi molecolari implicati nella motilità delle cellule T auto-reattive all'interno del parenchima del SNC può rappresentare un potenziale approccio terapeutico al fine di evitare i gravi effetti negativi dati dalla somministrazione sistemica. Inoltre, lo studio di questi *patterns* molecolari può promuovere lo sviluppo di nuovi target immunoterapeutici diretti contro patologie neurologiche autoimmuni quali la SM.

Visualization and characterization of T cell dynamics in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis

INTRODUCTION AND AIMS

The vast majority of neuroimmunological studies on multiple sclerosis (MS) have focused the attention on CD4+ T cells as critical mediators and regulators of disease. Nevertheless, there are data suggesting that CD8+ T cells may play an important role in the pathogenesis of MS. T cell migration and reactivation in the central nervous system (CNS) represent critical events in the initiation and progression of autoimmune pathology in MS and its animal model the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Reactivation of T cells requires cell-cell physical interactions. For this reason T cells need to freely move through the CNS parenchyma. The main goal of this project was to characterize autoreactive CD4+ and CD8+ T cells sub-populations dynamics in the CNS during EAE by using two-photon laser microscopy (TPLM) that provides direct observations of living T cells in the CNS during different EAE phases.

RESULTS

We first performed TPLM studies to determine distribution and dynamics of autoreactive CD4+ and CD8+ T cells in the spinal cord (SC) during different clinical phases of EAE. We found a massive infiltration of T cells at the peak of the disease in comparison with the preclinical and chronic phases of disease analyzed. This result made this disease phase a powerful experimental approach to investigate autoreactive T cell dynamics and molecular mechanisms involved in cell intraparenchymal

movements. In light of the larger amount of CD4+ compared to CD8+ T cells found at the peak of EAE, we decided to better characterized the intraparenchymal behavior of Th1 and Th17 cell CD4+ subsets. We distinguished two different behavioral patterns in auto-reactive Th1 cells: about 80% of cells were rapidly moving, while the rest of 20% was not moving and was anchored around a fixed point close to the vessel wall suggesting a potential physical contact with other cells. In the portion of moving cells, it was possible to distinguish between cells that were following the vessels wall (20%) and cells (60%) moving inside the parenchyma. Examining in depth, we could appreciate Th1 cells that were moving straight covering long distances deep in the SC, suggesting that they were meandering following a chemotactic gradient compared to the undirected movement of Th17 cells. Integrins are crucial adhesion molecules involved in the autoreactive T cells migration through the blood brain-barrier into CNS during EAE. Moreover their role in the T cells motility inside the CNS parenchyma is still unclear.

In order to investigate the role of integrins in the migration of autoreactive T cells in the CNS parenchyma during EAE we performed TPLM experiments using blocking antibodies. In particular we focused our attention on LFA-1 integrin. LFA-1 blockade drastically affects the intraparenchymal dynamics of Th1 cells interfering with their straight-line motility and massively reduces the velocity of Th17 cells till to stop. Efficient effector T cell motility in the CNS parenchyma is important for their functionality and

reactivation in the CNS. For this reason, we hypothesized that interfering with the local T cell dynamics in the CNS may limit their pathogenicity and may impact EAE development in immunized mice. In light of this we have performed a therapeutic treatment on EAE mice by anti-LFA-1 blocking antibody intrathecal administration the day after disease onset and 4 days later. We found that local LFA-1 blocking significantly inhibited EAE development, when compared to control mice. This clinical amelioration was associated with a significant reduction of both inflammatory cell infiltration and demyelination in anti-LFA-1 treated animals, compared to control treated animals. Furthermore, the massive microgliosis we quantified in the lumbar SC of control mice resulted profoundly attenuated in treated animals. To note, the second anti-LFA-1 injection 4 days after the first one further delayed the appearance of the clinical peak in EAE mice. Due to the

strong *data* obtained on the role of LFA-1 integrin in Th1 and Th17 cell subset dynamics during these years remains to be explored the role of integrins also in the motility behavior of CD8+ T cells even so found in the SC parenchyma at the peak of EAE.

CONCLUSIONS

This study has shown for the first time the strong impact of LFA-1 inhibition on the intraparenchymal motility of both Th1 and Th17 cells during EAE. Local CNS LFA-1 blocking limits EAE worsening, suggesting that interfering with specific molecular patterns in T cells intra-CNS motility may represent a potential therapeutic approach to avoid severe adverse effects of systemic administration. Furthermore, a deeper understanding of the molecular mechanisms involved in autoreactive T cell trafficking could promote development of new immunotherapeutic targets in autoimmune neurological disorder like MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Angiari S, Donnarumma T, Rossi B, Dusi S, Pietronigro E, Zenaro E, Della Bianca V, Toffali L, Piacentino G, Budui S, Rennert P, Xiao S, Laudanna C, Casasnovas JM, Kuchroo VK, Constantin G. TIM-1 glycoprotein binds the adhesion receptor P-selectin and mediates T cell trafficking during inflammation and autoimmunity. *Immunity*, 2014; 40:542-53.

Zenaro E, Pietronigro E, Della Bianca V, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, Turano E, Rossi B, Angiari S, Dusi S, Montresor A, Carlucci T, Nani S, Tosadori G, Calciano L, Catalucci D, Berton G, Bonetti B, Constantin G. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med*, 2015; 21:880-6.

Dusi S, Rossi B, Amoroso A, Carlucci T, Piacentino G, Constantin G. LFA-1 integrin controls Th1 and Th17 intraparenchymal motility behavior in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. XXIV AINI Congress, Sorrento-Naples (Italy), October 1-4, 2014.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 37.000 €

Barbara Rossi

Dipartimento di Medicina, Sezione Patologia Generale, Università Studi di Verona, Verona

COLLABORATORI:

Laura Marongiu, Jenny Piacentino, Antonella Amoruso

Ruolo delle cellule T regolatorie CD4+CD25+ nella modulazione dell'autoimmunità nel sistema nervoso centrale in corso di encefalomielite sperimentale autoimmune

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cellule T regolatorie CD4+CD25+ (Tregs) partecipano all'omeostasi immunologica attraverso la soppressione di risposte immunitarie inappropriate e sono in grado di inibire diverse malattie infiammatorie e autoimmuni. È stato dimostrato che le Tregs si accumulano nel sistema nervoso centrale (SNC) in corso di encefalite sperimentale autoimmune (ESA), durante la fase di remissione, ma la loro funzione soppressiva all'interno del SNC è ancora oggetto di dibattito. Il movimento delle cellule immunitarie all'interno del SNC è un requisito fondamentale affinché le cellule possano comunicare tra di loro durante le reazioni infiammatorie. La microscopia laser a due fotoni (MLDF) rappresenta un metodo d'indagine ad alta risoluzione per studiare *in vivo* il comportamento delle cellule. L'obiettivo di questo progetto era di studiare il potenziale ruolo delle Tregs nel modulare il movimento delle cellule Th1 e Th17 all'interno del SNC in topi con ESA, il modello sperimentale di sclerosi multipla (SM). In particolare, è stata studiata la motilità delle cellule T in assenza o presenza (tramite iniezione intravenosa) di Tregs esogene nelle diverse fasi di malattia: all'esordio e al picco di malattia. Questo progetto ha contribuito alla conoscenza dei meccanismi di soppressione da parte delle Tregs dei processi autoimmunitari all'interno del SNC in corso di ESA.

RISULTATI

Per prima cosa è stata caratterizzata la dinamica delle cellule Th1 e Th17 al picco di ESA. In questa fase di malattia le cellule Th1 e Th17 si comportano in modo diverso. Sebbene presentino velocità simili, queste cellule sono diverse nella loro direzionalità. Le cellule Th1 si muovono in direzione rettilinea coprendo lunghe distanze nel parenchima mentre le cellule Th17 sembrano muoversi intorno ad uno

specifico volume suggerendo due diversi meccanismi molecolari alla base della loro migrazione. In una fase precoce della risposta infiammatoria la riattivazione delle cellule T nel SNC richiede interazioni fisiche tra le stesse cellule T e le Cellule Presentanti l'Antigene (CPA). Per questo motivo è stata posta attenzione alla caratterizzazione delle interazioni tra le cellule T e le CPA, valutando in particolare l'impatto che la presenza delle Tregs potesse avere su questi contatti fisici durante il picco di malattia. I risultati ottenuti indicano che, nel SNC, le cellule Th1 e Th17 mediano contatti diretti con i fagociti perivascolari in modo molto simile sia in termini di frequenza sia di durata. L'infusione di Tregs si è rivelata efficace nella modulazione delle interazioni tra le cellule Th1 e i fagociti. In concomitanza di un'aumentata velocità delle cellule Th1, è stato, infatti, osservato un incremento nella frequenza dei contatti a breve termine mentre i contatti a lungo termine risultavano drasticamente ridotti. È stato inoltre possibile associare il controllo esercitato dalle Tregs sul dinamismo delle cellule Th1 con una ridotta proliferazione delle cellule T e una diminuita produzione di citochine pro-infiammatorie. L'iniezione di Tregs non è stata però in grado d'influenzare il movimento delle cellule Th17 nel SNC, suggerendo una specifica attività modulatrice da parte delle Tregs sulle cellule Th1 rispetto alle Th17. Sono stati, inoltre, eseguiti esperimenti per valutare l'impatto delle Tregs sul dinamismo delle cellule Th1 e Th17 durante la fase cronica in corso di ESA. Se paragonato al picco di malattia, il numero di cellule Th1 e Th17 migrate nel SNC è risultato più basso mentre l'analisi dei parametri dinamici ha mostrato un comportamento simile tra le cellule Th1 e Th17 con una drastica riduzione del movimento cellulare, dati che suggeriscono processi di riconoscimento dell'antigene in corso. Non sono stati osservati im-

portanti effetti modulatori da parte delle Tregs nella fase cronica di malattia, suggerendo come le Tregs possano intervenire più efficacemente durante l'esordio clinico. Inoltre è stato osservato che le Tregs raggiungono il SNC preferenzialmente durante le fasi precoci di malattia mostrando una ridotta capacità migratoria nella fase cronica di ESA.

CONCLUSIONI

Le cellule auto reattive che infiltrano il SNC attraverso la barriera emato-encefalica per poi essere riattivate *in situ* concorrono alla patogenesi della SM. L'importanza delle Tregs nel conferire resistenza nei processi autoimmunitari e nel limitare i danni tissutali

è stata ampiamente documentata in molti modelli di malattia compresa la SM. Come le Tregs riescano a modulare le risposte autoimmuni negli organi linfoidi secondari, è stato ampiamente studiato, ma il loro ruolo all'interno del SNC durante malattie autoimmunitarie come la SM, non è ancora stato chiarito. Individuare questi meccanismi risulta, quindi, cruciale nel comprendere più a fondo il ruolo che le cellule infiltranti giocano nel SNC durante i processi di regolazione dell'infiammazione. La conoscenza dei meccanismi attraverso i quali le Tregs controllino i processi autoimmunitari risulta di fondamentale importanza per un potenziale futuro sviluppo di nuovi approcci terapeutici applicabili anche alla SM.

Role of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the modulation of autoimmunity in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis

INTRODUCTION AND AIMS

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) participate in immunologic homeostasis by suppression of inappropriate immune responses and are able to inhibit a variety of autoimmune and inflammatory diseases such as MS. It has been shown that Tregs accumulate within the central nervous system (CNS) during the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE, but the suppressive function of Tregs within the CNS is still a matter of debate. The motility of immune cells inside the CNS is an essential prerequisite for cell-cell communication during inflammatory reactions. Two-photon fluorescence laser microscopy (TPLM) has become the principal technique for high-resolution imaging of cell behavior *in vivo*. The aim of this pilot project was to study the potential role of Tregs on the suppression of autoimmune-reactions in the CNS. In particular, using a TPLM approach we investigated the inhibitory effects exerted by Tregs in the modulation of Th1 and Th17 cells motility into the CNS of EAE induced mice. T cell motility was investigated in the absence or presence (by intravenously injection) of exogenous Tregs at different time points during EAE: at the disease onset and in the chronic phase. The project contributed to understand the mechanisms mediated by Tregs in the autoimmunity suppression in CNS during EAE.

RESULTS

We first characterized the dynamics of Th1 and Th17 cells during the peak of EAE. We observed significant differences between the behaviors of Th1 and Th17 cells during disease peak. Although both T cell have similar velocities, they display significant differences in the directional component, with Th1 cells moving in straight directions covering long distances deep in the CNS parenchyma, whereas Th17 cells move around in a specific volume of tissue, indicating different motility mechanisms between these two lymphocyte populations. Reactivation of primed T cells in the CNS requires that interactions take place between T cells and antigen presenting cells (APCs) locally in the CNS during the initiation of an inflammatory response. For this reason we focused our attention on the characterization of Th1 and Th17 cells interactions with APCs, valuating in particular, the impact of Tregs on the physical contacts between T cells and APCs during the peak of EAE. We noted that Th1 and Th17 cells make contacts in the CNS with perivascular phagocytes without any differences in the way they interact with APCs in term of frequency and duration of contacts. The injection of Tregs drastically affected interactions between Th1 and phagocytes. We observed an enhancement in the frequency of short lasting contacts whereas long lasting stable contacts were significant inhibited ac-

cordingly with an increased velocity in Th1 cells. We also could associate the dynamic control over Th1 cells in the CNS exerted by Tregs with a decreased T cells proliferation and pro-inflammatory cytokine production. However, Tregs injection did not influence Th17 cells dynamics in the CNS at the disease peak, suggesting that they do not influence intraparenchymal motility behavior of these cells having a preferential activity on Th1 cells. We also performed experiments to evaluate the impact of Tregs on the motility behavior of Th1 and Th17 cells during the chronic phase of EAE. The number of Th1 and Th17 cells migrated in the CNS was significantly lower if compared to what observed at the disease peak. However, compared to disease peak phase, the analysis of dynamics parameters showed that Th1 and Th17 cells behave similarly displaying a drastic reduction in dynamics suggesting an antigen-recognition process. No significant modulating effects exerted by Tregs were observed at the chronic phase of the disease, suggesting that Tregs intervene more efficiently during the disease peak. Moreover we found that Tregs preferentially migrate in the CNS during the early phases rather

than the late phase of the disease displaying a lower migration capability in the CNS during the chronic phase of EAE.

CONCLUSIONS

The pathology of MS is attributed to auto-reactive effector T cells that migrate through the blood-brain-barrier and are re-activated within the CNS. The importance of Tregs in conferring resistance to organ specific autoimmunity and in limiting autoimmune tissue damage has been documented in many disease models including MS. How Tregs may control autoimmune responses in secondary lymphoid organs has been widely studied and investigated, but the role of Tregs inside the CNS during autoimmune diseases, such as MS, is still not well elucidated. Understanding these mechanisms is critical in determining the role that infiltrated cells in the CNS play in regulating inflammation. The knowledge of the mechanisms controlling autoimmunity by Treg into the CNS is critical for further applications in potentially new therapeutic approaches with potential applications to multiple sclerosis patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Angiari S, Donnarumma T, Rossi B, Dusi S, Pietronigro E, Zenaro E, Della Bianca V, Toffali L, Piacentino G, Budui S, Rennert P, Xiao S, Laudanna C, Casasnovas Jm, Kuchroo Vk, Constantin G. Tim-1 Glycoprotein Binds The Adhesion Receptor P-Selectin And Mediates T Cell Trafficking During Inflammation And Autoimmunity. *Immunity*. 2014; 40:542-553.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2013 per il periodo di 1anno e l'ammontare di 30.000 €

Valerio Chiurchiù

IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

COLLABORATORI:

Alessandro Leuti

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Diego Centonze, Università degli Studi di Roma 'Tor Vergata', Roma

Luca Battistini, Unità di Neuroimmunologia, Fondazione Santa Lucia, Roma

Plasticità e polarizzazione dei macrofagi nella sclerosi multipla: in "ex vivo" veritas

PREMESSE E OBIETTIVI

Questo progetto rappresenta il primo studio completo e dettagliato sul ruolo dei vari tipi di macrofagi nella sclerosi multipla (SM), il cui coinvolgimento nell'immunopatogenesi della SM è in continuo aumento ma è ancora poco conosciuto. L'approccio di questo progetto risulta innovativo poiché sposta l'attenzione della ricerca su cellule dell'immunità innata, le quali influenzano poi le risposte autoreattive dell'immunità adattativa. L'obiettivo di questo progetto è quindi l'identificazione di meccanismi e molecole associate alla plasticità e polarizzazione dei macrofagi, fornendo una base per nuove strategie diagnostiche e terapeutiche centrate su queste cellule.

RISULTATI

In questo progetto, i macrofagi di tipo M1 (pro-infiammatori) e M2 (anti-infiammatori) sono stati investigati studiando il loro stato di attivazione e la loro plasticità a partire dai monociti ottenuti dai topi così come da donatori sani. Mediante citofluorimetria policromatica a flusso è stata effettuata una caratterizzazione *ex vivo* di vari marcatori di attivazione o di co-stimolazione e di recettori per le chemochine in questi due tipi di macrofagi. Nei topi, i nostri risultati hanno confermato che i marcatori più stabili che definiscono il fenotipo M1 sono iNOS, CD40, CD80 e CD86, mentre il fenotipo M2 è caratterizzato da molteplici marcatori quali il CD206, CD11c, CD44 e CD200R. Nei donatori sani, invece, marcatori *bona fide* dei macrofagi M1 sono iNOS, CD25, CD80, CD86, PD-L1 e il CCR7, mentre per i macro-

fagi M2 sono il CD206, CD36 e CD200R. Questo approccio multiparametrico ci ha, inoltre, permesso di individuare nuovi marcatori per gli M2 (quali CD11c, CD44, CD62L e CD115) e anche di apprezzare differenze tra uomo e topo.

Successivamente, questi marcatori sono stati seguiti sia nel modello sperimentale di SM, l'encefalite sperimentale autoimmune (ESA), sia nei pazienti SM recidivanti-remittenti. Abbiamo scoperto che i macrofagi M1 sono caratterizzati da un profilo pro-infiammatorio ancora più attivo, mentre gli M2 da un profilo meno anti-infiammatorio, sia nel modello ESA che nei pazienti SM. Infatti, gli M1 dei topi ESA esprimono livelli maggiori di iNOS, CD40 e CD80. Inoltre, gli M2 dei topi ESA sono caratterizzati da un profilo non più anti-infiammatorio, in quanto non solo mostrano livelli minori dei loro marcatori classici quali CD206 e CD44 ma producono marcatori tipici degli M1 come iNOS, CD40, CD80 e CD86. Questo scenario è simile anche nei pazienti SM, in cui gli M1 sono caratterizzati da aumentati livelli dei loro tipici marcatori pro-infiammatori quali iNOS, CD25, CD80, CD86, PD-L1 e CCR7, mentre gli M2 mostrano una riduzione di alcuni loro tipici marcatori anti-infiammatori CD206, CD36 e CD200R.

Dal punto di vista funzionale, il profilo infiammatorio degli M1 e M2 è stato studiato analizzando un pannello di citochine e chemochine nei topi di controllo e nei topi ESA, ed abbiamo individuato che durante la malattia gli M1 secernono quantitativi ancora maggiori di citochine (IL1- β , IL-6, IL-12, TNF- α) e chemochine (CCL2, CXCL9, CXCL10) pro-infiammatorie, mentre gli M2 producono livelli molto bassi

della loro tipica chemochina CCL22. Inoltre, l'immunizzazione con il peptide della mielina (MOG₃₅₋₅₅) dei macrofagi M1 e M2 determina negli M1 un aumento dell'espressione dei marcatori CD40 e CD86 e delle citochine e chemochine IL-6, IL-12, TNF- α e CXCL10 ed una diminuzione dei marcatori CD80 e MHCII; mentre negli M2 comporta un aumento dei marcatori tipici degli M1 (CD40, CD80 e CD86) e una concomitante riduzione della loro tipica chemochina CCL22. Infine, poiché l'attività dei macrofagi è significativamente controllata dalla loro capacità di "sentire" i vari agenti patogeni mediante l'espressione di recettori Toll-like (TLR), abbiamo anche investigato l'espressione di questi recettori nei due tipi di macrofagi di topo ed abbiamo scoperto che durante la malattia gli M1 esprimono livelli minori dei vari TLR batterici (TLR1, 2, 4, 5, 6) e del TLR vi-

rale TLR8. I macrofagi M2, invece, esprimono un profilo particolare di questi recettori, in cui diminuiscono i TLR batterici (TLR 1, 5, 6) ed aumenta il TLR batterico TLR2, mentre aumentano i TLR virali (TLR3 e TLR9) e diminuisce il TLR virale TLR8.

CONCLUSIONI

Questo studio dimostra che vi è un'alterazione immunofenotipica dei macrofagi M1 e M2 durante la SM ed il suo modello sperimentale ESA, in cui gli M1 sono iperattivi e maggiormente pro-infiammatori e gli M2 sono meno anti-infiammatori e protettivi e tendono a trasformare il loro fenotipo in M1. Questi risultati, sebbene debbano ancora essere associati a meccanismi molecolari, sono molto promettenti e crediamo possano fornire nuove basi patogenetiche, basate sui macrofagi, per la SM.

Macrophage plasticity and polarization in multiple sclerosis: in "ex vivo" veritas

INTRODUCTION AND AIMS

The present project represents the first detailed and complete study on the engagement and impact of the various subtypes of macrophages in multiple sclerosis, whose role in the immunopathogenesis of this autoimmune and neurodegenerative disease is continuously flourishing but is still in its infancy. This approach is innovative, since we will shift the focus of the current research on cells of the innate immune system, whose immunomodulation will ultimately influence the autoreactive responses of the adaptive immune system. The aim of the present project is thus the identification of mechanisms and molecules associated with macrophage plasticity and polarization, providing a basis for efficacious macrophage-centered diagnostic and therapeutic strategies.

RESULTS

In the present pilot project, we phenotypically investigated M1 and M2 macrophages in terms of their different activation status and plasticity in polarized monocyte-derived macrophages from EAE and control mice, as well as in healthy human subjects and in treatment-free RR-MS patients. An ex vivo characterization of surface activation/co-stimulatory markers and chemokine receptors was performed

through polychromatic flow cytometry in human and murine polarized M1 and M2 macrophages. In mice, our findings confirmed that the most stable and reliable M1 markers are CD40, iNOS and to some extent also CD80/86, whereas M2 showed multiple reliable markers including CD206, CD11c, CD44 and CD200R.

In humans our results proved iNOS, CD25, PD-L1, CD80/86 as well as chemokine receptor CCR7 to be *bona fide* markers of M1 polarization, whereas CD206, CD36 and CD200R for M2 polarization.

This multiparametric approach thus enabled us to unprecedentedly uncover CD11c, CD44, CD62L and CD115 as novel markers of M2 polarization and also to unravel differences between mice and humans.

Then, we phenotypically characterized M1 and M2 macrophages in EAE mice and RR-MS patients. We found that classically-activated and proinflammatory M1 macrophages possessed a higher proinflammatory profile in EAE compared to control mice, since they expressed higher levels of iNOS, CD40 and CD80. More interestingly, during EAE alternatively-activated anti-inflammatory M2 macrophages lost their M2-like phenotype by showing decreased expression of their signature markers like CD206 and CD44 and by concomitantly up-regulating M1-like

markers such as iNOS, CD40 and CD80/CD86. Similarly, RR-MS patients showed increased levels of all M1 signature markers iNOS, CD25, CD80/86, PD-L1, and CCR7 whereas M2 showed a reduced expression of their typical markers CD206, CD36 and CD200R. Concerning their functional activity, we also assayed the release of a panel of cytokines and chemokines from M1 and M2 cells in EAE compared to control mice. We found that during EAE M1 released higher levels of almost all pro-inflammatory cytokines (IL1- β , IL-6, IL-12, TNF- α) and chemokines (CCL2, CXCL9, CXCL10); whereas M2 chemokine CCL22 decreased during EAE.

Furthermore, MOG₃₅₋₅₅ immunization of control murine M1/M2 macrophages led to the upregulation of CD40 and CD86 and a downregulation of MHC-II and CD80 in M1 macrophages and a concomitant increase in IL-6, IL-12, TNF- α and CXCL10; whereas M2 macrophages displayed an increase in several pro-inflammatory markers typical of M1 cells, including CD40 and CD80/CD86 and a concomitant reduction of its signature chemokine CCL22.

Since macrophage activity is heavily controlled by their ability to sense pathogens through their toll-like receptors (TLR), we also evaluated their expression on murine M1/M2 macrophages during EAE and we found that M1 from EAE mice possessed lower levels of bacterial TLR1, 2, 4, 5, 6 and of viral TLR8 compared to control mice. On the other hand, M2 showed an interesting profile, where bacterial TLR1, 5, 6 were reduced and TLR2 was increased, whereas viral TLR3, 9 were increased and TLR8 was decreased.

CONCLUSIONS

Overall, our data seem to delineate that an immunophenotypic alteration of M1/M2 macrophages during MS and its animal model exists, with M1 being hyperactive and more pro-inflammatory and M2 being less protective. These findings, although yet to be associated to further mechanistic insights, are indeed promising and we believe might shed some light on novel pathogenic macrophage-driven mechanisms underlying MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Chiurchiù V. Novel targets in multiple sclerosis: to oxidative stress and beyond. *Curr Top Med Chem.* 2014;14(22):2590-9.

Chiurchiù V, Leuti A, Maccarrone M. Cannabinoid signaling and neuroinflammatory diseases: a melting pot for the regulation of brain immune responses. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015 Jun;10(2):268-80.

Chiurchiù V, Battistini L, Maccarrone M. Endocannabinoid signaling in innate and adaptive immunity. *Immunology* 2015. Jan 14. doi: 10.1111/imm.12441.

Chiurchiù V, Lanuti M, De Bardi M, Battistini L, Maccarrone M. The differential characterization of GPR55 receptor in human peripheral blood reveals a distinctive expression in monocytes and NK cells and a proinflammatory role in these innate cells. *Int. Immunol.* 2015 Mar;27(3):153-60.

Chiurchiù V, Cencioni MT, Lanuti M, Talamonti E, De Bardi M, Borsellino G, Battistini L, Maccarrone M. Endocannabinoids as "master regulatory bioactive lipids" of innate and adaptive immunity. *Keystone Symposia - Lipid Pathways In Biology And Disease*, 19th-24th March 2014, Dublin, Ireland.

Chiurchiù V, Talamonti E, Leuti A, Maccarrone M. The endocannabinoid system is a novel modulator of human macrophage plasticity and polarization. *24th Annual Symposium ICRS*, 28th June - 3rd July 2014, Baveno, Italy.

Chiurchiù V, Cencioni MT, De Bardi M, Centonze D, Battistini L, Maccarrone M. Modulation of monocytes by anandamide in multiple sclerosis involve distinct Toll-like receptors. *XXIV AINI CONGRESS*, 1st-4th October, Sorrento, Italy.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2013 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €



VERSO NUOVI
TRATTAMENTI

TOWARDS NEW TREATMENTS

Rosetta Pedotti

Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

COLLABORATORI:

Mhamad Abou-Hamdan, Massimo Costanza, Silvia Musio

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Gianfranco Balboni, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

Gabriela Constantin, Università di Verona, Verona

Pietro Luigi Poliani, Università degli Studi di Brescia, Brescia

Cinthia Farina, INSpe, Ospedale San Raffaele, Milano

Lawrence Steinman, Stanford University, CA, USA

Lucia Negri, Università La Sapienza, Roma

Le prokineticine nelle malattie demielinizzanti autoimmuni del sistema nervoso centrale: possibili nuovi target di terapia per la sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La patogenesi della sclerosi multipla (SM) non è ancora del tutto chiarita, ed il successo terapeutico è ancora limitato. È quindi necessario trovare terapie più efficaci per questa malattia e possibilmente una cura definitiva. Prokineticina 1 (PK1) e prokineticina 2 (PK2) sono due piccole proteine secretorie scoperte di recente, coinvolte in diverse funzioni biologiche inclusa l'immunomodulazione. L'obiettivo del progetto è di esplorare la possibilità di intervenire sul sistema delle prokineticine per ridurre la risposta autoimmune che causa infiammazione e demielinizzazione del sistema nervoso centrale (SNC) nel modello animale di SM, l'encefalomielite autoimmune sperimentale (ESA). L'ipotesi dello studio è innovativa, poiché non esistono dati sul ruolo delle prokineticine nella SM, e potrebbe portare nuove conoscenze sui meccanismi coinvolti nella malattia. Inoltre, data la disponibilità di composti in grado di bloccare il *signalling* delle prokineticine, questo progetto potrebbe avere un impatto translazionale nella clinica della SM.

RISULTATI

Abbiamo studiato per prima cosa l'espressione della prokineticina 2 (PK2, la più coinvolta delle due nell'immunomodulazione) durante l'ESA. Abbiamo

visto che l'RNA messaggero era over-espresso nel SNC e nelle cellule linfonodali dei topi con ESA. Inoltre, PK2 a livello proteico era espresso negli infiltrati infiammatori e nei sieri durante l'ESA. Abbiamo poi studiato PK2 nei pazienti con SM e trovato un aumento del trascritto di PK2 nei leucociti del sangue e nel siero di pazienti con SM recidivante remittente rispetto ai controlli sani. Abbiamo valutato se le prokineticine avessero un ruolo biologico nell'ESA usando un antagonista dei recettori per le prokineticine. L'antagonista preveniva o attenuava la gravità della malattia e riduceva la produzione delle citochine infiammatorie interferone (IFN)-gamma e interleuchina (IL)-17A da parte dei linfociti di topi trattati, e aumentava invece la produzione della citochina soppressoria IL10. *In vitro* PK2 aumentava IL17 e IFN-gamma e riduceva IL10 in splenociti murini attivati contro un antigene mielinico.

CONCLUSIONI

Questi dati suggeriscono che PK2 abbia un importante ruolo di immunomodulazione nella malattia autoimmune demielinizzante del SNC, e offre le basi per nuove ricerche sul ruolo di PK2 nella SM. PK2 ed i suoi recettori potrebbero costituire un nuovo meccanismo patogenetico della SM e diventare forse un nuovo target di terapia.

Prokineticins in autoimmune demyelinating disease of the central nervous system: possible novel targets of therapy for multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The pathogenesis of multiple sclerosis (MS) is still not completely understood, and the success of immune intervention in this disease is limited. Thus, tremendous clinical need exists for more effective, and fundamentally curative, therapies for MS. Prokineticin 1 (PK1) and prokineticin 2 (PK2) are relatively newly discovered small secreted proteins involved in different biological functions including immune modulation. The aim of the project is to evaluate the possibility of targeting prokineticins to reduce the autoimmune response leading to inflammation and demyelination of the central nervous system (CNS) in the animal model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). This study is novel and is likely to provide new insights into molecules involved in the pathology of the disease. Also, given the availability of compounds that target prokineticins, this project has the potential to move forward towards a translation in the clinic for patients with MS.

RESULTS

We first studied the expression of prokineticin 2 (PK2, which is the one most involved in immune regulation) during EAE. We found that PK2 messenger RNA was upregulated in the CNS and lymph node cells (LNCs) of mice with EAE. Moreover, PK2 protein was expressed in EAE inflammatory infil-

trates and was increased in sera during EAE. We next studied PK2 in patients MS, and found that in patients with relapsing-remitting MS transcripts for PK2 were significantly increased in peripheral blood mononuclear cells compared with healthy controls, and PK2 serum concentrations were significantly higher. We next evaluated whether or not prokineticins had a biological relevance in autoimmune CNS demyelinating disease by investigating *in vivo* in the EAE model the effects of a prokineticin receptor antagonist. PK2 receptor antagonist prevented or attenuated established EAE in chronic and relapsing-remitting models, reduced CNS inflammation and demyelination, and decreased the production of inflammatory cytokines interferon (IFN)-gamma and interleukin (IL)-17A in LNCs while increasing that of the suppressive cytokine IL-10. PK2 *in vitro* increased IFN-gamma and IL-17A and reduced IL-10 in splenocytes activated against myelin antigen.

CONCLUSIONS

These data suggest that PK2 is a critical immune regulator in CNS autoimmune demyelination, and offers the basis for new research on the role of PK2 in MS. PK2 and its receptors might represent an important new pathogenic mechanism involved in MS pathobiology, and might become a new target of treatment.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Lattanzi R, Radaelli M, Martinelli V, Salvadori S, Negri I, Poliani PL, Farina C, Balboni G, Steinman L, Pedotti R. Critical role for prokineticin 2 in central nervous system autoimmunity. *Neurology, Neuroimmunology and Neuroinflammation*. 2015 Apr 9;2(3):e95.

Costanza M, Binart N, Steinman L, Pedotti R. Prolactin: A versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. *Autoimmunity Reviews* 2015 Mar;14(3):223-230. Epub 2014 Nov 14 2014.

Costanza M, Di Dario M, Steinman L, Farina C, Pedotti R. Gene expression analysis of histamine receptors in peripheral blood mononuclear cells from individuals with clinically-isolated syndrome and different stages of multiple sclerosis. *J of Neuroimmunology. J Neuroimmunol*. 2014 Dec 15;277(1-2):186-8. Epub 2014 Sep 28.

Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, et al. An important role for prokineticin 2 in autoimmune CNS demyelination. *Journal of Neuroimmunology* Volume: 275 Issue: 1-2 Special Issue: SI Pages: 131-131 Meeting Abstract: 485 Published: OCT 15 2014.

Abou-Hamdan M, Costanza M, Musio S, et al. The prokineticin system in experimental autoimmune encephalomyelitis: Possible novel targets for immune intervention. *Journal of Neuroimmunology* Volume: 253 Issue: 1-2 Pages: 85-85 Published: DEC 15 2012.

Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Lattanzi R, Radaelli M, Martinelli V, Salvadori S, Negri I, Poliani PL, Farina C, Balboni G, Steinman L, Pedotti R. "An important role for prokineticin 2 in autoimmune CNS demyelination". XII International Congress of Neuroimmunology (ISNI), Mainz, Germany 9/13 November 2014.

Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Lattanzi R, Radaelli M, Martinelli V, Salvadori S, Negri I, Poliani PL, Farina C, Balboni G, Steinman L, Pedotti R. Prokineticin 2 promotes inflammatory response in autoimmune CNS demyelination. XXIV AINI Congress, 1-4 Ottobre 2014, Sorrento, Italia.

Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Negri L, Poliani PL, Farina C, Balboni G and Pedotti R. Involvement of the bioactive peptide prokineticin 2 in autoimmune demyelinating disease of the central nervous system. 30th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, 13-18 September 2014, Petersberg, Germany.

Abou-Hamdan M *, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Negri L, Poliani PL, Farina C, Balboni GF, Pedotti R. The Prokineticin system in EAE: possible novel target for immune intervention. 15th International Congress of Immunology, 22-27 September 2013, Milan, Italy.

Abou-Hamdan M *, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Negri L, Poliani PL, Farina C, Balboni GF, Pedotti R. The Prokineticin system in EAE: possible novel target for immune intervention. XXIII AINI Congress (Associazione Italiana Neuroimmunologia), 22 September 2013, Milan, Italy. Awarded with the Marco Vergelli award for the best oral presentation.

Pedotti R. The role of prokineticin in EAE. Congresso Scientifico Annuale FISM May 28/29 2014 Roma, Italy.

Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Negri L, Poliani PL, Farina C, Balboni GF, Pedotti R. The Prokineticin system in EAE. XI ISNI Congress (International Congress of Neuroimmunology), 4-8 November 2012, Boston, USA.

Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Negri L, Poliani PL, Farina C, Balboni GF, Pedotti R. A potential role for Prokineticins in EAE. XXII Congresso AINI (Associazione Italiana Neuroimmunologia), 26-29 September 2012, Catania, Italy.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 87.000 €

Erica Butti

Laboratorio di Neuroimmunologia, Divisione di Neuroscienze, Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI:

Elena Brambilla, Linda Chaabane

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Angelo Quattrini, Unità di Neuropatologia, Divisione di Neuroscienze, Ospedale San Raffaele, Milano

Ruolo diretto e indiretto dei precursori endogeni neurali nella demielinizzazione e remielinizzazione dopo danno indotto da cuprizone

PREMESSE E OBIETTIVI

Negli ultimi anni, è stato dimostrato che il sistema nervoso centrale adulto ha la capacità di rigenerarsi dopo danno. Questo concetto è stato molto studiato dalla comunità scientifica e in particolare da chi lavora nel campo delle malattie demielinizzanti, come la sclerosi multipla (SM). Nonostante l'efficace attività di riformare mielina esercitata dai precursori degli oligodendrociti (OPC) nelle lesioni acute della SM, il potenziale riparativo spontaneo non avviene nelle fasi successive della malattia e questo è il motivo principale per cui la degenerazione assonale e i deficit neurologici continuano a progredire.

Anche se i processi patologici legati alla SM sono ben conosciuti, la complessità delle interazioni fisiopatologiche di questa malattia è ancora poco nota. Per questo motivo nel corso degli anni si sono sviluppati modelli animali di SM che rappresentano un utile strumento per studiare il contributo dei vari componenti della malattia e il processo patologico. Inoltre, le cellule staminali neurali endogene (NPCs) della zona subventricolare (SVZ) hanno la capacità di migrare nella sostanza bianca sottocorticale e differenziarsi in oligodendrociti mielinizzanti, sia in condizioni normali sia patologiche. È ragionevole quindi ipotizzare che un'alterazione delle funzioni peculiari delle NPCs residenti nella SVZ possa essere legata alla mancata riformazione di mielina.

Il nostro obiettivo era quindi quello di studiare il ruolo funzionale delle NPCs durante il processo di demielinizzazione e di remielinizzazione del corpo calloso (CC) indotta dal cuprizone, in una linea di topi transgenici (NestinTK), in cui le NPCs possono

essere selettivamente uccise con somministrazione di ganciclovir (GCV).

RISULTATI

Nella prima parte del progetto abbiamo cercato di capire se le NPCs endogene siano importanti nei processi di demielinizzazione dopo la lesione indotta dal cuprizone. Abbiamo dato ai topi NestinTK e C57Bl/6 una dieta con il 0,2% di cuprizone per 6 settimane e li abbiamo trattati con GCV o PBS dalla prima di dieta per un totale di 1 mese. Al fine di seguire in vivo il danno del CC e di misurarlo, abbiamo eseguito la risonanza magnetica (RM), la quale ha evidenziato che il danno del CC è aumentato dopo la dieta del cuprizone, ma che non ci sono differenze nei diversi gruppi sperimentali. Abbiamo eseguito anche analisi istopatologiche per valutare la demielinizzazione e il danno assonale indotti dal cuprizone. In particolare, abbiamo osservato due diverse regioni del CC, il *body* e la prima parte dello *splenium*. Abbiamo trovato un danno assonale e della mielina più grave nello *splenium* rispetto al *body* del CC, ma non abbiamo trovato differenze nei topi con l'ablazione delle NPCs. Nessuna differenza è stata trovata tra i diversi gruppi sperimentali anche per quanto riguarda l'astrogliosi e l'attivazione microgliale.

Per indagare il contributo della NPC nella generazione di nuove cellule mielinizzanti, abbiamo osservato gli OPC, ma non abbiamo trovato alcuna differenza nel numero di queste cellule.

La seconda parte del progetto è focalizzata a indagare se le NPCs potrebbero avere un ruolo nella fa-

se di re-mielinizzazione. Topi C57Bl/6 e topi transgenici NestinTK sono stati nutriti con lo 0,2% di cuprizone mescolato alla dieta normale per 6 settimane e il GCV è stato somministrato per 1 mese a cominciare da 4 settimane dopo l'inizio della dieta. Rispetto a un topo sano, tutti i parametri osservati con la RM sono stati significativamente ridotti a 4 settimane in tutti gli animali, ma nessuna differenza è stata osservata tra i gruppi. Attraverso analisi di microscopia elettronica (ME) abbiamo osservato nei topi NestinTK trattati con il GCV una minore remielinizzazione rispetto ai topi C57Bl/6 trattati con il GCV. Per sostenere i risultati ottenuti in RM e in ME, abbiamo eseguito delle analisi patologiche per valutare la mielina e il danno assonale. Non abbiamo trovato alcuna differenza confrontando i gruppi sperimentali. Abbiamo poi valutato l'attivazione dell'astroglia e della microglia e anche in questo caso non abbiamo osservato nessuna differenza.

Più importante dovrebbe essere il ruolo delle NPC's nella proliferazione e generazione degli OPC e degli oligodendrociti maturi, ma non abbiamo trovato nessuna differenza nel numero di queste cellule. I nostri risultati, quindi, suggeriscono che le NPC's residenti nella SVZ non sembrano svolgere un ruolo nella modulazione del danno e nel reclutamento degli astrociti, microglia e OPC nella fasi di demielinizzazione e remielinizzazione.

CONCLUSIONI

Questo era un progetto pilota in cui abbiamo utilizzato un modello di topi transgenici per capire in quale misura le NPC's endogene siano coinvolte nel processo di demielinizzazione e remielinizzazione, come quello che avviene nella SM. Questo è un requisito importante per scoprire nuovi approcci rigenerativi e per sviluppare efficaci terapie per la SM.

Direct and indirect role of endogenous neural precursor cells in demyelination and remyelination after cuprizone-induced injury

INTRODUCTION AND AIMS

In the early 20th century, it was first demonstrated that the adult CNS has the ability to regenerate itself after an injury. Over the years this concept has gained attention from the scientific community in general and in particular from those working in the field of myelin disorders owing to the extensive regenerative capacity of the demyelinated brain in early phases of MS. However, despite the efficacious remyelinating activity exerted by OPCs in acute MS lesions, this spontaneous reparative potential fails at later stages of the disease and this is the main reason why axonal degeneration and neurological deficit invariably progress.

Although novel insights into pathological processes related to MS has been recently highlighted, the complexity of pathophysiological interactions in MS are still poorly understood. This is the reason why animal models of MS have been developed over the years and represent an useful *in vivo* tool to better dissect the contribution of the different parties with the MS pathological process.

Moreover, endogenous NPC's of the subventricular zone (SVZ) retain the ability to migrate into the sub-

cortical white matter and differentiate into myelinating oligodendrocytes, both in normal and pathological conditions. Thus, it is reasonable to hypothesize that an alteration of the peculiar functions of SVZ resident aNPC's over time is linked to remyelination failure.

Our aim was thus to address the functional role of aNPC's during a demyelinating and remyelinating process cuprizone-induced in a transgenic mouse line (NestinTK) in which aNPC's can be selectively killed by ganciclovir (GCV) administration.

RESULTS

We intended to understand whether endogenous aNPC's are important in the demyelination processes after cuprizone-induced injury. NestinTK and C57Bl/6 mice were fed with a 0.2% cuprizone diet for 6 weeks and they were treated with GCV or PBS from 1st to 5th week of diet for a total of 4 weeks. In order to follow *in vivo* and measure the damage in the corpus callosum (CC) we performed MRI (magnetic resonance image). We found that the size of the damage in the CC increased after cuprizone diet, but there were no differences in the different ex-

perimental groups. To evaluate whether aNPC ablation affects demyelination and axonal damage induced by cuprizone, were performed histopathological analysis. In particular, we observed two different regions of the CC, the body and the first part of the splenium. We found a severe myelin and axonal damage in the splenium compared to the body CC, but we didn't find any differences in aNPCs ablated mice.

Then, in order to investigate if aNPCs absence could influence the astrogliosis and the microglia activation, we performed astrocytes and microglia marker immunostaining. We observed no difference in the number of astrocytes and microglia cells.

To further investigate the contribution of NPC to the generation of new myelinating cells, we focalised our attention on oligodendrocytes precursor cells (OPCs), but we didn't find any difference in the number of these cells.

The second part of the project was focalised to investigate if aNPCs could have a role in re-myelination phase. C57Bl/6 and transgenic NestinTK mice were fed with cuprizone 0.2 % (w/w) mixed into a standard rodent chow for 6 weeks and GCV was administrated for 1 month starting 4 weeks after the beginning of cuprizone-diet.

Compared to healthy, all parameters observed by MRI were significantly reduced at 4 weeks in all animals and increased at 6 and 8 weeks, but no difference was observed through the groups. By

electronic microscopy we found that in NestinTK mice treated with GCV there was less remyelination compared to C57Bl/6 mice treated with GCV. To support MRI and EM results, we performed immunostaining analysis to evaluate the myelin and axonal damage. We didn't find any difference if we compared the experimental groups. Then, we moved to verify if the absence of aNPCs during remyelination phase could influence the astrogliosis and microglia activation and we observed no difference in the astrogliosis and microglia activation.

More important should be the role of aNPCs in the proliferation and production of OPCs and mature oligodendrocytes, so we investigated this aspect, but no difference in the number of these cells were observed.

So, our results suggest that SVZ resident aNPCs seem not play a role in the modulation of damage and in the recruitment of astrocytes, microglia and OPCs in the demyelinating and remyelinating phase.

CONCLUSIONS

This was a pilot project in which we used transgenic mouse models to discover to what extent endogenous aNPCs are involved in the process of demyelination and remyelination such as that occurring in MS. This is a priori requisite to discover new regenerative approaches to be further developing as novel and more efficacious therapies for MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Butti E, Chaabane L, Ruffini F, D.Giorgia, Comi G, Quattrini A, Martino G. Direct and indirect role of endogenous neural precursor cells in demyelination and remyelination after cuprizone-induced injury. Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, Italia, 28-29 Maggio 2014.

Butti E, Berera G, Ruffini F, L.Chaabane, D.Giorgia, Quattrini A, Martino G. Role of endogenous neural precursor cells in remyelination and axonal damage after cuprizone-induced injury. XXIV AINI Meeting, Associazione italiana di Neuroimmunologia, Sorrento (NA), Italia. Ottobre 1-4, 2014.

Butti E, Berera G, Ruffini F, L.Chaabane, D.Giorgia, Quattrini A, Martino G. Role of endogenous neural precursor cells in remyelination and axonal damage after cuprizone-induced injury. XII International Congress of Neuroimmunology, Mainz (Germania). Novembre 9-13, 2014. (Presentazione orale).

Butti E, Berera G, Ruffini F, L.Chaabane, D.Giorgia, Quattrini A, Martino G. Role of endogenous neural precursor cells in demyelination and remyelination after cuprizone-induced injury. OSR Scientific Retreat, Stresa, Italia. Marzo 13-15, 2015.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2013 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €

Claudia Cantoni

Dipartimento di Neurologia, Washington University in St. Louis, Missouri, USA

MENTORE: **Laura Piccio**

Ruolo del miR-223 nella sclerosi multipla e nel suo modello animale

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è la più comune malattia autoimmune del sistema nervoso centrale (SNC), caratterizzata da infiammazione, demielinizzazione e danno assonale. L'eziopatogenesi della SM è ancora largamente sconosciuta. Il principale modello animale per lo studio della SM è l'encefalomielite autoimmune sperimentale (ESA); grazie a studi sull'ESA sono state scoperte e successivamente approvate numerose terapie per la SM.

I microRNA (miRNA) sono una classe di piccoli RNA non codificanti che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale, degradando il mRNA o inibendo la traduzione della proteina bersaglio. I miRNA sono implicati nella patogenesi di numerose malattie, inclusa la SM e rappresentano potenziali bersagli terapeutici. Analisi con *microarrays* hanno evidenziato alterazioni dei livelli di miRNAs nel sangue e nel SNC di pazienti con SM. In particolare il miR-223 è risultato sovraespresso nel sangue e nelle placche attive di pazienti affetti da SM. Il miR-223 è altamente espresso nelle cellule mieloidi e modula il numero e la funzione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSCs). Le MDSCs sono una popolazione eterogenea di cellule mieloidi immature, suddivise in due sottopopolazioni, monociti (MO) e polimorfonucleati (PMN)-MDSCs. Le MDSCs possono sopprimere la proliferazione linfocitaria e modulare il decorso clinico della ESA. L'obiettivo di questo progetto è stato quello di caratterizzare il ruolo del miR-223 nell'ESA e nella SM. **OBIETTIVO 1.** Determinare gli effetti della mancanza del mir-223 *in vivo* durante l'ESA. **OBIETTIVO 2.** Caratterizzare l'espressione del miR-223 nel SNC di pazienti con SM e controlli.

RISULTATI

L'espressione miR-223 è stata analizzata nel midollo spinale isolato da topi immunizzati, con ESA al giorno 0, 5, 10, 15 e 30 dopo l'immunizzazione. I li-

velli di miR-223 sono risultati maggiori nei campioni ottenuti al picco di malattia. I nostri risultati evidenziano inoltre che il miR-223 è principalmente espresso nelle cellule mieloidi.

Per chiarire ulteriormente il ruolo di miR-223 nel SNC sono stati studiati topi deficitari per il miR-223 (miR-223KO) e topi controllo (WT) immunizzati con il modello ESA. I topi miR-223KO sono risultati più resistenti alla malattia rispetto ai topi WT. Analisi istologiche hanno dimostrato un numero diminuito di infiltrati infiammatori e meno demielinizzazione nel midollo spinale dei topi miR-223KO. Cellule della milza e cellule mononucleate del SNC sono state isolate dai topi miR-223KO e WT durante ESA e caratterizzate mediante citofluorimetria. Al picco della malattia, il numero assoluto di (PMN) e (MO)-MDSCs nella milza dei topi miR-223KO è risultato significativamente più alto rispetto ai topi WT. Inoltre, i topi miR-223KO presentavano un aumento significativo di (MO)-MDSC nel SNC rispetto ai WT. Per studiare come il miR-223 possa regolare le funzioni soppressive delle MDSCs, (PMN) e (MO)-MDSCs, isolate da topi KO e WT, sono state coltivate *in vitro* insieme alle cellule T. Abbiamo dimostrato che le (MO)-MDSCs dei topi KO inibiscono di più la proliferazione delle cellule T rispetto a quelle dei topi WT. Inoltre, le cellule T in cultura con (MO)-MDSCs dei topi KO producono meno citochine infiammatorie quali: IFN- γ e GM-CSF. Questi dati suggeriscono che le MO-MDSCs dei topi KO sono più efficienti nel sopprimere la proliferazione delle cellule T e la loro produzione di citochine. Alla luce dei dati ottenuti grazie al modello animale, abbiamo ipotizzato che il miR-223 possa modulare il numero e la funzione delle MDSCs durante l'ESA e potenzialmente nella SM. L'obiettivo numero 2 è stato modificato come segue: caratterizzare l'espressione e la funzione del miR-223 nelle MDSCs nel sangue di pazienti con SM e in controlli sani. Abbiamo esaminato il numero di MDSCs nel

sangue periferico di pazienti con SM (n = 11) rispetto a controlli sani (n = 13) mediante citofluorimetria. I risultati hanno evidenziato un numero ridotto di MDSCs e (MO)-MDSCs nel sangue dei pazienti affetti da SM rispetto ai controlli sani. I pazienti affetti da SM presentavano un'aumentata espressione del miR-223 (media \pm SEM sui controlli: $1,69 \pm 0,35$ vs $0,78 \pm 0,15$).

CONCLUSIONI

Le MDSCs sono potenti inibitori della proliferazio-

ne linfocitaria durante una situazione di infiammazione cronica e nelle malattie autoimmuni, ma il loro meccanismo di azione resta ancora poco conosciuto. Questo lavoro ha valutato le potenzialità del miR-223 come possibile modulatore delle MDSCs. I nostri studi hanno rilevanza clinica perché dimostrano che il miR-223 modula le MDSCs nella SM e nel suo modello animale. L'analisi delle funzioni dei miRNAs potrebbe portare in futuro all'identificazione di nuovi biomarcatori e bersagli terapeutici.

Role of miR-223 in multiple sclerosis and its animal model

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a complex disease of unknown etiology involving central nervous system (CNS) inflammation, demyelination, and axon/neuron damage. It is thought to be an autoimmune disease targeting CNS myelin. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the prime animal model for MS; work using this model has led to several approved MS therapies. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small, non-coding RNAs recently discovered to regulate gene expression post-transcriptionally, either by targeting mRNA degradation or by inhibition of protein translation. MiRNAs represent potential therapeutic targets as they are implicated in the pathogenesis of several diseases, including MS. Dysregulation of several miRNAs has been observed in blood cells and CNS tissues of MS vs. control subjects by microarray profiling. MiR-223 was found to be up-regulated by microarrays of whole blood and in active MS lesions compared to control tissues. MiR-223 is highly expressed in myeloid cells. It modulates number and function of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), a heterogeneous population of immature myeloid cells. MDSCs are subdivided into two subsets, monocytic (MO) and polymorphonuclear (PMN)-MDSCs. MDSCs can suppress T cell activities and are reported to modulate EAE clinical course and pathology. The goal of the present project was to characterize the role of miR-223 in EAE and MS. We tested the following hypotheses in two Aims. AIM 1. Determine the effects of miR-223 deficiency in vivo during EAE. AIM 2.

Characterize miR-223 expression in CNS autopsy tissues from MS and non-MS subjects.

RESULTS

MiR-223 expression was studied in spinal cord tissue isolated from naive and immunized control mice at 5, 10, 15 and 30 days post immunization. MiR-223 expression was markedly increased in the spinal cord of immunized mice at the peak of disease compared to naive mice. Furthermore we found that miR-223 was highly expressed in myeloid cells (macrophages and microglia). MiR-223 deficient mice develop attenuated EAE compared to WT mice.

To further clarify the role of miR-223 in CNS autoimmunity, EAE was induced in miR-223KO and littermate wild-type controls by active immunization with MOG35-55. MiR-223KO mice showed both delayed disease onset and an overall less severe disease compared to control mice. Concordant with reduced clinical severity, histological analyses showed decreased number of inflammatory infiltrates and demyelination in the spinal cord of miR-223KO mice compared to WT. Next, splenocytes and CNS mononuclear cells isolated from miR-223KO and WT mice were characterized by flow cytometry during EAE. At peak of disease, absolute numbers of miR-223KO (PMN) and (MO)-MDSCs were significantly higher in the spleen compared to WT. Phenotypic characterization of CNS-isolated mononuclear cells from miR-223KO and WT mice at EAE peak showed a significant increase of (MO)-

MDSC in miR-223KO compared to WT mice, but no differences in the number of (PMN)-MDSC between the two groups. To evaluate the role of miR-223 in MDSC immunosuppressive functions, miR-223KO and WT (PMN) and (MO)-MDSCs were cultured in vitro at different ratios with T cells. MiR-223KO (MO)-MDSCs had greater immune-suppressive effects on T cell proliferation in comparison to WT MO-MDSCs. T cell production of IFN- γ and GM-CSF was also suppressed more profoundly by miR-223KO than by WT MO-MDSCs. These data suggest that miR-223KO MO-MDSCs are more efficient in suppressing T cell proliferation and cytokine production. Based on all the data we have obtained in the animal model, we have formulating the hypothesis that miR-223 modulates the number and immunosuppressive activities of MDSCs during EAE and potentially during MS. The new revised aim 2 was: characterize miR-223 expression and function in MDSCs from MS and control subjects using blood. The experiments planned for the second aim changed to test this hy-

pothesis. We examined the number of MDSCs in the peripheral blood of MS patients (n = 11) in comparison to healthy control subjects (n = 13) by flow cytometry. We observed a lower number of total MDSCs and MO-MDSCs in the whole blood of MS patients in comparison to healthy subjects. Furthermore MDSCs isolated from MS patients had statistically higher expression of miR-223 in comparison with controls MDSCs (mean fold \pm SEM over controls: 1.69 ± 0.35 vs 0.78 ± 0.15).

CONCLUSIONS

This work evaluated miR-223 as a possible modulator of MDSCs activities. MDSCs suppress T cell activities during chronic inflammation and autoimmune disease, but their mechanism of action is poorly understood. Our studies are clinically relevant because we demonstrated that miR-223 modulates MDSCs in MS and in its animal model. Targeting specific miRNA-regulated pathways may provide new therapeutic avenues.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Cantoni C, Bollman B, Licastro D, Xie M, Mikesell R, Schmidt R, Yuede CM, Galimberti D, Olivecrona G, Klein RS, Cross AH, Otero K, Piccio L. TREM2 regulates microglial cell activation in response to demyelination in vivo. *Acta Neuropathol.* 2015;129(3):429-47.

Longbrake EE, Ramsbottom MJ, Cantoni C, Ghezzi L, Cross AH, Piccio L. Dimethyl fumarate selectively reduces memory T cells in multiple sclerosis patients. *Multiple sclerosis.* 2015.

Piccio L, Cantoni C, Henderson J, Hawiger D, Ramsbottom M, Mikesell R, Ryu J, Hsieh C, Cremasco V, Haynes W, Dong LQ, Chan L, Galimberti D and Cross AH. Lack of adiponectin leads to increased lymphocyte activation and increased disease severity in a mouse model of multiple sclerosis. *European journal of immunology.* 2013;43(8):2089-100.

Cantoni C, Cross A, and Piccio L. Oral presentation: Role of miR-223 in multiple sclerosis and its animal model. International Society of Neuroimmunology (ISNI) meeting in Mainz, Germany, 2014.

Cantoni C, Cross A and Piccio L. Poster presentation: Role of miR-223 in multiple sclerosis and its animal model. Americas Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ACTRIMS) meeting in New Orleans, USA, 2015.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 85.000 €

Diego Fresegna

Laboratorio di Neuroimmunologia e Plasticità Sinaptica, Fondazione Santa Lucia, Roma

MENTORE: **Diego Centonze**

Il potenziale coinvolgimento dell'interleuchina-1beta nelle alterazioni dell'umore in un modello animale di sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

I disturbi dell'umore sono frequenti nella sclerosi multipla (SM), anche nelle prime fasi della malattia ed in assenza di disabilità fisica. Piuttosto che una reazione personale ad una malattia cronica e potenzialmente invalidante, ansia e depressione nella SM sembrano pertanto dipendere dall'effetto dell'ambiente infiammatorio sulle connessioni e funzioni neuronali. Inoltre, dati recenti suggeriscono che tali disturbi dell'umore possono condividere basi neurobiologiche con il processo neurodegenerativo infiammatorio della malattia. Ad esempio, le citochine proinfiammatorie come l'interleuchina-1 β (IL-1 β) ed il fattore di necrosi tumorale, rilasciate durante le fasi di ricaduta, sono state correlate sia alla neurodegenerazione tardiva della SM che alle alterazioni dell'umore, suggerendo l'esistenza di substrati biologici comuni per entrambi i fenomeni. Il sistema endocannabinoide (ECS) ha la potenzialità di collegare la percezione degli stimoli esterni ed interni a fenomeni neurofisiologici e comportamentali distinti (come ansia e depressione). Inoltre, IL-1 β è stata già dimostrata interagire con i recettori cannabinoidi di tipo 1 (CB1R) nello striato, un'importante area del cervello coinvolta nella patogenesi della SM. Il ruolo svolto dal CB1R nelle alterazioni dell'umore associate alla SM è comunque del tutto speculativo.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare il coinvolgimento di IL-1 β nelle alterazioni dell'umore nell'EAS, un modello di malattia autoimmune indotta nei topi, che condivide aspetti clinici ed istologici con la SM. Successivamente, abbiamo studiato la disfunzione sinaptica striatale legata al CB1R, che è coinvolta nel comportamento ansioso-depressivo durante l'EAS, ed il ruolo di IL-1 β .

RISULTATI

Durante il primo anno, abbiamo studiato il comportamento ansioso-depressivo nei topi EAS, evitando

l'interferenza della disabilità motoria. A tale scopo, abbiamo valutato il comportamento durante la fase presintomatica e quella sintomatica in topi con normali prestazioni motorie. Sorprendentemente abbiamo osservato un aumento dei livelli di ansia e depressione in entrambe le fasi della malattia, dimostrando la presenza di disturbi dell'umore in assenza di disabilità nei topi EAS. Al fine di studiare il ruolo di IL-1 β in questo contesto, abbiamo inibito cronicamente il segnale di IL-1 β infondendo intracerebroventricolarmente l'antagonista del recettore (IL-1ra) ed abbiamo osservato che tale trattamento può migliorare i livelli di ansia e depressione nei topi EAS.

Durante il secondo anno, abbiamo studiato il potenziale meccanismo fisiologico che lega IL-1 β ai disturbi dell'umore nell'EAS. Mediante registrazioni elettrofisiologiche striatali, abbiamo osservato un recupero della risposta CB1R nei topi EAS trattati con IL1ra, come dimostrato dalla riduzione della frequenza GABA-ergica mediata dall'HU210. Al contrario, l'applicazione HU210 su fettine striatali di topo EAS-veicolo non modifica la trasmissione GABA, indicando una compromissione della risposta del CB1R in condizioni patologiche.

Infine, abbiamo testato l'ipotesi che un difetto nella trasmissione della dopamina (DA) a livello striatale fosse responsabile della inibizione dei CB1R nell'EAS. A tale scopo, abbiamo trattato topi EAS con anfetamina per favorire il rilascio della DA dalle terminazioni nervose. Registrazioni elettrofisiologiche striatali hanno dimostrato che la stimolazione del sistema DA nei topi EAS favorisce il recupero della funzione CB1R.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti indicano che l'ansia e la depressione osservate in topi EAS sono indipendenti dalla disabilità motoria. Inoltre, tali disturbi dell'umore

correlano con l'inibizione striatale della funzionalità del CB1R dipendente da IL-1 β e con l'alterazione del sistema dopaminergico. Collettivamente, i nostri dati contribuiscono a chiarire la base sinaptica dei disturbi dell'umore nell'EAS e, possibilmente, nella SM. Comprendere il fondamento neurobiologico che media il comportamento ansioso-depressivo

nell'EAS è di cruciale importanza per ottimizzare il trattamento dei disturbi dell'umore nella SM e, possibilmente, di altre malattie neuroinfiammatorie. In questa direzione, il *targeting* nel sistema endocannabinoidale può essere quindi considerato come un valido strumento terapeutico anche per il trattamento dei sintomi psichiatrici in pazienti con SM.

Potential involvement of interleukin-1beta in mood alteration in a mouse model of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Mood disturbances are frequent in multiple sclerosis (MS), even in early disease phases and in the absence of physical disability. Indeed, anxiety and depression have been recently recognized as direct consequences of the inflammatory milieu on neuronal function and connectivity, rather than merely representing a subjective reaction to a chronic and potentially disabling disease. These emerging data suggest also that mood disturbances share neurobiological bases with the inflammatory neurodegenerative process of the disease. For example, proinflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF), released during MS attacks, have been implicated both in delayed neurodegeneration in MS brains and in mood alterations, therefore suggesting that these phenomena share common determinants. The endocannabinoid system (ECS) has emerged as a linker between external and internal stimuli and neurophysiological and behavioral outcomes (such as anxiety and depression). Furthermore, IL-1 β has been shown to interact with type-1 cannabinoid receptor 1 (CB1R) in the striatum, an important brain area involved in MS pathogenesis.

Further work is needed to elucidate the potential role of CB1R in MS-associated mood alterations. This work aimed to investigate the involvement of IL-1 β in induced mood alterations in EAE, an autoimmune disease sharing clinical and histological similarities with MS and thus taken as a mouse model of the human disease. We then focused on the study of the possible link between CB1R and IL-1 β in EAE mood alterations.

RESULTS

In the first year, we studied anxious-depressive like behavior in EAE mice, avoiding the interference of motor disability. To this aim, we evaluated behavior phenotypes in preclinical EAE mice and observed increased levels of anxiety and depression. Next we evaluated the behavioral response in EAE mice showing normal motility during the symptomatic phase. Surprisingly, mood disturbances are observed in both presymptomatic and symptomatic phases of EAE despite the absence of motor impairment and fatigue.

To investigate the role of IL-1 β in EAE-induced mood disturbances, we chronically inhibited IL-1 β -signalling by delivery of IL-1ra (receptor antagonist) in mouse brains.

During the second year, we focused on the neurobiological mechanism that links IL-1 β to the EAE-behavioral phenotype. We observed a rescue of CB1R response in IL1ra-treated EAE mice by electrophysiological recordings of striatal neurons, as demonstrated by the HU210 mediated reduction of sIPSC frequency. Conversely, HU210 application to EAE-vehicle slices failed to alter GABA transmission. Finally, we tested the hypothesis that defective dopamine (DA) transmission could be responsible of a decrease of responsivity of CB1R in EAE. To this aim, we evaluated striatal CB1R function in mice treated with amphetamine, to favour DA release from nerve terminals. HU210 caused indeed the expected inhibition of sIPSC frequency in striatal brain slices obtained from these mice, confirming the rescue to CB1R function by dopaminergic system stimulation in EAE.

CONCLUSIONS

The results obtained indicate that anxiety and depression observed in EAE mice are linked to IL-1 β -dependent inhibition of striatal CB1R function, in turn mediated by the interference of this pro-inflammatory cytokine with the dopaminergic system. Our results point to CB1R as involved in EAE-associated mood disturbances and establish a previously unrecognized link between mood alterations and IL-1 β -dependent inflammatory synaptic dysfunction in EAE and, possibly, MS.

Collectively, our data contribute to clarify the synaptic basis of mood disturbances in EAE and, possibly, MS. Understanding the neurobiological bases of anxiety and depression-like behavior in EAE mice is of crucial importance to optimize the treatment of mood disturbances in MS and possibly in other neuroinflammatory diseases. Targeting the endocannabinoid system may be thus considered as a valid therapeutic tool for the treatment of both psychiatric and motor symptoms in MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Mandolesi G, Musella A, Gentile A, Grasselli G, Haji N, Sepman H, Fresegna D, Bullitta S, De Vito F, Musumeci G, Di Sanza C, Strata P, Centonze D. Interleukin-1 β alters glutamate transmission at purkinje cell synapses in a mouse model of multiples sclerosis. *J Neurosci*. 2013 Jul 17;33(29):12105-21.

Fresegna D, Gentile A, Federici M, Musella A, Rizzo FR, Sepman H, Bullitta S, De Vito F, Haji N, Rossi S, Mercuri NB, Usiello A, Mandolesi G, Centonze D. Dopaminergic dysfunction is associated with IL-1 β -dependent mood alterations in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis*. 2015 Feb.; 74:347-58.

Gentile A, De Vito F, Fresegna D, Musella A, Buttari F, Bullitta S, Mandolesi G, Centonze D. Exploring the role of microglia in mood disorders associated with experimental multiple sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 2015 Jun 25;9:243.

Fresegna D*, Sacchetti L, Gentile A, Musella A, Hajo N, Sepman H, De Vito F, Bullitta S, Mandolesi G, Centonze D. Interleukin-1 β -mediated mood disorders in a mouse model of multiple sclerosis. 45th European Brain and Behaviour Society Meeting - Munich (Germany) 6-9 September 2013.

Fresegna D*, Sacchetti, Gentile A, Musella A, Hajo N, Sepman H, De Vito F, Bullitta S, Mandolesi G, Centonze D. Interleukin-1 β -mediated mood disorders in a mouse model of multiple sclerosis" XV National Congress of Italian Society of Neuroscience - Rome (Italy) 3-5 October 2013.

Fresegna D, Gentile A. Experimental multiple sclerosis causes mood alterations by interacting with the dopaminergic system. XVI Multiple Sclerosis Lab Retreat – Sinalunga (SI; Italy) 16-17 January 2014 [invited lectureships].

Fresegna D, Gentile A, Musella A, De Vito F, Bullitta S, Sepman H, Haji N, Mandolesi G, Centonze D. Potential involvement of interleukin-1beta in mood alterations in a mouse model of multiple sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM – Rome (Italy) 28-29 May 2014.

Gentile A, Fresegna D, Musella A, Bullitta S, Sepman H, De Vito F, Rizzo F, Federici M, Mandolesi G, Centonze D. Experimental multiple sclerosis causes mood alterations by interacting with the dopaminergic system. 9th FENS Forum of Neuroscience- Milan (Italy) 5-9 July 2014.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 41.500 €

Miriam Mattosco

Università Imperial College London, UK

MENTORE: **Paolo Muraro**

Rilevanza clinica del diverso effetto della terapia con anticorpo monoclonale anti alfa-4 integrina sulla mobilizzazione di cellule staminali ematopoietiche in pazienti con sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'anticorpo monoclonale anti α -4 integrina natalizumab (Tysabri®) è utilizzato correntemente nella pratica clinica per il trattamento delle forme particolarmente attive di sclerosi multipla (SM). Durante la fase pilota dello studio, finanziata da FISM con una Borsa di addestramento e con un Progetto di ricerca (Bando 2010), abbiamo evidenziato un aumento significativo del numero di cellule staminali e progenitori ematopoietici (HSPC) circolanti durante la terapia con natalizumab ed anche osservato che le HSPC circolanti sono prevalentemente in stato quiescente del ciclo cellulare nei pazienti trattati, dato in favore dell'ipotesi originariamente formulata di un'attiva mobilizzazione di HSPC dal midollo osseo indotta dal farmaco. Abbiamo, inoltre, dimostrato, in modo totalmente innovativo, una risposta mobilizzatoria estremamente variabile tra i pazienti con SM trattati; la mancata mobilizzazione di HSPC è risultata associata al fallimento di risposta al trattamento ed alla prevalenza di cellule B *naïve* nella circolazione periferica, mentre la mobilizzazione significativa di progenitori ematopoietici ha dimostrato associazione con remissione clinica e con un aumento più significativo di linfociti B di memoria ed anche di cellule T CD8 regolatorie, suggerendo un'implicazione delle HSPC mobilizzate e delle popolazioni cellulari mature ridistribuite in periferia nell'attività anti-infiammatoria del farmaco.

La seconda fase del progetto finanziato, qui illustrata, si proponeva di validare l'incremento di HSPC indotto da natalizumab nella circolazione periferica dei pazienti con SM e di accertarne la rilevanza funzionale. Lo studio prevedeva il reclutamento di un nuovo gruppo di pazienti con SM in trattamento con natalizumab per permettere la valutazione dell'effettiva associazione tra risposta mobilizzatoria staminale e risposta clinica al trattamento e della funzionalità del-

le HSPC in termini di capacità di proliferazione, differenziazione ed interazione con il compartimento linfocitario maturo nella circolazione periferica.

RISULTATI

Abbiamo reclutato *de novo* 16 pazienti con SM al momento d'inizio del trattamento con natalizumab e valutato la frequenza delle HSPC circolanti tramite citofluorimetria (FACS) a quattro colori durante il primo anno di terapia, nonché l'associazione tra conta di HSPC dopo due infusioni di natalizumab e risposta clinica a sei mesi di trattamento. Abbiamo quindi valutato il potenziale clonogenico delle HSPC indotte da natalizumab tramite "Colony Forming Units (CFU) assay" in un sottogruppo di dieci pazienti ed in cinque controlli sani. Inoltre, abbiamo utilizzato FACS multicolore per la conta e l'ulteriore caratterizzazione delle popolazioni linfocitarie T e B circolanti, riservando un'attenzione particolare alle cellule B di transizione (considerate regolatorie), alle cellule T CD8 regolatorie, ed alle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC), che si pensa esercitino un'azione immuno-modulante in corso di patologie autoimmuni. Il pannello citofluorimetrico multicolore per tipizzazione delle MDSC è stato definito grazie alla collaborazione con la Dr.ssa Giovanna Borsellino (Fondazione Santa Lucia, Roma). In fine, abbiamo disegnato un modello *in vitro* per studiare l'effetto di concentrazioni crescenti di HSPC sulla proporzione delle popolazioni linfocitarie T e B mature in co-culture di HSPC e cellule mononucleate (MNC) isolate da sangue cordonale (cinque campioni, dono della Banca del cordone dell'Ospedale Careggi di Firenze grazie alla collaborazione con il Dott. Saccardi e la Dott.ssa Mazzanti). L'analisi dei dati ottenuti ha dimostrato ancora una volta la significativa variabilità della rispostata mobilizzatoria di HSPC nei 16 pazienti con SM reclutati in questo

studio di validazione. Per aumentare il potere statistico dell'analisi abbiamo integrato i nuovi dati di conta di HSPC (n=16) con quelli derivati dallo studio della popolazione prospettica pilota (n=12) e valutato l'associazione tra variazione del numero di HSPC dopo due infusioni di natalizumab e risposta clinica al trattamento dopo sei mesi. Così facendo abbiamo osservato uno stato di remissione clinica, definita in base all'eliminazione completa di *enhancement* dimostrata dalla risonanza magnetica effettuata dopo sei mesi di trattamento e dall'assenza di esacerbazioni cliniche durante l'equivalente periodo di osservazione, nei pazienti con SM che avevano dimostrato una significativa mobilitazione di HSPC ("Mobilizer", n=17) e persistenza dell'attività di malattia nei pazienti con scarsa o nulla risposta mobilitatoria dopo due infusioni di natalizumab ("Non-Mobilizer"; n=10). Lo studio di CFU ha rivelato una efficiente capacità di espansione e differenziazione *ex vivo* delle HSPC indotte da natalizumab, persino più significativa dell'equivalente capacità clonogenica delle HSPC isolate dalla circolazione periferica di donatori sani. Abbiamo osservato, nuovamente, un aumento significativo delle proporzioni di cellule B totali e T CD8 regolatorie e dimostrato per la prima volta un incremento delle B di transizione durante trattamento con natalizumab, con significatività statistica più alta nel gruppo dei "Mobilizer". La proporzione delle MDSC aumenta

anche' essa durante il trattamento, in maniera direttamente proporzionale all'incremento del numero di HSPC in periferia. In fine, la proporzione di cellule B di transizione ed il livello di IL-10 anti-infiammatoria aumentano significativamente *in vitro* in presenza di concentrazioni crescenti di HSPC in co-culture di HSPC e MNC, mentre il livello di IL-6, pro-infiammatoria, diminuisce significativamente.

CONCLUSIONI

Lo studio qui presentato evidenzia come l'aumento del numero di HSPC circolanti indotto da natalizumab, che abbiamo precedentemente dimostrato essere conseguenza di un vero e proprio processo di mobilitazione dal midollo osseo, ha notevole rilevanza funzionale, immunologica e clinica. La confermata variabile risposta mobilitatoria tra pazienti trattati e l'associazione tra mobilitazione significativa di HSPC e remissione dell'attività clinica di malattia, anch'essa validata nel corso di questa fase del progetto, sono in supporto dell'utilizzo della conta delle HSPC circolanti come marcatore biologico precoce della risposta clinica al trattamento con natalizumab. Inoltre, l'aumento significativo delle popolazioni linfocitarie B di transizione e T regolatorie e l'incremento percentuale delle MDSC, correlati alla mobilitazione significativa di HSPC, confermano un' implicazione di tali popolazioni cellulari nell'attività anti-infiammatoria del farmaco.

Clinical relevance of the differential increase of circulating haematopoietic stem cells following therapeutic alpha 4-integrin blockade in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The anti α -4 integrin monoclonal antibody natalizumab (Tysabri®) is broadly used in clinical practice for treatment of active multiple sclerosis (MS). Results from a pilot phase of this study, funded by FISM with a training fellowship and project grant (Bando 2010), showed a variable increase of circulating haematopoietic stem and progenitor cells (HSPC), whose quiescent cell cycle status supported the hypothesis of true mobilization from the bone marrow (BM), in natalizumab-treated MS patients; HSPC-mobilization failure associated with lack of treatment response and with predominance of naïve B cells subsets in the periphery whereas

HSPC mobilization associated with remission of disease activity and with a more significant increase in total circulating B-cells and CD8-T regulatory cells than in all other lymphocyte subsets as well as with predominance of memory B cells. These evidences suggested that HSPC mobilization status associates with a specific naïve/memory circulating B cells profile which, together with an increased proportion of CD8 regulatory T cells, may have an implication in the anti-inflammatory effect of natalizumab, yet the overall biological significance of the observed drug-induced effects remained unclear. This research wanted to ascertain the mobilization from the BM and the functional relevance of the in-

creased number of circulating HSPC induced by natalizumab in people with MS.

In details we aimed at validating in a group of newly recruited MS patients the association of HSPC-mobilization with clinical remission and at further establishing whether HSPC enumeration is a useful bio-marker to predict clinical response to natalizumab, as also suggested by the preliminary results. We also aimed at elucidating whether natalizumab-mobilized circulating HSPC actively proliferate and differentiate into lymphocytes progenitors and colonies and whether and how they interact with the mature lymphocytes compartment in the peripheral circulation.

RESULTS

We recruited 16 new MS patients who started natalizumab between December 2012 and December 2014 and followed them up for the first year of treatment. We performed HSPC enumeration by four-colours flow-cytometry on all the samples collected and looked again at the correlation between HSPC number and clinical data; we also performed Colony Forming Units (CFU) assay on the samples collected from a subgroup of the newly recruited MS patients (ten) to evaluate the differentiation and expansion potential of natalizumab-induced HSPC as compared to healthy donors (HD; four subjects). Multi-colours flow-cytometry was performed to enumerate and further characterized circulating T and B lymphocytes subsets, with special focus on the transitional B and the regulatory T cells groups, and to evaluate the proportion of Myloid Derived Suppressor Cells (MDSC), which are thought to exert an immune-modulatory effect in autoimmune setting, in the periphery of the natalizumab-treated MS patients recruited in the study. Moreover, an *in vitro* model was designed for studying the immune-modulatory effect of increasing concentrations of HSPC on the distribution of lymphocytes subsets in HSPC/mononuclear cells (MNC) co-cultures started from Cord Blood (CB) samples (five). The significantly variable HSPC mobilization response, which we reported among the previously analyzed MS population (29 patients, of which 12 prospectively followed and 17 studied cross-sectionally), was confirmed in the newly recruited validation cohort of 16 prospectively followed MS patients. We pooled together the new HSPC enumeration data with the ones obtained from the prospective cohort

previously recruited to make a group of 28 prospectively followed patients and performed correlation analysis between HSPC mobilization status and clinical and demographic characteristics of the MS population; by doing so we observed remission of inflammatory disease activity, as demonstrated by suppression of enhancement revealed at the MRI scan performed after 6 months of treatment and by absence of relapses during the time of observation, in those natalizumab-treated patients who showed significant HSPC mobilization (“Mobilizer”; n=17) whereas disease activity persisted in the patients who demonstrated a less significant or null HSPC mobilization (“Non-Mobilizer”; n=10; HSPC count variation was not available for one patient).

Natalizumab-induced circulating HSPC, previously described to be predominantly quiescent, therefore suggesting recent mobilization from the BM, were capable of differentiation *ex vivo* and even at higher rate than HSPC isolated from the periphery of HD. The proportions of CD8 and CD4 T cells significantly increase during natalizumab treatment, with effector-memory T cells increasing and prevailing over naive cells. The proportions of B cells, Transitional/regulatory B cells and CD103+ CD8+ regulatory T cells persistently increased in natalizumab-treated MS patients, more significantly in the “Mobilizer” group. Also, the number of MDSC increased significantly during natalizumab treatment, in a directly proportionate manner to the HSPC counts. Finally, B transitional/regulatory cells proportions increased significantly *in vitro* upon addition of increasing concentrations of HSPC in co-cultures, while the concentration of the pro-inflammatory cytokine IL-6 consistently decreased in co-cultures supernatant and the level of the anti-inflammatory molecule IL-10 significantly increased.

CONCLUSIONS

These data provide new evidence that natalizumab-induced circulating HSPC increase, previously proven to be the result of true mobilization from the BM, has clinical and immunological relevance. HSPC mobilization associated with clinical remission; thus, HSPC blood counts could represent an early biomarker of responsiveness to natalizumab. The increased proportion of circulating B and T regulatory lymphocytes and of MDSC, also associating to the peripheral HSPC increase, may contribute to the treatment’s mode of action.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Mattoscio M., Nicholas R, Sormani MP, Malik O, Lee JS, Waldman AD, Dazzi F and Muraro PA. Hematopoietic mobilization: Potential biomarker of response to natalizumab in multiple sclerosis, *Neurology*, April 7, 2015, vol. 84(14): 1473-1482.

Mattoscio M, Mazzanti B, Nicholas R, Malik O, Saccardi R and Muraro P. Natalizumab-induced circulating hematopoietic stem cells (HSC) have higher expansion capacity in MS patients who show significantly increased HSC count. *Multiple Sclerosis Journal*, September 2014; 20 (1 Suppl): 1 – 534 (abstract). Selected for poster presentation at the 2014ECTRIMS conference.

Mattoscio M, Mazzanti B, Dal Pozzo S, Nicholas R, Malik O, Saccardi R and Muraro P. Natalizumab-induced circulating hematopoietic stem cells of MS patients have intact progenitor capacity and expand at high efficiency rate. *Neurology*, April 8, 2014 vol. 82 no. 10 SupplementP1.196 (abstract). Selected for poster presentation at the 66th Annual Meeting of the American Academy of Neurology.

Mattoscio M, Nicholas R, Malik O and Muraro P. Circulating Hematopoietic Stem Cell Numbers during Natalizumab Treatment in Patients with Multiple Sclerosis: Association with Clinical and MRI. *Neurology*, 80: P05.194 Selected for poster presentation at the 65th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, February 14, 2013.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2012 per un periodo di 2 anni e per l'ammontare di 78.000 €

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni (prorogato di 2 anni) e l'ammontare di 67.268 €

Claudia Minici

Dipartimento di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Fondazione Centro San Raffaele, Milano

MENTORE: **Massimo Degano**

Caratterizzazione strutturale e biochimica della peptidil-arginina deiminasi 2, una proteina coinvolta nella destabilizzazione della membrana mielinica nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La progressione della sclerosi multipla è il risultato della sensibilizzazione di cellule T verso proteine della mielina e della neurodegenerazione che causa modificazioni metaboliche della guaina mielinica facilitandone la degradazione. La citrullinazione è una modificazione post-traslazionale irreversibile che provoca la deiminazione dei residui di arginina a citrullina. Nella mielina isolata da persone con sclerosi multipla si osserva un aumento di proteine citrullinate. La perdita di cariche positive a seguito della citrullinazione causa sia un'interazione meno efficiente con i lipidi, rendendo la mielina più suscettibile ad attacchi proteolitici, sia l'aggravamento della risposta immunitaria verso le proteine modificate. La citrullinazione avviene solamente attraverso una reazione chimica catalizzata dall'enzima peptidil-arginina deiminasi (PAD). PAD2 è l'isoforma principale nel cervello e la sua espressione aumenta nella mielina di pazienti con sclerosi multipla. Tutte queste osservazioni identificano PAD2 come un interessante obiettivo terapeutico.

Il progetto proposto aveva lo scopo di ottenere la struttura tridimensionale e la caratterizzazione biochimica dell'enzima PAD2. Questi dati forniscono le basi molecolari dell'interazione della proteina con i substrati e il meccanismo d'azione, offrendo un ottimo punto di partenza per il disegno di inibitori dell'enzima che rappresenteranno un nuovo approccio per contrastare l'insorgenza di un'alterazione importante nella mielina di pazienti con sclerosi multipla.

RISULTATI

Il progetto prevedeva la caratterizzazione dell'isoforma umana e murina di PAD2, per confrontare i parametri enzimatici e validare i modelli murini per

lo studio del ruolo di PAD2 nello sviluppo della sclerosi multipla. Studi strutturali e biochimici richiedono la disponibilità di milligrammi di proteina stabile e biologicamente attiva; esperimenti preliminari hanno mostrato che entrambe le isoforme di PAD2 sono espresse a bassi livelli in un sistema di espressione batterico.

Un intenso processo di ottimizzazione ha permesso l'identificazione delle procedure di espressione e purificazione necessarie per ottenere un elevato livello di purezza della proteina. L'isoforma umana, tuttavia, era espressa in quantità inadeguate per i successivi studi, per cui si è deciso di proseguire solo con lo studio dell'isoforma murina che, invece, era ottenuta in quantità idonee. Studi iniziali sull'attività enzimatica hanno mostrato che l'enzima è instabile e soggetto a rapida degradazione. Ciò ha influito negativamente sia sul processo di cristallizzazione, in quanto non si è identificata nessuna condizione iniziale promettente, sia sulla caratterizzazione enzimatica, poiché l'enzima diventava rapidamente inattivo.

Un modello della struttura di PAD2, calcolato partendo dalla similitudine con l'isoforma PAD4, di cui è nota la struttura, è stato usato per valutare possibili modificazioni del costrutto iniziale per aumentare la stabilità della proteina. Il modello mostra che la porzione N-terminale è coinvolta nella dimerizzazione dell'enzima; PAD2 presenta otto amminoacidi aggiuntivi rispetto a PAD4, oltre ad un *tag* di sei istidine, aggiunto per aiutare la purificazione. Questa porzione aggiuntiva potrebbe diminuire la stabilità del dimero, per cui è stato ingegnerizzato un costrutto che codifica per una proteina priva degli otto amminoacidi aggiuntivi e con il *tag* spostato in posizione C-terminale. Inoltre è stato adottato un sistema di espressione euca-

riotico e un nuovo protocollo di purificazione, ottenendo un aumento dell'attività enzimatica di 1,5 volte e l'assenza di degradazione. La proteina mostrava ancora propensione all'aggregazione e non si sono ottenuti cristalli; l'aumentata stabilità a breve termine, tuttavia, consente di iniziare la caratterizzazione funzionale.

CONCLUSIONI

Notevoli miglioramenti nell'espressione e purificazione di PAD2 hanno consentito di ottenere milligrammi di proteina pura e attiva, adatta all'ese-

cuzione degli studi funzionali. La formazione di aggregati rimane un ostacolo da superare per ottenere materiale adeguato per la cristallizzazione. Il modello di PAD2 mostra una superficie meno polare rispetto a PAD4 che potrebbe spiegare la maggior tendenza all'aggregazione; per ottenere una proteina più stabile alcuni amminoacidi non polari esposti in superficie saranno mutati con residui polari, mimando PAD4. In parallelo il modello per omologia sarà validato attraverso la caratterizzazione enzimatica di mutanti specifici e utilizzato per il disegno di inibitori dell'attività di PAD2.

Structural and biochemical characterization of peptidyl-arginine deiminase 2, a protein that contributes to the destabilization of the myelin membrane in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The pathogenesis of multiple sclerosis is the result of the sensitization of T-cells towards myelin proteins and the neurodegeneration that provokes metabolic changes in the myelin constituents. Citrullination is an irreversible post-translational modification that deiminates arginyl residues to obtain citrulline and ammonia. In myelin isolated from patients with multiple sclerosis an increased amount of citrullinated proteins is found. The loss of positive charges, resulting from citrullination, leads both to an impaired interaction with lipids, ultimately making the myelin vulnerable to proteolytic attacks, and to the worsening of immune response towards the altered proteins. Citrullination occurs only as a result of the activity of the enzyme peptidyl-arginine deiminase (PAD). PAD2 is the principal isoform in the brain, and its expression is increased in myelin of patients with multiple sclerosis. All these observations identify PAD2 as an interesting therapeutic target.

The project aimed at obtaining the three-dimensional structure of PAD2 and performing a biochemical characterization of the enzyme. The data allow to clarify the molecular basis of the protein interaction with its substrates and the mechanism of action of the enzyme, providing a valuable template for a rational design of inhibitors of the enzymatic activity. This will represent a new approach to hinder a relevant impairment that occurs in multiple sclerosis.

RESULTS

In the proposal I planned to characterize both the murine and the human isoform of PAD2 to compare the enzymatic parameters and to validate the available animal models for the studies of PAD2 involvement in multiple sclerosis. Structural and biochemical studies of enzymes demand milligram quantities of stable and biologically active protein. Pilot experiments showed that both the human and the murine PAD2 were expressed in a simple bacteria expression system, albeit at low levels. An extensive optimization identified the expression and purification procedures required to obtain a high degree of purity. Despite that, the resulting human isoform was too lowly expressed for further studies, and following stages focused on the murine PAD2, which gave adequate yields. Preliminary activity studies revealed that the enzyme was affected by low stability and rapid degradation. These events negatively affected both the crystallization process, as no lead conditions were identified, and the enzymatic characterization, because a rapid loss of activity occurred.

A PAD2 three-dimensional model was calculated on the basis of 50% similarity with another isoform, PAD4, whose structure is available, and used to evaluate possible modifications aimed at increasing protein stability. The model shows that N-terminal portion is involved in the dimerization of the enzyme; in that position, PAD2 shows eight addi-

tional amino acids, compared to PAD4, and a hexahistidine tag, added for purification purposes. These features could decrease dimer stability, so, a construct with a deletion of the N-terminal extension of mPAD2 was engineered, and the tag was moved at the C-terminus. In addition, a new expression system, exploiting an eukaryotic system, and a new purification protocol were adopted for this truncated enzyme. Altogether, this led to a 1.5 times increase of the short-term enzymatic activity and absence of protein degradation. The protein still showed propensity to aggregation, resulting in no crystal formation; nevertheless, the increased stability allows to carry out the enzymatic characterization.

CONCLUSIONS

Remarkable improvements in the expression and purification of PAD2 enzyme allowed to obtain milligram of pure and active enzyme, suitable for functional studies. The protein aggregation remains an issue to be addressed in order to have adequate material for crystallization. PAD2 model shows a less polar surface compared to PAD4, explaining the major propensity to aggregation; in the attempt to obtain a more stable enzyme some non-polar amino acids of the surface will be mutated into polar ones, mimicking PAD4 structure. In parallel, the homology model obtained will be validated through the enzymatic characterization of specific mutants and be exploited for the design of PAD2 inhibitors.

Simone Patergnani

Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Università di Ferrara, Ferrara

MENTORE: **Paolo Pinton**

Analisi della funzionalità e dell'energetica mitocondriale come caratteristiche principali del differenziamento oligodendrocitarie

PREMESSE E OBIETTIVI

I mitocondri ricoprono molteplici funzioni nella cellula, e disfunzioni a loro carico sono cruciali in diverse patologie, tra cui tumori e neurodegenerazione. Alterazioni della fisiologia mitocondriale sono correlate alla SM. A livello degli oligodendrociti, mutazioni delle funzioni mitocondriali determinano un incorretto differenziamento.

Il progetto si è proposto di comprendere il ruolo dei mitocondri nel differenziamento degli oligodendrociti durante condizioni infiammatorie, identificando nuovi target terapeutici.

In particolare, abbiamo cercato di definire i punti comuni tra energetica mitocondriale, citochine proinfiammatorie, differenziamento delle cellule progenitrici degli oligodendrociti (OPCs) e morte cellulare, in modo da analizzare la loro partecipazione nella SM e verificare se possono essere target per farmaci innovativi. Il progetto è diviso in una serie di sotto-argomenti: i) dettagliata analisi della fisiologia mitocondriale durante il differenziamento degli OPCs; ii) identificazione di partner molecolari attivati in seguito all'esposizione e al blocco del differenziamento indotto da TNF α e iii) identificazione dei meccanismi che determinano alterazione del metabolismo mitocondriale in seguito all'esposizione con TNF α .

I risultati ottenuti permetteranno di capire il meccanismo che sta alla base del differenziamento degli oligodendrociti, le sue relazioni con il TNF α e forniranno le basi per lo sviluppo di nuovi farmaci modulanti la fisiologia mitocondriale. Inoltre, si potranno identificare possibili interazioni tra infiammazione e alterazione di funzionalità di specifiche proteine coinvolte nell'omeostasi mitocondriale.

RISULTATI

Grazie ai risultati ottenuti mediante precedenti finanziamenti, siamo riusciti ad effettuare una detta-

gliata caratterizzazione della fisiologia mitocondriale durante il differenziamento oligodendrocitario in seguito ad esposizione con TNF α . I risultati ottenuti sono stati pubblicati sulla rivista '*Cell Death & Differentiation*'. Identificando un legame tra mitocondri e differenziamento degli OPCs, abbiamo iniziato una serie di trattamenti farmacologici a livello del compartimento mitocondriale. Come risultato, la fisiologia mitocondriale è migliorata; viceversa, non abbiamo riscontrato alcun miglioramento riguardo alla produzione di mielina in seguito ad esposizione combinata del farmaco e TNF α . Vie alternative che regolano l'asse mitocondri-TNF α -differenziamento degli OPCs sembrerebbero, quindi, coinvolte nella SM. Tra le numerose vie molecolari analizzate, abbiamo riscontrato una profonda alterazione della via correlata alle chinasi AMPK-MTOR. Queste chinasi sono fondamentali per la crescita cellulare e la percezione dei nutrienti. Inoltre, sono i principali attori che orchestrano il processo autofagico.

L'autofagia è un processo cellulare conservato e controllato geneticamente che avviene in risposta a mancanza di nutrienti. Prevede il reclutamento di vescicole a doppia membrana che avvolgono porzioni del citosol/organelli, che successivamente andranno a fondersi con i lisosomi, in cui il materiale sequestrato verrà degradato e riciclato. Inoltre, in determinate circostanze, l'autofagia è anche conosciuta come "morte cellulare autofagica" ed è risultato essere un determinante in diverse patologie associate all'uomo, neurodegenerazione inclusa. Abbiamo, quindi, iniziato a studiare l'autofagia durante l'esposizione con TNF α . Quello che è risultato è un forte innesco dell'autofagia e una perdita progressiva della quantità di mielina. Da notare che esistono anche particolari sottoforme di autofagia, che degradano selettivamente diversi compartimenti cellulari. In particolare, importante è la mitofagia, processo catabolico responsabile della

rimozione di mitocondri danneggiati. La mancata rimozione di tali mitocondri alterati, porterebbe danni secondari ai mitocondri vicini e alla cellula stessa. Dimostrando un'implicazione della via autofagica e della fisiologia mitocondriale in seguito ad esposizione con TNF α , siamo andati ad investigare un possibile coinvolgimento della mitofagia. Come risultato, il TNF α determina un forte innesco della mitofagia. Questo eccesso di auto-mitofagia potrebbe riflettere un alterato controllo di qualità e quantità dei mitocondri, motivo per cui si innescherebbe un danno prolungato ai mitocondri confinanti e all'intera cellula.

CONCLUSIONI

Di fatto, l'autofagia sembrerebbe ricoprire un ruolo chiave nella SM. Nonostante non fosse indicato nel

progetto, abbiamo provato a modulare negativamente l'autofagia con una serie di farmaci specifici. I risultati ottenuti sono promettenti: inibendo l'autofagia, siamo riusciti a ripristinare sia il metabolismo mitocondriale che la formazione di mielina in seguito ad esposizione con TNF α . Per questo motivo siamo fiduciosi di scoprire in maniera dettagliata quale sia il ruolo effettivo dell'autofagia durante il differenziamento degli OPCs, definire le proteine coinvolte in questo meccanismo molecolare e identificare specifici approcci terapeutici e target basati sulla modulazione della via autofagica. Di fondamentale importanza è il fatto che molti farmaci modulanti l'autofagia sono già impiegati in trial clinici per la cura di diverse patologie associate all'uomo, presentano pochi effetti collaterali e attraversano efficacemente la barriera ematoencefalica.

Quality and dynamics of mitochondria as key features of oligodendrocytes differentiation

INTRODUCTION AND AIMS

Mitochondria are fundamental for multiple functions within the cells and their dysfunctions are implicated in many diseases, such as cancer and neurodegeneration. Recently, many mitochondrial alterations were found to be related to MS. The project is focused on the comprehension of the role played by mitochondria in oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) differentiation during inflammation conditions, revealing novel putative targets for therapeutic strategies. In particular, the research addresses the identification of an axis between mitochondrial bioenergetics, pro-inflammatory cytokines, OPCs differentiation and cell death, in order to define how these events participate in MS dynamics and may be targeted by novel drugs.

This project is divided into the following complementary subtopics: i) a deeper characterization of mitochondrial physiology during OPCs differentiation; ii) identification of the molecular partner involved in TNF α induced impairment of differentiation and iii) molecular mechanism driving the mitochondrial recycling during TNF α induced block of differentiation. The results obtained will help to further understand the mechanism of OPCs differentiation and its relations with TNF α , providing new therapeutic

approaches based on drugs modulating mitochondrial functions. Furthermore, it will be possible to reveal putative interactions between the inflammatory process and a deregulation of specific proteins involved in mitochondrial physiology.

RESULTS

As shown in my previous reports, laboratory activities were focused to perform the OPCs isolation, culture and differentiation and a series of myelination assays.

Starting from this remarks and thanks to the results obtained by Prof. Pinton's research group in his previous FISM grant and by the results obtained with my previous training Fellowship, we performed a deeper characterization of mitochondrial physiology during OPCs differentiation. The results obtained are promising and have been reported in a work published in the journal '*Cell, Death & Differentiation*'.

Having found a direct link between mitochondrial metabolism and OPCs differentiation, we started to perform pharmacological intervention at mitochondrial level. We screened several compounds. Most of them are able to recover the mitochondrial impairment, but not the MBP expression in both con-

trol condition and together TNF α .

These findings suggest that other molecular pathways orchestrate the mitochondrial impairment promoted by TNF α with consequent inhibition of OPC differentiation.

Thus, we analyzed possible mitochondrial molecular partners involved in TNF α induced impairment of differentiation. We found a deep alteration of the activity of MTOR and AMPK kinase.

Of relevance, MTOR and AMPK are not only important for cell growth and nutrient sensing, but they are also critical regulator of the autophagic machinery.

Autophagy is a conserved and genetically controlled cellular response to nutrient deprivation and stress. This catabolic process is characterized by formation of double-membrane vesicles in the cytosol that engulf organelles/cytoplasm, and then fuse with the lysosomes, in which the contents are degraded and recycled. Under certain circumstances, autophagy is also considered a form of non apoptotic cell death termed "autophagic cell death". Recently, evidences highlight the importance of autophagy in various human diseases, including neurodegeneration. Thus, we started to investigate about the contribution of autophagic process during TNF α induced block of differentiation. We found that treatment with TNF α induced a progressive increase of autophagic levels and a parallel loss of MBP. Autophagy is not only a global cellular mechanism. Selective forms of autophagy were addressed, in particular an autophagy related mitochondrial quality control, called mitophagy. This mechanism provides to eliminate

damage mitochondria that otherwise could be toxic. Having found a deep involvement of mitochondrial compartment and autophagy during the block of differentiation, we investigated about the possible role of mitophagy.

Our results indicate that the mitochondrial damage promoted by TNF α triggers mitophagy. This significant augment in mitophagy may reflect in an uncorrected control of quality and quantity of mitochondria, which may promote damage to neighboring mitochondria and the entire cell.

CONCLUSIONS

Autophagy may play pivotal role during the progressive loss of myelin during MS. Even if the tasks reported in this Research Project did not include a possible pharmacological intervention against the autophagy, we started to screen a series of compounds modulating the autophagic activity.

Results so obtained are very promising. We found that treatments with different autophagic inhibitors increase in MBP-expression levels after TNF α exposition accompanied by a recover in the affected mitochondrial metabolism. Hence, we are confident to underline the role of autophagy during OPCs differentiation, define which protein are involved in this process and identify specific therapeutic approaches based on drugs that modulate the autophagic machinery. Of relevance, most of these agents are already employed for the treatment of human disorders and were reported to cross efficiently the blood-brain barrier and do not possess side effects.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Patergnani S, Pinton P Mitophagy and mitochondrial balance. *Methods Mol Biol* 1241:181-94, 2015.

Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S, Duszy ski J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-associated Membranes (MAMs): Composition, Molecular Mechanisms and Physiopathological Implications. *Antioxid Redox Signal* 22(12):995-1019, 2015.

Rimessi A, Bezzerri V, Patergnani S, Marchi S, Cabrini G, Pinton P (2015) Mitochondrial Ca²⁺-dependent NLRP3 activation exacerbates the Pseudomonas aeruginosa-driven inflammatory response in cystic fibrosis. *Nat Commun* 6:6201.

Carelli V, Musumeci O, Caporali L, Zanna C, La Morgia C, Del Dotto V, Porcelli AM, Rugolo M, Valentino ML, Iommarini L, Maresca A, Barboni P, Carbonelli M, Trombetta C, Valente EM, Patergnani S, Giorgi C, Pinton P, Rizzo G, Tonon C, Lodi R, Avoni P, Liguori R, Baruzzi A, Toscano A, Zeviani M Syndromic parkinsonism and dementia associated with OPA1 missense mutations. *Ann Neurol* 78(1):21-38, 2015.

Rimessi A, Patergnani S, Bonora M, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondrial Ca²⁺ remodeling is a prime factor in oncogenic behavior. *Front Oncol* 5:143, 2015.

Patergnani S, Giorgi C, Maniero S, Missiroli S, Maniscalco P, Bononi I, Martini F, Cavallesco G, Tognon M, Pinton P The endoplasmic reticulum mitochondrial calcium cross talk is downregulated in malignant pleural mesothelioma cells and plays a critical role in apoptosis inhibition. *Oncotarget* 6(27):23427-49, 2015.

Patergnani S, Missiroli S, Marchi S, Giorgi C. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Microenvironment: Targeting Autophagic and Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Front Oncol*. Jul 27;5:173, 2015.

Marchi S, Corricelli M, Trapani E, Bravi L, Pittaro A, Delle Monache S, Ferroni L, Patergnani S, Missiroli S, Goitre L, Trabalzini L, Rimessi A, Giorgi C, Zavan B, Cassoni P, Dejana E, Retta SF, Pinton P .Defective autophagy is a key feature of cerebral cavernous malformations. *EMBO Mol Med* 7(11):1403-17, 2015.

Patergnani S, Bonora M, Marchi S, Giorgi, C, Pinton P. Quality and dynamics of mitochondria as key features of oligodendrocytes differentiation” –Congresso FISM, Maggio 2013 Roma, Italy.

Patergnani S, Bonora M, Giorgi, C, Pinton P. Quality and dynamics of mitochondria as key features of oligodendrocytes differentiation Congresso FISM Maggio 2014, Roma, Italy.

Patergnani S, Bonora M, Giorgi, C, Pinton P. Targeting autophagy as new therapeutic approach to recover myelinization in Multiple Sclerosis model. Congresso FISM Maggio 2015, Roma, Italy.

Patergnani S, Bonora M, Giorgi, C, Pinton P. Targeting autophagy as new therapeutic approach to recover myelinization in Multiple Sclerosis model.–Convegno ABCD -The Biennal Congress of Association of Cell Biology and Differentiation. Settembre 2015, Bologna, Italy.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2012 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 50.000 €



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 2015

QUALITÀ DELLA VITA

Raffaella Molteni

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Milano

Comorbidità tra sclerosi multipla e depressione: ruolo degli eventi avversi in età precoce

Progetto di ricerca € 25.000 - 1 anno

Alessandra Solari

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, U.O. Neuroepidemiologia, Milano

Affrontare la transizione (ManTra) - una risorsa per le persone con sclerosi multipla secondariamente progressiva. Fase 1: costruzione della risorsa

Progetto di ricerca € 77.227,50 - 2 anni

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

Clara Ballerini

Università degli Studi Firenze, Dipartimento Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Firenze

Valutazione dell'impatto delle terapie immunomodulatorie su pazienti RRMS tramite lo studio del repertorio TCR con tecniche di next generation sequencing

Progetto di ricerca € 155.000 - 2 anni

Piero Del Boccio

Università degli Studi "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara, Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Centro Scienze dell'Invecchiamento (Ce.S.I.), Chieti

Studio del metaboloma delle lacrime per la ricerca di nuovi biomarcatori molecolari nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 29.500 - 1 anno

Annalisa Barla

Università degli Studi di Genova, DIBRIS - Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi, Genova

Rilevamento precoce di progressione della sclerosi multipla basato su scale cliniche e misure auto-riportate (DETECT-MS PRO)

Progetto di ricerca € 110.000 - 2 anni

Lucilla Nobbio

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

Marcatori biologici per monitorare demielinizzazione e rimielinizzazione

Progetto di ricerca € 111.350 - 2 anni

Antonio Bertolotto

Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri Ottolenghi (NICO), AOU San Luigi Gonzaga, Centro di Riferimento Regionale per la Sclerosi Multipla, Orbassano (TO)

Studio del ruolo diagnostico e prognostico degli anticorpi anti-canale del potassio KIR4.1 nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 72.000 - 1 anno

Girolama Alessandra Marfia

Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Roma

Motor Unit Number Estimation (MUNE): nuova potenziale misura elettrofisiologica di neurodegenerazione infiammatoria della sostanza grigia spinale nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

Stefano Angiari

Università degli Studi di Verona, Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Verona

Studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'interazione tra neutrofili ed endotelio vascolare nei vasi sanguigni del sistema nervoso centrale durante l'encefalomielite sperimentale autoimmune

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Vincenzo Barnaba

Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Roma

Ruolo delle risposte di cellule T CD8+ a epitopi associati a cellule T apoptotiche nella sclerosi multipla e nella encefalomielite sperimentale autoimmune

Progetto di ricerca € 222.000 - 2 anni

Francesca Boscia

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

Studio del ruolo dell'isoforma dello scambiatore Na⁺/Ca²⁺ NCX3 nella rimielinizzazione del sistema nervoso centrale

Progetto di ricerca € 98.000 - 1 anno

Valerio Chiurchiù

IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

Plasticità e polarizzazione dei macrofagi e della microglia come target nella sclerosi multipla: "in/ex vivo" veritas

Progetto di ricerca € 55.000 - 1 anno

Sandra D'Alfonso

Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze della Salute, Novara

Studio genomico e funzionale del ruolo del "pathway" di TNFSF14-TNFRSF14 nella suscettibilità alla sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 185.000 - 2 anni

Silvia Dusi

Università degli Studi di Verona, Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Verona

Visualizzazione e caratterizzazione delle dinamiche intraparenchimali dei neutrofili nel sistema nervoso centrale durante l'encefalomielite autoimmune sperimentale

Borsa di ricerca € 49.000 - 2 anni

Vittorio Gallo

Children's Research Institute, Center for Neuroscience Research, Washington DC

Meccanismi di segnalazione implicati in genesi e rigenerazione di oligodendrociti mediati da Sox17

Borsa di ricerca € 184.260 - 3 anni

Paolo Muraro

Imperial College London, Department of Medicine, Division of Brain Sciences, London

Risposte T cellulari citotossiche dirette contro il virus di Epstein-Barr e crossreattive con proteine della mielina in persone con la SM

Progetto di ricerca € 210.000 - 2 anni

Marco Patrone

Fondazione Centro San Raffaele, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Milano

Caratterizzazione molecolare di varianti protettive e di rischio nella sclerosi multipla dell'antigene nucleare 2 del virus di Epstein-Barr

Progetto di ricerca € 56.000 - 1 anno

Roberta Rizzo

Università degli Studi di Ferrara, Dipartimento di Scienze Mediche, Ferrara

Attivazione e differenziamento delle cellule Natural killer in risposta alle infezioni da Herpesvirus nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 82.000 - 2 anni

Cristina Rivellini

Fondazione Centro San Raffaele, INSPE-Istituto di Neurologia sperimentale, Ospedale San Raffaele, Milano

Ruolo di Jab1 nella patogenesi della sclerosi multipla progressiva

Borsa di ricerca € 50.000 - 2 anni

Francesca Santoni de Sio

Fondazione Centro San Raffaele, Dipartimento di medicina rigenerativa, cellule staminali e terapia genica, Milano

Studio del ruolo delle proteine KRAB (Kruppel-Associated Box) nella deregolazione epigenetica del sistema immunitario adattativo nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 100.000 - 1 anno

Michele Zampieri

Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Roma

Associazione tra i livelli di 5-idrossimetilcitosina e la poli (ADP-ribosilazione) nel cervello di individui affetti da SM

Progetto di ricerca € 29.000 - 1 anno

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

Roberta Brambilla

University of Miami, The Miami Project To Cure Paralysis, Miller School of Medicine, Miami, USA

Meccanismi molecolari della funzione protettiva del TNFR2 oligodendrogliale: un nuovo target terapeutico nelle patologie neuroimmuni

Progetto di ricerca € 161.000 - 3 anni

Francesco Cucca

Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) del CNR, Dipartimento di Biomedicina del CNR, Monserrato (CA)

Elucidazione del ruolo di BAFF e della sua via immuno-patogenetica nell'insorgenza della sclerosi multipla e utilizzo dell'avanzamento in conoscenza per lo sviluppo di terapie più mirate ed efficaci

Progetto di ricerca € 240.000 - 3 anni

Massimo Degano

Fondazione Centro San Raffaele, Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Milano

Struttura cristallografica e caratterizzazione funzionale del recettore GPR17, un bersaglio innovativo per terapia di rimielinizzazione nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 150.000 - 1 anno

Rosetta Pedotti

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Neuroimmunologia, Milano

Il ruolo della prokineticina 2 nella autoimmunità del sistema nervoso centrale e neurodegenerazione

Progetto di ricerca € 128.250 - 2 anni

Antonio Ucelli

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

Targeting terapeutico dell'attività e dell'espressione di REST allo scopo di ridurre la neurodegenerazione ed i deficit sinaptici in modelli di EAE cronica

Progetto di ricerca € 235.000 - 3 anni

Flavia Valtorta

Università Vita-Salute San Raffaele, Laboratorio di Neuropsicofarmacologia, Milano

Meccanismi omeostatici presinaptici nel corso di trattamento cronico di neuroni con citochine proinfiammatorie ed in corso di encefalite allergica sperimentale

Progetto di ricerca € 210.000 - 2 anni

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 mielinizzazione nel sistema nervoso

Borsa di ricerca senior € 100.715 - 2 anni

Roberto Furlan

Istituto 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, 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 β 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



COMITATO SCIENTIFICO
FISM 2015

FISM SCIENTIFIC COMMITTEE 2015

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

Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgico Specialistiche, Sezione di Scienze Neurologiche, Psichiatriche e Psicologiche, Università degli Studi di Ferrara - FERRARA

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 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 Zarin

Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Fondazione Italiana Sclerosi Multipla – GENOVA

LISTA DEGLI AUTORI / LIST OF THE AUTHORS

Bonzano Laura	32	Gianni Costanza	35
Brambilla Roberta	66	Guarnieri Fabrizia Claudia	69
Butti Erica	88	Mameli Giuseppe	57
Cantoni Claudia	91	Mattoscio Miriam	97
Cattaneo Antonino	72	Minici Claudia	101
Cencioni Maria Teresa	55	Ottoboni Linda	52
Chiurchiù Valerio	81	Pantano Patrizia	19
Cossarizza Andrea	42	Patergnani Simone	104
Cucca Francesco	49	Pedotti Rosetta	85
Deriu Franca	16	Rocca Maria Assunta	25
Di Filippo Massimiliano	60	Rossi Barbara	78
di Ioia Maria	45	Sandrini Giorgio	22
Dusi Silvia	75	Tavazzi Eleonora	29
Farina Cinthia	63	Verderio Claudia	38
Freseigna Diego	94		

Finito di stampare nel mese di maggio 2016
da Arti Grafiche Bicidi srl - Genova

