

2018



# LA RICERCA SULLA SCLEROSI MULTIPLA

Finanziata dalla Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

**50**  
**SCLE  
ROSI  
MULT  
IPLA**  
ONLUS  
associazione  
italiana

DA 50 ANNI  
LA SM NON CI FERMA

un mondo  
libero dalla SM

AISM. INSIEME, UNA CONQUISTA DOPO L'ALTRA



**2018**

# **LA RICERCA SULLA SCLEROSI MULTIPLA**

Finanziata dalla  
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

Associazione Italiana Sclerosi Multipla Onlus

A cura di:

**Roberta Guglielmino**

Area Ricerca Scientifica AISM-FISM

Progetto e coordinamento editoriale:

**Manuela Capelli**

Area Comunicazione e Ufficio Stampa AISM

Copyright FISM 2018

Publicato e distribuito da:

Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Onlus

Via Operai, 40 - 16149 Genova

Tutti i diritti sono riservati.

È vietata la riproduzione con qualsiasi mezzo, anche se parziale,  
senza il permesso scritto dell'editore.

Progetto grafico e impaginazione:

**Francesca Massa**

Finito di stampare nel mese di maggio 2018

da Arti Grafiche Bicidi srl - Genova

ISBN 978-88-7148-137-1

# Introduzione

«Si comincia a vedere una luce in fondo al tunnel», diceva Rita Levi Montalcini.

Oggi, a cinquant'anni esatti dalla nascita di AISM nel 1968, possiamo dire di essere già fuori dal tunnel. Abbiamo luce nuova sulla comprensione dei meccanismi patogenetici della malattia, sulla diagnosi e sul monitoraggio del suo andamento, come documentano anche gli studi pubblicati in questo Compendio della ricerca finanziata da FISM e conclusa nel 2017.

Dal 1996 a oggi sono stati approvati e introdotti 16 trattamenti, destinati ad aumentare. Senza dimenticare i trattamenti efficaci per curare sintomi di grande impatto come dolore e spasticità.

Abbiamo poi una neuro-riabilitazione che, grazie alla ricerca come quella qui rappresentata, sta dimostrando di avere un reale impatto sull'andamento di malattia e sulla qualità di vita di tante persone.

Possiamo dirlo con convinzione, anche con un pizzico di orgoglio: come esplicita il titolo della Giornata Mondiale 2018 della SM, "research is bringing us closer to ending MS".

Insieme, in 50 anni, abbiamo dato vita a un percorso di libertà da questa malattia e costruito un mondo diverso, dove avere la sclerosi multipla non è più una condanna senza appello né cura, ma una condizione a partire dalla quale si può comunque vivere una vita all'altezza delle proprie aspirazioni.

Le persone con sclerosi multipla sono sempre state, infatti, il punto di partenza e di arrivo di ogni progetto che AISM sceglie di finanziare.

È vero anche che la ricerca sta avvicinandoci, sta unendo sempre di più chi ogni giorno fa ricerca con le persone che ogni giorno affrontano la sclerosi multipla e ricercatori e persone con SM di nazioni diverse sono sempre più uniti con un unico obiettivo.

In questi cammini di "connessione multipla", nelle nazioni e fra nazioni diverse, che riguardano ricercatori, le Associazioni nazionali riunite nella nostra Federazione, persone con sclerosi multipla, istituzioni, industrie, operatori socio-sanitari, volontari e società civile, la nostra Associazione di persone con SM, nei suoi 50 anni di vita, ha certamente giocato un ruolo significativo, mettendosi a disposizione per costruire tutti insieme una rete di collaborazioni che stanno facendo la differenza.

E continueremo insieme a fare la differenza, anche grazie ai 5 milioni di euro, due in più dell'anno precedente, che AISM con la sua Fondazione FISM ha scelto di mettere a disposizione del Bando 2018 e a quelli ulteriori che verranno investiti per sostenere importanti progetti speciali quali quelli sulle cellule staminali neurali, sulla neuroriabilitazione, sulla qualità di vita, sul progetto del Registro Italiano Sclerosi Multipla.

Una sfida dopo l'altra, un 'goal' dopo l'altro, nella nostra storia condivisa abbiamo ottenuto risultati importanti: sono 65 i milioni di euro investiti da AISM con la sua Fondazione FISM nella ricerca negli ultimi 10 anni; negli ultimi 30 anni abbiamo finanziato 525 progetti di ricerca e 115 borse di studio; dal 2007 ad oggi sono 1.169 le pubblicazioni totali su riviste con impact factor.

Ma soprattutto abbiamo costruito una squadra coesa, in costante crescita: dei 409 ricercatori finanziati dal 1987 a oggi il 76% continua a fare ricerca di eccellenza sulla sclerosi multipla. Si tratta di una vera e propria "scuola" autorevole e riconosciuta a livello internazionale.

Altri due dati ci preme evidenziare: i 30 studi qui presentati e conclusi hanno generato 50 collaborazioni tra ricercatori di gruppi differenti. A dimostrazione che la ricerca migliore è quella che si fa insieme e che, per questo, attiva e coinvolge reti sempre più ampie e moltiplica una comunicazione scientifica che raggiunge tutti.

Ora è il tempo, per tutti noi, di raccogliere e vincere le sfide che ancora restano in campo, per trovare finalmente risposte efficaci per chi ha forme progressive di SM, per bloccare la neurodegenerazione prima che diventi irreversibile, per favorire il recupero del danno neuronale accumulato.

E lo potremo fare insieme, con un'alleanza forte, costruendo con il nostro lavoro e i nostri progetti le condizioni di una vera e propria scienza della collaborazione e della sostenibilità collettiva dove tutti investono e nessuno spende senza ritorni, dove tutti vinciamo e nessuno perde, dove si misura il reale impatto della ricerca per migliorare la vita delle persone, la società e la stessa scienza. Una sfida che richiede attenzione, risorse e collaborazione da parte di tutti.

**Mario Alberto Battaglia**  
*Presidente FISM*

**Paola Zaratini**  
*Direttore Ricerca Scientifica FISM*

# Introduction

«There is light at the end of the tunnel». *Rita Levi Montalcini*

Today, exactly 50 years since the founding of AISM in 1968, we can say that we have reached the light at the end of that tunnel.

We have ever-expanding knowledge on the pathogenic mechanisms of the disease, and on disease diagnosis and monitoring. The Compendium of Research completed in 2017 supported by FISM provides testimony to these scientific accomplishments.

From 1996 until today, 16 new pharmacological treatments for MS have been approved and this number will only increase in the near future. Moreover effective treatments of some of the symptoms of the disease, including pain and spasticity, have been developed with a significant impact on the person with MS.

Today neurorehabilitation, thanks to innovative research, some of which is presented here, has succeeded in having a tangible impact on disease activity and on the quality of life of so many people living with MS.

“Research is bringing us closer to ending MS” is the theme of this year’s World MS Day and we can proudly say that we are an important part of this movement.

Together over these last 50 years we have created a new reality, where people with MS are no longer condemned to facing their illness without hope and without treatment. Instead, today people with MS can achieve all of their dreams and ambitions.

For every single project that AISM has chosen to fund over the years, people with MS have been the starting point as well as the final objective.

Research is, in fact, bringing MS scientists closer to people who live with MS every day, from across the world, towards a common goal.

Throughout this 50-year journey, within countries and between countries, with scientists, the Multiple Sclerosis International Federation uniting all of the national MS organizations, people with MS, public institutions, industry, healthcare professionals, volunteers and the greater public, our MS Society has had a significant role in creating a network of contributors who are truly making a difference.

This year AISM is dedicating five million euro, an increase of 2 million more than last year, to the 2018 call for research proposals, a sum that is fundamental in pursuing our joint effort to continue to make a difference. Further funds will be invested in support of important special projects on neuronal stem cells, neurorehabilitation, quality of life and the Italian Multiple Sclerosis Registry.

One challenge after another, one goal after another, our history together has been chronicled by exceptional results: AISM has invested 65 million euro in research in the last 10 years. In the last 30 years, 525 research projects and 115 fellowships have been funded. Since 2007, 1,169 scientific papers have been published in peer-reviewed journals.

Perhaps most importantly, we have created a long-standing team in continual expansion. Of 409 researchers who received funding since 1987, 76% maintain their dedication to excellence in MS research. Our commitment to fighting MS through research is internationally recognized.

One other important accomplishment worthy of mentioning is that the 30 research projects that are presented here have resulted in 50 various collaborations between scientists from different groups. This is evidence that the best research is based on a collaborative spirit and not an individual endeavor.

We have come to a point in time where together we must face and triumph over the final challenges of MS that are waiting to be tackled: to find answers for those with progressive MS, to block neurodegeneration before there is no turning back and to repair accumulated CNS damage.

We can accomplish these goals together with an increasingly strong alliance, and by a united commitment to pursuing science based on collaboration, sustainability and shared responsibility, where everyone has a stake in the potential results of combing efforts, where the impact of research on improving the lives of people with MS, society in general and science itself, is a shared priority. This is a challenge that requires not only resources, but also the contribution and dedication of each of us.

**Mario Alberto Battaglia**  
*Chairman of the Italian  
Multiple Sclerosis Foundation*

**Paola Zaratini**  
*Director of Scientific Research for  
the Italian Multiple Sclerosis Foundation*

## LISTA DEGLI AUTORI / LIST OF THE AUTHORS

Angiari Stefano	<b>88</b>	Molinari Enrico	<b>21</b>
Baldari Cosima	<b>71</b>	Molteni Raffaella	<b>24</b>
Bertolotto Antonio	<b>30, 38</b>	Ostacoli Luca	<b>18</b>
Cecconi Francesco	<b>65</b>	Patergnani Simone	<b>105</b>
Centonze Diego	<b>12</b>	Patrone Marco	<b>51</b>
Chiurchiù Valerio	<b>82</b>	Piccio Laura	<b>75</b>
Coccia Eliana Maria	<b>54</b>	Piras Eleonora	<b>44</b>
D'Amico Roberto	<b>14</b>	Sambucci Manolo	<b>68</b>
Degano Massimo	<b>94</b>	Santoni de Sio Francesca	<b>62</b>
Del Boccio Piero	<b>41</b>	Severa Martina	<b>91</b>
Didonna Alessandro	<b>102</b>	Smania Nicola	<b>27</b>
Dusi Silvia	<b>79</b>	Taveggia Carla	<b>97</b>
Furlan Roberto	<b>86</b>	Zampieri Michele	<b>59</b>
Liguori Maria	<b>34</b>		
Luchetti Sabina	<b>100</b>		
Mechelli Rosella	<b>48</b>		



**INTRODUZIONE / INTRODUCTION**

<b>Mario A. Battaglia</b> <b>Paola Zarin</b>	<b>3</b>
-------------------------------------------------	----------

<b>LISTA DEGLI AUTORI in ordine alfabetico / LIST OF THE AUTHORS alphabetically</b>	<b>5</b>
-------------------------------------------------------------------------------------	----------

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

<b>Diego Centonze</b>	<b>12</b>
-----------------------	-----------

Promuovere la plasticità neuronale per contrastare la progressione clinica nella SM:  
studio pilota per valutare sicurezza ed efficacia del D-Aspartato  
Enhancing brain plasticity to contrast clinical progression in MS:  
a pilot study assessing the safety and efficacy of D-Aspartate

<b>Roberto D'Amico</b>	<b>14</b>
------------------------	-----------

Migliorare la sintesi dei risultati della ricerca sui trattamenti nella SM per il loro utilizzo  
nella pratica clinica e per influenzare l'agenda della ricerca futura  
Enhancing the way the research results are summarized for evidence-based use  
of treatments in MS and influencing the future research agenda

<b>Luca Ostacoli</b>	<b>18</b>
----------------------	-----------

L'efficacia di un intervento Mindfulness-based per i sintomi depressivi e la qualità della vita  
nei pazienti con SM e i loro caregivers. Uno studio clinico randomizzato controllato  
The efficacy of a Mindfulness Based Intervention for depressive symptoms and quality of life  
in patients with MS and their caregivers. A randomized controlled clinical trial

<b>Enrico Molinari</b>	<b>21</b>
------------------------	-----------

Migliorare la Qualità di Vita di persone con SM e dei loro familiari tramite  
un intervento di Mindfulness e Telemedicina  
Improving the Quality of Life of people with MS and their caregivers with  
a Telemedicine Mindfulness-Based Intervention

<b>Raffaella Molteni</b>	<b>24</b>
--------------------------	-----------

Comorbidità tra SM e depressione: ruolo degli eventi avversi in età precoce  
MS and depression comorbidity: deciphering the role of early-life adversities

<b>Nicola Smania</b>	<b>27</b>
----------------------	-----------

Effetti di un trattamento intensivo robot assistito sul recupero funzionale della mano e sull'autonomia  
nelle ADL in persone con SM: studio randomizzato controllato in singolo cieco  
Effects of high-intensity robot-assisted training in hand function recovery and ADL independence  
in individuals with MS: a randomized controlled single-blinded trial

**DIAGNOSI E MONITRAGGIO DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE**

<b>Antonio Bertolotto</b>	<b>30</b>
---------------------------	-----------

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  
A bio-bank and a laboratory devoted to the collection and supply of biological  
samples of PPMS, the replication and sharing of data, and the validation of biological methods

<b>Maria Liguori</b>	<b>34</b>
----------------------	-----------

Il deterioramento cognitivo nella sclerosi multipla pediatrica: ricerca di biomarcatori predittivi di progressione  
Cognitive impairment in pediatric multiple sclerosis: searching for biomarkers predictive of progression

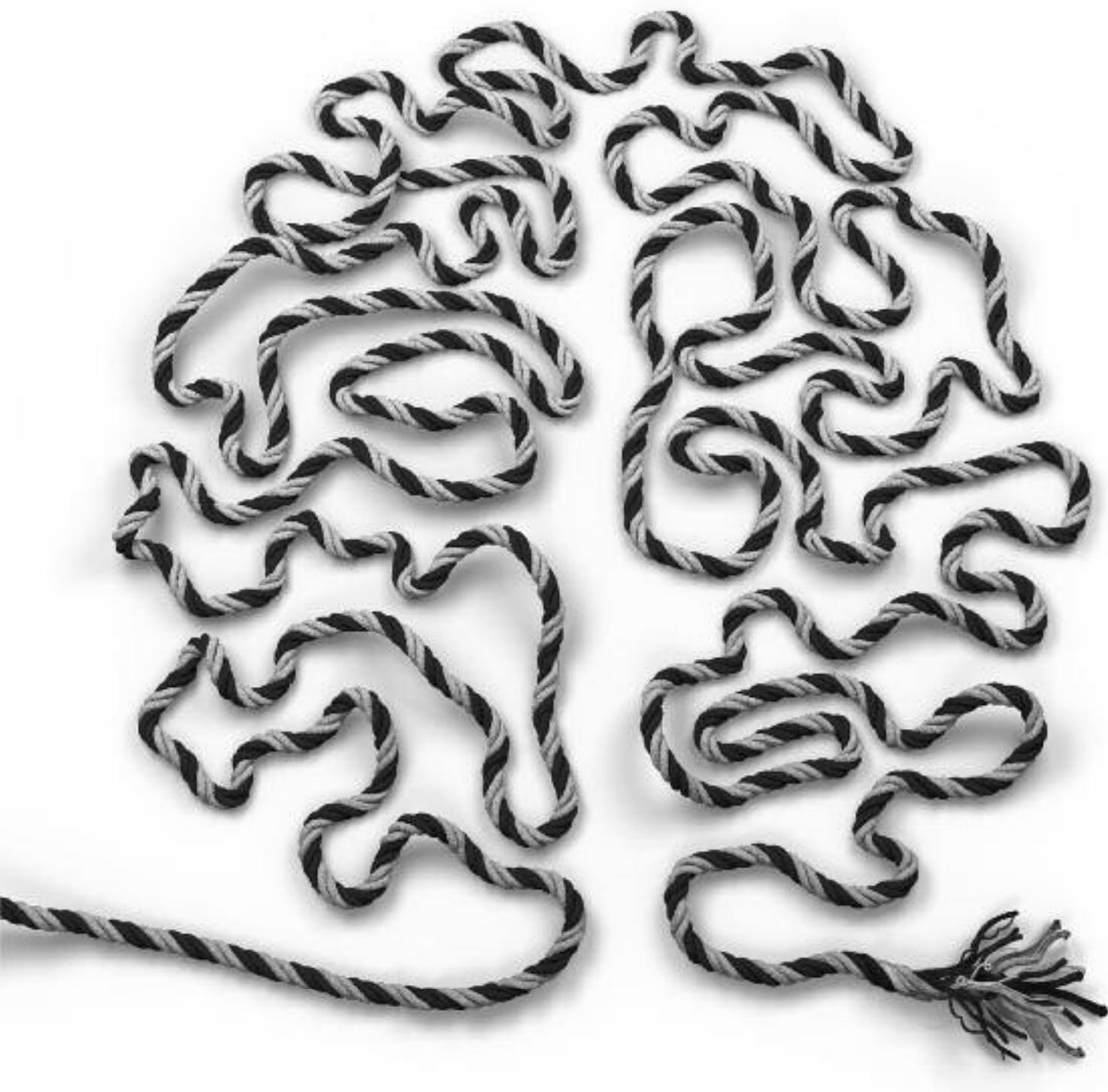
<b>Antonio Bertolotto</b>	<b>38</b>
---------------------------	-----------

Studio del ruolo diagnostico e prognostico degli anticorpi anti-canale del potassio KIR4.1 nella SM  
Evaluation of the diagnostic and prognostic role of anti-potassium channel KIR4.1 antibodies in MS

<b>Piero Del Boccio</b>	<b>41</b>
Studio del metaboloma delle lacrime per la ricerca di nuovi biomarcatori molecolari nella SM Study of tears metabolome for the research of new molecular biomarkers in MS	
<b>Eleonora Piras</b>	<b>44</b>
Monitoraggio dei linfociti T CD8+ EBV-specifici in malattie demielinizzanti in pazienti sottoposti a trials con nuovi farmaci antivirali Monitoring EBV-specific CD8+ T cells in demyelinating diseases in patients undergoing trials with novel antiviral drugs	
<b>PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / PATHOGENESIS AND RISK FACTORS</b>	
<b>Rosella Mechelli</b>	<b>48</b>
Approccio di tipo "interattoma-candidato" nella SM: dall'interazione geni-ambiente alla caccia dei bersagli terapeutici A candidate-interactome approach in multiple sclerosis: from gene-environment interplay to therapeutic target hunting	
<b>Marco Patrone</b>	<b>51</b>
Caratterizzazione molecolare di varianti protettive e di rischio nella SM dell'antigene nucleare 2 del virus di Epstein-Barr Molecular characterization of the protective and risk variants of Epstein-Barr nuclear antigen 2 in MS	
<b>Eliana Marina Coccia</b>	<b>54</b>
Analisi dell'INTERFEROME nella SM: alla ricerca di vie di segnale alterate Analysis of INTERFEROME in MS: searching for dysregulated pathways	
<b>Michele Zampieri</b>	<b>59</b>
Associazione tra i livelli di 5-idrossimetilcitosina e la poli (ADP-ribosilazione) nel cervello di individui affetti da SM Link between 5-hydroxymethylcytosine levels and poly(ADP-ribosyl)ation in human MS brain	
<b>Francesca Santoni de Sio</b>	<b>62</b>
Studio del ruolo delle proteine KRAB (Kruppel-Associated Box) nella deregolazione epigenetica del sistema immunitario adattativo nella SM Assessing the role of Kruppel-Associated Box (KRAB) proteins in the epigenetic deregulation of adaptive immune system in MS	
<b>Francesco Cecconi</b>	<b>65</b>
Ruolo della proteina adattatrice pro-autofagica AMBRA1 nel destino dei linfociti T e suo coinvolgimento nella SM Role of the autophagic adapter protein AMBRA1 in T cell fate decision and its implication in MS	
<b>Manolo Sambucci</b>	<b>68</b>
Linfociti T regolatori Foxp3+: Subsets differenti possono spiegare la mancanza di immunoregolazione nella SM? Foxp3+ Regulatory T Lymphocytes: different subsets can explain lack of immunoregulation in MS?	
<b>Cosima Baldari</b>	<b>71</b>
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 Astrocyte deficiency of the Shc family member Rai attenuates myelin-reactive Th17 cell-dependent neurodegeneration in EAE: a mechanistic study of astrocyte-T cell interactions	
<b>Laura Piccio</b>	<b>75</b>
Ruolo immunomodulatorio della adiponectina in modelli sperimentali della SM Immunomodulatory role of adiponectin in experimental models of MS	

<b>Silvia Dusi</b>	<b>79</b>
Visualizzazione e caratterizzazione delle dinamiche intraparenchimali dei neutrofili nel sistema nervoso centrale durante l'encefalomielite autoimmune sperimentale Visualization and characterization of neutrophil intraparenchymal dynamics in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis	
<b>Valerio Chiurchiù</b>	<b>82</b>
Plasticità e polarizzazione dei macrofagi e della microglia come target nella SM: "in/ex vivo" veritas Targeting macrophage/microglia plasticity and polarization in MS: "in/ex vivo" veritas	
 <b>VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS</b>	
<b>Roberto Furlan</b>	<b>86</b>
Microvescicole microgliali come vettore terapeutico in neuroinfiammazione Microglial microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation	
<b>Stefano Angiari</b>	<b>88</b>
Studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'interazione tra neutrofili ed endotelio vascolare nei vasi sanguigni del sistema nervoso centrale durante l'encefalomielite autoimmune Identification of the molecular mechanisms controlling neutrophil-endothelial interactions in central nervous system venules during experimental autoimmune encephalomyelitis	
<b>Martina Severa</b>	<b>91</b>
Un anticorpo coniugato all'Interferone-beta specifico per le cellule B: una nuova immuno-citochina per il trattamento della SM An interferon- $\beta$ -conjugated antibody targeted to B cells: a novel immunocytokine for the treatment of MS	
<b>Massimo Degano</b>	<b>94</b>
Struttura cristallografica e caratterizzazione funzionale del recettore GPR17, un bersaglio innovativo per terapia di rimielinizzazione nella SM Crystal structure and functional characterization of the GPR17 receptor, a novel pharmacological target for remyelination therapy in MS	
<b>Carla Taveggia</b>	<b>97</b>
Modulazione dell'attività enzimatica di TACE nella mielinizzazione e nella rimielinizzazione del SNC Modulating TACE activity in CNS myelination and remyelination	
<b>Sabina Luchetti</b>	<b>100</b>
Neurosteroidi come agenti neuroprotettivi, pro-mielinizzanti e anti-infiammatori nella SM Neurosteroids as neuroprotective, pro-myelinating and anti-inflammatory agents in MS	
<b>Alessandro Didonna</b>	<b>102</b>
MicroRNA come nuovi strumenti per modulare il processo di mielinizzazione nel sistema nervoso miRNAs as novel potential tools to modulate myelination in the CNS	
<b>Simone Patergnani</b>	<b>105</b>
Utilizzo di agenti modulanti il processo autofagico come nuova terapia per ripristinare la mielinizzazione in modelli di SM Targeting autophagy as new therapeutic approach to recover myelinization in MS model	
 <b>PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM / FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS</b> 2017, 2016	 <b>109-122</b>
 <b>COMITATO SCIENTIFICO FISM / FISM SCIENTIFIC COMMITTEE</b> 2017, 2016	 <b>123-127</b>





# **NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA**

*NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE*

## Diego Centonze

Università Tor Vergata, Roma & IRCCS Neuromed, Pozzilli (IS)

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Francesco Mori, Carolina Nicoletti, Fabrizia Monteleone, Girolama A. Marfia**

# Promuovere la plasticità neuronale per contrastare la progressione clinica nella SM: studio pilota per valutare sicurezza ed efficacia del D-Aspartato

### PREMESSE E OBIETTIVI

Il tessuto nervoso ha la capacità di potenziare o depotenziare la trasmissione inter-neuronale a livello sinaptico in modo duraturo. In corso di sclerosi multipla (SM), l'aumento dell'efficienza della trasmissione sinaptica, fenomeno chiamato long-term potentiation (LTP), può compensare la perdita degli impulsi sinaptici sui neuroni sopravvissuti e ripristinare così la loro funzione. I meccanismi di LTP possono essere favoriti dal trattamento riabilitativo oppure da agenti farmacologici, quali il D-aspartato (D-asp, che agisce sul principale recettore della plasticità sinaptica, il recettore NMDA) e possono essere misurati in modo non-invasivo e indolore tramite la stimolazione magnetica transcranica (TMS).

Nel nostro studio abbiamo pertanto voluto valutare la capacità del D-asp di favorire la plasticità sinaptica corticale nei pazienti con SM progressiva (SMP), nei quali la perdita di LTP è stata associata allo sviluppo di disabilità irreversibile.

### RISULTATI

In 20 pazienti con SMP, abbiamo misurato la trasmissione sinaptica eccitatoria e inibitoria usando dei protocolli di TMS ad hoc (SICI, ICF, SICF) e anche la LTP attraverso la stimolazione a theta burst. Abbiamo inoltre misurato la disabilità motoria mediante le scale EDSS e MSFC e la fatica mediante la FSS. I pazienti hanno ricevuto una singola

dose orale di D-Asp al dosaggio di 2.660 mg per 4 settimane. Abbiamo eseguito:

- I. misure TMS all'inizio dello studio, a 2, 4 e 8 settimane dopo il trattamento;
- II. misure cliniche all'inizio, e fino a 12 e 24 settimane dopo il trattamento;
- III. monitoraggio degli eventuali eventi avversi all'inizio, a 2, 4 e 8 settimane dopo il trattamento.

Non abbiamo registrato alcun effetto avverso del D-asp. La trasmissione sinaptica mediata dal neurotrasmettitore GABA-A (SICI) non era modificata dal trattamento con il D-asp. La trasmissione glutammatergica (ICF e SICF), al contrario, aumentava significativamente a 2 e 4 settimane dopo l'inizio del trattamento. Anche la LTP aumentava dopo trattamento con D-asp e la fatica, misurata con la scala FSS, migliorava significativamente. Le scale EDSS e MSFC non subivano modifiche.

### CONCLUSIONI

Il D-Asp si è dimostrato sicuro ed efficace nel ripristinare la plasticità cerebrale danneggiata nei pazienti con SMP. Poiché la LTP si ritiene che interferisca con la progressione della disabilità limitando l'espressione clinica del danno cerebrale, il D-asp potrebbe rappresentare una opzione terapeutica interessante nei pazienti con forme progressive di SM. Maggiori dati sono necessari per valutare gli effetti a lungo termine del D-asp sulla progressione della disabilità.

## Enhancing brain plasticity to contrast clinical progression in MS: a pilot study assessing the safety and efficacy of D-Aspartate

### INTRODUCTION AND AIMS

The central nervous system has the ability to potentiate or de-potentiate inter-neuronal communication, by altering synaptic transmission in a long-lasting manner. In patients with MS, the increase of synaptic transmission efficiency, a phenomenon called long-term potentiation (LTP), is able to compensate the loss of synaptic inputs onto surviving neurons, and to restore their excitability. LTP induction can be favored by rehabilitation treatments or by pharmacological agents like D-aspartate (D-asp, which acts on the main receptor of synaptic plasticity, the NMDA receptor), and can be measured non-invasively through transcranial magnetic stimulation (TMS).

In our study, we wanted therefore to evaluate the ability of D-asp in favoring cortical synaptic plasticity in patients with progressive forms of MS (PMS), in which LTP loss has been associated with the development of irreversible disability.

### RESULTS

In 20 PMS patients we measured synaptic transmission by using paired-pulse TMS protocols (SICI, ICF, SICF), LTP by using intermittent theta burst stimulation (iTBS), clinical disability by means of EDSS and MSFC measurements and fatigue by FSS. Patients re-

ceived single oral daily dose of D-Asp 2660 mg for 4 weeks. We performed:

- I. TMS measurements at baseline, 2, 4, 8 weeks after treatment;
- II. clinical measurements at baseline, 12, 24 weeks after treatment;
- III. adverse events and safety monitoring at baseline 2, 4, 8 weeks after treatment.

No adverse reactions were reported. SICI mediated by GABA-A receptors did not change after D-Asp. ICF and SICF mediated by glutamatergic transmission significantly increased between 2 and 4 weeks. LTP significantly increased after 2 weeks of D-Asp, and FSS scores significantly improved after 4 weeks of treatment. EDSS and MSFC did not show any significant changes.

### CONCLUSIONS

D-Asp proved safe and effective in restoring brain plasticity in PMS. As LTP is supposed to slow disease progression by limiting the clinical expression of brain damage, D-Asp could be a therapeutic option in progressive forms of MS. More data are needed to test long-term D-Asp treatment on progression of disability in MS.

---

### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Centonze D. Role of the autophagic adapter protein AMBRA1 in T cell fate decision and its implication in MS. XLVIII Congresso SIN, Napoli 14-17 ottobre 2017

Centonze D. Role of the autophagic adapter protein AMBRA1 in T cell fate decision and its implication in MS. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma 29-30-31 maggio 2017

---

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM Speciale Progressive 2014 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di € 71.350

Research project funded by FISM Special Call Progressive 2014 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 71,350

---

## Roberto D'Amico

Dipartimento di Medicina Diagnostica, Clinica e di Sanità Pubblica,  
Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Cinzia Del Giovane, Roberto Vicini**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Graziella Filippini, Irene Tramacere**, Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

## Migliorare la sintesi dei risultati della ricerca sui trattamenti nella sclerosi multipla per il loro utilizzo nella pratica clinica e per influenzare l'agenda della ricerca futura

### PREMESSE E OBIETTIVI

Il crescente numero di farmaci disponibili per la sclerosi multipla (SM) e il relativo aumento del numero di pubblicazioni scientifiche rende difficile la scelta su quale farmaco sia più efficace utilizzare tra tutti quelli disponibili.

Lo strumento che la comunità scientifica ha sviluppato per venire incontro all'esigenza, proveniente sia dai neurologi sia dalle persone con SM, di avere sintesi affidabili delle evidenze scientifiche è stato quello delle revisioni sistematiche (RS). Tale metodologia, tuttavia riesce a riassumere solo l'informazione sull'efficacia e la sicurezza di un solo confronto alla volta. Nell'ultimo decennio si è affermato un nuovo metodo per la sintesi dell'informazione: la Network Meta-Analysis (NMA).

Essa permette di riassumere tutta l'informazione proveniente dalle pubblicazioni scientifiche e di ottenere stime dirette e indirette dell'efficacia e sicurezza comparativa di tutti gli interventi, anche di quelli che non sono stati direttamente confrontati. L'utilizzo di tale metodologia, nonostante la sua complessità, è aumentato nel tempo così come è cresciuta la consapevolezza dell'utilità di questi risultati tra i neurologi, tra le persone con SM e/o tra i loro familiari. Lo scopo principale del progetto è di migliorare le modalità con cui i risultati delle NMA vengono riportati nella letteratura medica al fine di renderli più comprensibili e fruibili a chi deve prendere decisioni sanitarie o a chi si occupa di divulgazione scientifica. Il progetto si basa su una indagine nazionale rivolta a differenti tipologie di persone interessate a conoscere i risultati della ricerca clinica sulla SM.

### RISULTATI

L'indagine ha utilizzato questionari sviluppati da 4 panel di utilizzatori, ovvero le persone con SM e/o loro familiari, i neurologi, i giornalisti scientifici e i decisori sanitari. I questionari sono stati sviluppati a partire dai risultati di una NMA che ha valutato l'efficacia e la sicurezza di farmaci per la SM di tipo recidivante-remittente. L'esito considerato è stato la proporzione di persone con SM che sviluppano nuove ricadute nei primi 24 mesi dall'inizio del trattamento. Il progetto ha previsto lo sviluppo di un sito web, che ha permesso di fornire informazioni generali sullo studio e allo stesso tempo ha consentito di effettuare l'indagine in modalità on-line. L'indagine ha coinvolto un totale di 343 persone. Quarantadue neurologi hanno partecipato all'indagine. Il 31% era già a conoscenza della metodologia delle NMA. I risultati del questionario mostrano che i neurologi preferiscono il grafico a network come modalità di presentazione dei farmaci disponibili e dei confronti effettuati, mentre prediligono il grafico a barre orizzontali per rappresentare l'efficacia dei farmaci.

L'indagine ha permesso di raccogliere suggerimenti per migliorare le rappresentazioni grafiche. E' emersa la necessità di aggiungere informazioni sugli effetti collaterali dei farmaci, sulla finestra temporale nella quale il farmaco è stato valutato e sulla via di somministrazione. I partecipanti hanno sottolineato l'utilità di questi grafici come strumento per condividere le decisioni terapeutiche con le persone con SM e/o con i loro familiari.

L'indagine per le persone con SM e/o loro familiari ha coinvolto 267 individui. Circa il 23% era a conoscenza

delle RS. La modalità di presentazione dei risultati preferita da coloro che vogliono tenersi aggiornati sui farmaci disponibili è risultata essere quella basata su l'istogramma, nel quale i farmaci sono ordinati sulla base della loro efficacia rispetto al placebo, e su una tabella che illustra le stime di efficacia, i loro intervalli di confidenza e la valutazione della affidabilità di tale stima. Nel complesso i partecipanti hanno reputato tale rappresentazione molto utili per tenersi aggiornati sulle terapie disponibili.

Il questionario sviluppato per i giornalisti o per i professionisti della comunicazione ha visto la partecipazione di 21 di loro. Il grafico più apprezzato, anche in questo caso, è stato quello che presenta congiuntamente l'istogramma e la tabella. Questa modalità è stata reputata anche la più idonea per la comunicazione ai loro lettori. I partecipanti hanno, inoltre, suggerito di aggiungere una legenda che introduce il concetto di affidabilità delle stime. Hanno inoltre proposto di distinguere i grafici a secondo del numero di linee di trattamento somministrate.

Il questionario sviluppato per i decisori sanitari non

ha avuto una partecipazione sufficiente e per questo motivo i risultati non vengono presentati.

Complessivamente i risultati evidenziano che i neurologi, le persone con SM e i giornalisti o professionisti della informazione hanno diversi gradi di conoscenza riguardo le RS e NMA e necessitano di diverse modalità di rappresentazione dei risultati per soddisfare i loro bisogni conoscitivi. Questi risultati sono utili a tutti coloro che sono interessati al trasferimento dei risultati della ricerca clinica a coloro che devono prendere decisioni cliniche o che si occupano di divulgazione della informazione scientifica nel campo della SM.

### CONCLUSIONI

Il progetto fornisce indicazioni utili circa la modalità di presentazione dei risultati di NMA che possono essere utilizzate dai ricercatori per meglio presentare i risultati della propria ricerca in modo che questi siano meglio compresi e utilizzati da coloro che devono prendere decisioni sanitarie o che si occupano di divulgazione scientifica.

## Enhancing the way research results are summarized for evidence-based treatments of multiple sclerosis and influencing the future research agenda

### INTRODUCTION AND AIMS

In multiple sclerosis (MS) the efficacy and safety of drugs are assessed by randomized controlled trials (RCTs). Patients and professionals have to deal with an expanding body of evidence that can cause an increase of uncertainty about which drug among those assessed is better to use. Systematic reviews (SRs) have been developed to help clinicians summarize evidence and decide which treatment to use. However, these research syntheses, at most, only focus on the merits of two different treatments at a time. To summarize evidence across studies a statistical methodology, which is called Network Meta-Analysis (NMA), has been developed recently. It combines information from all direct and indirect comparisons from RCTs on the same clinical condition. Despite its complexity, such methodologies have also been increasingly used in medical literature. The awareness that results from NMAs could be useful for stakeholders, such as people with MS, neurologists, policy makers, health information professionals, is rising over time. Thus, the

main object of this project was to enhance the way the results of NMAs are summarized and presented in order to make their interpretation easier to understand especially for those who have to make decisions or broadcast the results to laypeople. The project was based on a survey involving different types of stakeholders.

### RESULTS

The survey involved different questionnaires, which had been developed by four panels of stakeholders, such as people with MS, neurologists, health information professionals and policy makers. The questionnaires were based on the results of a published NMA of drugs for the treatment of relapses-remitting MS. The outcome considered was the proportion of participants who experienced new clinical relapses over 24 months of follow-up. A website was established to provide information about the project and to allow people to take part in the web-based surveys. The questionnaires were launched in

a national survey and a total of 343 people contributed to the survey. Forty-two neurologists participated and 31% of them stated they were familiar with network meta-analysis. A figure showing interventions and comparisons through a network of dots and segments was the representation that they most preferred to be informed about the drugs available, whereas a graph with horizontal bars was the one preferred to know about the efficacy of drugs.

Besides, the participants suggested that the graphical displays needed to report other relevant pieces of information, such as side effects, time points in which the outcome was assessed as well as the drug administration route. Finally, neurologists reported that graphical representations were very useful for sharing decision-making about the drugs to use along with people with MS. Two-hundred-sixty-seven people with MS or their relatives, participated in the survey. Twenty-three percent of them had already heard about systematic reviews. The most preferred graph, especially by those people who wished to be updated, was the one based on a histogram, in which the interventions were sorted according to their efficacy that was presented by a histogram along with a table showing results, their confidence intervals and an assessment of the reliability of the results. Overall, people with MS and their relatives thought that those graphical representations were very useful with regards to being updated about therapies. Similar results were obtained when the questionnaire was administered to

information professionals. Twenty-one of them participated in the survey. The same graph preferred by people with MS or their relatives was also chosen by them, who also considered it the most appropriate to be used to present results to their readers. They also suggested making some changes to improve the graph, for example they recommended adding a legend to better explain the meaning of reliability of the results. They also proposed providing information on clinical characteristics of the people with MS that were considered (naïve or already treated).

The identification and involvement of policy makers were very difficult and since the survey developed for them involved only a few participants, the results are not presented.

Overall, the results of the survey suggest that the stakeholders have different levels of knowledge about NMAs and dissimilar needs about the way results and information have to be presented. The results of this project are useful for those who are interested in transferring results of medical research to those who have to make decisions on the basis of that, such as clinicians, people with MS, or their carers/relatives, or for broadcasters.

## CONCLUSIONS

This project provides insights into the way findings of NMAs need to be presented. The outcomes of this project will inform researchers on how to present their results in order to be better understood and used by those who have to make health decisions or by broadcasters.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Del Giovane C, Filippini G, Tramacere I, D'Amico R. What do clinicians understand and interpret results from network meta-analysis and the way they are presented? 24th Cochrane Colloquium, 23-27 October 2016, Seoul, Korea Workshop

Del Giovane C, Filippini G, Tramacere I, D'Amico R. Exploring how to enhance the readability, interpretability and usefulness of graphical representations and summaries of results from a network of interventions dealing with the same clinical condition: Insights from policy makers. What Works Global Summit 2016 in London (UK) 25 September 2016

Del Giovane C, Filippini G, Tramacere I, D'Amico R. Exploring how to enhance the readability, interpretability and usefulness of graphical representations and summaries of results from a network of interventions dealing with the same clinical condition: Insights from different stakeholders. 22nd Cochrane Colloquium, September 2014, Hyderabad, India

Del Giovane C, Filippini G, Tramacere I, D'Amico R. Exploring the type of graphical representation of results from network meta-analysis that different stakeholders would prefer. An Italian survey. Global Evidence Summit, 13-16 September 2017, Cape Town, 25<sup>th</sup> South Africa, Cochrane Colloquium

Del Giovane C, Filippini G, Tramacere I, D'Amico R. Exploring the understanding of consumers and clinicians about network meta-analysis results and their usefulness to make decisions: an Italian survey. 23rd Cochrane Colloquium, 3-7 October 2015, Vienna, Austria

Del Giovane C, Filippini G, D'Amico R. Migliorare la sintesi dei risultati della ricerca sui trattamenti per la sclerosi multipla per il loro utilizzo nella pratica clinica e per influenzare l'agenda della ricerca futura (Protocollo progetto di Ricerca FISM 2013). VII Congresso Nazionale della Società Italiana di Statistica Medica ed Epidemiologia Clinica, settembre 2013, Roma, Italia

Del Giovane C, Filippini G, Tramacere I, D'Amico R. Enhancing the way the research results are summarized for evidence-based use of treatments in multiple sclerosis and influencing the future research agenda Italian Multiple Sclerosis Foundation Annual Scientific Congress 29-31 May 2017, Roma, Italia

Del Giovane C, Filippini G, Tramacere I, D'Amico R. Enhancing the way the research results are summarized for evidence-based use of treatments in multiple sclerosis and influencing the future research agenda (FISM 2012). Italian Multiple Sclerosis Foundation 2017 Annual Scientific Congress 25-27 May 2016, Roma, Italia

Del Giovane C, Filippini G, Tramacere I, D'Amico R. Enhancing the way the research results are summarized for evidence-based use of treatments in multiple sclerosis and influencing the future research agenda (FISM 2012). Italian Multiple Sclerosis Foundation Annual Scientific Congress 27-29 May 2015, Roma, Italia

Del Giovane C, Filippini G, Tramacere I, D'Amico R. Enhancing the way the research results are summarized for evidence-based use of treatments in multiple sclerosis and influencing the future research agenda (Protocollo Progetto di ricerca FISM 2012). Associazione Alessandro Liberati Annual Meeting; 23rd May 2014

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2012 per il periodo di 3 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 200.000 €**

**Research project funded by FISM Grant 2012 for the period of 3 years (extended by 12 months) and the amount of € 200,000**

---

## Luca Ostacoli

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Scuola di Medicina  
Università degli Studi di Torino, Torino

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Martina Borghi, Diana Francone, Francesco Scavelli, Gabriella Bertino, Simona Malucchi, Valentina Tesio, Sara Carletto**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Antonio Bertolotto**, Centro Regionale di Riferimento per la Sclerosi Multipla (CReSM), A.O.U. San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

## L'efficacia di un intervento *Mindfulness-based* per i sintomi depressivi e la qualità della vita nei pazienti con sclerosi multipla e i loro caregivers. Uno studio clinico randomizzato controllato

### PREMESSE E OBIETTIVI

La depressione è un evento molto comune nelle persone con sclerosi multipla (SM), che ne soffrono in misura tre volte maggiore rispetto alla popolazione generale. È essenziale che vengano individuati degli interventi relativamente brevi e costo-efficaci per migliorare la qualità della vita (QdV) e ridurre il peso psicologico di questi pazienti e dei loro caregivers.

Gli interventi basati sulla consapevolezza *Mindfulness* hanno dimostrato di ridurre i sintomi depressivi e migliorare la qualità della vita nei pazienti con diverse patologie croniche, inclusa la SM. Gli interventi basati sulla *Mindfulness* nascono dal presupposto che una consapevolezza non giudicante e l'accettazione della propria esperienza momento per momento possano avere un effetto positivo per l'adattamento alla malattia, riducendo il carico psicologico e migliorando la QdV delle persone.

Fino ad oggi l'efficacia di questi interventi è stata valutata nelle persone con SM solo in confronto a gruppi di pazienti che non hanno ricevuto nessun trattamento attivo e nessuno studio si era focalizzato sui sintomi depressivi, nonostante le importanti ripercussioni sulla QdV dei pazienti, in particolare a livello familiare, sociale, e lavorativo.

Pertanto, il presente progetto di ricerca si è proposto di valutare l'efficacia di un intervento di gruppo *Mindfulness-Based (Body and Affective Mindfulness – BAM)* per il miglioramento dei sintomi depressivi e la QdV dei pazienti con SM, confrontandolo con un intervento di gruppo di tipo psico-educativo. Questo studio aveva, inoltre, l'obiettivo di coinvolgere anche

i caregivers dei pazienti per consentire anche a loro di poter beneficiare di un intervento volto a ridurre il disagio legato alla gestione di una malattia cronica invalidante come la SM.

### RISULTATI

I risultati hanno indicato che l'intervento di *Mindfulness (BAM)* si è dimostrato maggiormente efficace nel ridurre i sintomi della depressione rispetto all'intervento psico-educativo (PEI) con risultati di lunga durata (sei mesi dopo la fine dell'intervento). Abbiamo inoltre rilevato che il trattamento basato sulla *Mindfulness* era efficace nel migliorare la QdV dei pazienti, a differenza del PEI. In particolare, l'intervento *Mindfulness* ha ridotto i problemi di concentrazione, pensiero e stanchezza e ha migliorato i punteggi sulla sottoscala generale di soddisfazione, che riguarda la soddisfazione e l'accettazione della QdV correlata alla salute. Inoltre, il trattamento di *Mindfulness* è stato più efficace della Psicoeducazione nel promuovere un cambiamento nella percezione della malattia e questi miglioramenti sono stati mantenuti nella valutazione a sei mesi. I pazienti del gruppo BAM hanno riportato meno percezioni negative della malattia, suggerendo che l'intervento basato sulla *Mindfulness* aveva promosso una riorganizzazione positiva delle loro rappresentazioni cognitive ed emotive di malattia. Un cambiamento nelle percezioni della malattia può aiutare a ridurre la disabilità quotidiana e migliorare il funzionamento e la QdV.

Nel nostro studio entrambi i trattamenti sono stati solo leggermente efficaci nel ridurre la fatica e quindi

sono necessarie ulteriori ricerche in questo settore; infine, entrambi gli interventi si sono dimostrati egualmente efficaci nel ridurre l'ansia e lo stress percepito. Entrambi i trattamenti hanno ridotto i sintomi e gli effetti sono stati mantenuti nella valutazione a distanza di sei mesi, suggerendo che entrambi gli interventi possono essere efficaci nel produrre miglioramenti a lungo termine in questi domini.

Il nostro studio ha avuto un importante limite: sfortunatamente, non siamo stati in grado di coinvolgere un numero sufficiente di caregiver, pertanto non abbiamo potuto analizzare se i caregiver abbiano beneficiato dei trattamenti ricevuti.

## CONCLUSIONI

In conclusione, questi risultati forniscono dati metodologicamente validi a supporto dell'efficacia di un intervento basato sulla Mindfulness nel migliorare i sintomi di depressione e di ansia e lo stress percepito, nell'indurre un cambiamento nella rappresentazione della malattia e nel migliorare la QdV nelle persone con SM, con benefici mantenuti per almeno sei mesi.

Pertanto un trattamento basato sulla Mindfulness può essere considerato un intervento breve ed costo-efficace che può essere applicato nella pratica abituale dei centri clinici SM.

# The efficacy of a Mindfulness Based Intervention for depressive symptoms and quality of life in patients with multiple sclerosis and their caregivers. A randomized controlled clinical trial

## INTRODUCTION AND AIMS

Depression is a very common event in people with multiple sclerosis (MS), who are three times more likely to suffer from depression than the general population. It is essential that relatively short and cost-effective interventions are identified to improve the quality of life (QoL) and reduce the psychological burden of these patients and their caregivers.

Interventions based on awareness (MBI) have been shown to treat depressive symptoms and improve QoL in patients with various chronic diseases, including MS.

MBIs are based on the assumption that a non-judgmental awareness and acceptance of one's moment-to-moment experience can have a positive effect on the adaptation to the disease, reducing the psychological burden and improving patients' QoL.

To date the effectiveness of these interventions has only been evaluated compared to groups of patients who received no active treatment. Moreover, to date no study has focused on depressive symptoms, despite the important repercussions on the QoL of patients, particularly at the family, social, and work levels.

Therefore, the present research project aimed to evaluate the effectiveness of a Mindfulness-Based group intervention (Body and Affective Mindfulness – BAM) for the improvement of depressive symptoms and the QoL of patients with MS, comparing it with a psycho-educational group intervention. The aim of this study was also to involve patients' caregivers to

enable them to benefit from an intervention aimed at reducing the burden associated with the management of a disabling chronic disease such as MS.

## RESULTS

Results indicated that the Body and Affective Mindfulness (BAM) intervention was more effective in reducing symptoms of depression than the psycho-educational intervention (PEI) with long-lasting results (six months after the end of the intervention).

We found that the BAM intervention was effective in improving patients' overall QoL, whereas the PEI was not. In particular, the BAM intervention reduced problems with concentration, thinking and fatigue and improved scores on the general contentment subscale, which deals with satisfaction and acceptance of health-related QoL.

Moreover, the BAM intervention was more effective than PEI in promoting a change in illness perception and these improvements were maintained at the six-months follow-up assessment. Patients in the BAM group reported less negative illness perceptions after the intervention, suggesting that the intervention had promoted a positive reorganization of their cognitive and emotional illness representations. A change in illness perceptions can help to reduce everyday disability and improve functioning and quality of life.

In our study the BAM and PEI interventions were only slight effective in reducing fatigue. Further research into this area is needed.

Lastly, both interventions were similarly effective in reducing anxiety and perceived stress. Both treatments reduced symptoms and the effects were maintained at the six-months follow-up assessment, suggesting that they were similarly effective in producing long-term improvements in these domains. Our study has one important limitation: unfortunately, we were unable to recruit sufficient caregivers, therefore we weren't able to analyze whether caregivers have benefited from the treatments.

## CONCLUSIONS

In conclusion, these results provide methodologically robust evidence that in patients with MS with depressive symptoms the BAM intervention improve symptoms of depression and anxiety and perceived stress, modulate illness representation and enhance QoL, with benefits maintained for at least six months. Therefore BAM intervention could be considered as a brief and cost-effective treatment that can be applied in the usual practice of the MS care centers.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Carletto S, Tesio V, Borghi M, Francone D, Scavelli F, Bertino G, Malucchi S, Bertolotto A, Oliva F, Torta R, Ostacoli L. (2017). The Effectiveness of a Body-Affective Mindfulness Intervention for Multiple Sclerosis Patients with Depressive Symptoms: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Frontiers in Psychology*, 8:2083. doi: 10.3389/fpsyg.2017.02083

Carletto S, Borghi M, Francone D, Scavelli F, Bertino G, Cavallo M, Malucchi S, Bertolotto A, Oliva F, Ostacoli L. (2016). The efficacy of a Mindfulness Based Intervention for depressive symptoms in patients with Multiple Sclerosis and their caregivers: study protocol for a randomized controlled clinical trial. *BMC Neurology*, 16(1):7

Prosperini L. Convegno "Approfondimenti sulla mindfulness: dalla neurobiologia alle applicazioni cliniche", Aula Magna Dellepiane, Presidio Ospedaliero S. Anna, A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino, 6 giugno 2017

Prosperini L XVIII Congresso Nazionale Della Sezione Di Psicologia Clinica, Associazione Italiana di Psicologia (AIP), Roma, 16-18 settembre 2016

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 3 anni (prorogato di 4 mesi) e l'ammontare di 60.000 €**  
**Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 3 years (extended by 4 months) and the amount of € 60,000**

---

## Enrico Molinari

Dipartimento di Psicologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Francesco Pagnini, Cesare Cavallera**, Dipartimento di Psicologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Milano

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Marco Rovaris, Laura Mendozzi**, Centro Sclerosi Multipla, Unità Operativa Riabilitazione Neuromotoria, IRCCS S. Maria Nascente, Fondazione Don Gnocchi, Milano

**Luigi Pugnetti, Massimo Garegnani**, Laboratorio di Neurofisiologia, IRCCS S. Maria Nascente, Fondazione Don Gnocchi, Milano

## Migliorare la qualità della vita di persone con sclerosi multipla e i loro caregiver attraverso un intervento di mindfulness basato sulla telemedicina

### PREMESSE E OBIETTIVI

Il concetto di “mindfulness” è molto utilizzato per effettuare interventi psicologici in grado di promuovere benessere fisico e psicologico. Molti di questi interventi utilizzano tecniche di meditazione, derivate da tradizioni orientali ma adattate alla cultura occidentale, che aiutano a portare l'attenzione sul momento presente, con uno sguardo di accettazione e di gentilezza verso se stessi. Nell'ambito della sclerosi multipla (SM), questo approccio è stato ancora poco studiato, soprattutto da studi rigorosi e di buona qualità metodologica.

Per questo progetto abbiamo creato un nuovo protocollo basato sulla mindfulness, modificato per venire incontro alle esigenze delle persone con SM, e basato sulla telemedicina, ovvero completamente accessibile dal proprio computer. Gli incontri di gruppo sono stati effettuati via teleconferenza, utilizzando un software per la comunicazione a distanza. Ogni gruppo ha inoltre avuto accesso ad un sito internet appositamente creato per poter condividere esercizi e altro materiale multimediale. La partecipazione era aperta anche ad un familiare prossimo (ad esempio, compagno/a, genitore, figlio/a).

L'obiettivo dello studio è stato quello di testare l'efficacia di questo intervento nella promozione della qualità della vita di persone con SM, così come ridurre eventuali aspetti depressivi o ansiosi. Inoltre, abbiamo ipotizzato, sulla base della letteratura precedente, la possibilità di una riduzione della fatica

percepita e un aumento della qualità del sonno. Per verificare l'efficacia del trattamento sono state reclutate 139 persone con SM, che sono state assegnate casualmente all'intervento mindfulness, o ad un gruppo “placebo”, che ha partecipato ad un corso online di tipo psicoeducativo. Oltre alle persone con SM, hanno preso parte allo studio anche 25 familiari, suddivisi nei due gruppi. Tutti i partecipanti allo studio hanno completato questionari sulla qualità della vita e su vari aspetti psicologici, all'inizio dell'intervento, al termine dello stesso (due mesi) e dopo un *follow-up* di sei mesi.

### RISULTATI

Al termine del trattamento, i partecipanti che sono stati assegnati al gruppo sperimentale (mindfulness) hanno riportato un marcato miglioramento, in confronto al gruppo di controllo, della loro qualità della vita, insieme ad una forte diminuzione dei livelli di depressione e ansia. Inoltre, la qualità del sonno risultava migliorata, e la fatica percepita diminuita. Tuttavia, sei mesi dopo il termine del trattamento i due gruppi non differivano significativamente su alcuna variabile investigata.

La partecipazione dei familiari è stata inferiore alle attese, impedendo di analizzare i dati da un punto di vista quantitativo. I dati qualitativi raccolti indicano una elevata soddisfazione verso l'intervento, sia da un punto di vista della promozione del benessere, che da quello relazionale (tra la persona con SM e il familiare).

**CONCLUSIONI**

Il progetto ha dimostrato un elevato potenziale dell'intervento mindfulness nella promozione del benessere in persone con SM. Tuttavia, ne ha evidenziato anche i limiti: la conclusione più verosimile, basata anche sulle interviste e gli approfondimenti qualitativi effettuati dal nostro gruppo, è che la pratica meditativa e la promozione di un pensiero aperto e consapevole sia molto positiva per il benessere di persone con SM (e potenzialmente anche per i familiari più prossimi). Perché questa resti efficace, tutta-

via, è opportuno che sia coltivata e praticata con una certa costanza. I risultati dello studio incoraggiano la creazione di gruppi di intervento basati sulla mindfulness, che possano però non esaurirsi con il termine del corso. Una possibilità potrebbe essere la creazione di gruppi di supporto o di auto-aiuto (online, oppure *in vivo*), che inseriscano nelle proprie attività o discussioni degli elementi basati sulla mindfulness, con l'aiuto di personale opportunamente formato. Il potenziale per promuovere una migliore qualità della vita è a nostro avviso elevato.

## Improving the quality of life of people with multiple sclerosis and their caregivers with a Telemedicine Mindfulness-Based Intervention

**INTRODUCTION AND AIMS**

Some of the most promising clinical treatment for the improvement of psychological and physical well-being are based on the concept of mindfulness. Most mindfulness-based treatments use meditation techniques, derived from eastern traditions and adapted to the western societies. These techniques help focusing on the present moment, with acceptance and non-judgment. In the field of multiple sclerosis (MS), there is a paucity of well-conducted and rigorous studies.

We created a new mindfulness-based protocol, specifically developed for people with MS, based on telemedicine. Group meetings were conducted with a teleconference software, and participants were able to share materials and multimedia contents through a dedicated website. The groups were not limited to people with MS: primary caregivers were invited to join as well.

Study aim was to test the efficacy of this training in the promotion of quality of life, as well as in the reduction of depressive and anxious features. We also considered as secondary target outcomes sleep quality and fatigue.

We recruited 139 people with MS, together with 25 caregivers, who were randomly assigned to the mindfulness intervention group, or to a "placebo" group, receiving a psycho-educational training. Participants were assessed for quality of life, depression, anxiety, sleep quality, and fatigue, at three different times: at the recruitment, after two months, and after six months.

**RESULTS**

In comparison to the control group, those who joined the mindfulness treatment reported higher quality of life and lower depression, anxiety, fatigue, and sleep problems at the end of the intervention. However, after 6 months these group differences were no longer significant.

Although the limited participation of the caregivers prevented a quantitative analysis of their results, qualitative data collected indicate high levels of satisfaction toward the training, reporting improvements in terms of well-being and relational aspects.

**CONCLUSIONS**

The study suggests a high potential for an online mindfulness training in the promotion of quality of life in people with MS. However, it also indicates the limits of the approach. A plausible solution suggests that meditation practice, as well as the improvement of a mindful and open attitude could be particularly positive for people with MS (and, possibly, for the primary caregivers). The efficacy of this training, however, tends to disappear when not practiced. Therefore, a possible clinical application of these findings could be the creation of support (or self-guided) groups, either online or with live meetings, which insert a mindfulness-based training, available on a rolling base. The potential to improve the quality of life is, in our view, particularly relevant.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

### *Pubblicazioni / Publications*

Pagnini F, Bosma CM, Phillips D, & Langer E. Symptom changes in multiple sclerosis following psychological interventions: a systematic review. *BMC neurology* 2014, 14(1), 222

Cavalera C, Pagnini F, Rovaris M, Mendozzi L, Pugnetti L, Garegnani M, & Molinari E. A telemedicine meditation intervention for people with multiple sclerosis and their caregivers: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2016, 17(1), 4

Cavalera C, Rovaris M, Mendozzi L, Pugnetti L, Garegnani M, Molinari E, & Pagnini F. Online meditation training for people with Multiple Sclerosis: a randomized controlled trial. *Multiple Sclerosis* accepted, 2018 Feb 1:1352458518761187

### *Comunicazioni a Congressi / Congress Presentations*

Cavalera C, Pagnini F, Rovaris M, Mendozzi L, Molinari E. Improving the quality of life of people with multiple sclerosis and their caregivers with a telemedicine mindfulness-based intervention. Poster session, Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, maggio 2015

Cavalera C, Pagnini F, Rovaris M, Mendozzi L, Molinari E. Improving the quality of life of people with multiple sclerosis and their caregivers with a telemedicine mindfulness-based intervention. Poster session, Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, maggio 2016

Pagnini F, Cavalera C, Molinari E. Mindfulness for people with multiple sclerosis and their caregivers. Oral presentation at Society for the Exploration of Psychotherapy Research

Pagnini F, Cavalera C, Molinari E. An online meditation program for people with multiple sclerosis and their caregivers. Symposium organized by Dr. Pagnini at 47th SPR International Annual Meeting, Jerusalem, July 2016

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 117.075 €**

**Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 12months) and the amount of € 117.075**

---

## Raffaella Molteni

Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale,  
Università degli Studi di Milano, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Maria Serena Paladini, Andrea Carlo Rossetti**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Maria Pia Abbraccio, Marta Fumagalli, Davide Lecca, Giusy Coppolino, Davide Marangon**, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,  
Università degli Studi di Milano, Milano

## Comorbidità tra sclerosi multipla e depressione: ruolo degli eventi avversi in età precoce

### PREMESSE E OBIETTIVI

Questo progetto pilota nasce dalla necessità di studiare un aspetto a volte trascurato della sclerosi multipla (SM) e cioè la comorbidità che molto spesso presenta con alcune sindromi psichiatriche tra cui la depressione maggiore.

La presenza di sintomi caratteristici della depressione quali ridotto tono dell'umore, apatia, affaticamento, disinteresse per attività che normalmente suscitano piacere (anedonia), ha un forte impatto sia sulla qualità della vita che sul decorso della malattia neurologica. Tuttavia le persone con SM sottolineano che questi aspetti non sempre sono adeguatamente considerati e il loro trattamento rappresenta un'esigenza spesso insoddisfatta.

Sebbene sia comprensibile che il ridotto tono dell'umore possa rappresentare una reazione alla diagnosi della malattia neurologica, alcune evidenze suggeriscono che non sempre questo accade e che alterazioni di specifici sistemi molecolari possono invece esserne la causa.

Per cercare di valutare questa possibilità, il nostro approccio è stato quello di considerare alcuni aspetti comuni alle due patologie: entrambe sono più diffuse nella donna, presentano alterazioni a carico di proteine fondamentali per il funzionamento delle cellule nervose, annoverano eventi stressanti tra i fattori di rischio. È noto infatti che il vivere esperienze avverse può favorire lo sviluppo e/o esacerbare i sintomi sia di SM che di depressione.

Su queste basi, il nostro studio preclinico ha cercato di mimare l'associazione tra SM e depressione per

studiarne l'influenza reciproca e i meccanismi molecolari alla base. A tal fine abbiamo utilizzato un paradigma di stress nel roditore e analizzato quali fossero i suoi effetti sull'induzione e sulla progressione di encefalomielite autoimmune sperimentale (ESA), un modello riconosciuto di sclerosi multipla.

### RISULTATI

Il paradigma di stress adottato è stato l'esposizione a stress prenatale, una procedura utilizzata per indurre in età adulta lo sviluppo di un fenotipo simil-depresso. Topi gravide sono state sottoposte a stress durante gli ultimi giorni gestazionali e vista la maggior incidenza sia di depressione che di SM nella donna, la progenie femminile diventata adulta è stata sottoposta a immunizzazione per indurre ESA, per poi essere esaminata sia a livello comportamentale che molecolare.

I risultati delle nostre analisi hanno mostrato che il paradigma di stress non ha influenzato alcuni parametri generali della gravidanza o le cure materne, tuttavia ha indotto nella progenie diventata adulta una significativa riduzione dell'andamento ponderale a indicare che anche una manipolazione precoce e apparentemente lieve può avere effetti a lungo termine persistenti. Inoltre, sebbene l'esposizione a stress non ha provocato l'insorgenza di un fenotipo simil-depresso, abbiamo osservato una chiara tendenza allo sviluppo di anedonia solo nel gruppo di animali esposti allo stress e in cui è stata indotta l'ESA, a supportare l'esistenza di una influenza tra le due condizioni.

Questo aspetto è stato ulteriormente dimostrato dal fatto che, sebbene la tempistica di insorgenza dell'ESA non sia stata influenzata dall'esposizione allo stress, la severità della sintomatologia era maggiore negli animali esposti a stress, un effetto evidente soprattutto nelle fase acuta e in quella di recupero che caratterizzano la progressione dell'ESA.

L'obiettivo successivo è stato quello valutare se sistemi molecolari noti per essere alterati sia nella SM che nella depressione potessero essere coinvolti negli effetti osservati. I risultati di queste analisi hanno indicato che sia lo stress che l'induzione di ESA modificano i livelli proteici cerebrali della neurotrofina BDNF, un fattore neurotrofico fondamentale per il funzionamento della cellula nervosa. Infatti sia l'esposizione all'evento stressante che l'ESA riducono BDNF ed il suo recettore ad alta affinità.

## CONCLUSIONI

I dati ottenuti in questo studio mostrano come un evento avverso ha un impatto deleterio non solo sulla sintomatologia dell'ESA, ma anche su alcuni aspetti emozionali. Sebbene siano risultati preliminari, due sono gli aspetti critici che emergono dal nostro studio e che se ulteriormente indagati possono avere una rilevanza traslazionale. Sarebbe infatti importante capire se gli effetti dello stress, che sono più marcati nelle fasi acute e di recupero nella progressione dell'ESA, determinano una maggiore vulnerabilità a episodi di ricaduta.

In secondo luogo, analisi approfondite potrebbero chiarire il ruolo di BDNF nelle alterazioni comportamentali osservate e le sue potenzialità quale bersaglio terapeutico per un intervento rivolto anche verso la componente emozionale della SM.

## Multiple sclerosis and depression comorbidity: deciphering the role of early-life adversities

### INTRODUCTION AND AIMS

This pilot project stems from the need to study an aspect of multiple sclerosis (MS) sometimes overlooked: the comorbidity that very often this disease presents with psychiatric syndromes such as major depression.

The presence of depressive symptoms such as mood reduction, apathy, fatigue, anhedonia, has a strong impact on both the quality of life and the course of the neurological disease. Nevertheless, people with MS report that these symptoms are not always adequately considered and their treatment often represents an unmet need.

Although it is feasible that the depressive-like symptoms may be a reaction to the diagnosis of the neurological disease, some evidence suggests that not always this occurs and that alterations of specific molecular systems may instead be the cause.

In the attempt to evaluate this possibility, our approach has been to consider some common aspects of the two pathologies: both are more common in women, both are associated with alterations on proteins essential for the cell function, both include stressful events among the risk factors.

Indeed, it is well-known that adverse experiences can promote the development and/or exacerbate the

symptoms of both MS and depression.

On these bases, our preclinical study aimed to mimic the association between MS and depression to study their mutual influence as well as the molecular mechanisms underlying. To this aim, we used a stress paradigm in the rodent and we analyzed its impact on the induction and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a recognized experimental model of MS.

### RESULTS

As stress paradigm, we used prenatal stress exposure, a procedure used in rodents to induce a depressed-like phenotype in adulthood. Specifically, pregnant mice were subjected to stress during the last gestational days and -based on the high incidence of both depression and MS in women- the adult female progeny was immunized to develop EAE and then examined at both behavioral and molecular level.

Our results indicate that stress had no effect on general pregnancy parameters or maternal care, nevertheless it induced a significant reduction in body-weight gain in adult offspring, indicating that even an early mild manipulation can have persistent long-term effects.

Furthermore, although stress exposure did not result in depressive-like phenotype, we observed a clear tendency to the development of anhedonia only in the group of mice exposed to stress and EAE, supporting the existence of a mutual influence between the two conditions. Interestingly, although stress did not affect the EAE onset, it increased the severity of the symptoms, an effect mainly observed in the acute and in the recovery phases.

Next, we aimed to evaluate whether molecular systems altered in both MS and depression could be involved in the observed effects. Specifically, we measured the cerebral protein levels of the neurotrophin BDNF finding a reduction after both stress and EAE.

## CONCLUSIONS

The data obtained in this study show that an adverse event has a deleterious impact not only on the symptoms of the EAE but also on specific emotional aspects. Although these results are preliminary, they highlight two critical issues that might have a translational relevance and need to be further investigated. Indeed, it would be important to understand if the effects of stress, which are more pronounced in the acute and recovery phases of the EAE progression, may reflect increased vulnerability to relapse. Moreover, deepen analyzes are demanded to clarify the role of BDNF in the observed behavioral alterations and its potential as a therapeutic target for an intervention addressed also towards the emotional component of MS.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Paladini MS, Coppolino GT, Rossetti AC, Marangon D, Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP, Molteni R. Multiple sclerosis and depression comorbidity: deciphering the role of early-life adversities. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 29-31 maggio 2017

Paladini MS, Coppolino GT, Rossetti AC, Marangon D, Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP, Molteni R. Multiple sclerosis and depression comorbidity: deciphering the role of early-life adversities. Congresso Nazionale Società Italiana di Farmacologia, Rimini, 25-28 ottobre 2017. \*Best Poster Award

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 1 anno (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di 25.000 €**  
**Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 1 year (extended by 3 months) and the amount of € 25,000**

---

## Nicola Smania

Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Centro di Ricerca in Riabilitazione Nueromotoria e Cognitiva, Università di Verona, Verona

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Marialuisa Gandolfi, Nicola Valè, Eleonora Dimitrova, Alessandro Picelli, Maria Donata Benedetti, Alberto Gajofatto, Elena Chemello, Jessica Corradi, Mirko Filippetti, Carola Depaoli**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Stefano Mazzoleni, Elena Battini**, Istituto di BioRobotica, Scuola Superiore Sant'Anna, Pontedera (Pisa)

**Francesco Ferraro**, Section of Neuromotor Rehabilitation, Department of Neuroscience, ASST Carlo Poma, Mantova

**Matteo Castelli, Maruo Camin**, Centro di Riabilitazione Franca Martini - ATSM onlus, Trento

## Effetti di un trattamento intensivo robot assistito sul recupero funzionale della mano e sull'autonomia nelle ADL in persone con SM: studio randomizzato controllato in singolo cieco

### PREMESSE E OBIETTIVI

Il recupero funzionale dell'arto superiore rappresenta uno dei principali obiettivi in soggetti affetti da sclerosi multipla (SM). I disturbi di forza, sensibilità coordinazione e il tremore limitano fortemente la destrezza manuale e conseguentemente l'autonomia nelle attività della vita quotidiana peggiorando la qualità della vita. La letteratura scientifica sottolinea l'importanza di specifici programmi riabilitativi volti a incrementare il recupero funzionale dell'arto superiore. In particolare, vi è la necessità di sviluppare trattamenti riabilitativi intensivi e ripetitivi per favorire un migliore recupero funzionale. Negli ultimi decenni, sono stati sviluppati strumenti robotici che possono esercitare l'arto superiore in modo intensivo e ripetitivo. Amadeo è un robot che permette di allenare le dita della mano in condizioni facilitate e interattive. Allo stato attuale tale strumento ha mostrato di essere efficace in pazienti affetti da ictus cerebrale. Tuttavia non sono presenti studi condotti in soggetti con SM. La presente ricerca si propone di verificare gli effetti di un trattamento riabilitativo eseguito con Amadeo finalizzato al recupero funzionale della mano. Tale training potrebbe avere ripercussioni positive anche sull'autonomia nelle attività della vita quotidiana e sulla qualità della vita dei soggetti con SM. Per la prima volta saranno inoltre utilizzati marker elettromiografici per valutare le mo-

dificazioni dell'attività elettrica muscolare indotta dal trattamento riabilitativo.

### RISULTATI

Il risultato principale di questo studio randomizzato controllato è che sia il training robot-assistito sia il trattamento "convenzionale" hanno migliorato l'attività e la funzione dell'arto superiore nei pazienti con SM. È interessante notare che solo il gruppo che ha eseguito il training con dispositivo robotico ha riportato miglioramenti significativi sull'uso dell'arto superiore e sulla disabilità. Le osservazioni preliminari relative alle attivazioni muscolari hanno evidenziato il potenziamento dell'attivazione del muscolo estensore del carpo solo nel gruppo che ha eseguito trattamento della mano assistita da robot. Gli obiettivi prefissati dal progetto sono stati raggiunti.

### CONCLUSIONI

Per concludere, i nostri risultati hanno suggerito che entrambi gli approcci riabilitativi hanno migliorato l'attività dell'arto superiore e le prestazioni della mano, come valutato da valutazioni cliniche e strumentali. Lo studio quindi sottolinea il potenziale rigenerativo della funzione dell'arto superiore grazie a specifici interventi riabilitativi in persone con sclerosi multipla.

## Effects of high-intensity robot-assisted training in hand function recovery and ADL independence in individuals with MS: a randomized controlled single-blinded trial

### INTRODUCTION AND AIMS

The upper limb (UL) plays an important role in the daily functioning of patients with multiple sclerosis (PwMS) and negatively influences their quality of life. Effective arm-hand training programs are needed. Various robotic systems have been developed for UL rehabilitation, mainly used in patients with stroke. Preliminary work in MS has focused on proximal sections of the arm. No study has evaluated the use of robotics for improving manual dexterity and their effects on cortical activity. The results of this research project could be relevant for the advancement of knowledge about UL functional recovery in individuals with MS and to determine the neural underpinnings of efficacy of robotic systems for UL rehabilitation. For the first time a EMG paradigm will be used to compare the effects of an innovative robotic device developed specifically for UL rehabilitation versus conventional physiotherapy by means of a RCT on a large group of participants.

### RESULTS

The main finding of this randomized controlled trial is that both the Robot-Assisted Hand Training and the "conventional" treatment improved UL activity and function in PwMS. Interestingly, only the Robot-Assisted Hand training group reported significant improvements on the use of the treated UL and in the Assessment of skills during Life Habits (accomplishments). The preliminary observations related to muscular functions showed enhancement of the extensor carpi activation only in the Robot-assisted Hand training group. The aims of the study have been achieved

### CONCLUSIONS

To conclude, our results suggested that both trainings improved UL activity and hand performance, as evaluated by clinical and instrumental assessments. It suggests a restorative potential of UL function ought to specific rehabilitation interventions in PwMS.

### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Smania N, Valè N, Dimitrova E, Mazzoleni S, Filippetti M, Depaoli C, Corradi J, Battini E, Castelli M, Camin M, Benedetti MD, Gajofatto A, Ferraro F, Gandolfi M. Effects of high-intensity robot-assisted training in hand function recovery and adl independence in individuals with multiple sclerosis: A randomized controlled single-blinded trial. *Gait & Posture* 57S (2017) 1-40

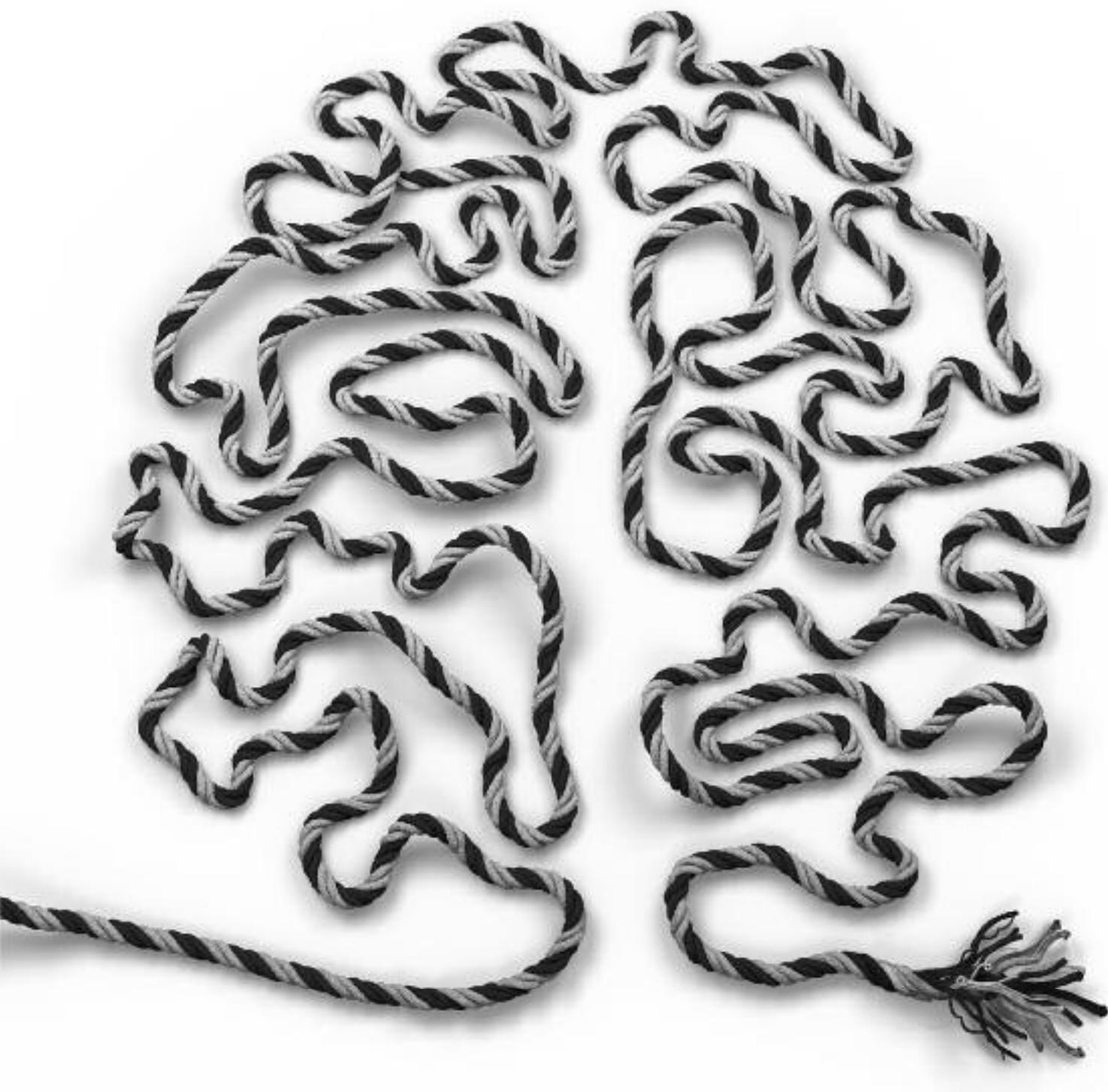
Smania N, Valè N, Dimitrova E, Mazzoleni S, Filippetti M, Depaoli C, Corradi J, Battini E, Castelli M, Camin M, Benedetti MD, Gajofatto A, Ferraro F, Gandolfi M. Effects Of High-Intensity Robot-Assisted Training In Upper Limb Function Recovery And Adl Independence In Individuals With Multiple Sclerosis: A Randomized Controlled Single-Blinded Trial. *European Congress of NeuroRehabilitation 2017*, 25-28 October 2017, Lausanne (Switzerland). Oral Presentation

Smania N, Valè N, Dimitrova E, Mazzoleni S, Filippetti M, Depaoli C, Corradi J, Battini E, Castelli M, Camin M, Benedetti MD, Gajofatto A, Ferraro F, Gandolfi M. Effects Of High-Intensity Robot-Assisted Training In Hand Function Recovery And Adl Independence In Individuals With Multiple Sclerosis: A Randomized Controlled Single-Blinded Trial. *XVIII Congresso Nazionale SIAMOC*, 4-10 ottobre 2017, Torino. Comunicazione orale

Filippetti M, Gandolfi M, Valè N, Dimitrova E, Mazzoleni S, Depaoli C, Corradi J, Battini E, Castelli M, Camin M, Benedetti MD, Gajofatto A, Ferraro F, Smania N. Effetti di un protocollo riabilitativo robotico intensivo sulla destrezza manuale e autonomia nelle ADL in pazienti con sclerosi multipla: studio in singolo cieco, randomizzato e controllato. *45° Congresso Nazionale Società Italiana di Medicina Fisica e Riabilitativa (SIMFER)*. Genova, 22-25 ottobre 2017. Presentato come Comunicazione orale

Valè N, Dimitrova E, Mazzoleni S, Chemello E, Corradi J, Rossini M, Battini E, Geroin C, Munari D, Picelli A, Benedetti MD, Gajofatto A, Gandolfi M, Smania N. Evaluating upper limb dysfunctions in patients with multiple sclerosis: an electromyography cross-sectional study. *XVII SIRN Congresso Nazionale* 6-8 aprile 2017 Pisa. Presentato come Poster

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 8 mesi) e l'ammontare di 75.000 €**  
**Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 8 months) and the amount of € 75,000**



# **DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA MALATTIA**

*DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE*

## Antonio Bertolotto

Istituto delle Neuroscienze Cavalieri Ottolenghi (NICO), Neurologia e CRESM (Centro di Riferimento Regionale per la Sclerosi Multipla), AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Marzia Caldano, Federica Brescia, Fabiana Marnetto, Paola Valentino**

## Una biobanca e un laboratorio dedicati alla raccolta e alla distribuzione di campioni biologici di SMPP, le replicazione e la condivisione di dati e la validazione di metodi biologici

### PREMESSE E OBIETTIVI

Nonostante i considerevoli investimenti nella ricerca clinica, pochi risultati di laboratorio si traducono nello sviluppo di nuovi farmaci, a causa della scarsa riproducibilità dei dati pubblicati (per mancanza di rigore nella raccolta dei campioni biologici), della insufficiente validazione dei metodi usati e della limitata condivisione dei risultati. In una malattia cronica come la sclerosi multipla primariamente progressiva (SMPP) ci sono altri due ostacoli: l'esiguo numero di pazienti che rende difficile la raccolta di campioni biologici e la necessità di follow-up attraverso la raccolta di dati clinici, biologici, di risonanza magnetica, neurocognitivi e neurofisiologici.

Questo progetto affronta questi problemi unendo l'attività della biobanca e quella del Laboratorio di Neurobiologia Clinica (NBC) del Centro di Riferimento Regionale per la Sclerosi Multipla (CRESM) a cui afferiscono più di 1800 pazienti con SM, di cui 250 con SMPP.

Il progetto mira ad espandere la attuale biobanca del CRESM, che raccoglie campioni biologici (siero, plasma, liquido cerebrospinale o CSF, urine, cellule del sangue e CSF per DNA e RNA) e dati clinici associati, di pazienti con PPMS, altri tipi di SM e vari controlli, secondo criteri rigorosi e standardizzati. Inoltre, il progetto mira a distribuire campioni a progetti finanziati dalla FISM o da altre istituzioni.

Il ricercatore che riceve campioni si impegna a condividere i dati dei suoi esperimenti con la biobanca in modo che possano essere disponibili per altri studi. Il laboratorio di NBC offre supporto tecnico per la co-validazione dei metodi.

L'ultimo obiettivo del progetto è la cooperazione con altre biobanche nella futura rete di biobanche dedicate alla ricerca sulla SM.

### RISULTATI

Per consentire la raccolta omogenea dei campioni, abbiamo stabilito procedure rigorose per la selezione dei pazienti, le tempistiche ideali per la raccolta del materiale biologico durante il follow-up e la standardizzazione della raccolta e del processamento dei campioni. I campioni di sangue vengono processati entro 3 ore dalla raccolta e i campioni di CSF vengono conservati a -80°C entro 2 ore dalla puntura lombare. Inoltre, il sistema di *biobanking* include l'utilizzo di provette con codice a barre, la preparazione di molte aliquote dello stesso materiale biologico e l'anonimizzazione dei campioni. Nella biobanca sono conservati campioni di pazienti trattati con tutti i farmaci approvati per la SM. Anche i campioni di sangue dei pazienti non ancora trattati sono inclusi nella biobanca. La messa a punto di una nuova tecnica di puntura lombare (Bertolotto et al, Cefalgia 2016) che riduce il mal di testa post-prelievo, consente la raccolta di circa 20 ml di CSF e si traduce nella disponibilità di più aliquote dallo stesso prelievo.

Tutti i pazienti disposti a partecipare sono stati informati del progetto e delle relative procedure in maniera dettagliata.

La collaborazione con l'Ospedale Ostetrico Ginecologico "Sant'Anna" di Torino consente la raccolta di campioni di sangue da donne con SM o sane in stato di gravidanza.

Finora i campioni conservati nella biobanca sono stati utilizzati in 8 progetti del gruppo di ricerca del Responsabile del Progetto (RdP) e in 6 progetti esterni; altri 5 progetti esterni sono in fase di revisione. Questi progetti riguardano la patogenesi della SM, la valutazione della risposta al trattamento e l'identificazione di biomarcatori diagnostici e/o prognostici.

Data l'importanza dell'integrità del campione, è in

corso uno studio sulla stabilità dell'RNA per verificare se alcune variabili pre-analitiche legate alla manipolazione e allo stoccaggio dei campioni possano influire sulla qualità del materiale biologico ottenuto. La biobanca collabora con altri laboratori per la validazione di saggi biologici. Il gruppo di ricerca del RdP è stato incluso nel progetto "Gruppo Europeo per il Monitoraggio degli Anticorpi Monoclonali (MAGE) per le malattie infiammatorie - Le Studium" che coinvolge altri 7 gruppi di ricerca europei.

È stato fatto molto lavoro per istituzionalizzare la biobanca focalizzandosi sull'ottimizzazione delle procedure. Dopo una proficua collaborazione con una bioeticista, il Comitato Etico dell'Ospedale San Luigi ha approvato un Consenso Informato revisionato per gli adulti e, ora, stiamo lavorando alla creazione di uno specifico Consenso Informato per i minori. La distribuzione dei campioni ad altri gruppi di ricerca è rego-

lata da una rigorosa procedura: a tal fine è stato creato uno specifico Accordo di Trasferimento di Materiale.

### CONCLUSIONI

L'obiettivo principale di questo progetto è la creazione di una biobanca al servizio della ricerca sulla SM e, per estensione, dei pazienti con SM attraverso l'identificazione delle migliori strategie per la gestione della malattia. Quella che inizialmente era una collezione di campioni di pazienti con SM e soggetti sani sta diventando una biobanca di ricerca sempre più strutturata (consenso informato, standardizzazione delle procedure di raccolta e conservazione del materiale biologico e dei dati associati). Il crescente interesse per la biobanca dal parte di ricercatori di tutto il mondo è segno che progetti come questo sono davvero una risorsa per l'intera comunità scientifica.

## A bio-bank and a laboratory devoted to the collection and supply of biological samples of PPMS for the replication and sharing of data, and the validation of biological methods

### INTRODUCTION AND AIMS

Despite considerable investment in clinical research, very few laboratory results are getting transformed into drugs. Some of the reasons for this are the poor reproducibility of published data due to lack of rigor in the collection of biological samples, the insufficient validation of the methods and limited sharing of data. In a chronic disease such as Primary Progressive Multiple Sclerosis (PPMS) there are two further obstacles: the small number of patients which makes it difficult to collect biological samples, and the patients need careful follow-ups through the collection of clinical, biological, MRI, neuro-cognitive and neurophysiological data. This project aims to address these problems by joining the activity of the biobank and that of the Clinical Neurobiology Lab (CNB) of CRESM that overlooks 1800 MS patients MS, of which 250 PPMS patients. In particular, the project aims to expand the biobank which is already in operation at the CRESM, through the collection of biological samples (serum, plasma, cerebrospinal fluid (CSF), urine, cells from blood and CSF for DNA and RNA,) of PPMS patients, other types of MS and various controls, according to strict criteria and recorded in a database. Moreover, the biobank project aims to

distribute samples to projects funded by FISM or other institutions. The researcher who receives samples is committed to share raw data of his experiments with the biobank so that could be available for others studies. The CNB Lab offers technical support for co-validation of methods. The last aim of the project is the cooperation with other biobanks in the future network of biobanks dedicated to MS research.

### RESULTS

To allow homogeneous samples collection, we established rigorous procedures regarding the selection of patients, the ideal time points for blood collection during their follow-up and the standardization of sample collection and handling. Blood samples are handled within 3 hours from collection; CSF samples are stored at -80°C within 2 hours from lumbar puncture. A robust biobanking system including cryovials with barcode, many aliquots of the same biological material, anonymization of samples etc., has been created. Samples from patients treated with all types of approved MS drugs are collected, thereby providing the researchers with a wealth of samples. The blood samples from treatment naïve MS patients are also included in the biobank. The development of new

lumbar puncture technique (Bertolotto et al, Cephalgia 2016) results in a reduction of the headache post-lumbar puncture and allows the collection of approximately 20 ml CSF and so multiple aliquots are available from the same collection.

All the patients willing to participate were informed of the project and the related procedures in detail.

The collaboration with “Sant’Anna” Obstetric and Gynaecologic Hospital in Turin allowed the collection of blood samples from pregnant women, both from MS patients and healthy donors.

Samples stored in the biobank have been used in 8 projects of the Principal Investigator (PI) research group and in 6 external projects so far; 5 additional projects are under review. These projects focused on the MS pathogenesis, the evaluation of treatment response and the identification of diagnostic and/or prognostic biomarkers.

Given the importance of sample integrity, an ongoing study of RNA stability is being designed to check for systematic changes due to handling and storage conditions over the lifetime of the project.

The biobank collaborates with other laboratories for cross-validation of biological methods. The PI research group has been included in the project “Monitoring of monoclonal Antibodies Group in Europe (MAGE) for inflammatory diseases – Le Studium” that involves 7 other European research groups.

A lot of work has been done to institutionalize the biobank and careful attention has been paid to ensure implementation of best practices. After a collaboration with a bioethicist, the Ethic Committee of San Luigi Hospital approved a revised Informed Consent for adults and we are working on the creation of an Informed Consent for minors. The distribution of samples to other research groups needs to be regulated by a rigorous procedure: for this purpose, the revision of the procedures allowing to obtain biological material from the bio-bank and the creation of a specific Material Transfer Agreement has been made.

## CONCLUSIONS

The main objective of this project is the creation of a bio-bank in the service of research on MS and by extension, service to MS patients by the identification of better strategies for disease management through this research.

Thanks to this project, what began as a collection of samples of patients with MS and healthy subjects is becoming an increasingly structured bio-research bank (informed consent, standardization of procedures for collecting and storing biological material and associated data). The growing interest in biobank research by researchers around the world is a sign that projects like this are a vital resource for the entire scientific community and beyond.

---

**PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI**  
**PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS**


---

Spadaro M, Montarolo F, Perga S, Martire S, Brescia F, Malucchi S, Bertolotto A. Biological activity of glatiramer acetate on Treg and anti-inflammatory monocytes persists for more than 10 years in responder multiple sclerosis patients. *Clin Immunol*. 2017 Aug;181:83-88

Marnetto F, Valentino P, Caldano M, Bertolotto A. Detection of potassium channel KIR4.1 antibodies in Multiple Sclerosis patients. *J Immunol Methods*. 2017 Jun;445:53-58

Valentino P, Marnetto F, Granieri L, Capobianco M, Bertolotto A. Aquaporin-4 antibody titration in NMO patients treated with rituximab: A retrospective study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016 Dec 15;4(2):e317

Tampoia M. Autoanticorpi anti-aquaporina nelle neuropatie. 9° Convegno GDS-AI, Mondello (PA) 9-10 ottobre 2015

Marnetto F, Valentino P, Caldano M, Bertolotto A. Anti-KIR4.1 antibodies as a biomarker in multiple sclerosis: problems and preliminary data. (Abstract release date: Oct 7, 2015) ECTRIMS Online Library. Oct 9, 2015

Sala A, Marnetto F, Valentino P, Capobianco M, Malucchi S, Bertolotto A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rituximab in NMOSD and RRSM treated patients. (Abstract release date: Sep 23, 2015) ECTRIMS Online Library. Oct 9, 2015

Spadaro M, Montarolo F, Perga S, Bertolotto A. The percentage of T regulatory and anti-inflammatory monocytes cells in multiple sclerosis patients is restored and maintained at high-level by glatiramer acetate. (Abstract release date: Oct 7, 2015) ECTRIMS Online Library. Oct 9, 2015

Sala A, Marnetto F, Valentino P, Capobianco M, Malucchi S, Bertolotto A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rituximab in NMOSD and RRSM treated patients. XLVI Evento Nazionale Società Italiana Neurologia, Genova 10-13 ottobre, 2015

Spadaro M, Montarolo F, Perga S, Bertolotto A. The percentage of T regulatory and anti-inflammatory monocytes cells in multiple sclerosis patients is restored and maintained at high-level by glatiramer acetate. XLVI Evento Nazionale Società Italiana Neurologia, Genova, October 10-13, 2015

Bertolotto A, Caldano M. Le Banche dati biologiche come integrazione dei registri di patologia. Banche dati biologiche e sclerosi multipla. Progetto "Registro Italiano Sclerosi Multipla". IRCCS Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - Milano Feb 26, 2016

Perga S, Montarolo F, Martire S, Spadaro M, Giordano I, Orlandi F, Bertolotto A. Multiple Sclerosis and Hashimoto's thyroiditis: similarities and differences in the immune regulation. XXV AINI Congress, Lecce May 11-14, 2016

Marnetto F, Valentino P, Caldano M, Bertolotto A. Anti-potassium channel KIR4.1 antibodies as a biomarker in Multiple Sclerosis: difficulties and preliminary data. XXV AINI Congress, Lecce May 11-14, 2016

Caldano M, Sala A, Brescia F, Bertolotto A. The biobank of CReSM: a tool to facilitate the research in Multiple Sclerosis. XXV AINI Congress, Lecce May 11-14, 2016

Martire S, Navone ND, Montarolo F, Perga S, Bertolotto A. A gene expression study denies the ability of 25 candidate biomarkers to predict the interferon-beta treatment response in Multiple Sclerosis patients. XXV AINI Congress, Lecce May 11-14, 2016

Valentino P, Marnetto F, Granieri L, Capobianco M, Bertolotto A. Anti-aquaporin-4 antibodies titration: biological role and clinical usefulness. XXV AINI Congress, Lecce May 11-14, 2016

Marnetto F, Valentino P, Caldano M, Bertolotto A. Anti-potassium channel KIR4.1 antibodies as a biomarker in Multiple Sclerosis: difficulties and preliminary data. 2<sup>nd</sup> Congress Of The European Academy Of Neurology, Copenhagen May 28-31, 2016

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM Speciale Progressive 2014 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 149.600 €**

**Research project funded by FISM Special Call Progressive 2014 for the period of 2 years and the amount of € 149.600**

---

## Maria Liguori

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Dipartimenti di Biomedicina,  
Istituto di Tecnologie Biomediche, Unità di Bari, Bari

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Nicoletta Nuzziello, Arianna Consiglio, Flavio Licciulli, Sabino Liuni,  
Giorgio Grillo, Nicola Losito**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Maria Trojano, Marta Simone, Carla Tortorella, Rosa G. Viterbo,  
Lucia Margari**, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi  
di Senso, Istituto di Neurologia, Università di Bari, Bari

**Teresa M. Creanza, Nicola Ancona**, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)  
Dipartimento di Ingegneria, ICT e tecnologie per l'energia e i trasporti, Istituto di Studi  
sui Sistemi Intelligenti per l'Automazione (ISSIA), Unità di Bari

**Sabina Tangaro, Nicola Ancona, Roberto Bellotti**, Istituto Nazionale  
Fisica Nucleare (INFN), Sezione di Bari e Dipartimento Interateneo di Fisica,  
Università di Bari, Bari

## Il deterioramento cognitivo nella sclerosi multipla pediatrica: ricerca di biomarcatori predittivi di progressione

### PREMESSE E OBIETTIVI

Segni clinici indicativi di alterazioni delle funzioni cognitive sono frequenti anche nella Sclerosi Multipla con esordio in età pediatrica (SMPed) e influenzano sia la qualità di vita dei pazienti che il loro rendimento scolastico. I meccanismi patogenetici alla base dei disturbi neuropsichiatrici non sono ancora completamente noti; potrebbero essere il risultato dell'impatto che l'infiammazione e la neurodegenerazione tipici della malattia producono sulla maturazione delle reti cognitive. D'altra parte è riconosciuto che durante la crescita il cervello conserva una capacità di riorganizzazione che persiste fino all'adolescenza, per lo più a seguito di processi fisiologici come l'eliminazione di sinapsi nei circuiti corticali, l'aumento della sostanza bianca e variazioni nei sistemi dei neurotrasmettitori. Queste evidenze suggeriscono che la possibilità di influenzare precocemente alcuni cambiamenti delle funzioni cognitive possa esistere sia nei soggetti sani che in condizioni patologiche come la SM. Al momento non sono stati identificati marcatori molecolari predittivi dell'insorgenza di disfunzioni cognitive o della loro progressione.

I microRNA (miRNAs), una classe di RNA non codifi-

cante, sembrano rivestire un ruolo di primo piano in malattie complesse come la SM, agendo come fattori circolanti di regolazione sull'espressione di geni-bersaglio. Numerose evidenze mostrano inoltre che network composti da miRNAs sono implicati in numerosi disordini neuropsichiatrici. In questo studio, usando un metodo di sequenziamento di nuova generazione, abbiamo caratterizzato diversi biomarcatori circolanti (miRNA) e loro geni-bersaglio nella SMPed. I dati clinici e molecolari sono stati analizzati da un team di esperti in bioinformatica e biostatistica con lo scopo finale di identificare eventuali caratteristiche molecolari associate al deficit cognitivo eventualmente rilevato nei pazienti selezionati.

### RISULTATI

Diciannove pazienti con SMPed sono stati analizzati entro cinque anni dall'esordio di malattia. Tutti sono stati sottoposti a esame neurologico, risonanza magnetica per immagini (RMI) e valutazione neuropsicologica, quest'ultima utilizzando una batteria di test che esplora diversi domini cognitivi (es. apprendimento verbale e visuospatiale, attenzione complessa, pianificazione, linguaggio espressivo) così come segni

clinici indicativi di depressione, e questo sia al tempo del reclutamento nello studio che dopo circa 12 mesi. Secondo linee guida pubblicate, un danno cognitivo è stato attribuito a quei pazienti che fallivano almeno tre tests (su un totale di 12). Anche 20 soggetti sani in età pediatrica sono stati sottoposti all'analisi molecolare.

Dal confronto dei dati molecolari tra SMPed e i controlli sani sono emerse differenze significative sia di miRNA che dei loro geni-bersaglio, coinvolgendo meccanismi sia immunologici che degenerativi. Nessun profilo molecolare significativo sembra caratterizzare i pazienti SMPed sommariamente divisi sulla base della assenza/presenza di problemi cognitivi (test falliti </> tre, rispettivamente).

Tuttavia, esaminando le singole funzioni cognitive, abbiamo verificato che l'espressione di alcuni miRNA correlava con i punteggi di singole prove neuropsicologiche. Tra gli altri, un pannello composto da 11 miRNA correlava con i punteggi ottenuti al *Trail Making Test-B* che valuta l'attenzione visuo-spaziale; inoltre, alte espressioni di quattro di loro correlavano con il peggior rendimento complessivo in tutta la valutazione neuropsicologica (valutato sulla base del numero di test non superati). Questi risultati sono stati confermati nei 10 (su 19) giovani pazienti che hanno accettato di essere nuovamente sottoposti ai test dopo circa un anno dal primo esame. Con-

siderando i geni-target influenzati dai miRNA più significativi, ne troviamo alcuni implicati ad esempio nei processi di memoria e apprendimento che sappiamo alterati in malattie come la schizofrenia (ADD2), geni coinvolti nella dislessia evolutiva (DIP2A) così come in meccanismi patogenetici di malattie con deficit cognitivi come la demenza di Alzheimer (ABCA1, RTN3) o nella risposta ai farmaci antipsicotici (KCNH2).

## CONCLUSIONI

Per quanto sappiamo, questo è il primo studio che ha analizzato le alterazioni dei miRNA circolanti e dei loro geni-bersaglio nella SMPed. Sebbene nessuna differenza molecolare significativa sembra distinguere nel complesso i pazienti senza/con problemi cognitivi, alcuni segni distintivi molecolari sono stati trovati associati a singoli test, specie in quelli che valutano funzioni superiori come l'attenzione (dati ottenuti al momento dell'inizio dello studio e dopo un anno di osservazione).

Se questi dati verranno confermati in popolazioni più numerose di SMPed pensiamo potranno aiutare a identificare le reti molecolari alterate in caso di disturbi cognitivi; a nostro avviso, questo sarebbe un primo passo verso lo sviluppo di una terapia individualizzata, così come nella selezione di biomarcatori circolanti su cui indirizzare sforzi terapeutici mirati.

## Cognitive impairment in pediatric multiple sclerosis: searching for biomarkers predictive of progression

### INTRODUCTIONS AND AIMS

Cognitive impairment is one of the most frequent clinical evidence also in pediatric Multiple Sclerosis (PedMS), exerting severe impact in patients' quality of life and school performances. The pathogenic mechanisms underlying neuropsychiatric disorders in MS are yet not fully understood; they may be the result of the irreversible damage that inflammation (demyelination) and neurodegeneration produce on the ongoing maturation of the cognitive pathways. On the other hand, it has been recognized that growing brain still holds a basic reorganization until the adolescence, mostly due to elimination of synapses in cortical circuits, increase in white matter and changes in neurotransmitter systems, suggesting

that an early open window for peculiar changes in cognitive functions does exist both in healthy as in specific pathological conditions like MS. So far, molecular markers predictive of cognitive dysfunctions' occurrence and progression still need to be identified.

MicroRNAs (miRNAs), a class of non-coding RNA, seem to play a key role in complex diseases like MS as circulating regulatory factors on target genes. Evidences also showed that miRNA networks are actively involved in many cognitive functions associated with neuropsychiatric disorders.

By using a Next-generation Sequencing approach, in this study we aimed to characterize different miRNAs and their target mRNAs (genes) in PedMS. Clinical and

molecular data were analyzed by an integrated team of experts in bioinformatics and biostatistics with the final purpose to possibly identify molecular signatures associated with PedMS cognitive dysfunctions.

## RESULTS

Nineteen PedMS patients were recruited within five years from the MS onset (T0). They received neurological examination (EDSS, FSS) and neuropsychological evaluation by using a battery of validated tests exploring several cognitive domains (verbal and visuospatial learnings, complex attention, planning, expressive language) as well as depression, at baseline and after 12 months (average). According to published guidelines, cognitive impairment (CI) was conferred after a failure of at least three (out of total 12) tests. Twenty pediatric healthy subjects (PHC) were also submitted to the molecular analysis.

The comparison between PedMS and PHC identified several significant molecular differences in both miRNAs and mRNAs levels, suggesting the involvement of immunological and degenerative processes. No significant molecular profiles were associated with any demographic and clinical features of the patients with PedMS, as well as no distinctive molecular signature discriminated CI from cognitively preserved (CP) patients. However, looking into specific cognitive functions, we found that the expression of some miRNAs correlated with the scores of single neuropsychological tests. Among the others, a panel composed by 11 miRNAs correlated with the scores obtained at the Trail Making Test (TMT-B) that ultimately evaluates the visuo-spatial attention; furthermore, the higher expressions of four of them also

correlated with the overall poorer cognitive performances (measured by the number of failed tests). These findings resulted the most significant among the other correlations and was confirmed in 10 out of 19 PedMS patients that were available for neuropsychological re-assessment.

The analysis of genes targeted by the significant miRNAs addressed the attention towards genes significantly implicated e.g. in the impacted memory and learning processes of schizophrenia (ADD2), in developmental dyslexia (DIP2A, a member of a molecular network involved in neuronal migration and neurite outgrowth) as well as in pathogenic mechanisms of specific diseases with cognitive dysfunctions like the Alzheimer's Disease (ABCA1, RTN3), and in the response to antipsychotic drugs (KCNH2).

## CONCLUSIONS

As far as we know, this is the first combined evaluation of dysregulated miRNAs and their target genes in PedMS and its phenotypic features. Although no significant differences marked the overall cognitive impairment (CI versus CP), some distinctive molecular marks were found associated with PedMS cognitive performances such as those related to the attention (data resulted at baseline and after one-year follow-up). If confirmed in larger PedMS populations, these data may help identifying cognitive impaired molecular networks; in our view, this would be a first step towards the development of an individualized therapy, as well as in the selection of circulating biomarkers possibly useful for selective therapeutic efforts.

---

**PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI**  
**PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS**


---

*Pubblicazioni / Publications*

Liguori M, Nuzziello N, Licciulli F, Consiglio A, Simone M, Gemma Viterbo R, Creanza TM, Ancona N, Tortorella C, Margari L, Grillo G, Giordano P, Liuni S, Trojano M. Combined microRNAs and mRNAs expression analysis in Pediatric Multiple Sclerosis: an integrated approach to uncover novel pathogenic mechanisms of the disease. *Hum Mol Genet.* 2018; 27(1): 66-79. doi: 10.1093/hmg/ddx385

Nuzziello N, Blonda M, Licciulli F, Liuni S, Amoroso A, Consiglio A, Avolio C, Liguori M. Molecular Characterization of Peripheral Extracellular Vesicles in Clinically Isolated Syndrome: Preliminary Suggestions from a Pilot Study. *Med Sci (Basel).* 2017 Sep 18;5(3). pii: E19. doi: 10.3390/medsci5030019

Amoroso N, Bellotti R, Fanizzi A, Lombardi A, Monaco A, Liguori M, Margari L, Simone M, Viterbo RG, Tangaro S. Association between MRI structural features and cognitive measures in Multiple Sclerosis. *Proceedings of SPIE 2017, Vol. 10396, pp.103961A (1-9).* doi: 10.1117/12.2273834

Creanza TM, Liguori M, Liuni S, Nuzziello N, Ancona N. Meta-Analysis of Differential Connectivity in Gene Co-Expression Networks in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun 15;17(6)

*Comunicazioni a Congressi / Congress presentations*

Liguori M, Nuzziello N, Simone M, Licciulli F, Viterbo RG, Ancona N, Consiglio A, Creanza T, Decaro G, Liuni S, Margari L, Trojano M. Molecular signatures associated with cognitive dysfunctions in Pediatric Multiple Sclerosis. Poster presentation, 32<sup>nd</sup> ECTRIMS meeting, London (UK), 14-17 September 2017

Liguori M, Nuzziello N, Simone M, Viterbo R, M, Consiglio A, Licciulli V, Tortorella C, Tulipano A, Ancona N, Grillo G, Tangaro S, Margari L, Trojano M. Investigating the molecular signatures of cognitive dysfunctions in Pediatric Multiple Sclerosis. Poster presentation, XLVIII Congresso SIN, Napoli, 14-17, ottobre 2017

Amoroso N, Bellotti R, Fanizzi A, Lombardi A, Monaco A, Liguori M, Margari L, Simone M, Viterbo RG, Tangaro S. Association between MRI structural features and cognitive measures in Multiple Sclerosis. Oral presentation, SPIE Meeting of the International Society for Optics and Photonics, San Diego (USA), September 19th, 2017

Liguori M, Nuzziello N, Simone M, Viterbo R, M, Consiglio A, Licciulli V, Tortorella C, Tulipano A, Ancona N, Grillo G, Tangaro S, Margari L, Trojano M. Cognitive impairment in pediatric Multiple Sclerosis: searching for biomarkers predictive of progression. Poster presentation, Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, maggio 2016

Nuzziello N, Simone M, Viterbo R, M, Consiglio A, Licciulli V, Tortorella C, Ancona N, Grillo G, Tangaro S, Losito N, Margari L, Trojano M, Liguori M. Cognitive impairment in pediatric Multiple Sclerosis: searching for biomarkers predictive of progression. Poster presentation, Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, maggio 2017

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni (prorogato di 9 mesi) e l'ammontare di 245.492 €**

**Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years (extended by 9 months) and the amount of € 245,492**

---

## Antonio Bertolotto

Istituto delle Neuroscienze Cavalieri Ottolenghi (NICO),  
Neurologia e CRESM (Centro di Riferimento Regionale per la Sclerosi Multipla),  
AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Fabiana Marnetto, Paola Valentino, Marzia Caldano,  
Serena Martire, Manuela Matta**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Bernhard Hemmer**, Neurological Clinic of the Klinikum rechts der Isar,  
Technische Universität, Munich, Germany

**Rajneesh Srivastava**, Department of Neurology, Klinikum rechts der Isar,  
Technische Universität, Munich, Germany

## Studio del ruolo diagnostico e prognostico degli anticorpi anti-canale del potassio KIR4.1 nella sclerosi multipla

### PREMESSE E OBIETTIVI

Nonostante la ricerca di biomarcatori diagnostici e prognostici per sclerosi multipla (SM) rappresenti da decenni una delle maggiori sfide nel campo neuroimmunologico, fino ad oggi i risultati prodotti sono ancora deludenti.

Nel 2012 il gruppo tedesco del prof. Hemmer pubblicò la scoperta di un possibile marcatore plasmatico presente nel 50% dei pazienti con SM: si trattava degli anticorpi contro il canale del potassio KIR4.1 presente nel sistema nervoso centrale. L'entusiasmo iniziale generato da questa scoperta è stato attenuato negli anni successivi, in quanto diversi gruppi hanno tentato di replicare in modo indipendente i dati ottenuti dal gruppo tedesco, ma senza successo. Le difficoltà principali nella riproduzione di quei dati risiedono nella particolare struttura del KIR4.1, nella sua glicosilazione (presenza di residui di zuccheri), e nella difficoltà di mantenere integri gli epitopi conformazionali durante il maneggiamento del campione per il test di laboratorio ELISA. Gli anticorpi dei pazienti sono diretti solo contro l'isoforma della proteina meno glicosilata, ma non contro quella molto glicosilata. Quindi il punto critico per avere un buon test di laboratorio è isolare il KIR4.1 poco glicosilato. Abbiamo visitato il laboratorio del Prof. Hemmer, dove abbiamo testato 20 campioni di sangue selezionati dalla nostra banca biologica trovando gli anti-

corpi anti-KIR4.1 in 10/16 pazienti con SM (i soggetti sani sono risultati negativi). Consapevoli dell'enorme importanza che un marcatore sierico specifico per la SM avrebbe avuto per i pazienti, i nostri obiettivi per questo progetto consistevano nel migliorare la procedura per ottenere un test di laboratorio riproducibile; testare un gruppo più grande di pazienti con SM e altre malattie neurologiche per studiare il valore diagnostico degli anticorpi anti-KIR4.1; studiare se la presenza degli anticorpi influenzi la progressione della malattia, e studiare gli effetti di alcuni trattamenti usati in SM sugli autoanticorpi. Tutti i campioni ed i dati clinici e di risonanza dei pazienti inclusi nello studio erano già disponibili nella biobanca del CRESM.

### RISULTATI

Nel nostro laboratorio abbiamo replicato in modo indipendente la procedura originale per rilevare gli anticorpi anti-KIR4.1 descritta dal gruppo tedesco. Abbiamo studiato 48 sieri di pazienti con SM e 46 sieri di individui sani. Da una prima analisi dei dati è emerso come i livelli sierici di anticorpi anti-KIR4.1 fossero effettivamente più alti nei pazienti con SM rispetto ai controlli. Tuttavia, abbiamo riscontrato una enorme variabilità nella qualità dell'antigene purificato nelle diverse sessioni di lavoro, oltre ad una sensibilità e specificità del test molto più basse rispetto

a quelle riportate dal gruppo tedesco. Abbiamo stabilito criteri molto stringenti che ci permettessero di identificare soltanto le sessioni di lavoro in cui l'antigene KIR4.1 poco glicosilato fosse stato purificato correttamente. Gli anticorpi anti-KIR4.1 risultavano così presenti nel 28% dei pazienti con SM e nel 5% dei soggetti sani (Marnetto F et al, 2017).

La procedura originale descritta nel 2012 risulta troppo complessa e poco controllabile a causa della variabilità dovuta all'utilizzo delle cellule HEK come fonte di KIR4.1. Per queste motivazioni non è stato possibile procedere con i successivi obiettivi dello studio. Abbiamo proseguito con il progetto cercando di individuare una nuova fonte di KIR4.1 che rendesse più semplice la purificazione dell'antigene. La linea cellulare di precursori di oligodendrociti umani MO3.13 sembrava un buon candidato. I nuovi obiettivi dello studio sono quindi diventati:

1. caratterizzazione morfologica e biochimica delle cellule MO3.13 prima e dopo 6 giorni di differenziazione in oligodendrociti maturi.
2. studio dell'espressione del KIR4.1 nelle cellule MO3.13 prima e dopo differenziazione.

3. studio della reattività dei sieri di pazienti e controlli sulle cellule MO3.13 differenziate.

Abbiamo così dimostrato che le cellule precursori MO3.13 si differenziano in oligodendrociti più maturi dal punto di vista biochimico e morfologico dopo 6 giorni di differenziazione. Il KIR4.1 è maggiormente espresso dalle cellule differenziate rispetto alle indifferenziate. Infine i sieri di pazienti con SM (risultati positivi al nostro precedente test in ELISA) mostrano una forte immunoreattività contro le cellule MO3.13 differenziate rispetto ai sieri dei soggetti di controllo.

### CONCLUSIONI

Gli anticorpi anti-KIR4.1 sono presenti in un sottogruppo di pazienti con SM. Ad oggi però non è ancora disponibile un test di laboratorio che permetta di quantificarli e quindi di utilizzarli come biomarcatore nella routine diagnostica. Le cellule MO3.13 potrebbero rappresentare una fonte alternativa di antigene KIR4.1, ma sono ancora necessari studi che consentano di mettere a punto una procedura solida e standardizzata per la purificazione dell'antigene e per la quantificazione degli anticorpi nel siero dei pazienti.

## Evaluation of the diagnostic and prognostic role of anti-potassium channel KIR4.1 antibodies in multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

There has been an intense search for new biomarkers in the field of Multiple Sclerosis (MS) since decades to now. Unfortunately, the results involving pathogenic autoantigens have been inconclusive so far. However, in 2012, a discovery of antibodies against the inward rectifying potassium channel KIR4.1 was made by Srivastava et al. in a substantial proportion (35-50%) of adult and paediatric MS patients via a protein-based ELISA test. Also, the loss of KIR4.1 immunoreactivity in brain lesions of MS patients and data in experimental models suggest that the humoral response against KIR4.1 may induce or amplify CNS damage. Yet, multiple groups have failed to validate the above data. The challenges in replication of these data include a peculiar structure of KIR 4.1, glycosylation, and the conservation of conformational epitopes in coating ELISA plates. Specifically, IgG from MS sera precipitates the lower glycosylated (LG) KIR4.1 but not higher glycosylated KIR4.1. Thus,

the critical point for a reliable ELISA for KIR 4.1 is the purification of the lower glycosylated isoform. To achieve this precision, we replicated this exact procedure in our lab in collaboration with the original authors. During our visit to their lab in August 2014, 20 serum samples from CRESM biobank were tested blind for anti-KIR4.1 antibodies, wherein 10/16 MS patients tested positive (all HCs were negative). Supported by these encouraging data, and conscious that a serum autoantibody specific for MS would aid MS diagnosis along with the monitoring of disease progression and treatment, in the present project we aimed to: 1. Optimize the whole procedure, leading to a more reproducible ELISA test; 2. Evaluate the diagnostic role of anti-KIR4.1 antibodies by testing a larger cohort of patients with MS, clinically isolated syndrome (CIS), and Other Neurological diseases (ONDs); 3. Evaluate the prognostic role of anti-KIR4.1 antibodies in patients with CIS followed up for at least two years, and in patients with MS followed

up for ten years (in terms of disease progression). 4. Evaluate the effect of treatments that target B cells (Rituximab) and autologous hematopoietic stem cell transplantation on anti-KIR4.1 antibodies. All serum samples needed for this project were already available in the CRESM Biobank.

## RESULTS

The first aim of this project was to verify the presence of KIR4.1 antibodies in MS patients. We independently replicated the original procedure in a precise manner. Sera of 48 MS patients and 46 HCs were studied. Briefly, the preliminary analysis indicated different KIR4.1 antibody levels between MS and HC. However, stringent criteria needed to be established to counter the high variability and low sensitivity of the assay as compared to the original findings. Finally, we detected LG-KIR4.1 antibodies in 28% of MS patients and 5% of HCs (Marnetto F et al, 2017). Nevertheless, this procedure is not suitable for diagnostic routine given its excessive complexity and variability attributable in part to the usage of HEK cell line. Thus, we could not continue further with the remaining aims of this project as previously determined. Instead, we attempted to resolve issues related to the reproducibility of this method by identifying a new reliable source of KIR 4.1. We selected the human oligodendrocyte MO3.13 cell line in this regard. Given that KIR4.1 is an immunogen extensively expressed by oligodendrocytes, MO3.13 could represent a reliable source for its purification. Therefore, our revised aims in this regard were,

- 1) to characterize MO3.13 cells as oligodendrocytic precursors and their differentiation in mature cells post six days in vitro;
- 2) To study KIR4.1 expression in non-differentiated and differentiated MO3.13 cells;
- 3) to evaluate the reactivity of the positive and negative sera (as per ELISA test) against MO3.13 cells.

These cells matured to an oligodendrocytic phenotype upon culturing in serum free medium in the presence of 100nM 4-b-phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) for six days. The Kir4.1 immunoreactivity was intensely augmented in these differentiated cells. Interestingly, serum samples from MS patients (positive for KIR4.1 Abs in our ELISA test) showed an intense reactivity against differentiated MO3.13 cells, compared to serum from HCs.

## CONCLUSIONS

In conclusion, data obtained in this project suggest the following: 1. KIR4.1 Abs are present in a subgroup of MS patients. 2. The ELISA test described by Srivastava in 2012 is not suitable for routine diagnostic practice, due to technical problems related to KIR4.1 expression and isolation from HEK cells. 3. Differentiated MO3.13 cell line could represent a new source of the immunogen KIR4.1. 4. Serum samples from MS patients and HC showed a different immunoreactivity on differentiated MO3.13 cells. 5. Further studies are needed to standardize the isolation and purification of the antigen for antibody quantification along with confirmation of true serum reactivity against KIR4.1.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Marnetto F, Valentino P, Caldano M, Bertolotto A. Detection of potassium channel KIR4.1 antibodies in Multiple Sclerosis patients. *J Immunol Methods*. 2017 Jun; 445:53-58. doi: 10.1016/j.jim.2017.03.008. Epub 2017 Mar 12

Marnetto F, Valentino P, Caldano M, Bertolotto A. Anti-KIR4.1 antibodies as a biomarker in multiple sclerosis: problems and preliminary data. Conference: 31st Congress of the European-Committee-for-Treatment-and-Research-in-Multiple-Sclerosis (ECTRIMS). Location: Barcelona, Spain, October 07-10, 2015. *Multiple Sclerosis Journal*, Volume: 21 Supplement: 11 Pages: 790-790 Meeting Abstract: P1503 Published: SEP 2015

Bertolotto, A, Caldano, M, Valentino, P, Marnetto F. "Quantification of anti-KIR4.1 Antibodies in Multiple Sclerosis: Difficulties and Acceptance Criteria. Conference: 68th Annual Meeting of the American-Academy-of-Neurology (AAN). Vancouver, Canada.; April 15-21, 2016. *Neurology*, Volume: 86 Supplement: 16 Meeting Abstract: P5.341 Published: April 5 2016

Bertolotto A, Valentino P, Caldano M, Marnetto F. Anti-potassium channel KIR4.1 antibodies as a biomarker in Multiple Sclerosis: difficulties and preliminary data. Poster presentation to EAN Congress Copenhagen 2016

Marnetto F, Valentino P, Caldano M, Bertolotto A. Anti-potassium channel KIR4.1 antibodies as a biomarker in Multiple Sclerosis: difficulties and preliminary data. XXVI Congresso AINI, Lecce, 11-14 maggio 2016

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 1 anno (prorogato di 4 mesi) e l'ammontare di 72.000 €**  
**Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 1 year (extended by 4 months) and the amount of € 72,000**

---

## Piero Del Boccio

Dipartimento di Farmacia, Unità di Biochimica Analitica e Proteomica,  
Centro Scienze dell'Invecchiamento e Medicina Traslazionale (Ce.S.I-MeT);  
Università degli Studi "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Damiana Pieragostino, Ilaria Cicalini, Maria di Ioia, Giovanna De Luca,  
Mirco Zucchelli, Paola Lanuti, Alessandra Lugaresi, Marco Onofrj**

## Studio del metaboloma delle lacrime per la ricerca di nuovi biomarcatori molecolari nella sclerosi multipla

### PREMESSE E OBIETTIVI

Ad oggi, le indagini di laboratorio più importanti per la diagnosi di sclerosi multipla (SM) sono le bande oligoclonali nel fluido cerebro-spinale (FCS) e una valutazione radiologica attraverso Risonanza Magnetica. Il FCS è certamente il liquido biologico che potrebbe meglio fornire informazioni sui processi patologici che si verificano nel sistema nervoso centrale, ma esso è ottenuto attraverso una procedura invasiva che, per ovvi motivi etici, non può essere facilmente ripetuta.

La ricerca di nuovi biomarcatori di malattia attraverso gli studi "omici" è considerato un approccio utile e innovativo per caratterizzare la disomeostasi molecolare in malattie multifattoriali come la SM. È noto, inoltre, che tra i vari liquidi biologici, le lacrime potrebbero rappresentare una risorsa preziosa per tali studi in quanto l'occhio può essere considerato un prolungamento del SNC e, come tale, può riflettere la sua condizione fisiopatologica.

Già in passato, le lacrime sono state oggetto di studio in questa patologia, ma l'esigua quantità di campione, insieme alla scarsa sensibilità delle tecniche classiche di diagnosi, ne hanno scoraggiato l'utilizzo.

Pertanto l'obiettivo principale di questo progetto pilota è stato quello di utilizzare tecniche altamente sensibili, basate sulla spettrometria di massa, per la caratterizzazione molecolare del fluido lacrimale e del FCS nella SM.

Attraverso questo approccio sperimentale è stato possibile descrivere una possibile correlazione tra i due compartimenti biologici ed individuare specifiche alterazioni molecolari in un fluido biologico più accessibile, aprendo la strada all'identificazione di nuovi potenziali biomarcatori di SM.

### RISULTATI

La prima fase del progetto è stata incentrata sullo studio di possibili alterazioni del metabolismo dei fosfolipidi nella SM. In particolare, attraverso cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) è stato analizzato il profilo di sfingomieline nel FCS. Diverse sfingomieline nel FCS sono risultate meno abbondanti nelle persone con SM rispetto al FCS di pazienti con altre malattie neurologiche (OND), mostrando buona sensibilità e specificità nella riclassificazione della SM. Inoltre, sono stati analizzati i livelli e l'attività della sfingomielinasi acida (ASMasi) nel FCS, un enzima chiave nel metabolismo della sfingomielina. I nostri dati hanno messo in luce bassi livelli di sfingomieline correlati ad una sovra-espressione e ad una maggiore attività della ASMasi nella SM. L'analisi di lipidomica condotta nelle lacrime ha evidenziato una tendenza simile a quella riscontrata nel FCS relativa ai bassi livelli di sfingomieline e all'elevata attività dell'ASMasi nella SM rispetto al gruppo di controllo.

Mediante LC-MS/MS sono stati studiati amminoacidi e acil-carnitine nelle lacrime. Il metodo ha permesso di analizzare fino a 31 acil-carnitine e 18 amminoacidi. Tuttavia, i livelli di carnitine nelle lacrime sembrano non essere rilevanti per la SM. D'altro canto, l'analisi degli amminoacidi ha rivelato livelli molto alti ( $p < 0,001$ ) di serina e treonina nei pazienti con SM rispetto a soggetti di controllo sani (compresi tre OND) e pazienti affetti da glaucoma.

Grazie ai risultati incoraggianti ottenuti, abbiamo approfondito lo studio sulla possibile interconnessione tra FCS e lacrime concentrandoci nella ricerca di Vesicole Extracellulari (VEs) e del loro carico. Analisi condotte mediante citometria di flusso hanno per-

messo di evidenziare un elevato numero di esosomi e una sottopopolazione di essi recanti l'ASMasi, caratterizzanti il FCS di persone con SM. Inoltre, sono state identificate sottopopolazioni di VEs di origine neuronale e microgliale nelle lacrime. Questi risultati sono stati corroborati dall'analisi proteomica di VEs isolate dal FCS e dalle lacrime, mettendo in luce una maggiore somiglianza, in termini di contenuto proteico, tra FCS e lacrime di SM rispetto alle proteine identificate nello stesso fluido biologico di controlli sani (lacrime di controllo), evidenziando specifici *pathways* biologici attivati esclusivamente in persone con SM.

### CONCLUSIONI

I nostri dati preliminari, ottenuti in una coorte clinica pilota, hanno aperto la strada alla comprensione della

bio-relazione tra FCS e lacrime. I risultati più rilevanti sono stati ottenuti dall'analisi di VEs purificate da FCS e lacrime. Questa metodica permette, inoltre, di isolare una specifica sottopopolazione di VEs per l'analisi di proteomica. Infatti, sulla base delle nostre conoscenze, questa è la prima volta che le VEs vengono descritte nelle lacrime e che una sottopopolazione di esse origina da neuroni e dalla microglia, probabilmente con un contenuto proteico specifico. In sintesi, lo studio delle lacrime nei pazienti con SM rappresenta un'applicazione pionieristica che ci ha permesso di acquisire informazioni utili su molecole biologicamente rilevanti per la SM. Sarà necessario un'indagine più approfondita per confermare o meno il potenziale utilizzo delle lacrime come fonte di nuovi biomarcatori molecolari per la SM.

## Study of tears metabolome for the research of new molecular biomarkers in multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

To date, the most important laboratory investigations for the diagnosis of Multiple Sclerosis (MS) are the oligoclonal bands in the Cerebrospinal Fluid (CSF) and a radiological evaluation through Magnetic Resonance. The CSF is certainly the biological fluid that could better provide information on the pathological processes that occur in the Central Nervous System (CNS), but it is obtained through an invasive procedure that, for obvious ethical reasons, cannot be easily repeated. A very active field in MS concerns the search for new biomarkers and "omics" studies are considered a useful and innovative approach to characterize molecular dyshomeostasis in multifactorial diseases such as MS. Moreover, it is known that among the various biological fluids, tears could represent a precious resource for the study of MS since the eye can be considered an extension of the Central Nervous System (CNS) and, as such, it can reflect its physiopathological condition. Already in the past, tears have been studied in this pathology, but the small amount of sample, along with the lack of sensitivity of classical diagnosis techniques, have discouraged its use.

Therefore, the main objective of this pilot project was to use highly sensitive techniques, based on mass spectrometry, for the molecular characterization of

tear fluid and CSF in MS. Through this experimental approach it was possible to study the correlation between the two biological compartments and identify specific molecular alterations in a more accessible biological fluid, opening the way to the identification of new potential biomarkers of MS.

### RESULTS

The first project phase was focused on the study of possible alterations of the phospholipid metabolism in the MS. In particular, the specific profile of sphingomyelins in CSF were studied through Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), followed by multivariate statistical analysis. Several sphingomyelins in CSF resulted less abundant in MS when compared to patients with Other Neurological Diseases (OND), showing good sensitivity and specificity in classifying MS disease. Furthermore, we studied levels of Acid Sphingomyelinase (ASMase), a key enzyme in sphingomyelins metabolism, and its activity in CSF.

Our results, demonstrated significant low levels of sphingomyelins associated to an over expression and to a major ASMase activity in MS, underlying an imbalance of sphingomyelin pathway. By tears lipidomics we highlighted a trend like that of CSF regarding the low levels of sphingomyelins and a high

ASMase activity in MS if compared to healthy people. Moreover, through LC-MS/MS, we analyzed aminoacids and acyl-carnitines. The method allowed to monitor up to 31 acyl-carnitines and 18 amino-acids. However, tears carnitines were found not relevant for MS. Amino-acids analysis in tears, revealed very high levels ( $p < 0.001$ ) of serine and threonine in MS patients compared to healthy control subjects (including three OND) and patients affected by glaucoma. Thanks to the encouraging results obtained, we investigated deeply the possible interconnection between CSF and tears focusing in the research of Extracellular Vesicles (EVs) and their cargo. Moreover, we investigated the ASMase expression on the EVs surface through flow cytometry, highlighting significant high number of exosomes and high ASMase expression in MS CSF. Furthermore, we identified a subpopulation of EVs of neuronal and microglia origin in tears of MS people. These preliminary results were corroborated by proteomics analysis of isolated (sorted) EVs in CSF and tears, showing a major simi-

larity in term of protein cargo and biological pathway between CSF and tears of MS than between the same biological fluid of healthy people (control tears).

## CONCLUSIONS

Our preliminary data, obtained in a pilot clinical cohort, opened the way to the understanding of the bio-relationship between CSF and tears. Our most relevant data were obtained by the analysis of purified EVs derived by CSF and tears. Moreover, this method allows us to isolate a specific EVs subpopulation for proteomics analysis. In fact, on the basis of our knowledge, this is the first time that EVs are described in tears and that there is a subpopulation of them that origin from neurons and microglia carrying a set of specific proteins. In summary, the study of tears in MS patients represented a pioneering application that helped us to recognize information about the biologically relevant molecules. A more exhaustive study will be necessary to confirm if tears could be a source of new molecular biomarkers for MS.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Pieragostino D, Cicalini I, Lanuti P, Ercolino E, di Ioia M, Zucchelli M, Zappacosta R, Miscia S, Marchisio M, Sacchetta P, Onofri M, Del Boccio P. -Enhanced release of acid sphingomyelinase-enriched exosomes generates a lipidomics signature in CSF of Multiple Sclerosis patients. Scientific Report 2018, Feb 15;8(1):3071

Pieragostino D, Cicalini I, Lanuti P, Marchisio M, Fontana A, Zappacosta R, Simeone P, Sacchetta P, di Ioia M, Lugaesi A, Del Boccio P. -Proteomic insights in extracellular microvesicles from CSF and tears of multiple sclerosis patients, 16th Annual World Congress of the Human Proteome Organisation, Dublin on 17-20<sup>th</sup> September 2017

Pieragostino D, Cicalini I, Lanuti P, Marchisio M, Fontana A, Zappacosta R, Simeone P, Sacchetta P, di Ioia M, Lugaesi A, Del Boccio P. -Proteomic insights in extracellular microvesicles from CSF and tears of multiple sclerosis patients, XII Annual Conference of the Italian Proteomics Association 2017, Lecce, 12th - 15th June 2017

Pieragostino D, Cicalini I, Rossi C, Di Ioia M, De Luca G, Zucchelli M, Lugaesi A, Bologna G, Marchisio M, Lanuti P, Del Boccio P. -Study of tears metabolome for the research of new molecular biomarkers in multiple sclerosis. XII Annual Conference of the Italian Proteomics Association 2017, Lecce - 12th - 15th June 2017

Cicalini I, Vergara D, Pieragostino D, Falcone L, Ballerini P, Petragnani N, De Domenico S, Maffia M, Del Boccio P. Characterization of lipid metabolism in the differentiation of oligodendrocytes in myelinating forms. XII Annual Conference of the Italian Proteomics Association 2017 Lecce - 12th - 15th June 2017

Pieragostino D, Cicalini I, Rossi C, di Ioia M, De Luca G, Zucchelli M, Lugaesi A, Bologna G, Marchisio M, Lanuti P, Del Boccio P. -Study of tears metabolome for the research of new molecular biomarkers in multiple sclerosis. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 29-31 maggio 2017

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 1 anno (prorogato di 1 mese) e l'ammontare di 29.500 €**

**Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 1 year (extended by 1 month) and the amount of € 29,500**

---

## Eleonora Piras

Viral Immunology Section, NIH/NINDS, Bethesda, MD, USA,  
Unità di Neuroimmunologia, Fondazione Santa Lucia, Roma

MENTORE / MENTOR: **Steven Jacobson, Luca Battistini**

### Monitoraggio dei linfociti T CD8+ EBV-specifici in malattie demielinizzanti in pazienti sottoposti a trials con nuovi farmaci antivirali

#### PREMESSE E OBIETTIVI

L'insorgenza della sclerosi multipla (SM) è il risultato di una complessa interazione multifattoriale. Anche se l'eziologia e la patogenesi di questa malattia non sono state ancora del tutto definite, dati epidemiologici e studi sui meccanismi che inducono la sclerosi multipla mostrano che l'Epstein-Barr virus (EBV) potrebbe avere un ruolo importante nella patogenesi della SM. Nel nostro precedente lavoro abbiamo dimostrato che nel sangue periferico dei pazienti con sclerosi multipla in fase attiva di malattia, rispetto ai pazienti con MS in fase stabile e ai donatori sani, vi è un aumento nella frequenza di cellule T CD8+ specifiche per gli antigeni della fase litica dell'EBV. Questo studio nasce dalla collaborazione tra l'Unità di Neuroimmunologia della Fondazione Santa Lucia di Roma, diretta dal Dottor Luca Battistini e la Viral Immunology Section del National Institute of Health, NIH (Bethesda) negli Stati Uniti, diretta dal Dottor Steven Jacobson.

Lo scopo del lavoro è stato di approfondire e validare le proprietà fenotipiche e funzionali delle cellule T CD8+ EBV-specifiche nelle malattie demielinizzanti. Abbiamo avuto la possibilità di monitorare la risposta immunitaria di un gruppo di pazienti con la paraparesi spastica tropicale demielinizzante HTLV-1-associata (HAM/TSP). L'HAM/TSP è una malattia cronica e progressiva del midollo spinale che insorge negli individui affetti dal virus HTLV-1. Il decorso clinico di questa malattia è molto simile alla forma primaria progressiva della SM (SMPP), con un costante peggioramento neurologico senza ricadute distinte o periodi di remissione. Sono stati, inoltre, reclutati pazienti arruolati in un trial clinico e trattati con un farmaco antivirale, il Raltegravir, che è stato dimostrato essere capace di interferire con la replicazione di herpes virus, come l'EBV. Abbiamo monitorato gli

effetti del Raltegravir attraverso l'analisi della carica virale di EBV nei pazienti con HAM/TSP prima e dopo trattamento. Raltegravir è anche considerato (e attualmente in uso) in studi clinici sulla SM. Visto il coinvolgimento dei virus nella SM, questo studio si è proposto di valutare l'uso di un farmaco antivirale per il trattamento della malattia.

#### RISULTATI

Abbiamo analizzato la risposta dei linfociti T CD8+ specifici per antigeni della fase latente e litica del virus EBV, per HTLV-1, e per CMV in cellule del sangue periferico di donatori sani, pazienti con SM e pazienti con HAM/TSP attraverso l'uso di tetrameri virus-specifici (sintetizzati dalla Core Facility dell'NIH) e con anticorpi per identificare le popolazioni di interesse e analizzarne il fenotipo. I nostri risultati confermano che sia la prevalenza sia la frequenza dei linfociti T CD8+ EBV-specifici dei pazienti con SM sono significativamente più alte rispetto ai donatori sani e ai pazienti con un'altra malattia demielinizzante come l'HAM/TSP. Lo studio di monitoraggio dei pazienti con HAM/TSP in trattamento con il farmaco antivirale, Raltegravir, ha mostrato che il farmaco non ha effetti né sulla frequenza dei linfociti T CD8+, virus-specifici, valutata tramite citofluorimetria, né sulla carica virale di HTLV-1, valutata tramite la *digital-droplet PCR* (ddPCR). Questi risultati negativi hanno spinto i ricercatori ed i clinici dell'NIH a non procedere verso un trial clinico con questo farmaco nei pazienti con SM. Abbiamo inoltre dimostrato che la frequenza dei linfociti T virus-specifici, ottenuta tramite l'analisi citofluorimetrica, e la carica virale di EBV di linfociti B isolati da pazienti con malattia demielinizzate, ottenuta tramite la tecnica della ddPCR, sono fortemente correlate.

**CONCLUSIONI**

Il nostro studio conferma che i pazienti con SM hanno una risposta immune EBV-specifica maggiore rispetto ai donatori sani e pazienti con un'altra malattia demielinizzante e che le nostre strategie di analisi rappresentano una valida chiave di lettura per monitorare l'efficacia di una terapia immunomodulatoria in pazienti con SM. Questi risultati possono servire da punto di partenza per ulteriori e più dettagliate analisi

che coinvolgano un più grande numero di pazienti, in modo da generare dati con una maggiore significatività statistica. Siamo confidenti che questo approccio analitico sarà seguito da uno studio più dettagliato della risposta virus-specifica e della funzionalità del sistema immunitario a seguito del trattamento con nuovi farmaci antivirali in pazienti con malattie croniche progressive, come la sclerosi multipla.

## Monitoring EBV-specific CD8+ T cells in demyelinating disease in patients undergoing trials with novel antiviral drugs

**INTRODUCTIONS AND AIMS**

Multiple sclerosis (MS) is a multifactorial disease associated with environmental and genetic factors in which the etiology and pathogenesis are not yet well defined. Epidemiological data and studies on the mechanisms that underlie MS suggest an important role for Epstein-Barr virus (EBV) in its pathogenesis. This project relies on a collaboration between the Neuroimmunology Unit, Saint Lucia Foundation in Rome, directed by Dr. Luca Battistini and the Viral Immunology Section, NIH, Bethesda, USA, directed by Dr. Steven Jacobson. This collaboration aimed at deepening and validating the phenotypic and functional properties of EBV-specific CD8+ T cells in demyelinating disease, in particular in patients with MS. In addition, we have had the unique opportunity to study a group of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients.

HAM/TSP is a chronic and slowly progressive disease of the spinal cord, which affects a subset of people infected with the HTLV-1 virus. The clinical course of HAM/TSP is most similar to the primary-progressive form of MS (PPMS) in that there is a steady worsening of neurological functioning without any distinct relapses or periods of remission. We have recruited HAM/TSP patients in a clinic trial with Raltegravir, which has been suggested to also inhibit Herpes viruses such as EBV. We have monitored the effect of Raltegravir through the analysis of EBV viral load in HAM/TSP patients before and after the clinical trial. Raltegravir is also being considered (and is currently being used) in clinical trials in MS. This study has helped inform the use of these anti-viral treatments

in MS, a disease in which viruses have been thought to play a role.

**RESULTS**

To evaluate the CD8+ T cell response to EBV, latent and lytic antigens, to HTLV and to CMV, frozen PBMCs from normal donors, MS and HAM/TSP patients were stained with fluorochrome-labeled tetramers (synthesized by Core Facility of NIH) and antibodies to isolate the populations of interest and analyze their phenotype. Our results confirm that both the prevalence and the frequency of CD8+ EBV-specific T cells patients are higher in MS compared to normal donors and another demyelinating disease, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. These results confirm that the dysregulation of the EBV specific immune responses is a specific feature in MS and it is not associated with other demyelinating diseases. The follow-up study of HAM/TSP patients under treatment with the new antiviral drug, Raltegravir showed that the drug did not affect the frequency of virus specific CD8+ T cells, evaluated by flow cytometry, nor the HTLV-I viral load, evaluated by digital-droplet PCR (ddPCR). These negative results have prompted the NIH not to proceed with the clinical trial in MS patients with this drug. By analyzing with flow cytometry techniques the tetramer-positive virus-specific T cells and by studying through digital PCR both PBMCs and sorted B cells isolated from patients with demyelinating diseases, we demonstrated that the frequency of CD8+ virus-specific and the EBV viral load are strongly associated.

### CONCLUSIONS

By analyzing with flow cytometry the tetramer-positive virus-specific T cells and by studying through digital PCR both PBMCs and sorted B cells isolated from patients with demyelinating diseases, we demonstrated that the frequency of CD8+ virus-specific and the EBV viral load are strongly associated. Thus, our strategy confirms that MS patients have a higher EBV-specific immune response compared to normal donors and patients with another demyelinating disease and, also, our strategy represents a

valuable readout to monitor therapeutic efficacy in MS patients undergoing immunomodulatory therapies. These results may serve as a starting point to launch further and more detailed analysis involving a greater number of patients, in order to generate results with greater statistical significance. We are confident that these approaches will allow for a more detailed study of virus-specific responses and functionality of novel anti-viral drug in patients with chronic progressive neurologic diseases, like multiple sclerosis.

---

### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Piras E, Angelini DF, Guerrera G, Borsellino G, Aloisi F, Salvetti M, Battistini L, Jacobson S. Monitoring EBV-specific CD8+ T cells in demyelinating disease in patients undergoing trials with novel antiviral drugs. XXV AINI Congress, Lecce, Italy, May 11-14, 2016

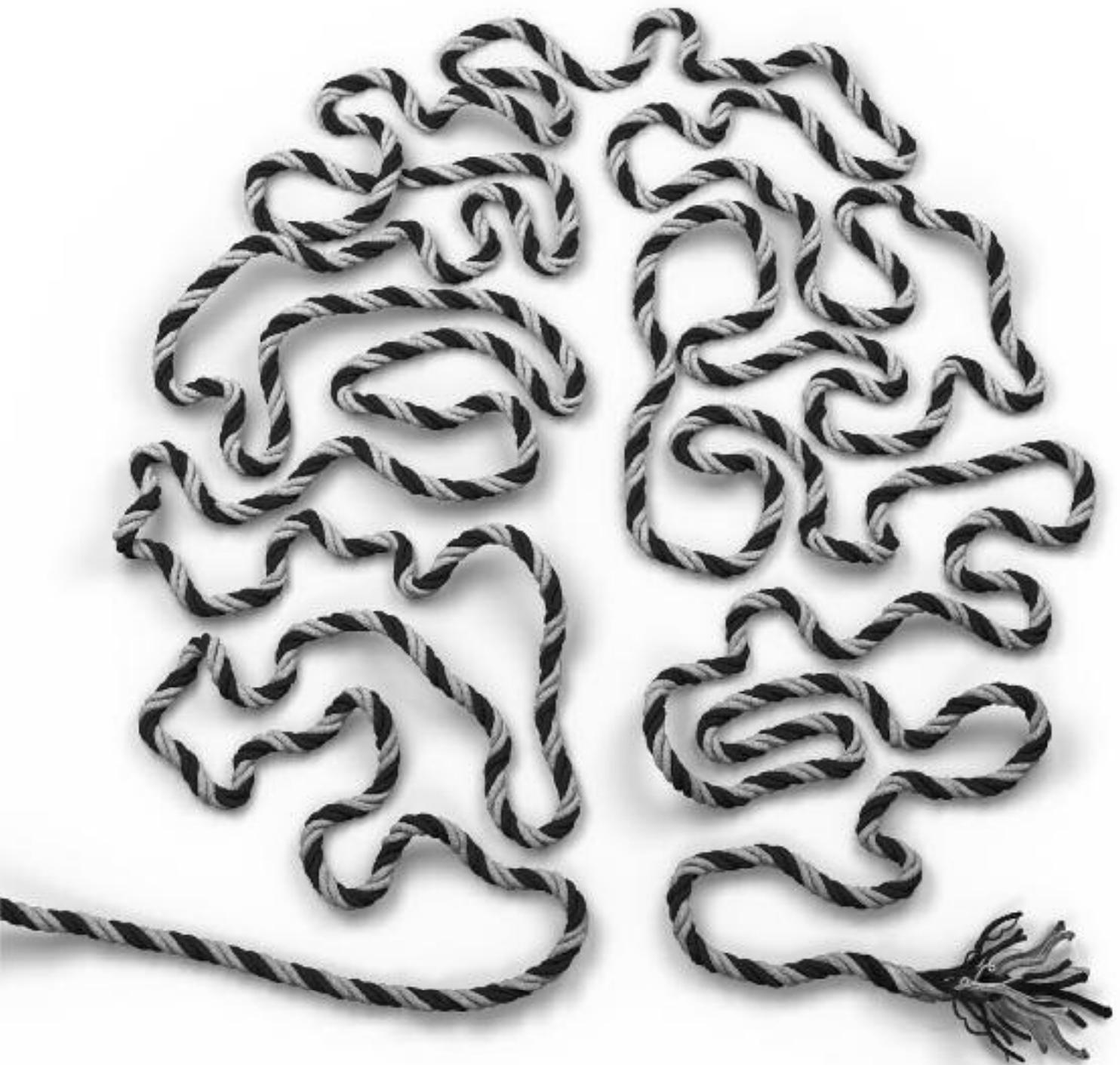
Amadio S, Parisi C, Piras E, Fabrizio P, Apolloni S, Montilli C, Luchetti S, Ruggieri S, Gasperini C, Laghi-Pasini F, Battistini L, Volonté C. Modulation of P2X7 receptor during inflammation in multiple sclerosis. *Frontiers Immunology*. Nov 15, 2017

---

**Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 73.000 €**

**Research Fellowship funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years and the amount of € 73,000**

---



# **PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO**

*PATHOGENESIS AND RISK FACTORS*

## Rosella Mechelli

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

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Giovanni Ristori, Marco Salvetti**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Renato Umeton**, Clinical & Translational Informatics Department, Dana-Farber  
Cancer Institute, Boston, MA, USA

**The International Multiple Sclerosis Consortium & the Wellcome Trust Case  
Control Consortium 2**, Oxford, United Kingdom

**Cinthia Farina, Sundararajan Srinivasan**, Institute of Experimental Neurology  
(INSpe) and Division of Neuroscience, San Raffaele Scientific Institute,  
Milan, Italy

**Richard Reynolds**, UK Multiple Sclerosis Tissue Bank, Wolfson Neuroscience  
Laboratories, Imperial College London Faculty of Medicine, Hammersmith Hospital  
Campus, UK

**Roberta Magliozzi**, Neurology B, Department of Neurosciences, Biomedicine and  
Movement, University of Verona, Verona, Italy and UK Multiple Sclerosis Tissue Bank,  
Wolfson Neuroscience Laboratories, Imperial College London Faculty of Medicine,  
Hammersmith Hospital Campus, UK

## Approccio di tipo “interattoma-candidato” nella sclerosi multipla: dall’interazione geni-ambiente alla caccia dei bersagli terapeutici

### PREMESSE E OBIETTIVI

Gli studi di associazione genetica su tutto il genoma (GWAS) stanno migliorando la nostra comprensione della biologia delle malattie multifattoriali.

Recentemente abbiamo iniziato ad esplorare l’opportunità di estrarre informazioni sul ruolo dell’ambiente nella sclerosi multipla (SM) attraverso i GWAS: in un’analisi del primo studio GWAS pubblicato sulla SM, abbiamo cercato arricchimenti statistici di associazioni tra “interattomi candidati” (geni cui i prodotti proteici sono noti per interagire fisicamente con fattori ambientali che possono essere rilevanti per la patogenesi della malattia) di rilevanza plausibile, incerta o improbabile per la patogenesi della SM.

In questo primo lavoro esplorativo, l’interazione tra genotipo dell’ospite e virus di Epstein Barr (EBV) sembra essere rilevante per l’eziologia della SM. Anche altri virus hanno mostrato un potenziale simile.

Per confermare i risultati ottenuti in precedenza e per comprenderne meglio la specificità e le implicazioni funzionali, abbiamo iniziato un nuovo studio che include risultati dei GWAS sulla SM più recenti e quelli di altre malattie multifattoriali e nuovi interattomi potenzialmente rilevanti anche per le altre patologie prese in considerazione.

### RISULTATI

Abbiamo ottenuto 20 interattomi dalla letteratura: 9 virus, 1 batterio, 10 fattori cellulari (9 proteine e 1 collezione di RNA target di miRNA). Sei sono stati curati manualmente [EBV, virus dell’epatite B (HBV), Citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma di Kaposi HHV8 (HHV8), virus JC (JCV), Inflammasoma], sette sono stati ottenuti da database di interazioni molecolari [Regolatore autoimmune (AIRE), recettore della vitamina D (VDR), recettore arilico di idrocarburi

(AHR), Sirtuin 1 (SIRT1), Sirtuin 7 (SIRT7) (BIOGRID <http://thebiogrid.org>), Polyomaviridae (VirusMentha database), RNA target di microRNA umani (miRecords database)], sette sono stati ottenuti da pubblicazioni che hanno utilizzato approcci sperimentali ad alta tecnologia [proteine umane bersaglio di 70 proteine virali (VIRORF), virus dell'immunodeficienza umana (HIV), virus dell'epatite C (HCV), interferone di tipo I (h-IFN), virus dell'influenza H1N1 (H1N1), istone deacetilasi (HDAC), Chlamydia].

Abbiamo usato il programma ALIGATOR (Association Lst Go AnnoTatOR) per cercare l'arricchimento statistico delle associazioni tra i 20 interattomi selezionati e i dati GWAS ottenuti da SM e altre malattie complesse (diabete di tipo 1 e tipo 2, artrite reumatoide, malattia infiammatoria intestinale, disturbo bipolare, ipertensione, malattia coronarica; ottenuti da Wellcome Trust Case Control Consortium), considerando SNP con un  $p < 0,05$  di associazione con le malattie.

Abbiamo studiato le associazioni all'interno di ciascuno degli interattomi mostrando che nel complesso i virus sono gli interattomi più associati alla SM: in particolare, gli herpes virus (CMV e HHV8) e principalmente EBV. Abbiamo poi confrontato l'analisi eseguita sulla SM con quella eseguita su altre malattie complesse, osservando che l'associazione con gli herpes virus, è un tratto specifico per la SM, non condiviso con altri disordini immuno-mediati.

Per valutare se i geni degli interattomi responsabili dell'associazione con la SM hanno una rilevanza funzionale, abbiamo analizzato le liste di espressione genica dal sangue periferico di persone con diverse forme di SM (sindrome clinicamente isolata, CIS, SM

recidivante remittente, RR, SM primariamente progressiva, PP, e SM secondariamente progressiva, SP; collaborazione con Cinthia Farina) e da aree corticali di cervelli post-mortem di soggetti con SM (collaborazione con Roberta Magliozzi e Richard Reynolds). Questa analisi ha mostrato che i geni nominalmente associati alla SM (attraverso l'analisi interattomica), sono arricchiti tra quelli differenzialmente espressi, e che i geni provenienti dall'interattoma di EBV sono quelli maggiormente disregolati sia nel circolo periferico delle SMPP, che nel tessuto cerebrale.

## CONCLUSIONI

Questo studio conferma ampiamente i nostri dati preliminari sulla rilevanza dell'interazione tra genotipo dell'ospite e virus (EBV e altri herpesvirus) per l'eziologia della SM. Questo risultato sembra essere specifico per la SM in quanto non è osservato in altre malattie, comprese le condizioni di origine immuno-mediata. Nella SM, queste interazioni coincidono con un'alterazione dell'espressione genica ed hanno una valenza funzionale, soprattutto nell'interazione tra EBV e la predisposizione genetica alla SM. Questa alterazione è più pervasiva a livello del sistema nervoso centrale rispetto al compartimento del sangue periferico in cui è rilevata nelle SMPP e non in campioni di pazienti con forme RR o SP. Questa conferma a livello funzionale è importante in quanto offre una chiave interpretativa a livello eziologico. Nonostante le differenze tra i due compartimenti possano essere dovute a differenze metodologiche, è interessante che il risultato più netto sia emerso nel sistema nervoso centrale, in cui la biologia della malattia è più strettamente legata alla sua eziologia.

## A “candidate-interactome” approach in multiple sclerosis: from gene-environment interplay to therapeutic target hunting

### INTRODUCTION AND AIMS

Genome-wide association studies (GWAS) are improving our understanding of multifactorial disease biology.

Recently we began to explore the opportunity of extracting information about environmental causation from GWAS in multiple sclerosis (MS): in an analysis of the first MS-GWAS data, we looked for statistical enrichments of associations among “candidate interactomes” (modules of genes whose products are known to physically interact with environmental factors that may be relevant for disease pathogenesis) of plausible,

uncertain, or unlikely relevance for MS pathogenesis. In this exploratory effort, the interaction between host genotype and Epstein Barr virus (EBV) appeared to be relevant for multiple sclerosis etiology. Also other viruses displayed a similar potential.

To confirm the results previously obtained, and to better understand their specificity and functional implications, we attempted to replicate the previous findings in a study that includes more recent MS-GWAS results, GWAS from other multifactorial diseases, and additional interactomes of diverse potential relevance for these other conditions.

## RESULTS

We obtained 20 candidate interactomes from the literature: 9 viruses, 1 bacterium, 10 cellular factors (9 proteins and 1 noncoding RNAs targets repository). Six were manually curated [Epstein-Barr virus (EBV), Hepatitis B virus (HBV), Cytomegalovirus (CMV), HHV8 Kaposi sarcoma virus (HHV8), JC virus (JCV), Inflammasome], 7 were obtained from databases of molecular interactions [Autoimmune regulator (AIRE), Vitamin D receptor (VDR), Aryl hydrocarbon receptor (AHR), Sirtuin 1 (SIRT1), Sirtuin 7 (SIRT7) (BIOGRID <http://thebiogrid.org>), Polyomaviridae (VirusMentha database), Human-microRNA targets (miRecords database)], 7 were obtained from publications that used high-throughput experimental approaches [proteins targeted by 70 innate immune-modulating viral open reading frames from 30 viral species (VIRORF), Human immunodeficiency virus (HIV), Hepatitis C virus (HCV), human innate immunity interactome for type I interferon (h-IFN), H1N1-influenza (H1N1) histone deacetylases (HDAC), Chlamydia]. We used ALIGATOR program (Association List Go AnnoTatOR) to search for statistical enrichment of associations between the 20 selected interactomes and GWAS data obtained from MS and other complex diseases (type 1 and type 2 diabetes, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, bipolar disorder, hypertension, coronary artery disease; Wellcome Trust Case Control Consortium), considering SNPs with a  $p$ -value  $< 0.05$  of association with the diseases. We investigated the associations within each one of the above interactomes showing that overall the viruses are the interactomes more associated with MS: specifically, herpes viruses (CMV and HHV8) and mainly EBV. We compared the interactome analysis performed on MS with that performed on other complex diseases: the association with herpes virus, is a trait specific for MS, not shared with other immune mediated disorders. To evaluate whether interactome's genes responsible for the association with MS have a functional relevance, we ana-

lyzed gene expression lists from the peripheral blood of persons with different form of MS (CIS, RRMS, PPMS and SPMS; collaboration with Cinthia Farina) and from cortical areas of post-mortem MS brains (Collaboration with Roberta Magliozzi and Richard Reynolds). This analysis allowed us to verify that genes nominally associated with MS (through the interactome approach), are more frequently present among differentially expressed genes, being the genes coming from EBV interactome the most dysregulated in both blood samples (in PPMS) and brain tissues.

## CONCLUSIONS

This study largely confirms our preliminary data on the relevance of the interaction between host genotype and viruses (EBV and other herpesviruses) for MS etiology. This result appears to be specific for MS as it is not observed in other diseases, including conditions of immune-mediated origin. In MS, these interactions coincide with dysregulated gene expression. The identification of the interaction between EBV and the genetic predisposition to MS as a factor relevant to disease etiology, provides a fair framework to interpret functional effects at the gene expression level. In so doing, exploiting gene expression lists from the peripheral blood of persons with MS and from cortical areas of post-mortem MS brains, we show that the expression of MS-associated genes, that are part of the EBV interactome, is altered. This alteration is more pervasive at the central nervous system (CNS) level compared to the peripheral blood compartment where it could be detected in PP-MS and not in samples from patients with RR- or SP-MS. This confirmation at the functional level is important as it offers an interpretative key at the etiological level. Despite the differences among the two compartments may be due to methodological differences, it is interesting that the more clear-cut result emerged from the CNS, where the biology of the disease is more closely linked to its etiology.

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Mechelli R, Umeton R, Reniè R, IMSGC-WTCCC, Ristori G, Salvetti M. Different environmental stimuli may activate common biological processes potentially involved in multiple sclerosis. 7th Joint ECTRIMS - ACTRIMS Meeting, Paris 25-28 October 2017

Mechelli R, Umeton R, Reniè R, IMSGC-WTCCC, Ristori G, Salvetti M. A "candidate interactome" approach to refine the role of environmental stimuli in multiple sclerosis. XXVI AINI Congress and 16<sup>th</sup> ESNi course, San Servolo Island, Venice (IT) 26-30 June 2017

Mechelli R, Umeton R, IMSGC-WTCCC2, Ristori G, Salvetti M. Gene-environment interaction study in multiple sclerosis. XLVII Congresso Società Italiana di Neurologia (SIN), Venezia (IT) 22-25 October 2016

Mechelli R, Umeton R, IMSGC-WTCCC2, Ristori G, Salvetti M. Gene environment interaction study in multiple sclerosis using a "candidate interactome" approach. 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), London (UK) 14-17 September 2016

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 81.000 €**

**Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years and the amount of € 81,000**

## Marco Patrone

Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive,  
Fondazione Centro San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Claudia Minici, Paola Tornaghi**

# Caratterizzazione molecolare di varianti protettive e di rischio nella SM dell'antigene nucleare 2 del virus di Epstein-Barr

## PREMESSE E OBIETTIVI

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è presente nel 90% della popolazione ed è fortemente collegato al rischio di sviluppare la sclerosi multipla (SM), ma manca ancora un'ipotesi chiara e definita sui meccanismi molecolari che fanno di uno dei virus umani più diffusi al mondo, un fattore di predisposizione in alcune persone.

Recenti studi hanno mostrato che alcune varianti genetiche di EBV sono a rischio di SM, mentre altre risultano protettive, spiegando in parte la discrepanza fra diffusione relativamente bassa dell'SM e globale di EBV.

Dopo la fase acuta, EBV entra in latenza nei linfociti B (le cellule che producono gli anticorpi) e ne condiziona la funzione consentendo la sopravvivenza del virus e la sua persistenza nell'ospite senza conseguenze patologiche nella maggior parte dei casi. Si sospetta che i linfociti B infettati in forma latente siano coinvolti nei meccanismi alla base della SM. La proteina virale EBNA2 è il regolatore del programma genetico della latenza di EBV nei linfociti B. Proprio varianti naturali di EBNA2 (identificate nei laboratori dell'Università Sapienza di Roma diretti dai Dott. Marco Salvetti e Giovanni Ristori) mostrano un gradiente di associazione con la SM, dal rischio alla protezione. EBNA2 ha bisogno di una proteina umana, chiamata RBPJ, per esercitare la sua azione.

Il nostro progetto avvia lo studio biochimico con tecniche ad alta risoluzione dell'interazione tra queste due proteine per comprendere gli effetti che le varianti genetiche identificate in EBNA2 hanno sul legame con RBPJ. Lo scopo è collegare le evidenze epidemiologiche con i fenomeni molecolari nelle cellule infettate e raccogliere dati utili che possono avere un importante impatto nella gestione della SM, dalla predizione del rischio allo sviluppo di approcci per prevenire o curare la malattia.

## RISULTATI

Il nostro progetto ha rappresentato uno studio di fattibilità per la caratterizzazione biochimica e con la metodologia della biocristallografia in diffrazione ai raggi X delle proprietà di varianti naturali della proteina EBNA2, in relazione alla SM. Ci siamo mossi in questo modo per verificare preliminarmente quale fosse il margine di manovra per raggiungere gli scopi scientifici che ci proponiamo nello studio del collegamento tra EBV e SM.

L'obiettivo generale era quello di ottenere i reagenti biochimici necessari (le proteine EBNA2 e RBPJ umana) e valutarne la qualità rispetto alla loro proprietà nota di interazione reciproca. Per ottenere l'elevato grado di purezza e le quantità richieste dalla biochimica strutturale, abbiamo esplorato più di 700 variazioni tra versioni artificiali di EBNA2 e protocolli di sintesi, riuscendo a trovare una combinazione in grado di fornire materiale in quantità e qualità necessarie. Successivamente, abbiamo misurato la stabilità dell'interazione tra EBNA2 ed RBPJ, ovvero la loro costante di dissociazione, come metro di riferimento per la futura analisi comparativa delle varianti di rischio e protezione identificate geneticamente.

Nel complesso, il progetto ha raggiunto gli obiettivi proposti, indicandoci la via per proseguire il nostro programma di studio.

## CONCLUSIONI

L'analisi diretta degli effetti delle varianti genetiche identificate sulla funzione di EBNA2 farà luce sui meccanismi molecolari, spiegando così i dati epidemiologici. I risultati ottenuti dal nostro progetto ci consentono di contribuire nel medio termine ed in maniera rilevante alla comprensione della relazione genotipo-fenotipo di EBNA2, svelando i meccanismi patogenetici che legano EBV alla SM.

D'altra parte, i tentativi di colpire l'infezione da EBV per ridurre la progressione e la gravità dell'infiammazione cerebrale nei pazienti con sclerosi multipla hanno portato a risultati promettenti, sebbene ancora molto limitati. L'interazione EBNA2-RBPJ è vitale affinché EBV persista nei linfociti B e gli studi che stiamo effettuando hanno due ricadute in una prospettiva terapeutica: i) l'implementazione di saggi

quantitativi che misurino l'interazione EBNA2-RBPJ rende possibile lo *screening* di inibitori di attivi contro la latenza EBV; ii) la classificazione basata sulla struttura delle varianti EBNA2 per il rischio di SM contribuisce allo sviluppo di protocolli di valutazione del rischio per le pratiche di *check-up* ravvicinato nei pazienti con SM.

## Molecular characterization of the protective and risk variants of Epstein-Barr nuclear antigen 2 in multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

Epstein-Barr virus (EBV) is present in 90% of the population and is strongly linked to the risk of developing multiple sclerosis (MS), but a clear and defined hypothesis is missing about the molecular mechanisms that make one of the human viruses most widespread in the world, a factor of predisposition in some infected individuals. Recent studies have shown that some genetic variants of EBV are at risk for MS, while others are protective, partly explaining the discrepancy between relatively low diffusion of the SM and global EBV.

After the acute phase, EBV enters latency in B cells (the cells that produce antibodies) and conditions its function allowing the survival of the virus and its persistence in the host without pathological consequences in most cases. It is suspected that the latently infected B lymphocytes are involved in the mechanisms underlying MS. The EBNA2 viral protein is the regulator of the genetic program of EBV latency in B lymphocytes. Just natural variations of EBNA2 (identified in the laboratories of Sapienza University in Rome directed by Dr. Marco Salvetti and Giovanni Ristori) show a gradient of association with the multiple sclerosis, from risk to protection. EBNA2 needs a human protein, called RBPJ, to exert its action.

Our project starts the biochemical study with high resolution techniques of the interaction between these two proteins to understand the effects that the genetic variants identified in EBNA2 have on the binding with RBPJ.

The aim is to link epidemiological evidence with molecular phenomena in infected cells and to collect useful data that can have an important impact on the management of MS, from risk prediction to the de-

velopment of approaches to prevent or treat the disease.

### RESULTS

Our project represented a feasibility study for the biochemical characterization also by the X-ray diffraction biocrystallography of the properties of natural EBNA2 protein variants in the frame of MS. We have moved this way to preliminarily assess the way to achieve the scientific purposes of studying of the link between EBV and MS. The overall aim was to obtain the necessary biochemical reagents (EBNA2 and human RBPJ proteins) and to evaluate their quality with respect to their known properties of mutual interaction.

To achieve the high degree of purity and the quantities required by structural biochemistry, we explored more than 700 variations comprising artificial versions of EBNA2 and synthesis protocols, managing to find a combination capable of supplying the needed material for quantity and quality. Subsequently, the EBNA2-RBPJ binding stability, i.e. the dissociation constant of the binary protein complex, has been measured as a reference for future comparative analysis of risk and protection variants identified genetically.

Overall, the project has achieved the proposed objectives, tracing the path for the continuation of our study program.

### CONCLUSIONS

The direct analysis of the effects of the genetic variants identified on EBNA2 function will shed light on molecular mechanisms, thus explaining the epidemiological data. The results obtained by our project

allow us to contribute in the mid-term and in a relevant way to the understanding of the genotype-phenotype relationship of EBNA2, revealing the pathogenic mechanisms that link EBV to MS.

On the other hand, attempts to target EBV infection to reduce the progression and severity of brain inflammation in patients with multiple sclerosis have led to promising, yet limited, results.

The EBNA2-RBPJ interaction is vital for EBV to per-

sist in B lymphocytes and the studies we are performing have two tails in a therapeutic perspective: i) the implementation of quantitative assays that measure the EBNA2-RBPJ interaction makes inhibitor screening possible to target EBV latency; ii) the classification based on the EBNA2 variant structures for MS risk contributes to the development of risk assessment protocols for close check-up in MS patients.

## Eliana Marina Coccia

Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Martina Severa, Fabiana Rizzo, Elena Giacomini**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Cynthia Farina**, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE) della Fondazione Centro San Raffaele, Milano, Italia

**Marco Salvetti**, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Sapienza Università di Roma, Centro di Sclerosi Multipla dell'Ospedale Sant'Andrea Roma, Roma, Italia

**Paul Hertzog**, Monash University, Clayton, Australia

## Analisi dell'INTERFEROME nella SM: alla ricerca di vie del segnale alterate

### PREMESSE E OBIETTIVI

Tra le diverse cause della sclerosi multipla (SM) si pensa che un'infezione virale possa rappresentare, in individui geneticamente predisposti, uno dei principali eventi scatenanti la malattia. In linea con questa ipotesi diverse pubblicazioni hanno dimostrato il legame tra mutazioni e varianti geniche associate ai meccanismi di segnale dell'Interferone (IFN) di tipo I, una nota e ben caratterizzata citochina dalle proprietà antivirali. Tuttavia in nessuna di queste pubblicazioni è stata condotta un'analisi dello stato antivirale nei pazienti senza terapia.

Per colmare questa lacuna, nel presente progetto ci siamo proposti di confrontare l'espressione genica associata all'azione di questa citochina antivirale sia in persone con SM recidivante e remittente che in soggetti di controllo appaiati per sesso ed età utilizzando il database "Interferome" (<http://www.interferome.org>) in modo da selezionare geni la cui espressione risultasse selettivamente alterata. Il vantaggio di utilizzare questo specifico database consiste principalmente nel poter ottenere una visione complessiva di possibili alterazioni dei pathway associati all'IFN difficilmente ottenibile dall'utilizzo di altri database in quanto *Interferome* contiene la più vasta collezione di dati di microarray pubblicati finora riferibili all'IFN.

Partendo da questi presupposti abbiamo voluto analizzare eventuali anomalie del sistema IFN in due specifiche popolazioni linfocitarie ovvero i linfociti B e i monociti. L'interesse per queste due sottopopolazioni nasce da nostre precedenti osservazioni in cui dimo-

stravamo che l'interazione tra monociti e cellule B è importante per il differenziamento di quest'ultime in cellule secernenti immunoglobuline e che, inoltre, un elemento importante per questo processo è rappresentato dal recettore Toll 7, un gene regolato dall'IFN di tipo I ed allo stesso tempo un potente induttore della produzione di questa citochina. Studi comparativi tra cellule ottenute da pazienti e quelle di donatori di controllo hanno evidenziato che i meccanismi indotti da TLR7 sono alterati nei pazienti. Questa evidenza e l'osservazione che sia i monociti che le cellule B sono i bersagli dell'infezione dal virus Epstein Barr (EBV) e da retrovirus endogeni, entrambi importanti fattori eziologici della SM, hanno posto le basi per la formulazione dell'ipotesi caratterizzante il nostro progetto ovvero: è possibile che l'alterata espressione dei geni indotti dall'IFN (IRG) in queste due popolazioni leucocitarie sia responsabile di un'inefficace risposta antivirale nei pazienti?

Per rispondere a questo quesito abbiamo utilizzato il database *Interferome* per analizzare in campioni di PBMC, monociti e linfociti B di pazienti e donatori di controllo appaiati per sesso ed età al fine di scoprire, validare e caratterizzare nuovi pathways e meccanismi associati all'IFN di tipo I, nonché a definire nuovi networks tra linfociti B e monociti ed, infine, per meglio comprendere i meccanismi indotti dalle terapie di prima linea della SM, quali IFN-beta e Copaxone.

### RISULTATI

Per raggiungere gli obiettivi prefissati abbiamo dise-

gnato due studi paralleli che ci hanno consentito di caratterizzare le alterazioni del sistema IFN.

Da un lato abbiamo analizzato gli IRG attraverso il database *Interferome* su dati già pubblicati e relativi a più di 400 trascrittomi ottenuti da PBMC totali di pazienti con SM in diverse fasi della malattia severa, oltre che dati ottenuti da pazienti RRMS prima e dopo trattamento con IFN-beta comparati con PBMC di donatori di controllo. Inoltre sono stati anche analizzati dati di trascrittomici di tessuti del sistema nervoso centrale e linfociti T CD4 prelevati da topi con encefalite allergica sperimentale (ESA) sempre in confronto con topi sani [Srinivasan S. et al., *Sci. Rep.* 2017].

Oltre a questo approccio abbiamo anche eseguito una analisi più mirata utilizzando RNA estratto da linfociti B e monociti isolati dal sangue periferico di 25 pazienti con la forma remissiva e recidivante della malattia e 25 donatori di controllo al fine di identificare in maniera selettiva e specifica per i due tipi cellulari eventuali alterazioni del sistema IFN.

Nel primo studio abbiamo affrontato l'analisi degli IRG nel modello murino ESA identificando variazioni importanti di questi geni sia nei campioni di tessuto cerebrale che nei linfociti CD4 che correla perfettamente con quanto descritto in letteratura sulla rilevanza di queste citochine nella patogenesi della SM. Inoltre, l'analisi dei 400 trascrittomi derivati da PBMC di pazienti confrontati con donatori di controllo mostra che, mentre l'espressione di un core di 21 geni risulta essere alterata nei pazienti verso individui di controllo, un numero consistente di IRG è invece significativamente modulato nelle diverse fasi della malattia. Tra 100 IRG, che sono stati validati in una corte caso-controllo, 53 risultano essere presenti anche tra quelli indotti in vivo dal trattamento con IFN-beta.

L'induzione da parte dell'IFN-beta di due di questi geni associati alla malattia, l'arrestin-beta 1 (ARRB1) e calcineurin like EF-hand protein 1 (CHP1), è stata anche confermata in corti di validazioni costituite sia da campioni *ex vivo* di PBMC ottenuti da pazienti prima dell'inizio che in corso di terapia che da PBMC trattati *in vitro* con dell'IFN-beta.

L'insieme di questi dati ci consente di proporre alcuni di questi geni indotti dall'IFN come nuovi biomarkers sia per monitorare l'efficacia della terapia che per seguire l'andamento della malattia.

Oltre a questo studio abbiamo anche condotto analisi di dati di microarray ottenuti da campioni di RNA da cellule B e monociti isolate da pazienti e donatori di controllo appaiati per sesso ed età. I dati ottenuti sono stati poi analizzati con il database *Interferome* (versione aggiornata di Settembre 2015). Da questo screening 1142 IRG sono risultati presenti nel trascrittoma delle cellule B e 1156 in quello dei monociti, tut-

tavia solo 285 geni presentano un livello alterato nelle cellule B e 158 nei monociti dei pazienti rispetto ai donatori di controllo.

La successiva analisi di gene ontology e di pathway ha indicato modificazioni di diversi processi specifiche per ogni tipo cellulare, modificazioni che sono state validate sia a livello molecolare che biologico su una nuova corte arruolata ad-hoc per questo scopo costituita da 28 pazienti ed 11 donatori di controllo da cui sono stati isolati linfociti B e monociti.

In particolare, abbiamo osservato nelle cellule B dei pazienti alterazioni nel pathway implicato nella risposta antivirale mentre nei monociti si sono osservate modifiche dei pathways associati alla trasduzione del segnale delle citochine. Geni collegati al pathway dell'apoptosi, in particolare la caspasi 3, risultano invece essere alterati sia nei monociti che nelle cellule B dei pazienti rispetto ai donatori di controllo.

In conclusione, il nostro studio svela un deficit specifico nelle risposte anti-virali nelle cellule B degli individui con SM, un dato questo che stiamo ulteriormente investigando avendo bene in mente il ruolo peculiare delle cellule B come *reservoir* del virus di Epstein-barr, che sempre più evidenze indicano essere associato con la SM. Inoltre, tra i *pathways* IFN-regolati comunemente alterati nelle cellule B e nei monociti dei pazienti, i nostri risultati indicano una forte induzione dei segnali intracellulari che portano all'apoptosi in entrambe le popolazioni studiate. I segnali di stress e la continua infiammazione in atto negli individui con SM potrebbero, infatti, alterare lo stato differenziativo di queste cellule determinando il loro destino cellulare ed avendo, di conseguenza, un forte impatto sullo sviluppo e decorso della patologia.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo progetto evidenziano differenze significative di diversi processi regolati dagli IFN in PBMC ma anche in cellule B e monociti dei pazienti rispetto ai donatori di controllo. La comprensione di queste alterazioni può aiutare a definire nuovi aspetti della patogenesi della SM verso cui orientare approcci terapeutici innovativi o per migliorare quelli già esistenti.

Inoltre, questo studio ha identificato anche altri pathway che includono diverse protein chinasi ed i loro bersagli molecolari, quali MAPK, cascata ERK ed NF-kB, fosforilazione delle proteine, regolazione della trascrizione e trasduzione del segnale, che meriterebbero un approfondimento al fine di assegnargli un significato patogenetico nonché di validare meccanismi specifici associati a geni, gruppi di geni o networks regolati dal sistema IFN che risultano essere selettivamente alterati nella SM.

## Analysis of INTERFEROME in MS: searching for dysregulated pathways

### INTRODUCTION AND AIMS

The etiology of multiple sclerosis (MS) is still unknown, although virus-triggered immunopathology operating on a background of genetic susceptibility represents the most likely cause. Despite several published genome-wide association studies (GWA) identified a deregulated expression of different single nucleotide polymorphisms (SNP) and variants involved in type I Interferon (IFN) signaling and antiviral pathways, no study has systematically analyzed the antiviral state in therapy-free MS patients.

Our proposal aims to fill this gap of knowledge by using the “*Interferome*” database (<http://www.interferome.org>) to select differentially expressed genes (DEG) related to the IFN signaling in therapy-free Relapsing-remitting (RR) MS patients and healthy donors (HD). *Interferome* database contains a compilation of the available microarray datasets generated so far, that enables a more comprehensive vision of the IFN response in different circumstances than any single dataset provides.

Our previously published results indicate that the crosstalk between B cells and monocytes is necessary for B cell differentiation into Ig-producing cells and requires signaling via the nucleic acid-sensing TLR7, an IFN-regulated gene (IRG) and potent inducer of type I IFN. We found this crosstalk dysregulated in MS patients. It is noteworthy that B cells and monocytes are also target of infection of Epstein-barr virus and human endogenous retroviruses, two classes of virus associated with MS pathogenesis.

It is therefore conceivable that a dysregulated expression of IRG in these cell types may lead to defective antiviral response in MS. Thus, to shed light on cell type-specific alterations that could contribute to understand in-deep MS immunopathogenesis, in this project we proposed to investigate the *Interferome* in paired PBMC, monocytes and B cells by performing comparative microarray analyses in RRMS patients and sex- and age-matched healthy individuals to discover, validate and characterize new IFN-linked deregulated pathways and networks in MS B cells and monocytes and understand the effects induced by the current first-line therapies for RRMS, namely IFN-beta and Copaxone, on these genes.

### RESULTS

To reach these goals we performed two parallel studies that allowed us to characterize the cell-type specific *Interferome* changes in MS.

We exploited, on one hand, the systematic collection of IRG expression profiles provided by the *Interferome* database in published datasets from more than 400 human PBMC transcriptomes at distinct MS stages, including RRMS before or after IFN-beta therapy, compared to HD as well as Central nervous System (CNS) tissues and encephalitogenic CD4 T cells derived from experimental murine MS [Srinivasan S. et al., Sci. Rep. 2017].

On the other hand, we isolated paired B cells and monocytes from 25 RRMS patients and 25 matched HD to perform a comparative microarray analysis and map cell type-specific disease-related *Interferome* transcriptional changes.

In the first study [Srinivasan S. et al., Sci. Rep. 2017], we exploited the systematic collection of IFN-regulated gene expression profiles provided by the *Interferome* database and mapped *Interferome* changes in experimental and human MS. Transcriptomics examination of CNS tissue and encephalitogenic CD4 T cells during EAE demonstrated that CNS inflammation and T cell pathogenicity were characterized by massive changes in *Interferome* transcription, which is consistent with the known contribution of type I and type II IFNs to the disease. Further, the analysis of more than 400 human PBMC transcriptomes showed that several IRG changed expression at distinct MS stages with a core of 21 transcripts concordantly dysregulated in all MS forms compared to HD. *Interferome* alteration was significantly enriched in RRMS form. 100 differentially expressed IRG were validated in independent case-control cohorts and 53 IRG out of 100 were also targeted by *in vivo* IFN-beta treatment. The regulation of two disease-associated IRG, arrestin-beta 1 (ARRB1) and calcineurin like EF-hand protein 1 (CHP1), by IFN-beta administration was also confirmed in *ex vivo* and *in vitro* experiments in a parallel validation cohort. Overall, this first study provided the proof of concept about impairment of *Interferome* in experimental and human MS and describes IRG signatures at distinct stages of disease, which can represent novel potential biomarkers to follow the

progression of the disease and therapy efficacy in MS. In parallel, microarray analyses of paired RNA samples from B cells and monocytes isolated from matched RRMS and HD were conducted and differentially expressed genes resulting for each cell type were mapped in the *Interferome* database (September 2015, updated version). Of IRG probes defined in the *Interferome* database 1142 were expressed in B cells and 1156 in paired monocytes. Among them, 285 IRG probes displayed altered levels in B cells and 158 in monocytes of RRMS subjects compared to HD. Gene ontology and pathway analysis showed cell type-specific significant changes in different cell processes. We validated alterations found in these pathways at a molecular and functional level in a newly ad-hoc enrolled validation cohort of 28 matched RRMS patients and 11 HD, from whom paired monocytes and B cells were isolated. In particular, our study highlighted a specific dysregulation in genes of the type I IFN-mediated signaling and response to virus pathways in B cells of MS patients, whereas the interleukin and cytokine signaling was found specifically deregulated in MS monocytes. Interestingly, then, the apoptosis pathway was found altered in both monocytes and B cells of MS patients displaying a particularly higher expression and activation level of caspase 3 than cells of HD. Overall, this second study unveiled a possible failure in immune responses to viral infection specifically in

B cells of MS patients, an intriguing piece of evidence that we are further investigating having in mind the peculiar role of B cells as human reservoir of the MS-associated EBV. Furthermore, our findings pinpoint the apoptotic pathway as the common denominator in dysregulation of monocytes and B cells in MS versus health, reflecting how stress signals and ongoing inflammation occurring in MS may alter and determine differentiation status and cell fate of both these immune cells impacting autoimmune responses (Severa et al., manuscript in preparation).

## CONCLUSIONS

Collectively, the results obtained in this project clearly highlighted differences in IFN-regulated processes in immune cells and between B cells and monocytes of MS and HD whose deeper comprehension would be likely helpful in dissecting crucial dysregulated events of IFN pathway in MS that are likely behind MS pathogenesis. In addition, other potentially dysregulated pathways involving kinase activity and their phosphorylated targets - i.e. MAPK activity, ERK and NF- $\kappa$ B cascade, protein phosphorylation, regulation of transcription and signal transduction - emerged by the *Interferome* mapping and deserve further characterization to assign significance and validate cell type-specific single gene, groups of genes, pathways or networks differentially expressed in MS.

---

**PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI**  
**PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS**


---

*Pubblicazioni / Publications*

Severa M, Rizzo F, Giacomini E, Salvetti M, Coccia EM. IFN- $\beta$  and multiple sclerosis: Cross-talking of immune cells and integration of immunoregulatory networks. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Apr;26(2):229-39

Severa M, Rizzo F, Giacomini E, Annibaldi V, Gafa V, Romano S, Buscarinu MC, Fornasiero A, Salvetti M, Coccia EM. IFN- $\beta$  therapy regulates TLR7-mediated response in plasmacytoid Dendritic Cells of Multiple Sclerosis patients influencing an anti-inflammatory status. *J. Interferon Cytokine Res.* 2015 Sep;35(9):668-81

Martini H, Citro A, Martire C, D'Ettore G, Labbadia G, Accapezzato D, Piconese S, De Marzio P, Cavallari EN, Calvo L, Rizzo F, Severa M, Coccia EM, Grazi GL, Di Filippo S, Sidney J, Vullo V, Sette A, Barnaba V. Apoptotic Epitope-Specific CD8+ T Cells and Interferon Signaling Intersect in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis.* 2016 Feb 15;213(4):674-83

Rizzo F, Severa M, Giacomini E, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Coccia EM. Interferon- $\beta$  therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in Multiple Sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol Cell Biol.* 2016 Oct;94(9):886-894

Giacomini E, Rizzo F, Etna MP, Cruciani M, Mechelli R, Buscarinu MC, Pica F, D'Agostini C, Salvetti M, Coccia EM, Severa M. Thymosin- $\alpha$ 1 expands deficient IL-10-producing regulatory B cell subsets in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2017 Feb 1:1352458517695892

Srinivasan S, Severa M, Rizzo F, Menon R, Brini E., Mechelli R, Martinelli V, Hertzog P, Salvetti M, Furlan R, Martino G, Comi G, Coccia EM, Farina C. Dysregulation of Interferome in experimental and human Multiple Sclerosis. *Sci Rep.* 2017 Aug 21;7(1):8981. doi: 10.1038/s41598-017-09286-y

Annibaldi V, Umeton R, Palermo A, Severa M, Etna MP, Giglio S, Romano S, Ferraldeschi M, Buscarinu MC, Vecchione A, Annese A., Policano C, Mechelli R, Mattei G., Angelini DF, Battistini L, Coccia EM, Salvetti M. and Ristori G. Transcriptome analysis of coding and non-coding RNAs in peripheral B cells of multiple sclerosis patients reveals a dysregulated interferon response factor (IRF)-1 pathway (submitted)

*Comunicazioni a Congressi / Congress Presentations*

Rizzo F, Giacomini E, Etna MP, Cruciani M, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Garaci E, Coccia EM and Severa M. Anti-inflammatory potential of Thymosin- $\alpha$ 1 in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: effects on B cell compartment. Oral communication to XXV Congress of Italian Society of Neuroimmunology, May 11-14 2016, Lecce, Italy

Srinivasan S, Menon R, Di Dario M, Russo A, Martina S, Rizzo F, Moiola L, Rodegher ME, Mechelli R, Romeo M, Radaelli M, Sangalli F, Hertzog P, Salvetti M, Coccia EM, Martinelli V, Comi G, Farina C. Searching for Dysregulation in Multiple Sclerosis. XXV Congress of Italian Society of Neuroimmunology, May 11-14 2016, Lecce, Italy

Srinivasan S, Menon R, Di Dario M, Russo A, Martina S, Rizzo F, Moiola L, Rodegher ME, Mechelli R, Romeo M., Radaelli M, Sangalli F., Hertzog P, Salvetti M, Coccia EM, Martinelli V, Comi G, Farina C. Searching for Dysregulation in Multiple Sclerosis. XIII International Congress of Neuroimmunology, 26-29th September 2016, Jerusalem, Israel

Severa M, Srinivasan S, Rizzo F, Di Dario M, Giacomini E, Buscarinu MC, Melania Cruciani M, Etna MP, Mechelli R, Hertzog PJ, Salvetti M, Cinthia Farina C and Coccia EM. INTERFEROME-based transcriptome analysis of paired B cells and monocytes identifies dysregulation in Interferon-regulated pathways in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis patients. Poster presentation, XXVI AINI Congress-joint-16<sup>th</sup> ESNI Course, June, 26-30; 2017, Venezia, Italy

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 9 mesi) e l'ammontare di 245.000 €**

**Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 9 months) and the amount of € 245,000**

---

## Michele Zampieri

Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia,  
Sapienza Università di Roma, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Paola Caiafa, Fabio Ciccarone, Anna Reale, Stefano Tagliatesta,  
Valentina Aversano, Linda Novara, Daniela Nocchia**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Marco Salvetti**, Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS),  
Neurologia e Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso,  
Sapienza Università di Roma, Roma

## Associazione tra il livelli di 5-idrossimetilcitosina e la poli(ADP-ribosil)azione nel cervello di individui affetti da SM

### PREMESSE E OBIETTIVI

Sebbene l'origine della sclerosi multipla (SM) sia incerta, si presume che un'interazione tra fattori genetici ed ambientali contribuisca alla sua patogenesi. Tuttavia, studi genetici ed epidemiologici indicano che una porzione significativa del rischio di SM sia dovuta a fattori non genetici. Questa ipotesi è anche supportata dalle alte percentuali di discordanza per la SM in gemelli identici.

Ciò indica che fattori chiave della SM possano risiedere nei meccanismi che governano l'interazione tra ambiente e informazione genetica, come i processi epigenetici.

L'epigenetica regola l'espressione genica indipendentemente dalla sequenza del DNA, basandosi invece sulla sua modificazione chimica e delle proteine istoniche. Questi processi sono strettamente controllati per consentire alla cellula di rispondere ai segnali ambientali modificando il modo in cui il genoma viene letto.

Evidenze preliminari suggeriscono una componente epigenetica nella SM. Effettivamente, alterazioni globali e sito-specifiche di modificazioni del DNA sono state rilevate in pazienti con SM e apparentemente contribuiscono a meccanismi rilevanti per la malattia come la regolazione immunitaria e la neurodegenerazione. Tuttavia, il legame tra epigenetica e SM rimane largamente ipotetico in assenza di informazioni sui meccanismi sottostanti.

Questo progetto pilota ha lo scopo di colmare questa lacuna cercando un'associazione tra livelli di metilazione del DNA del cervello SM ed alterazioni del mac-

chinario molecolare responsabile della loro origine e mantenimento. Questa possibilità è stata valutata in campioni autoptici di sostanza bianca di pazienti con SM secondariamente progressiva (SMSP), primariamente progressiva (SMPP) e individui non affetti. Differenze nei livelli globali delle principali modificazioni del DNA (5-metilcitosina, 5mC) e dei suoi derivati di ossidazione (5-idrossimetilcitosina, 5hmC; 5-formilcitosina, 5fC; 5-carbossilcitosina, 5caC) sono state studiate in relazione a cambiamenti di espressione dei principali fattori proteici ad esse associati. In particolare, le DNA metiltransferasi (DNMT1, 3A e 3B) che generano la 5mC; gli enzimi TET (TET1, 2 e 3) che iniziano il processo di demetilazione catalizzando la conversione di 5mC in 5hmC, 5fC e 5caC; il gene IDAX che codifica per il dominio legame al DNA di TET2 ed è richiesto per il controllo del suo reclutamento ed attività; l'enzima timina-DNA glicosilasi (TDG), che agisce su 5fC e 5caC per rigenerare la citosina attraverso la via di riparazione del DNA per escissione di basi (BER).

L'analisi è stata poi estesa alla poli(ADP-ribosil)azione (PARilazione), una modificazione post-sintetica di proteine nota per orchestrare i processi di metilazione/demetilazione del DNA attraverso il controllo del processo BER e l'espressione/attività catalitica delle DNMT e degli enzimi TET. Questo processo è stato monitorato attraverso l'analisi della PARilazione proteica totale e dell'espressione degli enzimi coinvolti nella sua formazione (PARP1, 2 e 3) e rimozione (PARG, TARG e ARH3).

**RISULTATI**

I dati mostrano una diminuzione di 5hmC negli SM rispetto ai controlli. Questa diminuzione non si accompagna ad alcuna variazione del suo precursore (5mC) o dei suoi derivati (5fC e 5caC), indicando che questa differenza non sia associata un processo di demetilazione attiva. Significativamente, il gruppo SMPP mostra un deficit di 5hmC più significativo rispetto ai pazienti SMSP, suggerendo quindi una relazione tra declino di 5hmC e decorso clinico.

L'analisi dell'espressione dei fattori responsabili della metilazione del DNA collega il deficit di 5hmC nei campioni SM all'espressione sbilanciata di componenti del *pathway* di idrossimetilazione mediato da TET2, specificamente della stessa TET2 e del suo partner IDAX. Infatti, mentre una ridotta TET2 si associa a perdita di 5hmC in entrambi i gruppi SM, la diminuzione di TET2 è controbilanciata dall'induzione di IDAX nei pazienti SMSP, il che spiega la minore perdita di 5hmC in questo gruppo.

Per quanto riguarda la possibilità di associare altera-

zioni epigenetiche ad alterazioni della PARilazione, i dati ottenuti non supportano questa ipotesi. Infatti, non è stato possibile rilevare alcuna alterazione nel livello di espressione degli enzimi correlati né apparenti differenze di PARilazione proteica totale.

**CONCLUSIONI**

Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono che la SM abbia una componente epigenetica che si manifesta in una perdita 5hmC dovuta a difetti nel *pathway* di idrossimetilazione mediato da TET2.

Questi risultati hanno una potenziale rilevanza per la SM, in quanto la 5hmC è nota per avere ruoli legati alla sopravvivenza degli oligodendrociti e alla risposta antinfiammatoria. È quindi plausibile che un difetto di 5hmC possa essere coinvolto nella patogenesi della SM.

Approfondimenti futuri potrebbero aprire nuove vie di indagine molecolare della patogenesi della SM e nuove prospettive per lo sviluppo di terapie basate sull'utilizzo di farmaci epigenetici.

## Link between 5-hydroxymethylcytosine levels and poly(ADP-ribosyl)ation in human MS brain

**INTRODUCTION AND AIMS**

Although the origin of multiple sclerosis (MS) remains uncertain, an interaction between genetic predisposition and environmental factors is assumed to play a contribution in its pathogenesis. However, genetic and epidemiological studies indicate that a significant portion of the total MS risk is actually connected to non-genetic factors. This hypothesis is also supported by the high discordance rates for MS in identical twins.

This indicates that key drivers of MS may lie in the mechanisms governing the interplay between environmental factors and genetic information, such as the epigenetic processes.

Epigenetic mechanisms regulate gene expression independently of the underlying DNA sequence, relying instead on the chemical modification of DNA and histone proteins. These modifications are tightly controlled to allow the cell to respond to environmental cues and to modify how the genome is read.

Emerging evidence actually suggests that epigenetic deregulation is associated with MS. In fact, both global and site-specific alteration of DNA modifica-

tions have been found in tissues of MS patients and apparently contribute to disease-relevant mechanisms such as immune regulation and neurodegeneration. However, the link between epigenetic defects and MS is largely putative due to the lack of any concrete evidence on underlying mechanisms.

This pilot project aims to fill this information gap by tracing DNA methylation states of the MS brain back to perturbation of the molecular machinery responsible for their establishment and maintenance. This association has been tested in autoptic tissue specimens from the white matter (WM) of patients with secondary progressive (SPMS) and primary progressive (PPMS) MS compared to unaffected individuals. The differences in global levels of the major epigenetic modifications of DNA (5-methylcytosine, 5mC) and its oxidation derivatives (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC; 5-formylcytosine, 5fC; 5-carboxylcytosine, 5caC) have been studied in relation to changes in expression of major DNA methylation-related factors. These are the DNA methyltransferases (DNMT1, 3A and 3B), which form the 5mC; the Ten-eleven Translo-

cation (TET) proteins (TET1, 2 and 3), which initiate the demethylation process by catalysing a stepwise conversion of 5mC into 5hmC, 5fC and 5caC; the TET2 DNA-binding CXXC domain gene IDAX (inhibition of the Dvl and Axin complex) required for appropriate TET2 targeting and activity; the thymine-DNA glycosylase (TDG) enzyme, which acts on 5fC and 5caC to regenerate unmodified cytosine through the base excision repair (BER) pathway.

The analysis was then extended to poli(ADP-ribosyl)ation (PARylation), a post-synthetic modification of proteins known for orchestrating DNA methylation-demethylation processes through the control of the BER process and the expression and catalytic activity of the DNMT and TET enzymes. This process was monitored through total protein PARylation analysis and testing the expression of the enzymes involved in its establishment (PARP1, 2 and 3) and turnover (PARG, TARG and ARH3).

## RESULTS

Data show a decrease of 5hmC in MS WM vs. controls. This decrease was not accompanied by any variation of its precursor (5mC) or its final reaction products (5fC and 5caC), indicating that this event is not linked to an active DNA demethylation process. Significantly, the PPMS group shows a stronger 5hmC decrease when compared to SPMS patients, thus suggesting a relationship between the MS clinical course and the 5hmC decline.

The analysis of DNA methylation-related factors ex-

pression linked the 5hmC deficit in MS samples to the unbalanced expression of the components of the TET2-mediated hydroxymethylation pathway, namely TET2 itself and its partner IDAX. In fact, while decreased TET2 matched the 5hmC loss in both the PPMS and SPMS groups, the TET2 decrease was counterbalanced by the induction of IDAX in SPMS patients, which explains the attenuated 5hmC decline in this group of individuals.

With regard to the possibility of tracing epigenetic alterations in MS back to alterations in the PARylation metabolism, the data obtained do not support this hypothesis. In fact, we could not detect any alteration in the expression level of related enzymes nor any apparent differences in total protein PARylation.

## CONCLUSIONS

Overall, our results indicate that MS may have an epigenetic component that manifests itself as a loss of 5hmC, most likely due to defects of TET2-related hydroxymethylation pathway.

These findings may have great relevance to the MS, as the 5hmC is known to have roles linked to oligodendrocytes survival and the anti-inflammatory response. It is therefore plausible that a reduced level of 5hmC might be involved in MS pathogenesis. Future investigation of this link has the potential to open up new ways of dissecting disease mechanisms at a molecular level and of developing new treatments based on epigenetic manipulation, for example by the use epigenetic drugs.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Tagliatesta S, Ciccarone F, Aversano V, Novara L, Nocchia D, Reale A, Salvetti M, Caiafa P, Zampieri M. TET2 gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis normal appearing white matter. Manuscript in preparation

Tagliatesta S, Ciccarone F, Aversano V, Novara L, Nocchia D, Reale A, Salvetti M, Caiafa P, Zampieri M. Link between 5-hydroxymethylcytosine levels and TET enzymes transcription in human MS brain. ABCD Congress, September 21-23 2017, Bologna, Italy

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 1 anno (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di 29.000 €**  
**Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 1year (extended by 3 months) and the amount of € 29,000**

---

## Francesca Santoni de Sio

Fondazione Centro San Raffaele, Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Daniele Avancini, Laura Passerini, Silvia Gregori**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Cinthia Farina, Vittorio Martinelli**, Istituto di Neurologia Sperimentale, (INSPE) Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

**Didier Trono**, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL), Losanna, Svizzera

## Studio del ruolo delle proteine KRAB (Kruppel-Associated Box) nella deregolazione epigenetica del sistema immunitario adattativo nella sclerosi multipla

### PREMESSE E OBIETTIVI

Sebbene l'immunobiologia della sclerosi multipla (SM) sia stata studiata a fondo, i meccanismi molecolari che sono alla base di questo aspetto della patologia non sono ancora stati svelati. Diversi studi hanno proposto un controllo epigenetico aberrante come (con-)causa delle manifestazioni autoimmuni della SM. Infatti, modificando in modo dinamico lo stato della cromatina, l'epigenetica controlla l'espressione genica integrando segnali intrinseci ed estrinseci (entrambi coinvolti nella patogenesi della SM). Una vasta famiglia di molecole che svolgono questa funzione di regolatori epigenetici è rappresentata dalle KRAB-ZFP. Diversi studi supportano un ruolo delle KRAB-ZFP nel controllo del funzionamento del sistema immunitario in generale e nei meccanismi che controllano l'infiammazione nella sclerosi multipla.

Obiettivo di questo studio è verificare la presenza di una de-regolazione epigenetica nelle cellule T dei pazienti SM e caratterizzare il ruolo del sistema KRAB nella patologia.

### RISULTATI

Durante il periodo finanziato abbiamo identificato 6 KRAB-ZFP deregolate nelle cellule mononucleate del sangue periferico dei pazienti con SM e abbiamo trovato la loro espressione significativamente arricchita nelle cellule T rispetto ad altri tipi di cellule ematopoietiche. Abbiamo testato il ruolo di una delle candidate (ZNF684) nel differenziamento/funzione delle cellule T. Mentre ZNF684 non ha influenzato significativamente il differenziamento delle cellule T in

vivo, ha alterato il profilo di produzione di citochine delle cellule T CD4+ coltivate in vitro, suggerendo un ruolo per ZNF684 nel controllo dei segnali pro/antinfiammatori nelle cellule T CD4+. Tuttavia, un'analisi accurata dei siti di legame delle KRAB-ZFP ha rivelato un contributo minimo per le ZFP selezionate nella regolazione epigenetica delle cellule T. Per questo motivo non abbiamo proseguito lo studio di KRAB-ZFP.

Abbiamo identificato gli elementi regolatori genetici (RE) attivi nelle cellule T e mappato i loro putativi geni bersaglio, che abbiamo trovato arricchiti in classi funzionali legate alla biologia delle cellule T, convalidando il nostro approccio per identificare i nodi trascrizionali (geni bersaglio + RE). L'intersezione tra siti di legame di KRAB-ZFP e RE identificati nelle cellule T ha rivelato una sovrapposizione molto limitata, che indica un contributo minimo delle KRAB-ZFP selezionate nel controllo epigenetico delle cellule T. Per questo motivo non abbiamo proseguito lo studio dei RE controllati da KRAB, ma abbiamo valutato più in generale la rilevanza della de-regolazione dei RE nella SM. Abbiamo quindi analizzato lo stato della cromatina e i profili di espressione delle cellule T CD4+, da 5 donatori con SMRR e 5 donatori sani. Abbiamo identificato 65 RE differenzialmente attivi (DARE), 64 dei quali erano attivi nelle cellule dei donatori sani e meno/non attivi nelle cellule SM. Eseguendo analisi *in silico* abbiamo identificato 132 geni target che interagiscono fisicamente con DARE. Abbiamo trovato i geni bersaglio dei DARE sovra-espressi nelle cellule T CD4+ dei donatori sani, confermando l'attività dif-

ferenziale dei DARE identificati nelle cellule T di donatori sani rispetto a quella dei pazienti con SM. Inoltre, la lista dei geni bersaglio dei DARE è arricchita in classi funzionali legate a malattie autoimmuni e infiammatorie e include alcuni geni già associati alla SM, risultato che suggerisce un ruolo funzionale per i DARE identificati nella risposta delle cellule T nelle manifestazioni autoimmuni della SM. Per identificare il network molecolare che controlla l'attività dei DARE nella SM, abbiamo mappato i siti di legame dei fattori di trascrizione (FT) nei promotori dei geni bersaglio dei DARE e nei DARE stessi e abbiamo trovato un arricchimento per i siti di legame di FT legati a un fenotipo Th1/Th17. Poiché questo fenotipo delle cellule T è strettamente legato all'infiammazione in SM, questo risultato suggerisce che un nucleo di FT infiammatori potrebbe controllare l'attività dei DARE in SM.

### CONCLUSIONI

Anche se durante lo svolgimento del progetto ab-

biamo ottenuto dei dati che hanno suggerito un contributo minimo alla patologia SM delle KRAB-ZFP selezionate, abbiamo comunque raggiunto l'obiettivo principale del progetto e valutato la de-regolazione epigenetica nelle cellule T di pazienti SM. Così facendo, abbiamo identificato un'attivazione aberrante di un discreto numero di elementi regolatori genetici, che sembrano essere parte di una rete molecolare che controlla le vie tollerogeniche nelle cellule CD4+ T nella SM.

Pertanto, i risultati ottenuti mediante l'utilizzo di screening ad alta processività e analisi *in silico* di ultima generazione indicano un ruolo significativo della de-regolazione epigenetica nella SM e suggeriscono che ulteriori studi basati sulla cromatina dei nodi trascrizionali deregolati identificati aiuteranno a chiarire i meccanismi patogenetici che portano alla SM. Questi nuovi studi contribuiranno sulla lunga distanza a disegnare terapie più specifiche per i pazienti con SM e, in prospettiva, a migliorare la loro qualità di vita.

## Assessing the role of Kruppel-Associated Box (KRAB) proteins in the epigenetic deregulation of adaptive immune system in multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

Although the immunobiology of multiple sclerosis (MS) has been deeply studied, the molecular mechanisms underlying the abnormal immune response and tolerance triggering the pathology have not yet been unravelled. Several lines of evidence link MS autoimmune manifestations to defects in the epigenetic machinery, which is the machinery that modifies chromatin status and controls gene expression patterns. The main family of human transcriptional/epigenetic repressors comprises the Kruppel Associated Box C2H2-zinc finger proteins (KRAB-ZFPs). KRAB-ZFPs greatly expanded during evolution and exert their action of compacting chromatin (and thus inhibiting gene transcription) by interacting with their universal cofactor KAP1. Although the physiological targets of the KRAB system are still largely unknown, several studies put forward its role in controlling key molecules regulating immune tolerance and MS-related autoimmunity.

Main aim of the project was to assess epigenetic deregulation in MS CD4+ T cells by identifying candidate KRAB-ZFP and KRAB-controlled genetic reg-

ulatory elements (RE) and investigating their role in governing MS-related T cell response.

### RESULTS

During the funded period we have identified 6 KRAB-ZFP deregulated in MS patients' PBMC, and found their expression to be significantly enriched in T cells when compared to other hematopoietic cell types. We have tested the role of one of the candidates (ZNF684) in T cell differentiation/function. While ZNF684 did not significantly affect T cell differentiation *in vivo*, it altered the cytokine profile of CD4+ T cells cultured *in vitro*, suggesting a role for ZNF684 in controlling pro-/anti-inflammatory signals in CD4+ T cells. Still, an accurate analysis of KRAB-ZFP binding sites revealed a minor contribution for the selected ZFP to the epigenetic regulation of T cells. For this reason we did not pursue the study of KRAB-ZFP. We have identified genetic regulatory elements (RE) active in T cells and mapped their putative target genes, which we found enriched in functional classes related to T cell biology, validating our approach to

identify transcriptional nodes (RE+target gene). Intersection between identified T cell RE and KRAB-ZFP binding sites revealed a very limited overlapping, indicating a minor contribution of the selected KRAB-ZFP in epigenetic control of T cells. For this reason we did not pursue the study of KRAB-controlled RE, but more broadly assessed the relevance of deregulated RE in MS pathology. We did this by analyzing chromatin status and expression patterns of CD4+ T cells from 5 RRMS patients and 5 healthy donors (HD). We identified 65 differentially active regulatory elements (DARE), 64 of which were active in HD and less/not active in MS. By performing in silico meta-analysis we identified 132 target genes that were physically interacting with DARE.

DARE-target genes were over-expressed in HD CD4+ T cells, confirming the differential activity of identified DARE in T cells from HD compared to that of MS patients. DARE-target gene list was enriched in autoimmune/inflammatory disease gene ontology classes and included some MS-associated genes, suggesting a functional role for the identified DARE in T cell response in MS autoimmune manifestations. To assess the molecular network controlling the activity of MS DARE, we in silico mapped transcription factor

(TF) binding sites in DARE and DARE-target gene promoters and found Th1/Th17-related TF-binding to be enriched. Since Th1/Th17 T cell types are main player in SM inflammation, these findings suggest that a core of inflammatory TF might control the activity of MS DARE.

## CONCLUSIONS

Even if our data suggested a minor contribution of the selected KRAB-ZFP to MS pathology, we were able to reach the main aim of the project and assess the epigenetic deregulation of MS T cells. Indeed, we found aberrant activation of a limited number of RE, which seem to be part of a molecular network controlling tolerogenic pathways, in MS CD4+ T cells.

Thus, our innovative analysis using state-of-the-art high throughput screenings and in silico approaches, indicate a significant role for the deregulation of the activity of RE in MS and suggest that further chromatin-based studies of the identified deregulated transcriptional nodes will help clarifying the pathogenic mechanisms leading to MS.

This will help designing more specific therapies for MS patients on the long term and, in perspective, ameliorating their quality of life.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Avancini D, Marzetta F, Martinelli V, Trono D, Gregori S, Farina C, Santoni de Sio FR. In silico genome wide identification of KRAB-regulated T cell-specific regulatory elements for the assessment of KRAB-ZFP role in multiple sclerosis. Poster presentation at EMBO Conference "From functional genomics to systems biology". November 12th–15th, 2016. Heidelberg, Germany

---

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 100.000 €  
Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 100,000

---

## Francesco Cecconi

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Juliane Becher, Elisabetta Volpe, Marco De Bardi, Flavie Strappazzon, Valentina Cianfanelli, Luca Simola**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Luca Battistini**, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

**Gian Maria Fimia**, IRCCS Centro Nazionale Malattie Infettive L. Spallanzani, Roma

**Marcello D'Amelio**, Università Campus Biomedico, Roma

**Roberto Furlan**, Università Vita e Salute, San Raffaele, Milano

**Diego Centonze, Silvia Campello**, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

**Giuseppe Matarese**, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

## Ruolo della proteina autofagica adattatrice AMBRA1 nel differenziamento delle cellule T e il suo impatto sulla sclerosi multipla

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla è una malattia demielinizzante causata maggiormente da cellule T autoreattive che si infiltrano nel sistema nervoso centrale. L'attività delle cellule T autoreattive è contrastata dalla funzione soppressoria delle cellule T regolatorie (Treg). È quindi estremamente importante studiare i meccanismi che sottostanno allo sviluppo delle Treg. L'autofagia è un processo di degradazione intracellulare usato dalle cellule per rispondere ad un aumento delle esigenze energetiche e allo stress. L'autofagia è fondamentale nel regolare la risposta delle cellule T alla stimolazione del loro recettore. La molecola AMBRA1, un fattore cruciale nel meccanismo degradativo intracellulare dell'autofagia, ha un ruolo importante nella mediazione della tolleranza immunitaria grazie al suo impatto positivo sulle cellule Treg.

Il nostro scopo era quello di studiare più in dettaglio i meccanismi con cui AMBRA1 regola positivamente le cellule Treg e svelare la connessione tra autofagia e AMBRA1 nell'innescare questi eventi. Abbiamo anche analizzato le implicazioni di questi processi nella resistenza cellulare all'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), un modello animale riconosciuto della sclerosi multipla. A questo scopo abbiamo sviluppato due linee murine, in cui Ambra1 era ipo-regolata nelle cellule ematopoietiche o nell'intero organismo. È stata così ottenuta una visione approfondita dei meccanismi con cui AMBRA1 media

la tolleranza immunitaria che ci ha fornito informazioni straordinarie per sviluppare possibili strategie innovative contro la sclerosi multipla.

### RISULTATI

Grazie a questo progetto, abbiamo dimostrato la dipendenza del fattore FOXP3, essenziale nel differenziamento delle Treg, da AMBRA1 in Treg già differenziate o in corso di determinazione. Abbiamo anche scoperto che AMBRA1 è un regolatore negativo dell'espressione di T-BET, a sua volta il principale regolatore delle cellule Th1, il che consente di concludere come AMBRA1 rappresenti un fattore cruciale nella mediazione dell'omeostasi dei linfociti T, favorendo il fenotipo Treg piuttosto che Th1. Si noti che FOXO3a, un fattore di trascrizione e regolatore positivo di FOXP3, è nettamente diminuito nelle cellule T prive di AMBRA1 *in vitro* in condizioni polarizzanti verso un destino Treg. Abbiamo inoltre dimostrato che questo non dipende dalla ridotta trascrizione del gene FOXO3a, suggerendo che siano modifiche post-traduzionali a regolare i livelli di FOXO3a. Abbiamo quindi controllato il suo stato di fosforilazione e individuato un aumento della quantità relativa di FOXO3a fosforilata sul sito Ser253, una fosforilazione associata a una diminuita attività di FOXO3a. È interessante notare che questo residuo, che è fosforilato da AKT, è bersaglio della fosfatasi proteica 2 A (PP2A). PP2A è stata identificata nel

nostro laboratorio (Cianfanelli et al., 2015) come bersaglio di AMBRA1. Questa interazione è fondamentale al fine di de-fosforilare e quindi inattivare l'antagonista di FOXO3a c-myc. Sorprendentemente, le cellule HeLa che sovra-esprimono un mutante AMBRA1 (AMBRA1-PXP) caratterizzate dall'incapacità di legare PP2A, si comportano in modo simile alle cellule prive di AMBRA1, mostrando livelli ridotti di FOXO3a e un relativo aumento nella variante trascrizionalmente inattiva di FOXO3a fosforilata sulla Ser253 rispetto a cellule normali. Abbiamo rilevato che c-myc è aumentato nelle cellule T prive di AMBRA1 in condizioni di coltura che favoriscono il differenziamento delle cellule Treg. In concomitanza con l'aumento dei livelli di c-myc, abbiamo individuato anche un aumento nel suo stato di fosforilazione, che è positivamente correlato all'attività c-myc. Tutti questi risultati sono stati riprodotti in vivo, in modelli ani-

mal della sclerosi multipla.

Pertanto, possiamo concludere che AMBRA1 innesca lo sviluppo delle cellule Treg, fondamentale risorsa dell'organismo contro l'autoimmunità tipica della sclerosi multipla, attraverso la regolazione opposta di FOXO3a rispetto a c-myc, la fosfatasi PP2A.

## CONCLUSIONI

La comprensione dettagliata da noi ottenuta sulla regolazione dell'autofagia in un gran numero di sistemi cellulari, del suo ruolo nell'omeostasi delle cellule T e del ruolo del regolatore dell'autofagia AMBRA1 nello specifico differenziamento delle cellule Treg (in condizioni sperimentali che ricapitolano l'ontogenesi della sclerosi multipla in vitro e in vivo) ha il grande potenziale di offrire nuovi strumenti farmacologici e in generale terapeutici per modulare la risposta immunitaria a questa malattia.

# Role of the autophagic adapter protein AMBRA1 in T cell fate decision and its implication in multiple sclerosis

## INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis is a demyelinating autoimmune disease mainly caused by central nervous system infiltrating autoreactive T cells. The pathogenic activity of autoreactive T cells can be counteracted by the suppressive function of regulatory T cells (Treg). It is thus of the highest importance to study the mechanisms underlying Treg differentiation and proliferation. Autophagy is a lysosomal degradation pathway used by cells to recycle cytosolic material and entire organelles to respond to increased energy demands and cellular stress. Autophagy has been shown to be crucial for T cells to respond to T cell receptor. The pro-autophagy molecule AMBRA1 plays an important role in mediating immune tolerance due to its positive impact on regulatory T cells (Tregs). Our aim was to study in more details the mechanisms by which AMBRA1 positively regulates Treg and to unravel the connection between autophagy and AMBRA1 in triggering these events. We also intended to investigate the implication of these processes in the cell resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a recognized animal model of human multiple sclerosis. To this aim we developed two mouse lines, in which Ambra1 was

downregulated in hematopoietic cells or in the whole organism. The insights obtained by this project into the mechanisms by which AMBRA1 mediates immune tolerance finally provides us with new outstanding information for possible molecular targeting to fight multiple sclerosis.

## RESULTS

We found the dependence of the key Treg differentiation-factor FOXP3 on AMBRA1 in both, differentiating and already differentiated Treg. We also found that, on the other hand, AMBRA1 is a negative regulator of T-BET expression, the master regulator of Th1 cells, this depicting AMBRA1 as a crucial factor in mediating T cell homeostasis, favoring the Treg rather than Th1 phenotype. We were able to demonstrate that AMBRA1 regulates FOXP3 acting upstream of the FOXP3 transcription. Interestingly, we found that FOXO3a, a transcription factor and positive regulator of FOXP3, is markedly decreased in T cells lacking AMBRA1 grown in vitro under Treg polarizing conditions. We showed that this is not depending on decreased transcription of the FOXO3a gene, suggesting the implication of post-translational modifications in regulating

FOXO3a levels. We therefore checked its phosphorylation state and found an increase in the relative amount of FOXO3a phosphorylated at Ser253, a phosphorylation associated with decreased FOXO3a activity. Interestingly, this residue, which is phosphorylated by AKT, is a target of the protein phosphatase 2 A (PP2A). PP2A has recently been shown in our laboratory (Cianfanelli et al., 2015) to interact with AMBRA1. This interaction is crucial to dephosphorylate and thus inactivate the FOXO3a antagonist c-myc. Strikingly, HeLa cells overexpressing an AMBRA1 mutant (AMBRA1-PXP) characterized by the inability to bind PP2A, behave similar to cells lacking AMBRA1, showing reduced levels of FOXO3a and a relative increase in the transcriptionally inactive variant of FOXO3a phosphorylated at Ser253 when compared to wildtype cells. In contrast to FOXO3a and in line with our recent publication (Cianfanelli et al., 2015) we found c-myc to be increased in T cells lacking AMBRA1, grown under Treg differentiating conditions. In concomitance to increased c-myc levels,

we found also an increase in its phosphorylation state, which is positively correlated to c-myc activity. Interestingly, c-myc has recently been associated to decreased FOXP3 expression in ATG7 deficient Treg. All our findings were confirmed in vivo in the given mouse models of multiple sclerosis. Thus, we suggest AMBRA1 to trigger Treg development through the opposite regulation of FOXO3a versus c-myc through the phosphatase PP2A. Altogether these results are summarised in our paper under revision on the Journal Developmental Cell (Becher J, Simula L et al., 2018).

## CONCLUSIONS

Of note, our detailed understanding of the fine tuning of autophagy upstream regulation in a number of cell systems, of its role in T cell homeostasis and of the role of the autophagy regulator AMBRA1 in Treg differentiation both in vitro and in vivo (Becher et al., in revision) has the ultimate potential to offer new tools for modulating the immune response in multiple sclerosis.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

### *Pubblicazioni / Publications*

Capizzi M, Strappazzon F, Cianfanelli V, Papaleo E, Cecconi F. MIR7-3HG, a MYC-dependent modulator of cell proliferation, inhibits autophagy by a regulatory loop involving AMBRA1. *Autophagy* 2017,13:554-566

Nazio F, Carinci M, Valacca C, Bielli P, Strappazzon F, Antonioli M, Ciccocanti F, Rodolfo C, Campello S, Fimia GM, Sette C, Bonaldo P, Cecconi F. Fine-tuning of ULK1 mRNA and protein levels is required for autophagy oscillation. *J Cell Biol.* 2016, 215:841-856

Corrado M, Mariotti FR, Trapani L, Taraborrelli L, Nazio F, Cianfanelli V, Soriano ME, Schrepfer E, Cecconi F, Scorrano L, Campello S. Macroautophagy inhibition maintains fragmented mitochondria to foster T cell receptor-dependent apoptosis. *EMBO J.* 2016 35:1793-1809

Strappazzon F, Di Rita A, Cianfanelli V, D'Orazio M, Nazio F, Fimia GM, Cecconi F. Prosurvival AMBRA1 turns into a proapoptotic BH3-like protein during mitochondrial apoptosis. *Autophagy* 2016, 12:963-975

Rodolfo C, Di Bartolomeo S, Cecconi F. Autophagy in stem and progenitor cells. *Cell Mol Life Sci.* 2016, 73:475-496

Chrisam M, Pirozzi M, Castagnaro S, Blaauw B, Polishchuck R, Cecconi F, Grumati P, Bonaldo P. Reactivation of autophagy by spermidine ameliorates the myopathic defects of collagen VI-null mice. *Autophagy* 2015, 11:2142-2152

Cianfanelli V, Fuoco C, Lorente M, Salazar M, Quondamatteo F, Gherardini PF, De Zio D, Nazio F, Antonioli M, D'Orazio M, Skobo T, Bordi M, Rohde M, Dalla Valle L, Helmer-Citterich M, Gretzmeier C, Dengjel J, Fimia GM, Piacentini M, Di Bartolomeo S, Velasco G, Cecconi F. AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nature Cell Biol* 2015, 17:20-30

### *Comunicazioni a Congressi / Congress Presentations*

Cecconi F. invited lectureship Gordon Research Conference on Autophagy Lucca 2014

Cecconi F. EMBO Conference on Autophagy signalling and progression in health and disease Chia 2015

Cecconi F. Keystone Symposium on Autophagy: Molecular and Physiological Mechanisms, Whistler 2016

Cecconi F. IFOM-inStem Conference on Inflammation and Tissue Homeostasis, Bengaluru 2016

Cecconi F. The 8th International Symposium on Autophagy, Nara 2017

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 3 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 180.000 €**  
**Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 3 years (extended by 6 months) and the amount of € 180,000**

---

## Manolo Sambucci

Unità di Neuroimmunologia, Centro Europeo di Ricerca sul Cervello,  
Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma

MENTORE / MENTOR: **Giovanna Borsellino**

# Linfociti T regolatori FoxP3+: subsets differenti possono spiegare la mancanza di immunoregolazione nella sclerosi multipla?

### PREMESSE E OBIETTIVI

Il sistema immunitario possiede una caratteristica intrinseca che lo rende capace di rispondere ai cambiamenti dell'organismo che sorveglia: il dinamismo. Adattare costantemente la propria funzione in base alle esigenze del momento, che possono essere per esempio rispondere ad una infezione oppure terminare una reazione infiammatoria non più necessaria ed anzi potenzialmente dannosa, lo rendono un sistema costantemente attivo e altamente "configurabile". La fine regolazione di questo sistema richiede un delicato equilibrio tra la componente pronta per essere attivata e la controparte abile invece a spegnere le reazioni immunitarie. Quest'ultima qualità è il risultato della funzione svolta dai linfociti T regolatori (Treg). I linfociti Treg rappresentano uno splendido esempio di come il sistema immunitario si sia evoluto nel corso del tempo, ed anzi recenti studi hanno rivelato che i linfociti Treg in realtà sono una grande famiglia che comprende delle sottopopolazioni fenotipicamente identiche tra loro ma che possono essere funzionalmente molto differenti.

Il fattore di trascrizione che determina i linfociti T naive ad assumere un fenotipo Treg è noto con il nome di FoxP3 e nell'uomo, a differenza invece del suo omologo nel modello murino, va incontro al fenomeno dello *splicing* alternativo, un processo che fa parte del naturale percorso maturativo di moltissime proteine e che determina la produzione di forme diverse della stessa proteina. In questo contesto negli ultimi anni sono state descritte diverse forme (isoforme) della proteina FoxP3: l'isoforma completa (FoxP3fl), l'isoforma mancante della porzione trascritta dall'esone 2 (FoxP3 $\Delta$ 2), e l'isoforma mancante contemporaneamente delle porzioni trascritte dall'esone 2 e dall'esone 7 (FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7). Le isoforme senza l'esone 2 ( $\Delta$ 2) non sono in grado di interagire con i fattori di trascrizione ROR $\alpha$  e ROR $\gamma$ t e quindi di ini-

bire la loro funzione, che consiste nel stimolare il differenziamento dei linfociti T verso cellule proinfiammatorie che producono IL17, dette cellule Th17. È ormai dimostrato che un declino quantitativo e qualitativo delle cellule Treg contribuisce allo sviluppo di patologie autoimmuni ma quello che resta ancora da svelare, data la complessità del sistema, è come si sviluppi il contesto patologico. L'identificazione delle cellule Treg nel sangue circolante è molto complessa: infatti, la maggior parte dei marcatori di superficie delle cellule Treg sono condivisi con le cellule T effettrici attivate. Tuttavia la combinazione di alcuni marcatori consente di distinguere dei subset con diverse capacità soppressive. Per esempio l'utilizzo del CD45RA, come suggerito dal gruppo di Sakaguchi, in combinazione con il CD25 ed il FoxP3 può dare un quadro delle principali sottopopolazioni di cellule Treg. A questa strategia abbiamo aggiunto il risultato di precedenti evidenze prodotte dal gruppo del dottor Battistini, dove si è dimostrata l'importanza del marcatore CD39 nella funzione delle cellule Treg, attraverso l'inattivazione catalitica di ATP e la generazione di adenosina, un potente immunosoppressorio. Infine, abbiamo cercato di districare dal groviglio delle cellule Treg quelle potenzialmente soppressive mediante l'uso di diversi cloni di anticorpi anti-FoxP3. L'aggiunta del marcatore PD-1 ci ha permesso di valutare il livello di "exhaustion" cellulare.

### RISULTATI

La caratterizzazione fenotipica delle cellule CD4+CD25<sup>hi</sup>FoxP3+, a partire da PBMC ex-vivo è stata fatta attraverso i quattro cloni anti-FoxP3 commercialmente disponibili, che riconoscono epitopi differenti della proteina FoxP3. È stato osservato che negli individui con SM c'è una variabilità maggiore di cellule FoxP3+ identificate dai quattro cloni rispetto ai controlli che invece risultano essere più omogenei,

e questa osservazione correla anche con il numero di molecole FoxP3 per cellula. In particolare, sembra che la maggiore variabilità si concentri proprio nella identificazione di cellule Foxp3+ con il clone che discrimina la proteina contenente l'esone 2. In effetti i pazienti con SM mostrano una ridotta frequenza di cellule CD25high che esprime l'isoforma del FoxP3 con l'esone 2, e dunque in grado di contrastare la differenziazione dei linfociti Th17. Un'analisi più approfondita ha mostrato che queste cellule sono CD45RA<sup>neg</sup> (sono quindi cellule della memoria), che hanno una bassissima espressione di CD39, mentre invece esprimono livelli di PD-1 maggiori dei controlli. Questo suggerisce che le cellule T regolatorie nei pazienti non solo esprimono livelli minori della proteina FoxP3 che conferisce le maggiori abilità im-

munosoppressive, ma sono anche meno efficaci in quanto "esauste".

### CONCLUSIONI

Diversi studi hanno rivelato che la diminuzione quantitativa o qualitativa delle cellule Treg contribuisce allo sviluppo di patologie autoimmuni. Tuttavia non c'è ancora un consenso generale data l'eterogeneità e la complessità delle patologie, dovuto alla generazione di risultati contrastanti. Noi abbiamo messo a punto una strategia per identificare le cellule Treg soppressive in una patologia a carattere autoimmune come la sclerosi multipla. I risultati ottenuti dimostrano che le cellule Treg nelle persone con SM sono nello stesso tempo sia ridotte in numero sia frenate nelle loro funzioni.

## Foxp3+ Regulatory T Lymphocytes: different subsets can explain lack of immunoregulation in multiple sclerosis?

### INTRODUCTION AND AIMS

The immune system is in constant activity, continuously adapting itself to the environment and responding to environmental cues which determine its "configuration" at any given moment. To balance these perpetual challenges and unceasing activating signals, regulatory mechanisms exist which control the extent of immune activation, shutting down immune responses once the threat has been eliminated. T regulatory lymphocytes are a fundamental component of these control mechanisms, and they represent a population of suppressor cells that contain autoreactive and over-shooting inflammatory immune responses by active suppression. Several subsets of T regulatory lymphocytes have been identified in humans; their common feature is the ability to inhibit the effects of immune activation, such as proliferation or cytokine production by effector cells of both the innate and the adaptive arms of the immune system. The key transcription factor controlling T cell development and function is FoxP3, and its deficiency determines highly aggressive systemic autoimmunity, both in mice and in humans. Contrary to murine Treg cells, however, human Tregs are not homogeneous in gene expression, phenotype, and suppressive functions. Moreover, in humans several splicing variants of FoxP3 have been described,

adding to the heterogeneity of the human Treg landscape. Indeed, two main isoforms are expressed at equivalent levels by Treg cells: one is the full-length isoform (FoxP3<sup>fl</sup>), while the other lacks exon 2 (FoxP3 $\Delta$ 2), which contains the sequences involved in the interaction with retinoic acid-related orphan receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  (ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ ). The main functional distinction between these two isoforms consists in the inability of FoxP3 $\Delta$ 2 to interact with ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$  and to inhibit their function, ultimately contrasting the development of Th17 cells. A third isoform has also been described which lacks both exon 2 and exon 7 (FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7), which contrary to the other two isoforms facilitates Th17 differentiation. The precise identification of natural T regulatory cells in the peripheral blood is in itself a challenge, since proteins expressed by T regulatory cells are mostly shared by activated conventional effector cells. However, in ex-vivo freshly isolated lymphocytes, the expression of certain combinations of markers neatly pinpoints distinct subsets of Tregs with varying suppressive abilities. Following the first characterization of human Tregs, several studies have identified markers which are predominantly expressed, or selectively downregulated, by these cells. Miyara and colleagues (Sakaguchi's group) have shown that CD45RA is a useful marker when com-

bined with CD25 and FoxP3 expression to study the heterogeneity of Treg cells.

In particular CD4+CD45RA-CD25hi cells show potent suppressive activity and the highest levels of FoxP3 expression. Previously, our lab (Battistini's group) has shown that the catalytic inactivation and conversion of extracellular ATP by CD39 is an anti-inflammatory key mechanism of Treg cells with implications in immune suppression. Based on recent data on the functional consequences of the differential expression of the distinct FoxP3 isoforms, and thanks to the availability of isoform-specific antibodies, we have investigated FoxP3 expression by Treg cells in persons with multiple sclerosis (MS) and in control donors (HD), focusing on the Treg subtypes identified by differential expression of activation and exhaustion (like PD-1) surface markers.

## RESULTS

We detected FoxP3 by flow cytometry using the commercially available antibody clones. These recognize different epitopes on the FoxP3 protein, thus identifying Treg cells as subpopulations which comprise Tregs with potent immune-suppressive abilities.

Results show that the percentages of FoxP3+ Treg cells identified by gating on CD4+CD25hiFoxP3+ are more variable in MS individuals compared to controls. Interestingly the greater differences emerge when using the antibody which recognizes the FoxP3 isoform containing exon 2, which confers suppressive abilities to Treg. Furthermore, these exon2+ Treg cells are CD45RAneg, indicating that they represent a memory subpopulation, with lower CD39 expression and with higher PD-1 expression compared to controls.

## CONCLUSIONS

Several studies have revealed that quantitative or qualitative declines in Treg cells contribute to the development of autoimmune diseases, although given the vast heterogeneity and complexity of these disorders a consensus has not been reached, and conflicting results have often been generated. We have found a strategy to identify fully functional and suppressive Treg cells, in an autoimmune disease like multiple sclerosis, and we suggest that these cells are both reduced in number and functionally restrained in person affected by this disease.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

### *Pubblicazioni / Publications*

Sambucci M, Gargano F, De Rosa V, De Bardi M, Picozza M, Placido R, Ruggieri S, Capone A, Gasperini C, Matarese G, Battistini L, Borsellino G. FoxP3 isoforms and PD-1 expression by T regulatory cells in multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2018 Feb 27;8(1):3674.

### *Comunicazioni a Congressi/Congress presentations*

Sambucci M. FoxP3 isoforms and T regulatory cell exhaustion in multiple sclerosis. XI SIICA (National Congress of the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology). May 28-31 2017 abstract ID 568. Oral Presentation

Sambucci M. Foxp3 isoforms in multiple sclerosis. Giornata Romana di Immunologia (GRI). June 6, 2016. Rome. Oral Presentation.

Sambucci M, Gargano F, De Rosa V, Borsellino G, De Bardi M, Gasperini C, Ruggieri S, Matarese G, Battistini L. Foxp3 isoforms and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis. XXV AINI (Associazione Italiana Neuroimmunologia) Congress. May 11-14, 2016. Lecce Italy. Abstract n°25. Poster Session.

---

**Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 48.000 €**

**Research fellowship funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years and the amount of € 48,000**

---

## Cosima Baldari

Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Siena, Siena

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Cristina Ulivieri, Domiziana De Tommaso, Francesca Finetti, Francesca Cattaneo, Laura Patrussi**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Mario Milco D'Elis**, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze, Firenze

**Clara Ballerini**, Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Università degli Studi di Firenze, Firenze

**Giuliana Pelicci**, Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

## 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

### PREMESSE E OBIETTIVI

Negli ultimi anni è stato dimostrato che il reclutamento e l'attivazione delle cellule T autoreattive nel sistema nervoso centrale (SNC) sono responsabili della reazione infiammatoria che causa la distruzione della mielina ed il danno assonale nei pazienti con sclerosi multipla (SM). Dati recenti suggeriscono tuttavia che anche le cellule del SNC tra cui gli astrociti, rispondendo all'ingresso delle cellule T autoreattive, sono capaci di controllare lo sviluppo e la progressione della malattia tramite meccanismi non ancora ben caratterizzati.

Nell'ambito del precedente progetto finanziato da AISM abbiamo dimostrato che la proteina ShcC/Rai, fino ad allora descritta e studiata nei linfociti e nei neuroni, è presente anche negli astrociti dove promuove il rilascio di molecole pro-infiammatorie e contribuisce allo sviluppo dell'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), il modello sperimentale di SM, identificandola quindi come un potenziale bersaglio terapeutico. Dal momento che i dati in nostro possesso dimostrano che l'assenza della proteina ShcC/Rai nel SNC protegge dallo sviluppo della SM nel topo, a dispetto di un'aumentata attivazione di linfociti mielina specifici della sottopopolazione proinfiammatoria Th17, lo scopo di questo progetto è stato quello di individuare e comprendere i meccanismi molecolari che permet-

tono agli astrociti privi della proteina ShcC/Rai di bloccare la funzione delle cellule T autoreattive. Nello specifico ci siamo prefissati di analizzare sia l'informazione trasmessa dagli astrociti ai linfociti tramite il contatto diretto che quella trasmessa tramite il rilascio nel microambiente di fattori solubili. Questi comprendono sia fattori responsabili dell'inibizione specifica delle cellule Th17, come le citochine IL-27 e IL-10, che molecole in grado di inibire tutte le cellule immunitarie, come l'adenosina.

### RISULTATI

In questo progetto abbiamo incentrato la nostra attenzione sulla capacità di Rai/ShcC di modulare il rilascio di ATP da parte degli astrociti e la sua trasformazione in adenosina, una nota molecola immunosoppressiva, in una condizione che mima quella che si viene a creare a livello del SNC durante la SM, ovvero in un microambiente ricco di molecole pro-infiammatorie. La nostra ricerca ha rivelato che la proteina ShcC/Rai modula l'interazione tra astrociti e cellule infiammatorie che contribuiscono al danno neuronale da una parte inibendo il rilascio da parte degli astrociti di IL-27 e IL-10, che bloccano in modo specifico l'azione delle cellule Th17, dall'altra sopprimendo l'attività di due proteine, il CD39 ed il CD73, che si trovano sulla superficie degli astrociti e

che sono coinvolte nella degradazione dell'ATP nel suo prodotto immunosoppressorio adenosina. Questi dati, ottenuti *in vitro* utilizzando astrociti purificati da topi privi della proteina ShcC/Rai e topi di controllo trattati con molecole pro-infiammatorie (IL-17, IFN $\gamma$ ) prodotte dalle cellule Th17, sono stati confermati *ex vivo* tramite analisi dell'attività del CD39 e CD73 sugli astrociti derivanti da topi Rai<sup>-/-</sup> e di controllo in cui era stata indotta l'ESA.

Utilizzando inoltre co-culture di astrociti e linfociti T autoreattivi specifici per la mielina o colture di astrociti messe in contatto con il solo terreno di coltura degli stessi linfociti abbiamo evidenziato che l'assenza di Rai conferisce agli astrociti un fenotipo immunosoppressivo, caratterizzato da un aumento dei livelli di CD39 e CD73, attraverso un meccanismo contatto indipendente. Abbiamo inoltre dimostrato che i sovrinatanti di coltura di astrociti privi della proteina ShcC/Rai sono più immunosoppressivi se paragonati ai sovrinatanti di controllo in quanto capaci di inibire la proliferazione di linfociti T mediante l'induzione della molecola inibitoria CTLA-4. Dal momento che questi effetti vengono neutralizzati quando gli astrociti sono trattati con un inibitore di

CD39 e CD73 da cui dipende la concentrazione di adenosina nel microambiente, questi risultati dimostrano che l'assenza di Rai/ShcC negli astrociti risulta nell'inibizione dei linfociti T autoreattivi tramite la produzione di adenosina nel SNC di topi con ESA. A supporto di meccanismi contatto-indipendenti di inibizione dei linfociti T mediati da fattori solubili generati dagli astrociti, l'assenza di Rai negli astrociti non inficia la loro capacità di formare con cellule T autoreattive la sinapsi immunologica, una regione di contatto specializzata tra astrociti e linfociti che è necessaria perché i linfociti T autoreattivi una volta infiltrati nel SNC possano essere riattivati.

### CONCLUSIONI

I nostri dati suggeriscono un nuovo meccanismo patogenico per la SM in cui la proteina ShcC/Rai negli astrociti sostiene la funzione delle cellule T autoreattive promuovendo il rilascio di molecole pro-infiammatorie e mantenendo elevati i livelli di ATP extracellulare tramite l'inibizione del CD39 e CD73.

Pertanto l'inibizione di ShcC/Rai nel sistema nervoso centrale potrebbe rappresentare una nuova prospettiva terapeutica per la SM.

## Astrocyte deficiency of the Shc family member Rai attenuates myelin-reactive Th17 cell-dependent neurodegeneration in EAE: a mechanistic study of astrocyte-T cell interactions

### INTRODUCTION AND AIMS

In recent years autoreactive T cell recruitment and activation in the central nervous system (CNS) have been identified as the key pathogenic processes leading to neuroinflammation which is ultimately responsible for myelin destruction and axonal damage in multiple sclerosis (MS) patients. Recent data indicate, however, that cells resident in the CNS, including astrocytes, respond to T cell entry in MS, actively modulating the T cell dependent autoimmune response through mechanisms largely unknown.

In the context of our previously funded AISM project we demonstrated that the protein adaptor ShcC/Rai, previously described in lymphocytes and neurons, is expressed in astrocytes where it promotes the production of pro-inflammatory molecules contributes to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the mouse model of MS, thus identifying astrocytic Rai as a potential therapeutic

target in MS.

Since our data demonstrated that Rai deficiency in the CNS protects from EAE development, despite an enhanced activation of myelin-specific T cells belonging to the pro-inflammatory Th17 subset, the objective of this project was to explore and characterize the molecular mechanisms that underlie the ability of ShcC/Rai deficient astrocytes to antagonize the function of autoreactive T cells. Specifically we proposed to characterize how astrocytes impact T cell function both directly in a contact-dependent manner and through the release of soluble factors including the Th17 suppressive cytokines, IL-27 and IL-10 as well as adenosine, a well-known broadly immunosuppressive molecule.

### RESULTS

We first explored the ability of ShcC/Rai to modulate ATP release from astrocytes and its hydrolysis to its

immunosuppressive metabolite adenosine under conditions which mimic *in vitro* the CNS pro-inflammatory microenvironment during MS. Our results revealed that ShcC/Rai modulates the interplay between astrocytes and inflammatory cells that contribute to neuronal damage on the one hand by inhibiting the production of the Th17 suppressive cytokines IL-27 and IL-10, on the other suppressing the enzymatic activity of CD39 and CD73 which are expressed on the surface of astrocytes and are responsible for ATP hydrolysis into adenosine. Our *in vitro* findings, obtained on astrocytes purified from wild-type or Rai-deficient mice treated with Th17-specific cytokines, namely IL-17 or IFN $\gamma$ , were further confirmed in *ex vivo* experiments using astrocytes purified from wild-type or Rai-deficient EAE mice.

Moreover, using co-cultures of astrocytes and myelin-specific T cells as well as astrocytes exposed to the culture medium of autoreactive T cells we demonstrated that Rai deficiency confers to astrocytes an immunosuppressive phenotype characterized by high levels of surface CD39 and CD73 compared mainly through a contact-independent mechanism. Interestingly, we also found that soluble factors released by Rai-deficient astrocytes effectively inhibit T cell proliferation

by promoting the expression of CTLA-4, a surface receptor that suppresses T cell activation. Since these effects can be reversed by CD39 and CD73 inhibitors, which reduce adenosine concentration, these findings provide evidence that Rai deficiency in astrocytes suppresses autoreactive T cells by increasing adenosine production in the CNS of EAE mice. In agreement with a central role for a contact-independent mechanism of T cell suppression mediated by astrocyte-derived soluble factors, Rai deficiency in astrocytes does not impair their ability to form immunological synapses with autoreactive T cells, which is instrumental for autoreactive T cell activation in the CNS.

### CONCLUSIONS

Our results have identified a new mechanism by which astrocytic ShcC/Rai sustains the pathogenic potential of autoreactive T cells by promoting the astrocyte-mediated production of pro-inflammatory molecules and by preventing the degradation of proinflammatory extracellular ATP to its suppressive metabolite adenosine through the inhibition of CD39 and CD73. Hence inhibition of ShcC/Rai in the CNS may represent a novel therapeutic approach for the treatment of MS.

---

**PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI**  
**PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS**


---

*Pubblicazioni / Publications*

Ulivieri C, Savino MT, Luccarini I, Fanigliulo E, Aldinucci A, Bonechi E, Benagiano M, Ortensi B, Pelicci G, D'Elcios MM, Ballerini C, Baldari CT. The Adaptor Protein Rai/ShcC Promotes Astrocyte-Dependent Inflammation during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 2016 Jul 15;197(2):480-90

Ulivieri C, Baldari CT. Regulation of T Cell Activation and Differentiation by Extracellular Vesicles and Their Pathogenic Role in Systemic Lupus Erythematosus and Multiple Sclerosis. *Molecules.* 2017 Feb 2;22(2)

Ulivieri C, De Tommaso D, Finetti F, Pelicci G, D'Elcios MM, Ballerini C, Baldari CT. Rai signaling establishes a proinflammatory microenvironment during EAE by impairing the activity of extracellular ATP-degrading enzymes. Manuscript in preparation

*Comunicazioni a Congressi / Congress presentations*

Ulivieri C, De Tommaso D, Finetti F, Pelicci G, D'Elcios MM, Ballerini C, Baldari CT. Rai signaling in astrocytes plays a critical role in shaping the CNS microenvironment during EAE. Bari, 28-31 maggio 2017

Ulivieri C, De Tommaso D, Finetti F, Ortensi B, Pelicci G, D'Elcios MM, Ballerini C, Baldari CT. Astrocyte deficiency of the Shc family member Rai attenuates myelin-reactive Th17 cell-dependent neurodegeneration in EAE: a mechanistic study of astrocyte-T cell interactions. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 29-31 maggio 2017

Ulivieri C, De Tommaso D, Finetti F, Ortensi B, Pelicci G, D'Elcios MM, Ballerini C, Baldari CT. Astrocyte deficiency of the Shc family member Rai attenuates myelin-reactive Th17 cell-dependent neurodegeneration in EAE: a mechanistic study of astrocyte-T cell interactions. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 25-27 maggio 2016

Ulivieri C, De Tommaso D, Finetti F, Ortensi B, Pelicci G, D'Elcios MM, Ballerini C, Baldari CT. Astrocyte deficiency of the Shc family member Rai attenuates myelin-reactive Th17 cell-dependent neurodegeneration in EAE: a mechanistic study of astrocyte-T cell interactions. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 27-29 maggio 2015

Ulivieri C, Savino MT, Luccarini I, Fanigliulo E, Aldinucci A, Bonechi E, Benagiano M, Ortensi B, Pelicci G, D'Elcios MM, Ballerini C, Baldari CT. Rai promotes astrocyte-dependent inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis. 4th European Congress of Immunology Vienna 2015, Vienna September 6-9. Poster presentation

Ulivieri C, Savino MT, Aldinucci A, Fanigliulo E, Bonechi E, Della Bella C, Pelicci G, Ballerini C, D'Elcios MM, Baldari CT. The adaptor protein Rai: a novel player in multiple sclerosis pathogenesis. 9<sup>th</sup> National Conference of the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA). Firenze 28-31 maggio 2014. Poster presentation

Ulivieri C, Savino MT, Aldinucci A, Fanigliulo E, Bonechi E, Della Bella C, Pelicci G, Ballerini C, D'Elcios MM, Baldari CT. The adaptor protein Rai: a novel player in multiple sclerosis pathogenesis. EMBO Conference. Lymphocyte signalling. Bertinoro (FC) 2014, May 17-21. Poster presentation

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 75.000 €**

**Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 75,000**

---

## Laura Piccio

Dipartimento di Neurologia, Washington University in St Louis, St Louis, MO, USA

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Francesca Cignarella, Claudia Cantoni, Robert Mikesell, Hamid Salim**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Robyn Klein**, Dipartimento di Medicina Interna,  
Washington University in St Louis, St Louis, MO, USA

**Lily Dong**, University of Texas Health Science Center at San Antonio,  
San Antonio, TX, USA

## Ruolo immunomodulatorio della adiponectina in modelli sperimentali della sclerosi multipla

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune cronica demielinizzante, che interessa il sistema nervoso centrale (SNC). La SM colpisce circa 2,3 milioni di individui in tutto il mondo. I farmaci ad oggi impiegati contro la SM sono in grado di controllare solo parzialmente la componente infiammatoria della malattia, mentre non sono disponibili farmaci che prevengano o rallentino la componente neurodegenerativa. Recentemente diversi studi hanno dimostrato che l'obesità in bambini/giovani adulti conferisce un aumentato rischio di sviluppare la SM. I meccanismi biologici che correlano obesità e SM non sono però ancora noti. Sappiamo che l'obesità è caratterizzata da uno stato di infiammazione cronica, accompagnata dal rilascio di citochine infiammatorie che possono influenzare la risposta immunitaria. Il tessuto adiposo è un'importante fonte di citochine, note anche come adipochine, che regolano sia il metabolismo che la risposta immunitaria.

Una di queste adipochine prodotte dal tessuto adiposo è l'adiponectina. L'adiponectina esiste in circolazione come proteina intera, come un frammento proteolitico costituito dalla porzione globulare (adiponectina globulare) e in forma di oligomeri. L'adiponectina è una molecola insulino-sensibilizzante, ma svolge anche funzioni anti-infiammatorie e protettive sui vasi sanguigni. Gli effetti dell'adiponectina sono mediati da specifici recettori (AdipoR1 e AdipoR2) espressi in vari organi e diversi tipi di cellule: nel muscolo, nel fegato, sulle cellule endoteliali e, come abbiamo precedentemente dimostrato nel nostro

laboratorio, anche sui linfociti murini. I livelli circolanti di adiponectina correlano inversamente con l'indice di massa corporea. I livelli di adiponectina sono ridotti nel siero di soggetti obesi e sono invece aumentati con un regime di restrizione calorica (RC).

L'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAS) è il principale modello animale per la SM.

Nella EAS e nella SM si ha una attivazione periferica di cellule immunitarie, i linfociti, che reagiscono contro antigeni del SNC; questi linfociti auto reattivi presenti nel sangue periferico riescono ad infiltrare il SNC attraversando la barriera emato-encefalica (BEE). La BEE agisce limitando il flusso di soluti e cellule tra sangue e SNC. Dati recenti in letteratura suggeriscono che la BEE possa essere attivata da cambiamenti metabolici dovuti all'obesità. L'adiponectina ha vari effetti protettivi sulla funzione endoteliale, quindi con variazioni del suo livello sierico è possibile influenzare le caratteristiche della BEE. Ad oggi non esistono dati sul ruolo dell'adiponectina nel modificare la funzionalità della BEE nel contesto della SM o EAS. Gli obiettivi principali di questo progetto sono stati: 1 - determinare l'effetto di diverse forme di adiponectina nel modello di EAS; 2 - determinare il meccanismo con cui l'adiponectina modula l'integrità della BEE e valutare possibili effetti sulla migrazione di cellule immunitarie nel SNC.

### RISULTATI

Nella prima parte di questo progetto (Obiettivo 1) abbiamo studiato gli effetti dell'adiponectina nel modello di EAS e sulla BEE *in vivo*. Abbiamo dimostrato

che topi geneticamente mancanti del gene per l'adiponectina (topi *Adp<sup>-/-</sup>*) presentano una ridotta permeabilità della BEE all'esordio della malattia nel modello di EAS. Questi dati suggeriscono che l'adiponectina possa avere un ruolo nel modulare l'integrità e la permeabilità della BEE nel SNC durante l'infiammazione. Inoltre, il decorso clinico dell'EAS e la neuropatologia sono risultati più severi nei topi *Adp<sup>-/-</sup>* se comparati ai controlli. Abbiamo anche dimostrato un'augmentata espressione sulla BEE in topi *Adp<sup>-/-</sup>* rispetto ai controlli, di molecole di adesione (ICAM-1 and VCAM-1) coinvolte nella migrazione di linfociti nel SNC. Nell'insieme questi risultati dimostrano che l'adiponectina ha un ruolo protettivo durante l'EAS; suggeriscono inoltre che questi effetti benefici siano almeno in parte dovuti all'effetto dell'adiponectina sulla BEE.

Nella seconda parte della ricerca (Obiettivo 2) per studiare il potenziale ruolo dell'adiponectina nel modulare la permeabilità della BBB, abbiamo utilizzato dei modelli *in vitro* di BBB umani e murini. Il modello di BBB umano è stato allestito utilizzando delle cellule endoteliali microvascolari umane immortalizzate (hCMEC/D3) coltivate con astrociti primari umani *in vitro*. L'integrità della barriera *in vitro* è stata valutata misurando la resistenza elettrica transendoteliale (TEER) o valutando la diffusione di soluti fluorescenti (destrano fluorescente di vari pesi molecolari). Abbiamo valutato *in vitro* gli effetti sulla BEE di due differenti adiponectine ricombinanti: l'intera proteina e la forma di adiponectina globulare. Entrambe le forme di adiponectina hanno aumentato significativamente la TEER e fanno diminuire la diffusione di destrano fluorescente quando comparati ai controlli. Questi risultati suggeriscono che l'adiponectina sia in grado di ridurre la permeabilità della BEE a differenza di altre citochine con funzioni pro-infiammatorie come IFN-gamma e TNF-alpha (inclide nei nostri

esperimenti come controlli positivi), che invece diminuiscono la TEER e quindi aumentano la permeabilità della BEE nel nostro modello *in vitro* di BEE. Abbiamo anche generato un modello murino di BEE utilizzando una coltura primaria di cellule cerebrali microvascolari (BMECs) derivate da topi adulti. I risultati ottenuti in questo modello murino sono risultati comparabili a quelli ottenuti nel modello umano di BEE.

In corso di svolgimento di questo progetto si è resa disponibile una nuova molecola chiamata AdipoRon. Questa molecola sintetica mima gli effetti dell'adiponectina agendo come agonista selettivo AdipoR1 and AdipoR2. I nostri dati hanno dimostrato che l' AdipoRon è in grado di riprodurre gli effetti delle adiponectine ricombinanti nei nostri modelli *in vitro* di BEE, sia umana che murina, aumentando la TEER. In esperimenti *in vivo* con topi C57BL/6 abbiamo inoltre dimostrato che il trattamento con AdipoRon, (iniziato nella fase post-immunizzazione) è in grado di migliorare il decorso clinico della EAS.

## CONCLUSIONI

Studi recenti suggeriscono nella SM l'esistenza di una diretta interazione tra metabolismo e sistema immunitario. Il nostro progetto ha avuto lo scopo di studiare questi aspetti facendo luce sul potenziale ruolo immunomodulatorio dell'adiponectina nella EAS, come modello per la SM. Questo studio ha inoltre considerato l'utilizzo di adiponectina e AdipoRon come possibili trattamenti per l'EAS e potenzialmente per la SM.

L'adiponectina è fisiologicamente presente in circolo e la sua produzione può essere manipolata con la dieta, ad esempio è fortemente indotta in un regime di restrizione calorica. I risultati di questa ricerca potrebbero aprire nuove possibilità terapeutiche per le persone con la SM.

## Immunomodulatory role of adiponectin in experimental models of multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a presumed autoimmune disorder directed against components of central nervous system (CNS) myelin affecting about 2.3 million world-wide. Current treatments are only partially effective in controlling disease activity and no drugs are available that prevent or slow MS progressive forms. Several recent studies showed that obesity during childhood/young adulthood confers increased risk of developing MS. Obesity is characterized by a low-grade chronic inflammatory state accompanied by cytokine release that can affect immune responses. Indeed, white adipose tissue, is an active source of cytokines, known as adipokines that regulate not only metabolic pathways, but also immune and inflammatory responses. One such adipokine is adiponectin, which exists in the circulation in its full-length form, a functional proteolytic fragment (its globular domain) and in oligomeric forms. Adiponectin is an insulin-sensitizing molecule, but has multiple other anti-inflammatory and vascular protective functions. Adiponectin effects are mediated through specific cell surface receptors, adiponectin receptor R1 and R2 (AdipoR1 and AdipoR2) expressed on various cell types including muscle, liver, endothelial cells and, as we have shown, on murine lymphocytes. Circulating adiponectin levels display a strong inverse correlation with body mass index (BMI). Its levels are reduced in serum of overweight subjects and increased with calorie restriction (CR).

MS can be mimicked by the animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In both MS and EAE, activation of immune cells against CNS antigens occurs in the periphery as self-reactive lymphocytes are detectable in the blood and gain access to the CNS by crossing the blood brain barrier (BBB). The BBB strictly limits the inflow of solutes and cells from the blood to the CNS and it is formed by endothelial cells brought together by tight junctions formed by claudins and occludins and tight liner sheets of pericytes and astrocytic endfeet. Recent evidence suggests that the BBB is activated as a result of metabolic and inflammatory changes that occur in response to obesity. Adiponectin has been reported to have a variety of protective effects on endothelial function and therefore changes in its serum levels can

potentially impact the BBB. The possible role of adiponectin in modulating the function of the BBB in the CNS in the context of MS and EAE has not been evaluated previously. This study had two major aims: Objective 1 - Determine the effects of treatment with different forms of adiponectin in EAE; Objective 2 - Determine the mechanism of adiponectin-mediated enhancement of BBB integrity and whether there is concurrent limitation of immune cell transmigration during homeostatic and inflammatory conditions.

### RESULTS

In the first part of this projects (Objective 1) we focused on studying the effects of adiponectin in vivo on the BBB and on EAE. We demonstrated that mice that are genetically deficient for adiponectin (Adp<sup>-/-</sup> mice) displayed increased BBB permeability in vivo at the time of EAE clinical onset. This finding suggests that adiponectin may play a role in modulating BBB integrity and permeability during CNS inflammation. Moreover, EAE clinical course and pathology were more severe in Adp<sup>-/-</sup> mice compared to mice normally producing adiponectin. Interestingly, we have also observed increased expression of BBB adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) that would favour T cell migration in the CNS of Adp<sup>-/-</sup> mice compared to mice with normal levels of adiponectin in the serum. All together these results demonstrate a protective role of adiponectin during EAE. They also suggest that this could be at least partially mediated by adiponectin effects on the BBB. Next, to better investigate the potential role of adiponectin in modulating BBB permeability we utilized in vitro human and murine models of BBB. A human BBB in vitro model was generated using immortalized human cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC/D3) co-cultured with primary human astrocytes in a transwell system. *In vitro* barrier integrity was assessed by measurement of transendothelial electrical resistance (TEER) or the diffusion of fluorescently labeled solutes (fluorescein-dextran of various molecular weights). We tested the in vitro direct effects on the BBB of full-length and globular recombinant adiponectin. Both forms of adiponectin significantly increased TEER and decrease the diffusivity of fluorescein-dextran compared to treatment with vehicle (PBS) in a dose-dependent

fashion. These results suggest that adiponectin can reduce BBB permeability as opposed to pro-inflammatory cytokines like IFN $\gamma$  or TNF $\alpha$  (included as positive controls in our experiments) which decreased TEER and BBB permeability in our in vitro BBB system. A murine BBB model was also generated in vitro with primary brain microvascular endothelial cells (BMECs). Similarly to what observed in the human BBB model, globular and full-length adiponectin were able to maintain BBB integrity and increase BBB permeability in vitro. In addition, during the course of this project, a selective, orally active, synthetic small-molecule named AdipoRon which function as an adiponectin agonist for AdipoR1 and AdipoR2 was developed. We demonstrated that AdipoRon was mimicking the effects of recombinant adiponectin on the human and murine BBB models by increasing TEER. Importantly, treatment with AdipoRon started after immunization in C57Bl/6 mice was also able to ameliorate EAE clinical course. The

use of this molecule as a potential therapeutic intervention instead of adiponectin would have several advantages including more stability in the blood, possibility of oral administration and effectiveness at lower concentration.

## CONCLUSIONS

Several lines of evidence suggest an interplay between metabolic pathways and the immune system in MS. Our proposal had the goal to study the immunomodulatory role of adiponectin in EAE as a model for MS. In addition, this study evaluated adiponectin and the adiponectin agonist AdipoRon as a treatment for EAE and possibly MS. Adiponectin is normally present in human blood, and its production is greatly enhanced by calorie restriction. We expect adiponectin to be safe, and perhaps can be endogenously generated by dietary manipulations. Our preliminary results thus may open new avenues for safe and effective therapeutic interventions.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

### *Pubblicazioni / Publications*

Cignarella F, Cantoni C, Laura Ghezzi L, Salter A, Dorsett Y, Chen L, Fontana L, Weinstock GM, Cross AH, Zhou Y and Piccio L. Intermittent fasting confers protection in CNS autoimmunity by altering the gut microbiota. *Cell Metabolism*, in press

### *Comunicazioni a Congressi / Congress Presentations*

Cignarella F, Cantoni C, Salimi H, Klein R and Piccio L. Immunomodulatory role of adiponectin in experimental models of multiple sclerosis. ACTRIMS Forum. San Diego, CA, USA, 2018

Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Zhou Y, Cross A and Piccio L. Effects of Intermittent Fasting in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis". American Neurological Association's (ANA) 142<sup>nd</sup> Annual Meeting. San Diego, CA, USA, 2018

Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Zhou Y, Cross A and Piccio L. Effects of Intermittent Fasting in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. XXVI AINI Congress and 16th ESNI Course. Venice, Italy, 2017

Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Zhou Y, Cross A and Laura Piccio L. "Effects of Intermittent Fasting in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis". CNND Symposium. St. Louis, MO, USA, 2017

Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Zhou Y, Cross A and Piccio L. Effects of Intermittent Fasting in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. ACTRIMS Forum. Orlando, FL, USA, 2017

Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Zhou Y, Cross A and Piccio L. Effects of Intermittent Fasting in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. American Neurological Association's (ANA) 141<sup>st</sup> Annual Meeting. Baltimore, MD, USA, 2016

Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Mikesell R, Ramsbottom M, Zhou Y, Cross A and Piccio L. Effects of intermittent fasting in an animal model of multiple sclerosis. ACTRIMS Forum. New Orleans, LA, USA, 2016

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 79.800 €**

**Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years and the amount of € 79,800**

---

## Silvia Dusi

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

MENTORE / MENTOR: **Gabriela Constantin**

# Visualizzazione e caratterizzazione delle dinamiche intraparenchimali dei neutrofili nel sistema nervoso centrale durante l'encefalomielite autoimmune sperimentale

## PREMESSE E OBIETTIVI

La maggioranza degli studi di neuroimmunologia sulla sclerosi multipla (SM) ha identificato come principali mediatori della patologia i linfociti T auto-reattivi. Recentemente tuttavia, è stato dimostrato che le cellule chiamate neutrofili polimorfonucleati (PMNs) svolgono un ruolo importante in diverse patologie del sistema nervoso centrale (SNC), quali l'ictus ischemico e l'Alzheimer. Un ruolo per i PMNs sta inoltre emergendo nella patogenesi di disordini autoimmuni, inclusa la SM ed il suo modello animale, l'Encefalomielite Sperimentale Autoimmune (ESA). Il coinvolgimento dei PMNs nell'induzione e nella progressione dell'MS/ESA non è ancora chiaro. Inoltre, i meccanismi molecolari che regolano l'attività dei PMNs nel parenchima del SNC sono perlopiù non noti. Per tali ragioni, lo scopo principale di questo progetto è stato caratterizzare le dinamiche dei PMNs 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 sistema nervoso centrale *in vivo*.

## RISULTATI

Abbiamo innanzitutto valutato il reclutamento dei PMNs nel SNC durante l'ESA caratterizzando le diverse componenti proinfiammatorie nelle diverse fasi di malattia in topi C57Bl/6J immunizzati con l'antigene mielinico MOG35-55. I risultati della citofluorimetria hanno evidenziato PMNs infiltrati sia nel cervello che nel midollo spinale in tutte le fasi di malattia, nello specifico durante la fase preclinica, all'esordio, al picco e durante la fase cronica di ESA. I PMNs sono risultati la maggiore componente leucocitaria infiltrata nel midollo spinale di tutte le fasi di ESA, rappresentando circa il 40% dei leucociti totali infiltrati. Questo dato inatteso suggerisce un ruolo cruciale dei PMNs non solo nelle fasi iniziali della ma-

lattia, ma anche nel perpetuarsi dell'infiammazione. Abbiamo, dunque, caratterizzato la distribuzione e le dinamiche dei PMNs nel parenchima del midollo spinale mediante MLDF all'esordio di ESA, caratterizzato da un massivo infiltrato di neutrofili. I PMNs infiltrati nel SNC sono risultati caratterizzati da tre diverse classi di velocità: il 50% dei PMNs totali presentavano un movimento stocastico nel parenchima midollare; il 15% dei PMNs totali mostravano un'alta velocità con un movimento direzionato lungo i vasi, mentre il rimanente 30% dei PMNs erano praticamente fermi a livello perivascolare, a suggerire un potenziale contatto con le cellule del SNC. Le dinamiche dei PMNs sono risultate comparabili tra l'esordio di malattia e le altre fasi di ESA analizzate.

Allo scopo di investigare il ruolo di molecole di adesione come le integrine, nel traffico dei PMNs, abbiamo effettuato esperimenti di MLDF utilizzando anticorpi bloccanti, focalizzando inizialmente la nostra attenzione sull'integrina LFA-1. Il blocco di LFA-1 ha portato a un netto aumento della velocità dei PMNs con un incremento nella numerosità nella classe di PMNs che si muovevano velocemente dal 15% al 34%. Inoltre, il blocco di LFA-1 ha portato ad una riduzione nella compartimentalizzazione perivascolare con i PMNs che si muovevano maggiormente nel parenchima spinale. Questi dati indicano un ruolo per LFA-1 nel controllo delle dinamiche dei PMNs infiltrati nel parenchima spinale in corso di ESA. Successivamente, mediante MLDF su topi transgenici Cx3cr1GFP/+ immunizzati per ESA abbiamo osservato i PMNs infiltranti esibire un movimento direzionato verso la microglia con cui creavano contatti stabili. Il blocco di LFA-1 ha visto i PMNs allontanarsi dalla microglia e muoversi a velocità maggiore nel parenchima spinale. Inoltre, studiando altre molecole potenzialmente implicate nel traffico dei PMNs abbiamo osservato l'espressione della proteina TIM-1 a livello intracellu-

lare nei PMNs quiescenti, con traslocazione sulla loro membrana cellulare dopo stimolazione *in vitro*. Dati preliminari hanno inoltre mostrato l'espressione di superficie di TIM-1 sui PMNs infiltrati nel SNC durante ESA. Questi dati suggeriscono un nuovo inesplorato ruolo per TIM-1 nella funzionalità neutrofilica, con importanti implicazioni nel loro traffico intravascolare ed intraparenchimale in corso di infiammazione.

### CONCLUSIONI

Questo studio ha caratterizzato per la prima volta l'accumulo e le dinamiche dei PMNs nel parenchima spinale in corso di ESA, evidenziando un loro ruolo

proinfiammatorio nella patogenesi così come nella fase cronica di malattia. L'integrina LFA-1 è risultata cruciale nel controllo della compartimentalizzazione dei PMNs e dei contatti instaurati con la microglia nel parenchima spinale durante l'ESA. Inoltre, la traslocazione di TIM-1 a livello della membrana cellulare dei PMNs dopo stimolazione *in vitro* nonché *in vivo*, suggerisce un ruolo ancora non conosciuto per TIM-1 nel traffico dei PMNs in corso di infiammazione. Collettivamente, lo studio dei meccanismi molecolari che regolano la funzionalità neutrofilica migliorerà le conoscenze della patogenesi e cronicizzazione della SM/ESA, promuovendo lo sviluppo di nuove prospettive terapeutiche.

## Visualization and characterization of neutrophil intraparenchymal dynamics in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis

### INTRODUCTION AND AIMS

The majority of neuroimmunological studies on multiple sclerosis (MS) have focused the attention on myelin-reactive T lymphocytes as key players of the disease. Anyhow, in recent years it has been demonstrated that polymorphonuclear neutrophils (PMNs) play an important role in the pathogenesis of inflammatory disorders of the central nervous system (CNS), such as ischemic stroke and Alzheimer's disease. A role for PMNs is also emerging in the pathogenesis of autoimmune diseases, including MS and its animal model the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). However, the involvement of PMNs in MS/EAE induction and progression is still unclear and the molecular mechanisms controlling their activity in the CNS parenchyma are not known. For this reason, the main goal of this project was to characterize PMN intraparenchymal dynamics in the CNS during EAE by using two-photon laser microscopy (TPLM) that provides direct observations of living PMNs into CNS.

### RESULTS

In order to understand the timing of PMN recruitment into the inflamed CNS during EAE, we compared the inflammatory cell infiltrates of C57Bl/6 MOG35-55-immunized EAE mice at different time points: at the preclinical phase, disease onset, disease peak and during the chronic phase. Our multicolor

flow cytometry results showed that, in all disease phases, PMNs infiltrate both the brain and spinal cord (SC). Interestingly, PMNs were the most represented leukocyte population at all time points in the SC, accounting for more than 40% of the total leukocyte infiltrates. These unexpected data suggest a crucial role for PMNs not only in the initiation of the disease, but also in its chronicization. We next characterized the dynamics of PMN motility during EAE in TPLM studies focusing on disease onset, which is characterized by massive neutrophil infiltration. Intraparenchymal infiltrated PMNs resulted characterized by three different velocity classes with the 50% of total PMNs moving slowly with an undirected movement inside the SC parenchyma. Around 15% of total PMNs were rapidly moving along vessels wall exhibiting a directed motility. Intriguingly, around 30% of infiltrated PMNs showed the lowest mean velocity among total PMNs. This portion of cells was not moving and was swarming around a fixed point closed to the vessel wall, suggesting potential physical contacts with CNS cells. We analyzed motility behavior of PMNs at different EAE phases revealing that the velocity of infiltrated PMNs was independent on the disease stage with cells at the onset of disease showing a comparable velocity with the other phases.

We next investigated the role of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) integrin in PMN dynam-

ics inside the SC parenchyma at EAE onset. LFA-1 blockade led to increased mean velocity and motility coefficient, and the percentage of cells moving faster was clearly increased from 15% to 34%. Interestingly, the anti-LFA-1 treatment led to a reduction in vessel-associated motility with higher number of PMNs moving deep in the CNS parenchyma when compared to control condition. These data demonstrate that LFA-1 controls PMN behavior in the SC parenchyma during EAE onset having a role in the perivascular compartmentalization of these cells. TPLM experiments on Cx3cr1GFP/+ transgenic mice immunized with MOG35-55 peptide showing that immediately after transmigration PMNs display a migration bias and rapidly move toward microglia cells. Confocal imaging of SC sections from Cx3cr1GFP/+ EAE mice confirmed many PMNs in the parenchyma that were juxtaposed to microglial cells. Interestingly, the proportion of not moving PMNs interacting with microglia cells was drastically decreased after LFA-1 blockade leading to an increased mean velocity of treated PMNs.

Additionally, we observed a T cell immunoglobulin mucin domain-1 (TIM-1) expression localized intra-

cellularly in resting neutrophils and on plasma membrane upon *in vitro* stimulation. Moreover, very preliminary experiments on EAE mice, shown infiltrating TIM-1+ PMNs in brain and SC parenchyma. These interesting new data suggest a novel unexplored role for TIM-1 in PMN functions with potentially important consequences in their intravascular and intraparenchymal motility within inflamed tissue.

## CONCLUSIONS

For the first time to our knowledge the present study: (i) characterizes intraparenchymal PMN accumulation and dynamics within inflamed SC tissue; (ii) identifies LFA-1 integrin as a pivotal molecule able to affect neutrophil dynamics in the SC parenchyma during EAE but also to interfere with their capacity to contact microglia cells; (iii) finds out a surface expression of TIM-1 molecule on PMNs upon activation, both *in vitro* and *in vivo*. Collectively, a deeper understanding on the molecular mechanisms governing PMN motility may help to better understand EAE/MS pathogenesis and chronicization, potentially improving therapeutic approaches in autoimmune neurodegenerative disorders.

---

### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Dusi S, Rossi B, Lopez N, Angiari S, Carlucci T, Arioli J, Ruggieri S and Constantin G. LFA-1 integrin controls neutrophils trafficking and contacts with microglial cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. XXVI AINI Congress, San Servolo-Venezia, Italy, June 26-30 2017

---

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 49.000 €

Research Fellowship funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years and the amount of € 49,000

---

## Valerio Chiurchiù

Laboratorio di Neurochimica dei Lipidi, IRCCS, Fondazione Santa Lucia, Roma

COLLABORATORE / COLLABORATOR:

**Alessandro Leuti**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Luca Battistini**, Laboratorio di Neuroimmunologia, IRCCS, Fondazione Santa Lucia, Roma

## Plasticità e polarizzazione dei macrofagi come target nella sclerosi multipla: in “ex vivo” veritas

### PREMESSE E OBIETTIVI

Questo progetto rappresenta il primo studio completo e dettagliato sul ruolo dei macrofagi classicamente attivati di tipo M1 o dei macrofagi alternativamente attivati di tipo M2 nella sclerosi multipla (SM), le cui proprietà rispettivamente dannose o benefiche sembrano essere coinvolte nella progressione di tale malattia. 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 associati alla plasticità e polarizzazione dei macrofagi nelle diverse fasi di malattia e nel loro effetto nell'influenzare le risposte dei linfociti T, 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 donatori sani e da pazienti con SM recidivante-remittente (SM-RR) o progressiva (SM-P). A tale scopo, mediante citofluorimetria policromatica a flusso, ELISA e RT-PCR quantitativa è stata effettuata una caratterizzazione dettagliata *ex vivo* di vari marcatori di attivazione o di co-stimolazione, di recettori per le chemochine così come di citochine e chemochine ed altri marcatori infiammatori in questi due tipi di popolazioni macrofagiche.

I nostri dati hanno evidenziato che gli M1 delle persone con SM-RR mostravano un profilo più pro-infiammatorio rispetto ai donatori sani, in quanto esprimevano maggiori quantità dei loro tipici marca-

tori di tipo M1 come iNOS, CD25, CD80/CD86, PD-L1 e CCR7 ed elevati livelli di citochine e chemochine pro-infiammatorie, tra cui IL-12 e CXCL10. Inoltre, gli M2 dei pazienti SM-RR sembravano aver perso il loro caratteristico profilo anti-infiammatorio, in quanto mostravano diminuite quantità dei loro tipici marcatori quali CD206, CD200R, CD36 e delle chemochine CCL17 e CCL18, e al contempo mostravano un'aumentata espressione di alcuni marcatori tipici degli M1 come iNOS, CD25, CD80/86 e IL-12. Questi risultati sono supportati anche dall'evidenza che entrambe le popolazioni di macrofagi delle persone con SM erano in grado di influenzare l'attività funzionale dei linfociti T. Infatti, mentre gli M1 dei pazienti SM inducevano una risposta Th1 maggiore (SM-P > SM-RR) rispetto agli M1 dei donatori sani senza invece influenzare le risposte Th2 e Treg, gli M2, pur non mostrando alcun effetto nel modulare le risposte Th2 o Treg, erano caratterizzati da una lieve capacità di indurre risposte Th1 in maniera direttamente proporzionale alla gravità di malattia.

### CONCLUSIONI

Questo studio dimostra che vi è un'alterazione del delicato equilibrio tra macrofagi M1 e M2 durante la SM, 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 e riscontrati anche *in vivo*, sono molto promettenti e potrebbero fornire nuove conoscenze per la patogenesi di tale malattia e persino nuovi approcci terapeutici basati sul modulare la plasticità di tali cellule verso un destino più anti-infiammatorio e protettivo.

## Targeting 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 classically-activated M1-like and alternatively-activated M2-like macrophages in multiple sclerosis (MS), whose respective detrimental and beneficial properties is likely to be involved in disease progression. This approach is novel, since it shifts 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 a thorough investigation of mechanisms and molecules associated with macrophage plasticity and polarization in the different phases of MS and of their effect on driving T cell responses, providing a basis for efficacious macrophage-centered diagnostic and therapeutic strategies.

### RESULTS

In the present Project, we phenotypically investigated M1 and M2 macrophages in terms of their different activation status and plasticity in polarized monocyte-derived macrophages obtained from healthy human subjects and from treatment-free relapsing-remitting (RR-MS) and progressive (P-MS) patients. Thus, an ex vivo characterization of surface activation/co-stimulatory markers and chemokine receptors, cytokines and chemokines and other inflammatory makers was performed through polychromatic flow cytometry, ELISA and qRT-PCR in human polarized M1 and M2 macrophages. Our investigation showed that M1 macrophages of RR-MS patients possessed a higher proinflammatory profile compared to healthy donors, since they expressed higher levels of activation and/or co-stimulatory M1-like markers iNOS, CD25, CD80/CD86, PD-L1 and CCR7 as well as increased release of several proinflammatory cytokines and chemokines, particularly IL-12 and CXCL10). On the other hand, M2 lost their M2-like

phenotype by showing a decreased expression of their signature markers CD206, CD200R, CD36 and chemokines (CCL17 and CCL18) as well as a concomitant upregulation of several M1-like markers such as iNOS, CD25, CD80/CD86 and IL-12. This immunophenotypical alteration was even more evident and exacerbated in P-MS patients, with M1 macrophages showing a profile that was even more pro-inflammatory and M2 macrophages even less protective than RR-MS patients. These data were also supported by the evidence that M1 and M2 macrophages of RR-MS and P-MS patients functionally affected T cell responses, whereby M1 induced a stronger Th1 response (P-MS > RR-MS) without significantly affecting Th2 and induced-Treg (iTregs) polarization; whereas M2 cells of MS patients not only didn't affect induction of Th2 and iTregs, but acquired a slight ability to induce Th1 cells which was directly proportional to disease severity. Overall, our data not only delineate an immunophenotypical and functional alteration of M1 and M2 macrophages during MS and suggest the existence of a disrupted M1/M2 balance, with M1 being hyperactive and more pro-inflammatory and M2 being less protective and switching to an M1-like phenotype, but also that such disrupted balance exacerbates during disease progression.

### CONCLUSIONS

Overall, our data seem to delineate that an altered M1/M2 macrophages' balance during MS 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 and to be identified *in vivo*, are indeed promising and we believe might shed some light on novel pathogenic macrophage-driven mechanisms underlying MS possibly leading to potential therapeutic approaches aimed at driving their plasticity towards an anti-inflammatory and neuroprotective destiny.

---

### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Talamonti E, Pauter AM, Asadi A, Fischer AW, Chiurchiù V, Jacobsson A. Impairment of systemic DHA synthesis affects macrophage plasticity and polarization: implications for DHA supplementation during inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Aug;74(15):2815-2826

Chiurchiù V, Leuti A, Cencioni MT, Albanese M, De Bardi M, Bisogno T, Centonze D, Battistini L, Maccarrone M. Modulation of monocytes by anandamide in multiple sclerosis involve distinct Toll-like receptors. *Pharmacological Research* 2016 Sep 8;113(Pt A):313-319

Chiurchiù V, Orlacchio A, Maccarrone M. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7909380

Leuti E, Gentile A, Fresegna D, Centonze D, Battistini L, Maccarrone M, Chiurchiù V. The balance of M1/M2 macrophages is significantly altered in experimental autoimmune encephalomyelitis. 2018, Under Review

Battistini L, Centonze D, Maccarrone M. M1/M2 macrophages' balance is altered in multiple sclerosis. Valerio Chiurchiù, Alessandro Leuti, Maria Albanese, ECTRIMS, London, UK 14th-17th September 2016

Chiurchiù V, Leuti A, Gentile A, Albanese M, Fresegna D, Bullitta S, Centonze D, Maccarrone M, Battistini L. The equilibrium of M1/M2 macrophages is altered in multiple sclerosis and its experimental animal model. ISNI, Jerusalem, Israel 26th-29th September 2016

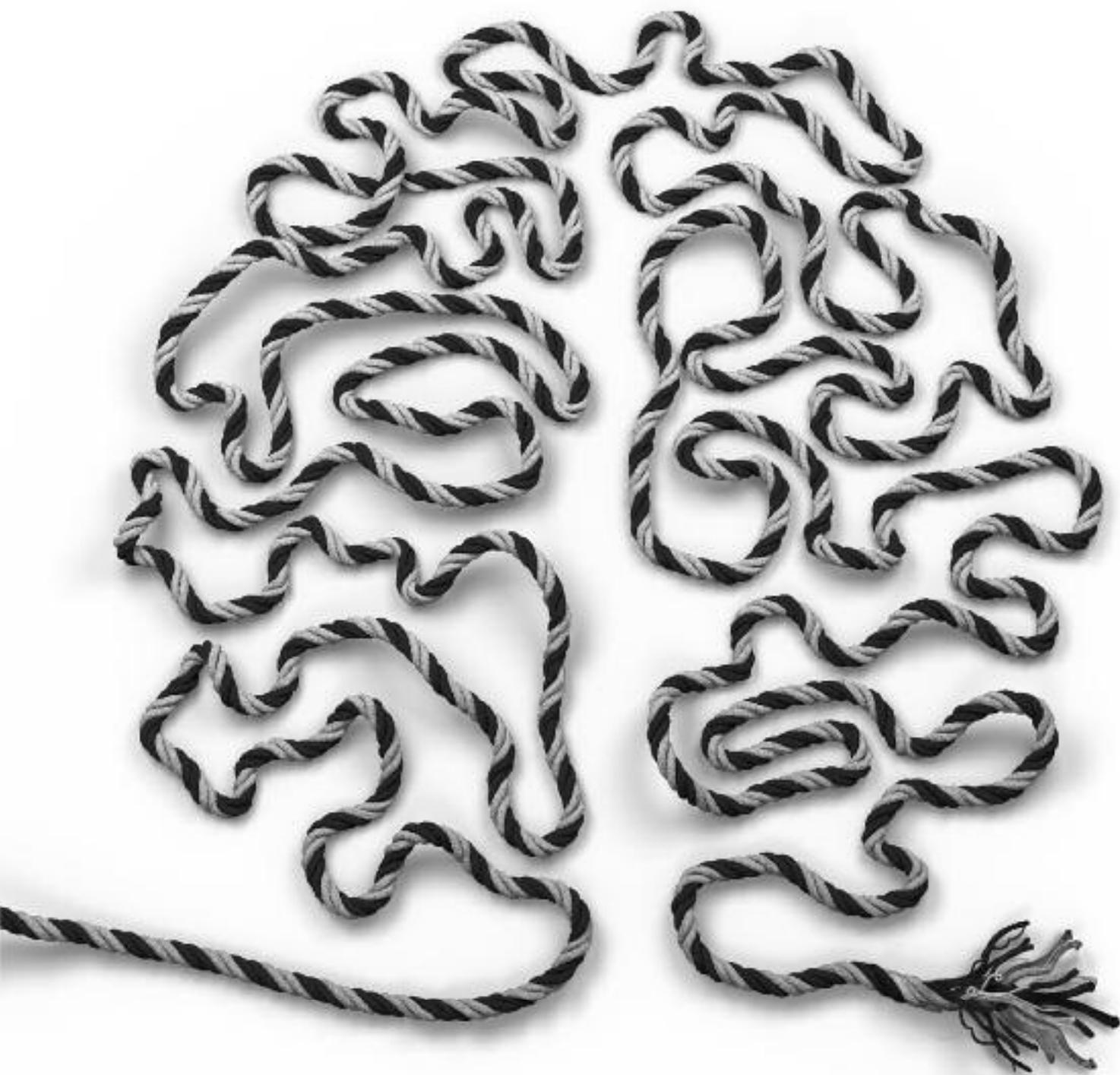
Chiurchiù V, Leuti A, Gentile A, Albanese M, Fresegna D, Bullitta S, Centonze D, Maccarrone M, Battistini L. The equilibrium of M1/M2 macrophages is altered in multiple sclerosis and its experimental animal model. CELL SYMPOSIA, 100 years of Phagocytes, Giardini Naxos, Sicily Italy 19th-22<sup>nd</sup> September 2016

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 55.000 €**

**Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 1 year and the amount of € 55,000**

---



**VERSO NUOVI  
TRATTAMENTI**

*TOWARDS NEW TREATMENTS*

## Roberto Furlan

Unità di Neuroimmunologia Clinica, Istituto di Neurologia Sperimentale,  
Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Giacomo Casella, Federico Colombo, Annamaria Finardi,  
Gerard Ill-Raga, Mattia Bastoni**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Antonello Spinelli**, Servizio di Fisica Sanitaria, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano  
**Paola Podini**, Unità di Neuropatologia, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano  
**Hélène Descamps, Luca Muzio** Unità di Neuroimmunologia,  
Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

## Microvescicole microgliali come vettore terapeutico in neuroinfiammazione

### PREMESSE E OBIETTIVI

Tra le cellule del cervello la microglia è considerata la prima linea di difesa, la cellula del sistema nervoso che comunica con il sistema immunitario. Si ritiene perciò che la microglia sia molto coinvolta nelle malattie neuroinfiammatorie come la sclerosi multipla. In particolare durante le fasi progressive della sclerosi multipla, l'infiammazione è sostenuta soprattutto da microglia attivata piuttosto che da cellule immunitarie provenienti dal sangue periferico. Le terapie correnti, tuttavia, non sono in grado di modulare efficientemente la microglia. Per comunicare tra loro e con altri tipi cellulari la microglia rilascia piccolissime vescicole, che vanno dai 100 ai 500 nanometri, chiamate vescicole extracellulari. La nostra proposta era quella di utilizzare questo sistema di comunicazione naturale come approccio terapeutico originale per la sclerosi multipla. In particolare volevamo produrre vescicole ingegnerizzate in modo da contenere molecole anti-infiammatorie e verificare il loro potenziale terapeutico *in vitro* e *in vivo*.

### RISULTATI

Abbiamo ingegnerizzato una linea cellulare microgliale in modo da sovra-esprimere la molecola anti-infiammatoria IL4. Abbiamo dimostrato che questa linea cellulare rilascia vescicole extracellulari contenenti IL4. Abbiamo poi dimostrato che le vescicole extracellulari contenenti IL4 erano capaci di trasferire un segnale anti-infiammatorio a cellule microgliali re-

cipienti. Abbiamo aumentato la capacità delle vescicole extracellulari di essere fagocitate dalla microglia recipiente esprimendo sulla loro superficie un segnale "mangiami".

Con queste vescicole contenenti IL4 ottimizzate siamo andati in vivo e le abbiamo iniettate nel liquido cefalorachidiano che circonda il cervello dei topi. Abbiamo scoperto che queste vescicole extracellulari vengono fagocitate dalle prime cellule cerebrali che incontrano, diffondendo relativamente poco all'interno del cervello. Ciononostante abbiamo trattato con le vescicole extracellulari contenenti IL4 dei topi affetti da sclerosi multipla sperimentale, dimostrando un significativo effetto terapeutico. Infine, abbiamo trovato che l'effetto terapeutico indotto dalla somministrazione di vescicole extracellulari contenenti IL4 nel cervello dei topi era associato ad un prolungato incremento di IL4 nel cervello dei topi.

### CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato che le vescicole extracellulari ingegnerizzate sono un potenziale sistema di somministrazione di agenti terapeutici nelle malattie neuroinfiammatorie. Il loro vantaggio consiste nell'utilizzare un sistema di comunicazione fisiologico e nella possibilità di recapitare segnali multipli contemporaneamente. Poiché sfruttano un sistema di comunicazione naturale l'auspicio è che siano anche meno immunogeniche e abbiano pochi, o nessun, effetto collaterale.

## Microglial microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation

### INTRODUCTION AND AIMS

Among brain cells, microglia is considered the first line of defense, the brain cell type that communicates with and is part of the immune system. Microglia is therefore considered to play a major role in neuroinflammatory diseases such as multiple sclerosis. In particular, during the progressive phases of MS, inflammation mostly consists of activated microglial cells rather than of immune cells entering the brain from the blood stream. Current therapeutic approaches, however, fail to target efficiently microglia. To communicate among them and with other cell types, microglia releases very small vesicles, ranging from 100 to 500 nanometers, called extracellular vesicles. Our proposal was to exploit this natural communication system as a novel therapeutic approach for multiple sclerosis. In particular, we wanted to produce *in vitro* extracellular vesicles engineered to contain anti-inflammatory molecules and assess their therapeutic potential *in vitro* and *in vivo*.

### RESULTS

We engineered a microglial cell line to overexpress the anti-inflammatory molecule IL4. We demonstrated that this cell line releases extracellular vesicles containing IL4. We next showed that the

extracellular vesicles containing IL4 were able to transfer an anti-inflammatory signal to recipient microglia. We increased the uptake of extracellular vesicles by recipient microglia expressing an “eat-me” signal on their surface.

With these optimized IL4-containing extracellular vesicles we moved *in vivo* and injected them in the cerebrospinal fluid surrounding the brain of mice. We found that these extracellular vesicles were taken up by the first brain cells encountered, with relatively little diffusion to the inside of the brain. Nevertheless, we treated with IL4-containing extracellular vesicles mice affected by ongoing experimental multiple sclerosis and showed a significant inhibition of the disease. Finally, we showed that the therapeutic effect of the administration of IL4-containing extracellular vesicles in the mice brain was associated to long lasting increased levels of IL4 in the brain of mice.

### CONCLUSIONS

This study has shown that engineered extracellular vesicles are a potential drug delivery tool in neuroinflammation. Their advantage is to use a physiological communication system and the ability to deliver multiple signals at the same time. Exploiting a natural communication system, their promise is also to have reduced immunogenicity and low side effects.

---

### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

*Pubblicazioni / Publications*

Casella G, Garzetti L, Gatta AT, Finardi A, Maiorino C, Ruffini F, Martino G, Muzio L, Furlan R. IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation *in vitro* and *in vivo*. *Journal of neuroinflammation* 2016 13 (1), 139

*Abstract pubblicati / Published abstracts*

Casella G, Colombo F, Furlan R. Microglial Microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation. *Glia* 2015, 63, E364-E365

Casella G, Colombo F, Furlan R. Transferring alternative polarizing factors by myeloid cell-derived shedding vesicles. *Molecular Biology Of The Cell* 2015, 26

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 164.778 €**  
**Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 164,778**

---

## Stefano Angiari

Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona, Verona  
Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, Dublino, Irlanda

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Tommaso Carlucci, Valentina Tonin, Elena Zenaro**

### Studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'interazione tra neutrofili ed endotelio vascolare nei vasi sanguigni del sistema nervoso centrale durante l'encefalomielite sperimentale autoimmune

#### PREMESSE E OBIETTIVI

I granulociti neutrofili sono una popolazione di globuli bianchi che rappresenta la prima linea di difesa contro patogeni extracellulari come i batteri. Le molecole infiammatorie rilasciate dai neutrofili possono però avere un effetto tossico e causare del danno collaterale ai tessuti, e recentemente è stato dimostrato un ruolo patogenico per i neutrofili in patologie infiammatorie autoimmuni. In particolare, durante lo sviluppo della sclerosi multipla (SM) e del suo modello animale l'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), molecole di segnale rilasciate dal sistema nervoso centrale (SNC) infiammato possono causare il reclutamento dei neutrofili nel tessuto, con conseguente aumento dell'infiammazione locale e danno tissutale. Un ruolo per i neutrofili nella patogenesi dell'ESA è già stato suggerito in precedenza, ma la loro funzione nello sviluppo della malattia e i meccanismi molecolari necessari per la loro migrazione nel SNC non sono ancora stati chiariti in dettaglio. L'obiettivo principale del progetto è stato quello di valutare il ruolo di diverse molecole di adesione e mediatori infiammatori nel reclutamento dei neutrofili nel SNC durante lo sviluppo dell'ESA. A tale scopo, sono state utilizzate diverse metodiche sperimentali come saggi di adesione, microscopia intravitale e microscopia a due fotoni, per visualizzazione e studiare le interazioni tra leucociti circolanti e l'endotelio vascolare *in vitro* ed *in vivo* in corso di ESA.

#### RISULTATI

Il nostro progetto è partito dall'osservazione che, tra le diverse molecole di adesione studiate, i neutrofili sono in grado aderire *in vitro* sulla glicoproteina T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-1 (TIM-1) in condizioni di flusso fisiologico, sug-

gerendo un ruolo per TIM-1 nel reclutamento dei neutrofili sull'endotelio vascolare. Per questo motivo, il nostro studio si è focalizzato sul ruolo di TIM-1 nel reclutamento dei neutrofili nel SNC. Abbiamo inizialmente individuato diversi possibili ligandi per TIM-1 espressi dai neutrofili, come la mucina P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), l'integrina lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) e la glicoproteina CD44.

Abbiamo, inoltre, dimostrato che TIM-1 è espressa su cellule endoteliali cerebrali *in vitro*, che la sua distribuzione sulla superficie cellulare può essere modulata da segnali infiammatori, e che il TIM-1 ha un ruolo nell'interazione cellula-cellula, supportando un suo coinvolgimento nella migrazione leucocitaria nel tessuto. Analisi di microscopia confocale hanno inoltre identificato l'espressione di TIM-1 sull'endotelio vascolare del SNC in corso di ESA, in particolare nelle fasi di insorgenza della malattia, suggerendo che TIM-1 potrebbe supportare l'adesione dei neutrofili sull'endotelio vascolare del SNC in tale fase. Abbiamo inoltre confermato che i neutrofili sono la popolazione leucocitaria più abbondante nel SNC all'insorgenza dell'ESA, in particolare nel midollo spinale, il principale sito di infiammazione in questo modello. Grazie ad esperimenti di microscopia intravitale, abbiamo dimostrato come i neutrofili aderiscano in modo massiccio all'endotelio vascolare del midollo spinale nelle fasi di insorgenza di malattia, mentre la loro capacità adesiva è minore nella fase preclinica ed al picco di malattia, suggerendo una possibile espressione differenziale di molecole di adesione come il TIM-1 sull'endotelio del midollo spinale in fasi differenti di malattia. In accordo con queste osservazioni, il trattamento con un anticorpo bloccante il TIM-1 ha inibito l'adesione dei neutrofili ai vasi sanguigni del

midollo spinale in corso di ESA, confermando un ruolo essenziale per questa glicoproteina nell'attacco dei neutrofili circolanti all'endotelio vascolare infiammato. Esperimenti di microscopia a due fotoni hanno inoltre dimostrato che il blocco di TIM-1 non ha effetto sulla motilità dei neutrofili sulla superficie dei vasi sanguigni del midollo spinale in corso di ESA, al contrario di altre molecole di adesione come LFA-1, che gioca un ruolo fondamentale nel processo. Questi risultati indicano come il TIM-1 sia necessario per l'adesione dei neutrofili sulla superficie vascolare e la loro rapida trasmigrazione nel SNC in corso di ESA. Abbiamo infine valutato l'impatto del trattamento sistemico con un anticorpo anti-TIM-1 all'insorgenza

dell'ESA sullo sviluppo della malattia, e abbiamo osservato una significativa inibizione della malattia nei topi trattati, rispetto al trattamento con un anticorpo controllo.

### CONCLUSIONI

I nostri risultati supportano un ruolo fondamentale per la proteina TIM-1 nel controllo del reclutamento dei neutrofili nel SNC e nello sviluppo dell'ESA. Ulteriori studi sono necessari per valutare se il TIM-1 ha un ruolo nel traffico dei leucociti umani nel sito di infiammazione e se l'inibizione di TIM-1 può bloccare lo sviluppo di patologie infiammatorie autoimmuni come la SM.

## Identification of the molecular mechanisms controlling neutrophil-endothelial interactions in central nervous system venules during experimental autoimmune encephalomyelitis

### INTRODUCTION AND AIMS

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the first line of defence against extracellular pathogens such as bacteria. However, neutrophils can release inflammatory mediators and toxic products, which can cause collateral tissue damage, and a role for PMNs in autoimmune diseases has recently emerged. During multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), localized tissue danger signals released by the inflamed central nervous system (CNS) may induce the extravasation of blood PMNs, increasing local inflammation and tissue damage. Recent data suggest that neutrophils contribute to the pathogenesis of EAE/MS, but their specific role in disease development and the molecular mechanisms controlling neutrophil recruitment to the CNS are unknown. The main goal of the project was to evaluate the importance of several adhesion molecules and inflammatory mediators in PMN recruitment in the CNS during EAE development. To this purpose, we used different experimental approaches such as adhesion assays, intravital and two-photon microscopy techniques, to visualize and study the interactions between flowing neutrophil and the vascular endothelium *in vitro* and *in vivo* during EAE.

### RESULTS

Our project began from the observation that, among other adhesion molecules, neutrophils can adhere *in*

*vitro* on the T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-1 (TIM-1) glycoprotein under physiologic flow conditions, suggesting a role for TIM-1 in neutrophil recruitment on the vascular endothelium. For this reason, we focused our study on TIM-1 glycoprotein and its role in neutrophil trafficking to the CNS. We initially detected several TIM-1 ligands expressed by PMNs, such as mucin P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), integrin lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) and CD44 glycoprotein. We also demonstrated that TIM-1 is expressed on brain endothelial cells *in vitro*, that TIM-1 distribution on cell surface can be modulated by inflammatory signals and that TIM-1 may impact endothelial cell-cell interactions, supporting its role in leukocyte migration in the tissue. Confocal microscopy analysis also detected TIM-1 expression on the vascular endothelium of the CNS during EAE, in particular in the pre-onset and onset phase of the disease, indicating that TIM-1 glycoprotein may preferentially support PMN adhesion on CNS venules in these phases of the disease. We confirmed that neutrophils are the most abundant leukocyte population recruited in the CNS of EAE mice at disease onset, in particular in the spinal cord (SC), the main site of inflammation in the model. By performing intravital microscopy experiments, we found that neutrophils massively adhere on SC pial venules at disease pre-onset and onset, while their adhesive capacity is

lower in the pre-clinical phase and at disease peak, suggesting a possible differential expression of endothelial cell adhesion molecules such as TIM-1 on SC vessels at different disease phases. Importantly, pre-treatment of EAE mice with an anti-TIM-1 blocking antibody at disease onset strongly inhibited neutrophil adhesion on inflamed SC venules, confirming an essential role for this glycoprotein in the attachment of flowing neutrophils to inflamed SC vessels during EAE. Two-photon laser microscopy experiments also indicated that TIM-1 blocking does not impact neutrophil motility on endothelial surface of SC venules, whereas adhesion molecules such as integrin LFA-1 play a key role in this process. This suggests that TIM-1 is probably necessary for neutrophil attach-

ment to SC venules and rapid transmigration in the CNS. We finally investigated the impact of systemic anti-TIM-1 treatment at disease pre-onset on the development of EAE, and we found that anti-TIM-1 treatment significantly inhibited disease development, compared to an isotype control antibody.

### CONCLUSIONS

Overall, our results clearly support a crucial role for TIM-1 in controlling neutrophil trafficking to the CNS and EAE development. Further studies are needed to evaluate whether TIM-1 also controls trafficking of human leukocyte to site of inflammation and if its inhibition might potentially impact the development of human autoimmune and inflammatory pathologies.

---

#### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Angiari S, Dusi S, Rossi B, Toffali L, Tonin V, Carlucci T, Piacentino G, Constantin G. Endothelial TIM-1 mediates neutrophil adhesion in inflamed spinal cord venules during EAE. XXV AINI Congress Lecce, Italy, May 11-14, 2016

Angiari S, Dusi S, Rossi B, Toffali L, Tonin V, Carlucci T, Piacentino G, Constantin G. Endothelial TIM-1 triggers neutrophil adhesion under inflammatory conditions and contributes to the induction of autoimmunity. The Society for Leukocyte Biology 49th Annual Meeting and "Neutrophil 2016", Verona, Italy, September 15-17 2016

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €**

**Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 1 year and the amount of € 30,000**

---

## Martina Severa

Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Fabiana Rizzo, Silvia Sandini**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Alessandra Mallano, Zuleika Michelini**, Centro Nazionale per la salute Globale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Marco Salvetti**, Centre for Experimental Neurological Therapies, CENTERS, Sapienza Università di Roma, Ospedale S. Andrea, Roma

## Un anticorpo coniugato all'Interferone- $\beta$ specifico per le cellule B: una nuova immuno-citochina per il trattamento della sclerosi multipla

### PREMESSE E OBIETTIVI

Grazie agli studi finora condotti nei pazienti colpiti da sclerosi multipla (SM) sottoposti a terapie depletive dei linfociti B, si è evidenziata sempre più la rilevanza di questo tipo cellulare nella patogenesi e nello sviluppo di questa malattia, ruolo fino a poco tempo fa oscurato dall'enfasi per la ricerca sulle cellule T.

Il riconoscimento che la terapia con anticorpi monoclonali (mAc), come l'anti-CD20 Rituximab, sia più efficace quando somministrata in combinazione con farmaci immunomodulanti è il concetto su cui si basa il razionale del nostro studio. Pertanto, l'azione sinergica di più molecole può auspicabilmente consentire una riduzione delle dosi o della frequenza della somministrazione con vantaggi clinici associati ad una migliore efficacia terapeutica e ad una diminuzione dei rischi correlati.

Analogamente a quanto osservato nella terapia con Rituximab, in cui la deplezione dei linfociti B della memoria si associa alla scomparsa dei sintomi clinici, i nostri studi hanno evidenziato che anche le terapie basate sulla somministrazione di Interferone-beta (IFN- $\beta$ ) riducono questa popolazione linfocitaria attraverso l'attivazione di processi apoptotici.

Il nostro progetto si prefiggeva di sviluppare un approccio immunoterapeutico di nuova generazione basato su anticorpi diretti contro le cellule B, cui fosse legato l'IFN- $\beta$ . Avevamo ipotizzato che questa nuova molecola potesse avere un'augmentata performance rispetto ai singoli trattamenti con IFN- $\beta$  o Rituximab e che potesse essere applicata non solo alle forme recidivanti-remittenti ma anche a quelle pro-

gressive della malattia, per cui al momento non sono state identificate terapie efficaci.

Nel progetto ci eravamo prefissati di sintetizzare una molecola composta dal frammento variabile della catena singola (ScFv) dell'anticorpo anti-CD20 Rituximab fuso all'IFN- $\beta$ . Una volta sintetizzato il composto ci proponevamo di valutare la sua specificità per i linfociti B e di monitorare la sua efficacia nella modulazione del fenotipo e delle funzioni di queste cellule.

### RISULTATI

Nel progetto originale, avevamo preso contatto con Creative Biolabs™ (<http://www.creative-biolabs.com/>), una company riconosciuta a livello internazionale per lo sviluppo di mAc a scopo di ricerca, diagnostica e terapia, per sintetizzare ed esprimere rapidamente il costruito composto dal scFv dell'anti-CD20 Rituximab fuso al gene umano dell'IFN- $\beta$ . Come riferito dalla company stessa però, la produzione di questo costruito su larga scala non è stata possibile per l'elevato tasso di mortalità nelle colture di HEK-293 (una linea di cellule umane renali embrionali) dopo la trasfezione del costruito.

In seguito alla mancata produzione della proteina di fusione da parte della company, abbiamo tentato di produrre "in-house" il costruito per cercare di portare a termine il progetto proposto.

La nuova immunocitochina è stata ingegnerizzata mettendo "in frame" la sequenza genica dello scFv dell'Ac anti-CD20 Rituximab (regione variabile della catena pesante, VH -*linker*- regione variabile della catena leggera, VL) con il gene dell'IFN- $\beta$  (scFv-CD20-

IFN- $\beta$ ). Abbiamo poi trasfettato questo costrutto nelle cellule Lenti-X HEK-293T, un subclone delle HEK-293 selezionato per supportare alti livelli di espressione proteica. Nel nostro sistema sperimentale, non abbiamo osservato alcun incremento della mortalità in questo tipo cellulare in seguito alla trasfezione. Comunque, ad eccezione di un basso livello di espressione della proteina di fusione negli estratti cellulari, non abbiamo ottenuto produzione nei sovranatanti di coltura.

Evidenze recenti indicano che il clonaggio dello scFv dell'Ac anti-CD20 Rituximab (anticorpo parentale c2B8 murino) con l'inversione VL-VH origina proteine con un livello di produzione molto più elevato rispetto all'originale VH-VL, come nel nostro costrutto (<https://www.google.ch/patents/US7727525>). Di conseguenza, abbiamo deciso di clonare una nuova versione dello scFv-CD20-IFN- $\beta$  contenente l'inversione VL-VH per cercare di migliorare la produzione proteica e, quindi, arricchire la secrezione nei sovranatanti di coltura (scFv-CD20-VL-VH-IFN- $\beta$ ). La quantificazione dell'espressione del gene dell'IFN- $\beta$  e l'analisi tramite la tecnica western blotting degli estratti cellulari delle

Lenti-X HEK-293T trasfettate con la nuova versione del costrutto evidenziano chiaramente un incremento nei livelli di espressione della nuova proteina di fusione. Però, anche in questo caso, non è stata osservata alcuna produzione nei sovranatanti.

### CONCLUSIONI

Sfortunatamente, non essendo riusciti a produrre l'immunocitochina scFv-CD20-IFN- $\beta$ , è stato impossibile portare a termine quanto originariamente proposto nel progetto. Allo stesso tempo, non abbiamo potuto verificare se lo scFv-CD20-IFN- $\beta$  fosse in grado di modulare *in vitro* il fenotipo e le funzioni delle cellule B degli individui con SM.

Comunque, ancora crediamo fortemente nel razionale dell'originale proposta progettuale. Vorremmo, quindi, tentare di isolare lo scFv-CD20-VL-VH-IFN- $\beta$  dagli estratti cellulari derivati dalle Lenti-X HEK-293T trasfettate, preparati in condizioni native per preservare il *fold*ing della proteina e quindi il suo legame al recettore, per poter poi testare *in vitro* questa proteina di nuova sintesi a livello funzionale nelle cellule dei pazienti.

## An interferon- $\beta$ -conjugated antibody targeted to B cells: a novel immunocytokine for the treatment of multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

Owing to the boost of knowledge gained from studies of B cell-depleting therapies in multiple sclerosis (MS), over the past few years B cells have been increasingly recognized as disease-relevant and many evidences on their immunopathogenic support during MS development have been collected highlighting their central role, historically overshadowed by the emphasis on T cell research.

The rationale for our proposed strategy is the general finding that therapy with monoclonal Antibodies (mAbs), such as the anti-CD20 Rituximab, are more effective if used in combination with immunomodulatory drugs. Synergistic drug combinations of relatively "strong" molecules can potentially decrease the cumulative dose or the administration frequency of any one medication and, thus, improve clinical outcome and reduce treatment-associated risks.

In accordance with data collected in patients treated with Rituximab, showing a dramatic depletion of

memory B lymphocytes soon after the beginning of treatment and a concomitant sustained disappearance of clinical symptoms, we also found that *in vivo* administered Interferon-beta (IFN- $\beta$ ) reduces the percentage of circulating total B cells and, in particular, affects the memory compartment.

Based on this ground, we originally planned to apply a next-generation Ab-based immunotherapeutic approach to deliver IFN- $\beta$  specifically to B lymphocytes in MS patients.

We hypothesized that a CD20-targeted IFN- $\beta$  might have higher performance than either IFN- $\beta$  or Rituximab alone in the Relapsing-Remitting form of disease and might be applicable also to the progressive MS for whom there is currently no effective treatment.

In the original proposal we sought to synthesize a single chain variable fragment (scFv) correspondent to that of Rituximab fused to the human IFN- $\beta$  gene and test its specificity of action on B cells, as well as monitoring its efficacy in modulating B cell phenotype and functions.

## RESULTS

In the original proposal, in order to rapidly synthesize and express the scFv of the anti-CD20 Rituximab fused to the human IFN- $\beta$  gene, we contacted Creative Biolabs™ (<http://www.creative-biolabs.com/>), an internationally recognized company focused on developing mAbs for research, diagnostic and therapeutic uses. However, as reported by the company, this was not possible due to the high-mortality rate of human embryonic kidney cells 293 (also referred to as HEK-293), used to express the construct.

Due to these experimental issues, we tried to produce “in-house” the construct to give the project a chance. The new immunocytokine gene was constructed using a sequence encoding the gene of scFv-CD20 [(heavy chain variable region (VH)-linker-light chain variable region (VL)] linked to the full IFN- $\beta$  gene (scFv-CD20-IFN $\beta$ ). After cloning, we transfected the plasmid in Lenti-X HEK-293T cells, a subclone of the transformed HEK-293 highly transfectable and supporting high levels of protein expression. In our experimental system, no mortality of the transfected cells was observed. However, even reaching a mild expression level in cell extracts, no production of this construct was observed in culture supernatants.

Recent evidences indicate that cloning the scFv-CD20 of Rituximab® (parental antibody, murine c2B8) with a VL-VH inversion originates constructs with higher yield of production than the version

cloned with VH-VL orientation, as for our construct (<https://www.google.ch/patents/US7727525>). Thus, we cloned a new version of the scFv-CD20-IFN- $\beta$  immunocytokine with a VL-VH inverted orientation hoping to ameliorate protein expression and rich secretion of fusion protein in culture supernatants (scFv-CD20-VL-VH-IFN- $\beta$ ). Quantification of IFN- $\beta$  gene expression and western blotting analysis of cell extracts from transfected Lenti-X HEK-293T cells showed an increased yield of expression. However, also in this case no production was found in supernatants.

## CONCLUSIONS

Unfortunately, having obtained no protein purification of the immunocytokine scFv-CD20-IFN- $\beta$  made impossible to accomplish the originally proposed project goals. Nonetheless, it was also impossible to look at the CD20-targeted IFN- $\beta$ -mediated modulation of phenotypes and function of B cells from MS patients.

However, we still believe in the rationale of the original proposal. Thus, in the near future we would like to try to isolate the scFv-CD20-VL-VH-IFN- $\beta$  immunocytokine from cellular extracts of transfected Lenti-X HEK-293T prepared in native conditions, to preserve its folding and its binding to the corresponding receptor, and then test it at a functional level in cells of patients.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

### *Pubblicazioni / Publications*

Rizzo F, Giacomini E, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Severa M\*, Coccia EM.\* Interferon- $\beta$  therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol Cell Biol.* 2016 Jul 5. doi: 10.1038/icb.2016.55. (\*shared last co-authorship)

Giacomini E, Rizzo F, Etna MP, Cruciani M, Mechelli R, Buscarinu MC, Pica F, D'Agostini C, Salvetti M, Coccia EM, Severa M. Thymosin- $\alpha$ 1 expands deficient IL-10-producing regulatory B cell subsets in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2017 Feb 1:1352458517695892.

### *Comunicazioni a Congressi / Congress presentations*

Rizzo F, Giacomini E, Etna MP, Cruciani M, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Garaci E, Coccia EM, Severa M. Anti-inflammatory potential of Thymosin- $\alpha$ 1 in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: effects on B cell compartment. Oral presentation, AINI Congress 2016, Lecce, May, 11-16; 2016,

Severa M. Analyzing how different immune-modulatory therapies target pathogenic memory B cells in Multiple Sclerosis: all roads lead to...ROME. Oral presentation, "Giornata Romana di Immunologia" Sapienza University, Rome, November, 20; 2015

Severa M, Srinivasan S, Rizzo F, Di Dario M, Giacomini E, Buscarinu MC, Melania Cruciani M, Etna MP, Mechelli R, Hertzog PJ, Salvetti M, Cinthia Farina C and Coccia EM. INTERFEROME-based transcriptome analysis of paired B cells and monocytes identifies dysregulation in Interferon-regulated pathways in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis patients. Poster presentation, XXVI AINI Congress-joint-16th ESNI Course, Venezia June, 26-30; 2017

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 1 anno (prorogato di 11 mesi) e l'ammontare di 29.977,50 €**

**Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 1 year (extended by 11 months) and the amount of € 29,977.50**

---

## Massimo Degano

Unità di Biocristallografia, IRCCS Fondazione San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Marco Patrone, Claudia Minici, Paola Tornaghi**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Maria Pia Abbracchio**, Università degli Studi di Milano, Milano

**Stefano Capaldi**, Università degli Studi di Verona, Verona

**Ivano Eberini**, Università degli Studi di Milano, Milano

**Maria Letizia Trincavelli**, Università di Pisa, Pisa

## Struttura cristallografica e caratterizzazione funzionale del recettore GPR17, un bersaglio innovativo per terapia di rimielinizzazione nella sclerosi multipla

### PREMESSE E OBIETTIVI

Il recupero funzionale dalla disabilità nei pazienti con sclerosi multipla (SM) richiede un processo efficiente di ricostruzione della mielina nel sistema nervoso centrale (SNC). Al momento, sono in via sperimentale diversi approcci per ottenere questo risultato, comprese terapie basate sul trapianto di cellule staminali e farmacologiche. Uno studio recente e innovativo ha dimostrato come l'attivazione della proteina GPR17, un recettore accoppiato a proteina G, possa indurre cellule precursori di oligodendrociti (OPC) a riparare il SNC tramite produzione di mielina. GPR17 può anche essere attivato in modo promiscuo da molecole quali ossisteroli pro-infiammatori e chemochine (CXC) rilasciate nelle lesioni demielinizzanti, indicando che è necessario un bilanciamento tra l'attività di GPR17 e dei recettori di chemochine (CXCR) per una rimielinizzazione corretta. Queste scoperte aprono la strada allo sviluppo di una terapia per la ricostruzione della mielina in persone con SM basata sull'attivazione di GPR17 da parte di composti specifici. Lo sviluppo di molecole con queste caratteristiche richiede la conoscenza della struttura tridimensionale di GPR17, nonché della conoscenza del dettaglio dell'interazione con i CXCR. Per giungere a questo obiettivo il progetto di ricerca si è proposto di determinare la struttura (ossia, la forma più dettagliata) di GPR17, e come questo recettore cooperi con i CXCR per portare a rimielinizzazione. La struttura della proteina ci consentirà lo sviluppo di molecole in grado di rendere le OPC nei pazienti affetti da sclerosi multipla nuovamente capaci di stimolare

la produzione della mielina distrutta, e consentire un recupero dalla disabilità.

### RISULTATI

La prima parte del progetto ha portato all'ingegnerizzazione di un frammento di GPR17 con caratteristiche ottimali per gli studi strutturali. Infatti, per ottenere cristalli di proteine di membrana è essenziale ridurre le parti flessibili della proteina, al contempo mantenendo gli elementi strutturali che ne definiscono la funzione. Un'azione sinergica tra i laboratori ha consentito l'analisi efficace di decine di segmenti di DNA modificato per identificare quello con le caratteristiche ottimali per gli studi strutturali. Questo DNA è stato inserito in cellule di insetto in coltura per produrre milligrammi della proteina GPR17. La proteina è stata poi purificata ad omogeneità, ed ha caratteristiche ottimali per la cristallizzazione.

Contemporaneamente, abbiamo dimostrato che il recettore GPR17 si associa fisicamente sia con CXCR2 che CXCR4, e abbiamo studiato l'effetto di questa interazione sui segnali che ciascuna di queste proteine è in grado di trasmettere dentro alle cellule. Da questo studio è emerso chiaramente che le molecole che si legano a GPR17 causano una risposta diversa di CXCR2 ai suoi ligandi specifici. Viceversa, l'attivazione di CXCR4 porta ad una diversa attività di GPR17. Questi studi hanno evidenziato come future terapie che mirino a GPR17 come "interruttore" per riattivare la mielinizzazione debbano tenere conto della contemporanea attività dei recettori di chemo-

chine, sia per la migrazione cellulare che per la modulazione del segnale che porta alla differenziazione ad oligodendrociti.

### CONCLUSIONI

Il progetto ha portato alla produzione di GPR17 in quantità ottimali per la cristallizzazione e studi strutturali. Inoltre, ha evidenziato come le funzioni di GPR17 e i recettori CXCR cooperino, e la loro intera-

zione debba essere sfruttata sia per portare le cellule OPC al sito di danno alla mielina, sia per consentire una corretta rimielinizzazione. La futura struttura di GPR17 fornirà la base strutturale per la progettazione e realizzazione di molecole che ne attivino la funzione. I risultati funzionali ottenuti sono la base per lo sviluppo di molecole con un profilo farmacologico adeguato per una terapia rimielinizzante che sfrutti in modo ottimale l'asse GPR17: CXCR.

## Crystal structure and functional characterization of the GPR17 receptor, a novel pharmacological target for remyelination therapy in multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

The functional recovery from disability in multiple sclerosis (MS) patients requires an efficient process of myelin reconstruction in the central nervous system (CNS). At the present, several promising approaches are being pursued, including stem cell transplantation and pharmacologically-induced remyelination. A recent, innovative study demonstrated how the activation of the G-protein coupled receptor GPR17 induces the differentiation of oligodendrocyte-precursor cells (OPCs) to myelinating oligodendrocytes. These differentiated cells can repair the damaged CNS by leading to regeneration of the destroyed myelin. GPR17 can also be activated by molecules such as oxisterols and chemokines (CXC) that are released in active lesions. This indicates that correct remyelination requires a balance between the activation of GPR17 and CXC receptors (CXCRs). Thus, in order to develop a successful remyelinating therapy it is mandatory to fully understand the interplay of GPR17 and CXCRs. With the long term goal of this project being the characterization of the crystal structure of GPR17, we aimed at producing large quantities of recombinant GPR17. Moreover, we wished to assess the physical and functional interplay between GPR17 and two crucial chemokine receptors, CXCR2 and CXCR4. Ultimately, the knowledge of the three-dimensional structure of GPR17 will represent the blueprint for the design of new compounds that can become the cornerstones of remyelination therapy. At the same time, the optimal manipulation of OPC cells for remyelination will require a full understanding of the interplay between GPR17 and CXCRs.

### RESULTS

In the first part of the project we streamlined a method that allowed us the engineering and functional analysis of GPR17 fragments with a favourable profile for structural studies. Indeed, membrane proteins require removal of flexible portions in order to maximize the likelihood of crystallization. At the same time, care was taken not to tamper with the structural elements of the protein that define its function. Taking advantage of insect cell cultures, we successfully expressed milligram quantities of a compact portion of GPR17 and purified it to homogeneity. This material will now be used for crystallization experiments in order to determine the structure of the receptor using the X-ray crystallography technique.

We also demonstrated that GPR17 physically interacts with two major chemokine receptors, CXCR2 and CXCR4. Since this contact between different receptors may affect their physiological behaviour, we investigated the consequences of GPR17: CXCR association at the cellular level. We showed that when cells express on their surface both GPR17 and CXCR2, the selective activation of GPR17 modulates the response to CXCR2 ligands. Vice versa, when cells express both GPR17 and CXCR4, the response of GPR17 when stimulated by specific compounds is modulated if CXCR4 is also activated. Taken together, the results show that future therapies aiming at triggering the GPR17 switch for remyelination must take into account the effect on chemokine receptor signalling, affecting both migration of OPCs and the signal that ultimately leads to their transition to

oligodendrocytes that are ultimately capable of remyelination of the CNS.

### CONCLUSIONS

We produced milligram quantities of a highly optimized GPR17 fragment for the determination of its crystal structure. Moreover, we demonstrated an interplay between GPR17 and CXCRs, and how the signals mediated by these proteins are mutually modulated. Our results underscore how both GPR17

and CXCRs must be adequately triggered in order to lead to OPC migration and differentiation to the oligodendrocytes, ultimately leading to remyelination. The future GPR17 crystal structure will provide a blueprint for the design of highly specific GPR17 ligands to activate its function. The unveiled functional interplay between receptors is instrumental for the design of molecules with an optimal pharmacological profile to take full advantage of the GPR17: CXCR axis.

---

### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Parravicini C, Daniele S, Palazzolo L, Trincavelli ML, Martini C, Zaratini P, Primi R, Coppolino G, Gianazza E, Abbracchio MP, Eberini I. A promiscuous recognition mechanism between GPR17 and SDF-1: Molecular insights. *Cell Signal*. 2016 Jun;28(6):631-42. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.03.001. Epub 2016 Mar 10

Parravicini C, Coppolino GT, Lecca D, Fumagalli M, Marangon D, Daniele S, Palazzolo L, Martini C, Gianazza E, Trincavelli ML, Zaratini P, Eberini I and Abbracchio MP. A promiscuous interaction between GPR17 and SDF1 may be at the basis of impaired remyelination in demyelinating diseases. Poster presentation to Neurosciences 2016, Society for Neuroscience, San Diego, USA, November 12-16, 2016

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 150.000 €**  
**Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 150,000**

---

## Carla Taveggia

Divisione di Neuroscienze e INSPE, Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Evelien Fredrickx**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Angelo Quattrini**, Divisione di Neuroscienze e INSPE, Ospedale San Raffaele, Milano

**Angela Bachi**, IFOM-FIRC, Istituto di Oncologia Molecolare, Milano

## Modulazione dell'attività enzimatica di TACE nella mielinizzazione e nella rimielinizzazione del SNC

### PREMESSE E OBIETTIVI

La gliogenesi e lo sviluppo del sistema nervoso dipendono strettamente dall'interazione tra assoni e cellule gliali, oligodendrociti (OL) nel sistema nervoso centrale (SNC) e cellule di Schwann nel sistema nervoso periferico. Le cellule gliali favoriscono la sopravvivenza neuronale, regolano l'organizzazione degli assoni mielinizzati e promuovono il differenziamento assonale e la produzione della mielina, mentre gli assoni favoriscono la sopravvivenza e lo sviluppo delle cellule gliali.

Nel SNC nessuna molecola è stata identificata come regolatore specifico della mielinizzazione; è quindi probabile che molti fattori contribuiscano alla sua formazione e al suo mantenimento. L'identificazione dei fattori coinvolti nel promuovere la mielinizzazione durante lo sviluppo e la rimielinizzazione è cruciale per sviluppare trattamenti efficaci per la sclerosi multipla (SM) in cui la comunicazione tra assoni e cellule gliali è gravemente compromessa ed è la principale causa di danno. Per sviluppare un trattamento efficace per questo debilitante malattia, è anche essenziale caratterizzare le molecole che possano proteggere l'assone e/o ridurre la componente infiammatoria. Inoltre, capire se queste molecole operano anche durante la demielinizzazione e la rimielinizzazione potrebbe favorire lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per la SM, in particolare per quelle forme per cui non esiste un trattamento efficace, come la SM progressiva. Studi recenti del nostro e di altri gruppi hanno identificato nelle secretasi proteine chiave nella modulazione della mielinizzazione. In particolare, l'alfa secretasi TACE può processare diversi substrati, inclusi molti fattori di crescita e i loro rispettivi recettori.

Pertanto, definire la funzione di TACE può essere rilevante per comprendere meglio i processi che regolano la mielinizzazione nel SNC e il differenziamento degli OL e potrebbe aiutare nell'identificazione di nuove molecole che partecipano alla mielinizzazione del SNC. Da notare che farmaci contro TACE sono già stati sviluppati per il trattamento di altre patologie, per cui sarebbe possibile ipotizzare una validazione dei risultati di questi studi in pazienti. Per chiarire il ruolo di TACE nella mielinizzazione del SNC e il suo coinvolgimento nella patogenesi della SM, abbiamo proposto di:

- a. identificare le molecole target dell'attività TACE
- b. determinare se TACE ha un ruolo nella rimielinizzazione del SNC e nella patogenesi della SM.

### RISULTATI

Durante questo finanziamento abbiamo raggiunto tutti gli obiettivi proposti e abbiamo ampliato i nostri studi per analizzare il ruolo di TACE nella formazione della mielina centrale. In primo luogo abbiamo confermato che solo la TACE che viene espresso nei neuroni controlla il differenziamento degli OL e la mielinizzazione nel SNC. Abbiamo inoltre caratterizzato i meccanismi molecolari mediati da TACE e responsabili dello sviluppo degli OL. I nostri risultati indicano che TACE espressa nei neuroni sia importante per il differenziamento degli OL *in vitro* e *in vivo* e per la formazione di mielina *in vivo*. Inoltre, abbiamo evidenza che questo difetto di sviluppo sia, in parte dovuto all'attivazione costitutiva del pathway Notch/Jagged 1, che inibisce la mielinizzazione. Sorprendentemente, i nostri risultati suggeriscono anche che TACE espressa negli OL *in vivo* non abbia alcun ruolo sulla formazione

della mielina. Come originariamente proposto, abbiamo anche caratterizzato le proteine rilasciate dai neuroni che non esprimono TACE. Da queste analisi abbiamo trovato un numero rilevante di proteine che sono importanti per lo sviluppo degli OL. Infine, abbiamo studiato il ruolo di TACE nella rimielinizzazione. Per questi studi abbiamo utilizzato topi transgenici che non esprimono TACE negli OL e che non hanno alcun fenotipo evidente durante lo sviluppo. I nostri risultati suggeriscono che, a differenza dello sviluppo, TACE espressa negli OL potrebbe essere importante nella rimielinizzazione, poiché in sua assenza la rimielinizzazione è compromessa.

### CONCLUSIONI

Complessivamente, i nostri studi mostrano che TACE espressa sugli assoni controlla la mielinizzazione del

SNC promuovendo il differenziamento degli OL, molto probabilmente modulando il pathway di Notch1 / Jagged.

Inoltre, abbiamo identificato un set di proteine tagliate da TACE che sono rilasciate dai neuroni e che potrebbero partecipare allo sviluppo e alla sopravvivenza degli OL. Da ultimo, i nostri risultati suggeriscono che a differenza di quanto avvenga nello sviluppo, TACE espressa negli OL è importante per un'efficace rimielinizzazione del SNC.

In conclusione, i nostri studi hanno contribuito alla comprensione del ruolo di TACE nella mielinizzazione del SNC e possono avere importanti implicazioni per spiegare la patogenesi associata a patologie demielinizzanti del SNC, in particolare alla SM, favorendo lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche che promuovano la rimielinizzazione.

## Modulating TACE activity in CNS myelination and remyelination

### INTRODUCTION AND AIMS

Gliogenesis and the development of nervous system strictly depend upon interaction between axons and glial cells, oligodendrocytes (OL) in the central nervous system (CNS) and Schwann cells in the peripheral nervous system. Glial cells promote neuronal survival, regulate the organization of myelinated axons and promote axonal differentiation and myelin sheath production. On the contrary, axons promote glial cells survival and development.

In the CNS no molecule has yet been identified as specific regulator of myelination. It is thus likely that many factors contribute to the formation of the myelin sheet and its maintenance. The identification of the factors involved in promoting OL myelination in normal development and in remyelination is key to develop effective treatments for multiple sclerosis (MS) in which altered cross-talk between axon and glial cells is severely compromised and is the main cause of morbidity. To develop an effective treatment for this debilitating disorder, it is also crucial to characterize the molecules that can protect against axonal damage and/or reduce the inflammatory component. Furthermore, understanding whether

these molecules also operate in demyelination and remyelination could significantly enhance the development of novel therapeutic approaches for MS, in particular for those forms for which there is no actual treatment, as progressive MS.

Recent studies from our and other groups have reported that secretases are key mediator in modulating myelination. In particular the alpha secretase TACE can process several substrates, including many growth factors and their cognate receptors. Thus, defining the function of TACE could be extremely valuable to better understand the processes regulating CNS myelination and OL differentiation and might help in identifying novel molecules that participate in CNS myelination. Of note, therapeutical targets against TACE have already been developed for the treatment of other disorders, providing immediate translation of the studies proposed from animal models to patients. To elucidate the role of TACE in CNS myelination and its involvement in the pathogenesis of MS, we proposed to:

- identify the molecule(s) targeted by TACE activity
- investigate whether TACE has a role in CNS remyelination and MS pathogenesis.

## RESULTS

During this award we addressed all Aims and we expanded our studies to analyze the role of TACE in CNS myelin formation. We first confirmed that only neuronal TACE controls OL precursors differentiation and CNS myelination in development and we characterized the molecular mechanisms responsible for TACE mediated OL development. Our results indicate that ablation of TACE in neurons impairs OL differentiation *in vitro* and *in vivo*, delays myelin formation *in vivo* throughout development causing hypomyelination. We suggest that this developmental defect is, in part, due to constitutive activation of the Notch/Jagged 1 pathway, which inhibits myelination. Surprisingly, our results also suggest that *in vivo* conditional ablation of TACE in OL has no effect on myelin formation.

As originally proposed we also characterized the proteins released by TACE null neurons. From these analyses we found a significant numbers of protein differentially expressed that are important in OL development.

Finally, we investigated the role of TACE in remyelination. For these studies we concentrated on trans-

genic mice lacking TACE expression in OL that do not present any overt phenotype during development. Our results suggest that, unlike in development, glial TACE might be important in remyelination, as in its absence remyelination is impaired.

## CONCLUSIONS

Collectively, our data show that TACE expressed on axons controls developmental CNS myelination by promoting OL differentiation, most likely by modulating the Notch1/Jagged signaling pathway. In addition, we identified proteins that are differentially released by wild type and TACE null DRG neurons and that could participate in OL development and survival. Further, our data indicate that unlike in development, TACE expressed in OL is important for effective CNS remyelination.

The results of our studies have contributed in understanding the role of TACE in CNS myelination and may have important implications for the pathogenesis of disorders of myelinated fibers in the CNS, specifically MS, leading to new therapeutic strategies to promote remyelination.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

### *Pubblicazioni / Publications*

Fredrickx E, Colombo E, Dina G, Podini P, Nave KA, Quattrini A, Taveggia C. Neuronal ADAM 17 promotes oligodendrocyte differentiation and CNS myelination. *Under revision Glia*

Taveggia C. Schwann cells - axon interaction in myelination. *Current Opinion in Neurobiology* 2016; 39:24-29

Trimarco A, Forese MG, Alfieri V, Lucente A., Brambilla P, Dina G, Pieragostino D, Sacchetta P, Urade Y, Boizet-Bonhoure B, Martinelli Boneschi F, Quattrini A, Taveggia C. Prostaglandin D2 synthase-GPR44: a signaling axis in PNS myelination. *Nature Neuroscience* 2014; 17:1682-1692

Laterza C, Merlini A, De Feo D, Ruffini F, Menon R, Onorati M, Fredrickx E, Muzio L, Lombardo A, Comi G, Quattrini A, Taveggia C, Farina C, Cattaneo E, Martino G iPSC-derived neural precursors exert a neuroprotective role in immune-mediated demyelination via the secretion of LIF. *Nature Communications* 2013; 4:2597

### *Comunicazioni a Congressi / Congress presentations*

Taveggia C. Demyelinizzazione centrale e periferica: target terapeutici condivisi?. XLVII Congresso Società Italiana di Neurologia. Venezia, Italy 22-25 October, 2016. C. Taveggia invited speaker.

Taveggia C. Novel players on the stage of myelination. *Myelin Gordon Research Conference*. Il Ciocco, Italy 15-20 May, 2016. C. Taveggia invited speaker

Taveggia C. Meccanismi di mielinizzazione nel SNC: implicazioni per la Sclerosi Multipla. MS: from Bench to Bedside, Perugia. April 1, 2016

Taveggia C. Axo-Glial interactions in development and disease. European Charcot Foundation. Baveno 26-28 November, 2015. C. Taveggia invited speaker

Taveggia C. Axonal signals in remyelination. ECTRIMS. Barcelona 7-10 October, 2015. Taveggia invited speaker

Taveggia C. Axonal signals in myelination. SISSA, Trieste. January 29, 2015

---

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 115.000 €**

**Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 12 months) and the amount of € 115,000**

---

## Sabina Luchetti

Neuroimmunology laboratory, Netherlands Institute for Neuroscience (NIN), Amsterdam, The Netherlands

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Inge Huitinga, Karianne Schuurman, Corbert van Eden, Sara Cossu, Arja Sluiter, Adelia Adelia**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

**Michael Schumacher, Philippe Liere**, Research Unit UMR 788, Inserm & University Paris, France

**Eleonora Aronica**, Department of Pathology, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam, The Netherlands

**Dick Swaab**, Neuropsychiatric disease department, Netherland Institute for Neuroscience Amsterdam, The Netherland

## Neurosteroidi come agenti neuroprotettivi, promielinizzanti e anti-infiammatori nella sclerosi multipla

### PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è più comune nelle donne che negli uomini e il corso della malattia è diversa nei due sessi. La gravidanza (quando i livelli ormonali sono alti) protegge contro gli attacchi di SM, mentre subito dopo il parto (quando gli ormoni si riducono) aumenta il rischio di un attacco di SM. Gli ormoni sessuali (e.g. estrogeni, progesterone, testosterone) quindi sembrano svolgere un ruolo importante nella SM. Infatti, recenti studi clinici dimostrano che terapie con ormoni sessuali possono influenzare favorevolmente la progressione della SM.

In questo studio proponiamo di misurare i livelli di ormoni nel cervello (chiamati "neurosteroidi") di persone con SM e di indagare sulle loro funzioni nelle cellule del cervello coinvolte (cellule gliali) per individuare possibili nuove strategie terapeutiche.

### RISULTATI

Le misurazioni delle concentrazioni di neurosteroidi nel cervello di donne e uomini con SM mostrano che in aree danneggiate, i livelli di progesterone e di uno dei suoi derivati chiamato "allopregnanolone" sono significativamente più elevati nelle donne, mentre negli uomini, i livelli di progesterone ed anche di estrogeni sono ridotti.

In aree di rimielinizzazione (dove la "mielina" si riforma restaurando le normali funzioni delle cellule nervose), i livelli di testosterone sono ridotti ma solo negli uomini. Abbiamo testato gli effetti di questi neurosteroidi su cellule gliali umane (cellule con un ruolo di sostegno, coinvolte nella risoluzione dell'infiammazione, nella protezione e nella riparazione del danno cerebrale). Abbiamo osservato che il trattamento con progesterone o estradiolo aumenta differenti sostanze neuroprotettive, mentre il testosterone aumenta la formazione di alcuni componenti della mielina.

Questi risultati suggeriscono che i neurosteroidi possono in parte aiutare a proteggere e riparare il cervello di persone con SM. Abbiamo pertanto soddisfatto tutti gli obiettivi del nostro progetto.

### CONCLUSIONI

I nostri risultati mostrano che in cervelli di persone con SM esiste uno squilibrio nella produzione di neurosteroidi in aree dove danno e riparazione del danno si verificano. Se somministrati alle cellule gliali i neurosteroidi possono in parte aiutare a proteggere le cellule nervose e contribuire a ripararne il danno. Pertanto alcuni neurosteroidi, in futuro, potrebbero essere valutati come terapia aggiuntiva.

## Neurosteroids as neuroprotective, pro-myelinating and anti-inflammatory agents in multiple sclerosis

### INTRODUCTION AND AIMS

Multiple Sclerosis (MS) is more common in women than men and the course of the disease varies between both sexes. Pregnancy (when levels of hormones are high) protects against attacks by MS, while the risk of MS attacks increases just after delivery (when hormone levels decrease). Sex hormones (e.g. estrogen, progesterone, testosterone) therefore seem to play an important role in MS. Indeed, recent clinical trials show that the administration of sex hormones favorably influence the course of MS. In this study we aim to measure the levels of hormones in the brain (also called neurosteroids) of persons with MS and to investigate their effects on the brain cells involved in MS (glial cells) in order to find possible new therapeutic strategies.

### RESULTS

Measurements of the actual concentrations of neurosteroids in the brains of men and women with MS show that in damaged areas, progesterone and one of its derivatives called “allopregnanolone” are significantly higher in women, while in men levels of progesterone, and also estrogen were reduced. In remyelinating

areas (where “myelin” is produced again restoring normal function of nerve cells) the amount of testosterone was reduced only in men.

Effect of these neurosteroids was therefore tested on human glial cells (brain cells with a supportive role, that are involved in resolution of inflammation, protection and brain damage repair). We observed that progesterone and estradiol treatment increase a number of protective molecules while testosterone increases some myelin components.

These results suggest that neurosteroids can help to protect and heal the brain in persons with MS. We have therefore satisfied all the objective of our proposal.

### CONCLUSIONS

Our results show a disturbed balance of neurosteroids in MS brains and the involvement of neurosteroids in areas where tissue damage and repair happen.

If they are administered to glial cells, neurosteroids can partly help to protect neural cells and contribute to repair of damage. Therefore neurosteroids can be explored as additional therapy in the future.

---

### PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

Luchetti S. Neurosteroids as neuroprotective, pro-myelinating and anti-inflammatory agents in multiple sclerosis. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 28 -29 maggio 2014

Luchetti S. Neurosteroids as neuroprotective, pro-myelinating and anti-inflammatory agents in multiple sclerosis. 8th International Meeting- Steroids And Nervous System – Torino, 14-18 febbraio 2015

Luchetti S. Neurosteroids as neuroprotective, pro-myelinating and anti-inflammatory agents in multiple sclerosis Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 27-29 maggio 2015

Luchetti S. Neurosteroids as neuroprotective, pro-myelinating and anti-inflammatory agents in multiple sclerosis Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, 25-27 maggio 2016

---

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2012 per il periodo di 3 anni (prorogato di 16 mesi) e l'ammontare di 140.000 €

Research project funded by FISM Grant 2012 for the period of 3 years (extended by 16 months) and the amount of € 140,000

---

## Alessandro Didonna

University of California San Francisco, Department of Neurology, USA

MENTORE / MENTOR: **Jorge R. Oksenberg**

### MicroRNA come nuovi potenziali strumenti per modulare il processo di mielinizzazione del sistema nervoso

#### PREMESSE E OBIETTIVI

I micro RNA (miRNA) sono piccoli RNA non-codificanti che funzionano come modulatori dell'espressione genica, promuovendo l'inibizione di determinati geni bersaglio a livello post-trascrizionale. Nei mammiferi, più di metà dell'intero genoma è soggetto alla regolazione dei miRNA e un singolo miRNA può controllare alcune centinaia di geni diversi. Diversi studi sono stati condotti sui miRNA nell'ambito della sclerosi multipla (SM), principalmente caratterizzando i miRNA in campioni di sangue periferico o in lesioni demielinizzate isolate *post mortem*. Purtroppo, questi studi non hanno tenuto conto della eterogeneità cellulare del sangue e dell'estrema complessità della struttura del sistema nervoso, non permettendo di associare in maniera affidabile i miRNA identificati ad un particolare citotipo. Inoltre, le attuali metodologie di isolamento cellulare inducono stress meccanici che spesso sono causa di artefatti. Per ovviare a questi limiti, ho proposto di utilizzare la metodologia denominata miRAP per caratterizzare i miRNA negli oligodendrociti, uno dei bersagli principali del processo patologico dell'SM. Questa tecnica è un nuovo metodo di purificazione dei miRNA in specifici tipi cellulari mediante la marcatura genetica della proteina chiamata Argonaute 2 (AGO2), un enzima coinvolto nella maturazione dei miRNA.

Nel presente progetto, propongo di combinare la tecnica miRAP con i recenti metodi di sequenziamento massivo per caratterizzare i cambiamenti globali nei miRNA degli oligodendrociti indotti dal modello murino di SM encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA) (Obiettivi 1 e 2). I risultati derivanti dalla prima parte del progetto saranno poi utilizzati per sviluppare il primo approccio di terapia genica basato su miRNA e finalizzato a contrastare la demielinizzazione nell'ambito della SM (Obiettivo 3).

#### RISULTATI

Durante il periodo di finanziamento sono stati rac-

colti dati fondamentali per il completamento dei tre obiettivi proposti. In particolare, è stato generato il primo modello murino che esprime la versione ingegnerizzata di AGO2 (GFP-Myc-AGO2) negli oligodendrociti usando una linea Cre col promotore del gene Olig1. È stata effettuata una approfondita caratterizzazione del modello a livello biochimico ed istologico, dimostrando che il transgene è espresso sia nel cervello che nel midollo spinale tramite esperimenti di immuno-precipitazione con anticorpi specifici per gli epitopi GFP e Myc.

Inoltre, saggi di microscopia confocale hanno confermato che l'espressione è circoscritta agli oligodendrociti e persiste anche nelle lesioni indotte da ESA. Una cospicua parte delle risorse è stata investita per ottimizzare la tecnica miRAP in modo da garantirne la riproducibilità. Nel dettaglio, sono stati testati diversi kit per la preparazione di librerie geniche e sono stati comparati i risultati di diversi centri di sequenziamento. I test hanno confermato che i campioni preparati seguendo il protocollo miRAP sono prevalentemente composti da miRNA, dimostrando che la tecnica permette di isolare miRNA da tessuto nervoso intatto in maniera altamente selettiva.

In parallelo, ho anche sviluppato un protocollo bioinformatico che permette una analisi efficiente della grande quantità di dati derivanti da sequenziamento massivo. Questa procedura analitica è stata testata in un esperimento miRAP di *time-course* in cui il miRNA miR-3102-5p è stato trovato significativamente inibito negli stadi pre-sintomatici di ESA (5 e 10 giorni dopo l'immunizzazione) mentre il miRNA miR-5107-3p è stato trovato maggiormente espresso dopo la comparsa dei sintomi clinici (15 e 20 giorni dopo l'immunizzazione).

In ultimo, ho sviluppato un protocollo sperimentale per manipolare l'espressione genica degli oligodendrociti *in vivo* mediante trasduzione di costrutti lentivirali. Inoltre, ho ottimizzato colture primarie di oligodendrociti su *micropillar*, per permettere di stu-

diare in maniera quantitativa il ruolo dei miRNA nel processo di mielinizzazione attraverso una tecnica innovativa sviluppata di recente alla Università della California di San Francisco (UCSF).

### CONCLUSIONI

In conclusione, ho affrontato le sfide tecniche che questo progetto comportava e sono vicino alla realizzazione dei primi due obiettivi proposti. Inoltre, ho

ottimizzato le tecniche sperimentali per completare l'ultimo obiettivo. I dati raccolti durante il periodo di finanziamento rafforzano il razionale iniziale e confermano ulteriormente l'attuabilità del progetto. In particolare, i due miRNA identificati suggeriscono una possibile connessione funzionale con lo sviluppo della patologia demielinizante e rappresenteranno il punto di partenza per iniziare le strategie di terapia genica proposte.

## miRNAs as novel potential tools to modulate myelination in the CNS

### INTRODUCTION AND AIMS

Micro RNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs which act as modulators of gene expression by promoting the down regulation of target genes in a post-transcriptional fashion. More than half of the entire mammalian transcriptome is subjected to miRNA regulation and a single miRNA can affect the levels of several hundred transcripts. A number of studies have been conducted on miRNAs in the context of multiple sclerosis (MS), mainly by profiling miRNAs in the peripheral blood and post-mortem demyelinating brain lesions. However, these studies failed to consider the multi-cellularity of peripheral blood specimens and the extreme complexity of the cyto-architecture of the central nervous system (CNS), thus preventing the attribution of differentially regulated miRNAs to a specific cytotype. On the other hand, the physical enrichment of target cell populations subjects the cells to non-physiological stress, is often time-consuming, and prone to technical artifacts. To overcome these limitations, I proposed to use the novel technique called miRAP to purify miRNAs from oligodendrocytes (OLs), one of the principal targets of MS pathology. This technique can be combined with next-generation sequencing (NGS) to efficiently characterize OL-specific microRNA dynamics at different stages of the disease in the EAE model (Aims 1 and 2). The gained information would be then used to develop a possible miRNA-based gene therapy approach aiming at preventing OL loss upon autoimmune challenges (Aim 3).

### RESULTS

Upon the funding period, I have collected critical data

for the completion of the proposed aims. In particular, we generated the first double transgenic mouse model expressing an epitope-tagged version of AGO2 in OLs by crossing the Gt(ROSA)26Sortm1(CAG-GFP/Eif2c2)Zjh line carrying a stop codon-flxed GFP-Myc-Ago2 transgene with the B6.129S4-Olig1tm1(cre)Rth/J driver line in which Cre recombinase is under the transcriptional control of Olig1 promoter, a well-known pan-OL marker. In the past years, I have performed a thorough characterization of this mouse line in terms of transgene expression at both biochemical and histological levels. I could assess by immunoprecipitation (IP) assays with antibodies specific for Myc and GFP that tagged-AGO2 is expressed in the brain and spinal cord of transgenic mice. Moreover, I extensively confirmed by confocal microscopy that expression patterns of the transgene are restricted to the OL population and persist in demyelinated lesions as well.

I have invested a considerable effort in developing a robust and reliable miRAP experimental protocol by comparing different library preparation kits (from Illumina and New England Biolabs) and testing different genomic core facilities to assess the quality and reproducibility of NGS. As highlighted by biotype analysis, miRAP samples are highly enriched in miRNA species, confirming that miRAP methodology is able to immunoisolate miRNAs in a selective manner. In parallel, I established a bioinformatic analytical pipeline for the analysis of large-scale sequences datasets. To this extent, I have performed a miRAP time-course experiment in which miR-3102-5p was found significantly down-regulated at both pre-symptomatic stages of EAE (5 and 10 dpi)

while miR-5107-3p was up-regulated after disease onset (15 and 20 dpi), suggesting that these two miRNAs might be functionally correlated with disease progression. I am now in the process of replicating these promising results.

Lastly, I have optimized the protocols to genetically manipulate OLs via lentiviral transduction. I can efficiently deliver lentiviral particles to the mouse CNS and transduce oligodendrocytes *in vivo*. Moreover, I set up primary OL cultures on micropillar arrays, which will be used to quantitatively assess the involvement of specific miRNAs in myelin formation according to a methodology recently developed at UCSF.

## CONCLUSIONS

In summary, I have addressed most of the technical challenges of the project and nearly completed the first two aims of the proposal. In addition, I have established the technologies that will be instrumental to accomplish Aim 3. Overall, the data collected upon the funding period strengthen the initial scientific rationale and confirm the feasibility of this ambitious project. In particular, the two miRNA candidates I have identified, if replicated, will represent the first targets for the preclinical gene therapy approaches.

---

## PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

---

### *Pubblicazioni / Publications*

Didonna A, Cekanaviciute E, Oksenberg JR, and Baranzini SE. Immune cell-specific transcriptional profiling highlights distinct molecular pathways controlled by Tob1 upon experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scientific Reports* 2016 6:31603

Guglielmetti C, Najac C, Didonna A, Van der Linden A, Ronen SM, and Chaumeil MM. Hyperpolarized <sup>13</sup>C MR metabolic imaging can detect neuroinflammation *in vivo* in a multiple sclerosis murine model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)* 2017 114(33):E6982-E6991

### *Capitoli di libro e Revisioni / Peer-reviewed book chapters and reviews*

Didonna A. Preclinical Models of Multiple Sclerosis: Advantages and Limitations towards Better Therapies. *Current Medicinal Chemistry* 2016 23:1421-38

Didonna A and Oksenberg JR. The genetics of multiple sclerosis. In: *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis*. Ian S. Zagon and Patricia J. McLaughlin (Editors), Codon Publications, Brisbane, Australia, 2017

### *Comunicazioni a Congressi / Congress Presentations*

Didonna A, Cekanaviciute E, Oksenberg JR, and S. Baranzini SE. Immune cell-specific transcriptional profiling highlights distinct molecular pathways controlled by Tob1 upon experimental autoimmune encephalomyelitis. Abstract presented at The American Society for Cell Biology Annual Meeting ASCB2016, San Francisco, CA, USA, 3-7 December 2016. The abstract was awarded a travel grant

Didonna A and Oksenberg JR. MicroRNA dynamics in oligodendrocytes in the context of autoimmune demyelination. Abstract presented at the UCSF 2017 Neuroimmunology Group Retreat MS 2020. Basic and Translational Research. San Francisco, CA, USA, 29 August 2017

Didonna A and Oksenberg JR. MicroRNA dynamics in oligodendrocytes in the context of autoimmune demyelination. Abstract presented at the First Joint ASCB-EMBO meeting, Philadelphia, PA, USA, 2-6 December 2017. The abstract was awarded a travel grant

Guglielmetti C, Najac C, Didonna A, Van der Linden A, Ronen SM, and Chaumeil MM. Metabolic imaging of hyperpolarized [<sup>1-13</sup>C] pyruvate can detect neuroinflammation in the cuprizone model of MS. Seventh joint ECTRIMS-ACRIMS meeting Paris, France, 25-28 October 2017

---

**Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 100.715,20 €**

**Research Fellowship funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years and the amount of € 100,715.20**

---

## Simone Patergnani

Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale,  
Università di Ferrara, Ferrara

MENTORE / MENTOR: **Paolo Pinton**

### Utilizzo di agenti modulanti il processo autofagico come nuova terapia per ripristinare la mielinizzazione in modelli di sclerosi multipla

#### PREMESSE E OBIETTIVI

Il progetto di ricerca propone di definire l'esatto ruolo dei processi catabolici di autofagia e mitofagia durante la patogenesi della sclerosi multipla (SM) e individuare nuovi possibili target per innovative strategie terapeutiche.

L'autofagia cellulare è un meccanismo che permette la degradazione e il riciclo dei componenti cellulari danneggiati. In particolare la mitofagia è un evento cellulare di autofagia che porta alla degradazione selettiva dei mitocondri. Negli ultimi anni, è stato ampiamente dimostrato che l'autofagia è coinvolta nei processi di neurodegenerazione. In particolare, l'autofagia è stata correlata alla sopravvivenza neuronale in condizione sfavorevoli, come di stress ossidativo e metabolico. Nonostante questo, il suo ruolo nella SM non è stato ancora ben definito. Diversi studi suggeriscono che livelli eccessivi di autofagia possono essere una condizione "pericolosa" per il differenziamento degli oligodendrociti, promuovendo così la progressione della patologia. Infatti, è stato documentato che esiste un forte legame fra autofagia e metabolismo mitocondriale, e come la perdita di mielina sia un evento fortemente dipendente dal metabolismo mitocondriale. Per questo motivo, è facile ipotizzare un collegamento fra autofagia, energetica mitocondriale e SM. Ci proponiamo di svelare i possibili punti di contatto tra autofagia e la progressiva perdita di mielina che contraddistingue la patologia, in modo da riuscire a realizzare nuovi approcci terapeutici contro la SM, basati su farmaci capaci di modulare il processo autofagico.

#### RISULTATI

Dati in nostro possesso dimostrano che una condizione pro-infiammatoria determina un aumento progressivo dei livelli di autofagia, accompagnato da perdita di mielina. Siccome l'autofagia è dipendente

dall'attività delle chinasi AMPK e MTOR (rispettivamente regolatori positivi e negativi dell'autofagia), abbiamo investigato una loro eventuale partecipazione nella SM. Abbiamo così osservato che in seguito all'esposizione a citochine pro-infiammatorie, gli oligodendrociti presentano alti livelli di attività di AMPK e una ridotta attività di MTOR. L'autofagia esiste in diverse forme selettive; la più studiata e maggiormente correlata a patologie umane è la mitofagia, che rappresenta una rimozione selettiva di mitocondri danneggiati e non funzionanti da parte dell'autofagia. Mediante l'utilizzo di una serie di strumenti in grado di analizzare lo stato funzionale dei mitocondri, abbiamo osservato come condizioni pro-infiammatorie causano una riduzione dell'attività e dell'energetica mitocondriale. In parallelo, abbiamo riscontrato un aumento dell'attività glicolitica delle cellule esaminate. Tali dati ci permettono di affermare che i mitocondri di cellule oligodendrocitarie esposte a condizioni infiammatorie sono sottoposti a un forte stress energetico e che potrebbero essere soggetti ad eventi mitofagici. Esperimenti mirati ad analizzare la mitofagia confermano questa ipotesi e evidenziano il coinvolgimento della via di segnalazione composta da PINK1-Parkin, i principali regolatori del processo mitofagico.

In seguito, ci siamo focalizzati di confermare il coinvolgimento dei processi auto-/mitofagici in campioni biologici ottenuti da pazienti SM. A tale scopo, abbiamo ricercato marcatori specifici di queste vie di segnalazione cataboliche in campioni ematici e di liquido cerebrospinale (CSF) di persone sane e con SM. Come risultato, nei campioni patologici sono stati riscontrati eccessivi livelli autofagici e mitofagici.

Appurato l'effettivo coinvolgimento di questi processi nella malattia, abbiamo provato a modulare l'attività autofagica con specifici inibitori, quali clorochina e farmaci antipsicotici come clozapina e aloperidolo. In

modo rilevante abbiamo osservato come questi farmaci ripristinano sia la produzione di mielina, che il processo di mielinizzazione in cellule precedentemente trattate con citochine pro-infiammatorie e/o agenti demielinizzanti.

A questo punto abbiamo trasferito le nostre osservazioni ottenute *in vitro* in un modello sistemico murino che riproduce una condizione di demielinizzazione (modello Cuprizone).

I risultati ottenuti sono promettenti. Infatti, il trattamento farmacologico con l'inibitore autofagico (in particolare clozapina e aloperidolo) determina un ripristino del processo di mielinizzazione in seguito ad esposizione con cuprizone.

### CONCLUSIONI

Possiamo affermare che autofagia e mitofagia sono coinvolte nella SM. A dimostrazione, condizioni riprodotte la patologia determinano un aumento dei li-

velli di auto-/mitofagia. Questi eventi sembrerebbero essere causati da un'alterazione della funzionalità mitocondriale, che determina una forte perdita nella produzione di energia, sufficiente per innescare i processi catabolici sopra indicati. A ulteriore conferma della nostra ipotesi, campioni ematici e di CSF ottenuti da persone con SM sono contraddistinti da eccessivi livelli di marker autofagici e mitofagici. Per questo motivo, ostacolare i livelli eccessivi di autofagia può essere considerato un nuovo approccio terapeutico contro la SM. A dimostrazione, abbiamo osservato (sia in modelli *in vitro* che *in vivo*) che mediante l'utilizzo di una serie di farmaci anti-autofagici è possibile aumentare i livelli di produzione della mielina e ripristinare il processo di mielinizzazione.

Prima però di poter pensare a un utilizzo clinico di tali farmaci nella SM, è necessario correlare l'effettivo stadio clinico del paziente con la propria attività autofagica.

## Target autophagy as new therapeutic approach to recover myelinization in multiple sclerosis model

### INTRODUCTION AND AIMS

The program addresses to define how autophagy and mitophagy participate in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) and revealing novel putative targets for therapeutic strategies. In last decade, it has been demonstrated how autophagy plays a key role in neurodegenerative process. Because its major role in cell survival during unfavorable conditions, it is not surprising that autophagy protects from neuronal death. However, much data also identify autophagy as a cytotoxic mechanism. Seemingly, autophagy plays a dual role in neurodegenerative disease. Even if the possible involvement of autophagic process during MS pathogenesis remains still unexplored, many studies suggest that enhanced autophagic levels may be a very harmful condition for MS progression and OPCs differentiation.

Since it has been well documented: i) a critical role of autophagy and its effector in regulation of mitochondrial metabolism, ii) an autophagy dependence on the mitochondrial energy state, iii) the immune-mediated loss of myelin is linked to the cellular energy demand and, iv) mitochondria cover a key role in OPCs growth and differentiation, it is reasonable to think about a

strong correlation between autophagy, mitochondria bioenergetics and MS. Hence, we proposed to reveal putative interactions between the inflammatory process and an alteration of specific molecular signaling pathways of the autophagic process, in order to create novel therapeutic approaches against MS based on drugs modulating the autophagy process.

### RESULTS

We found that pro-inflammatory cytokines provoked a progressive increase of autophagic accompanied by myelin loss. Autophagy is highly dependent of the activity of kinases AMPK and MTOR. We determined that during inflammation, AMPK (positive regulator of autophagy) levels were increased in oligodendrocytes treated with cytokines. Accordingly, we also denoted significant reduction of MTOR (negative regulator of autophagy) levels in our experimental conditions.

It is well known that autophagy also exists in selective forms. The most studied and related to human diseases is the mitophagy, the selective removal of damaged and not functioning mitochondria by autophagy. By using a series of instruments aims to control the

mitochondrial status, we found that mitochondrial activity was globally reduced during inflammatory conditions. Moreover, we also detected an increment in glycolytic activity. These data suggested that mitochondria are suffering. Thus, we tried to link this aspect to the abnormal autophagic activity recorded, by measuring the amount of mitophagy and the possible involvement of the main pathway regulating this catabolic process, the PINK1-Parkin axis.

As a result, we revealed that treatments with cytokines also promote mitophagic activation.

Subsequently, we measured these molecular events in human samples obtained by MS-affected individuals. We found that in their serum and cerebrospinal fluid (CSF) the amount of auto-mitophagic markers was enhanced.

Our data indicated that auto-/mitophagy pathways are involved in MS. Hence, we modulated the autophagic process to recover myelin production *in vitro* by using the most used inhibitors that are: chloroquine and anti-psychotic drugs like clozapine and haloperidol. Very promising results were obtained. In fact, by using them is possible to recover myelin production *in vitro*. Next, we tried to reproduce our findings *in vivo* mouse model of MS. Results so obtained were very promising. First, we demonstrated that cuprizone lead to an increase in autophagic levels in the brain.

Of most interest, we found that by using Cuprizone model, intrapleural administration of anti-autophagic compounds (in particular clozapine and haloperidol) improve in a significant matter the remyelination after cuprizone withdrawal.

## CONCLUSIONS

We finally address about the exact role of catabolic processes during the progressive loss of myelin during MS. Accordingly, MS-like conditions provoke activation of both autophagic and mitophagic processes. Everything seem to be driven by an attack to the mitochondrial compartment, which affect the mitochondrial functioning and lowered the overall energy production of an oligodendrocyte cell. At demonstration of our hypothesis, exaggerate autophagic and mitophagic markers have been found in CSF and serum of MS patients. Counteract this excessive auto-/mitophagic levels may represent a real therapeutic opportunity. Indeed, our *in vitro* and *in vivo* (a cuprizone model of demyelination) data showed that by using a series of anti-autophagic compounds is possible to restore the myelin levels and the ability of oligodendrocytes to form the myelin sheath. Further experiments are now ongoing to link the clinical state of patients with MS to the autophagic levels. Only then shall we create a possible therapeutic approach focused on autophagic inhibition.

---

**PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI**  
**PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS**


---

Patergnani S, Castellazzi M, Bonora M, Marchi S, Casetta I, Pugliatti M, Giorgi C, Granieri E, Pinton P. Autophagy and mitophagy elements are increased in body fluids of Multiple Sclerosis-affected individuals. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017. Sep 2. pii: jnnp-2017-316234

Marchi S, Bonora M, Patergnani S, Giorgi C, Pinton P. Methods to Assess Mitochondrial Morphology in Mammalian Cells Mounting Autophagic or Mitophagic Responses. *Methods Enzymol* 2017, 588:171-186

Danese A, Patergnani S, Bonora M, Wieckowski MR, Previati M, Giorgi C, Pinton P. Calcium regulates cell death in cancer: roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). *BiochimBiophys Acta (Bioenergetics)* 2017, Aug;1858(8):615-627

Missiroli S, Danese A, Iannitti T, Patergnani S, Perrone M, Previati M, Giorgi C, Pinton P. Endoplasmic reticulum-mitochondria Ca<sup>2+</sup> crosstalk in the control of the tumor cell fate. *BiochimBiophys Acta (Molecular Cell Research)* 2017,1864:858-864

Patergnani S, Pinton P. Mitophagy and mitochondrial balance. *Methods Mol Biol* 2015, 1241:181-94

Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S, Duszyński J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-associated Membranes (MAMs): Composition, Molecular Mechanisms and Physiopathological Implications. *Antioxid Redox Signal* 2015, 22(12):995-1019

Rimessi A, Bezzeri V, Patergnani S, Marchi S, Cabrini G, Pinton P. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent NLRP3 activation exacerbates the *Pseudomonas aeruginosa*-driven inflammatory response in cystic fibrosis. *Nat Commun* 2015, 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* 2015, 78(1):21-38

Rimessi A, Patergnani S, Bonora M, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> remodeling is a prime factor in oncogenic behavior. *Front Oncol* 2015, 5:143

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* 2015, 6(27):23427-49

Patergnani S, Missiroli S, Marchi S, Giorgi C. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Microenvironment: Targeting Autophagic and Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2015, Jul 27;5:173

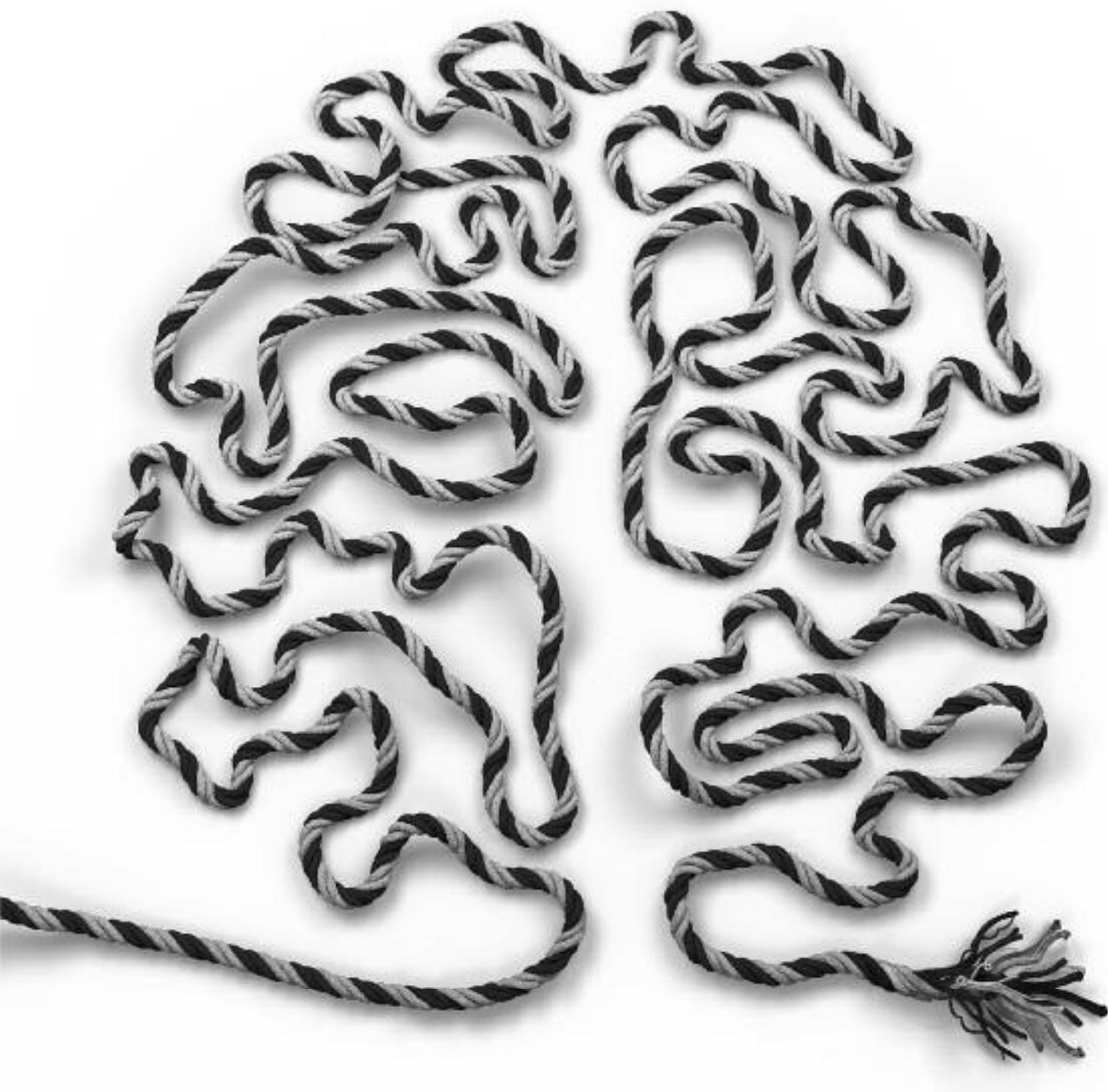
Marchi S, Corricelli M, Trapani E, Bravi L, Pittaro A, Delle Monache S, Ferroni L, Patergnani S, Missiroli S, Goitre L, Trabalzini L, Rimessi A, Giorgi C, Zavan B, Cassoni P, Dejana E, Retta SF, Pinton P. Defective autophagy is a key feature of cerebral cavernous malformations. *EMBO Mol Med* 2015, 7(11):1403-17

---

**Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 55.000 €**

**Research fellowship funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years and the amount of 55,000 €**

---



# **PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM 2017**

*FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2017*

## PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM 2017 FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2017

### SM PROGRESSIVA / PROGRESSIVE MS

#### Giulia Bommarito

Department of Radiology and Medical Informatics, CIBM,  
University of Geneva, Switzerland

**La connettività funzionale dinamica  
nella sclerosi multipla progressiva:  
nuovi approcci e rilevanza clinica**

*The dynamic functional connectome  
in progressive multiple sclerosis:  
novel approaches and clinical relevance*

Borsa di Ricerca / Research Fellowship  
€ 78.000 - 2 anni / years

#### Raffaella Chieffo

Unità Sperimentale di Neurofisiologia, IINSPE,  
Ospedale San Raffaele, Milano

**Stimolazione magnetica transcranica ripetitiva  
con H-coil per potenziare gli effetti della  
riabilitazione cognitiva nelle persone con  
sclerosi multipla progressiva**

*Repetitive transcranial magnetic stimulation with the  
H-coil to enhance the effects of cognitive rehabilitation  
in people with progressive multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

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

#### Roberto Bergamaschi

Centro di Ricerca Interdipartimentale per la Sclerosi  
Multipla (CRISM), IRCCS, Fondazione Istituto  
Neurologico Nazionale C. Mondino, Pavia

**Costi della comorbidità e analisi costo-efficacia  
di un programma di assistenza integrata in pazienti  
con sclerosi multipla**

*Costs of comorbidity and cost-effectiveness  
analysis of an integrated collaborative care program  
in multiple sclerosis people*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 100.000 - 2 anni / years

#### Alberto Priori

Dipartimento di Scienze della Salute,  
Università degli Studi di Milano, Milano

**La stimolazione spinale transcutanea  
e la stimolazione transcranica a corrente continua  
come strumenti per migliorare la spasticità  
nella sclerosi multipla**

*Transcutaneous spinal cord and transcranial direct  
current stimulation as tools to improve spasticity  
in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

#### Massimiliano Pau

Dipartimento di Ingegneria Meccanica, Chimica e  
dei Materiali, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

**Soluzioni innovative a basso costo basate  
su realtà virtuale per la riabilitazione domiciliare  
nella sclerosi multipla**

*Innovative low-cost solutions based on virtual reality for  
upper limb home-based rehabilitation in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 97.000 - 2 anni / years

#### Luca Prosperini

Dipartimento Neuroscienze  
U.O.C. Neurologia e Neurofisiopatologia Azienda  
Ospedaliera S. Camillo Forlanini, Roma

**Utilizzo dell'exergaming domiciliare per migliorare  
la funzione cognitiva nella sclerosi multipla: studio  
multicentrico, randomizzato, di non inferiorità**

*Using home-based exergames to improve cognitive  
function in multiple sclerosis: a multicenter,  
randomized, non-inferiority trial*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 180.000 - 3 anni / years

DIAGNOSI E MONITRAGGIO  
DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS  
AND MONITORING OF THE DISEASE

**Monica Biggio**

*DIMES - Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Fisiologia Umana, Università degli Studi di Genova, Genova*

**Un approccio combinato di tecniche neurofisiologiche e di neuroimaging per esplorare la funzionalità cortico-cerebrale nella sclerosi multipla**

***A combined neurophysiological and neuroimaging approach to explore the cortico-brainstem functionality in multiple sclerosis***

Borsa di Ricerca / Research Fellowship  
€ 27.000 - 1 anno / year

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO /  
PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

**Angelo Ghezzi**

*Centro Studi Sclerosi Multipla, ASST Valle Olona Ospedale Gallarate, Gallarate (VA)*

**Analisi di fattori di rischio genetici e dell'interazione gene-ambiente nella sclerosi multipla pediatrica (PEDiatric Italian Genetic and enviRonment ExposurE) (studio PEDIGREE)**

***Identification of genetic risk factors and interaction between genetic and non-genetic risk factors in pediatric multiple sclerosis (PEDiatric Italian Genetic and enviRonment ExposurE) (PEDIGREE study)***

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 90.000 - 1 anno / year

**Vincenzo Brescia Morra**

*Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli*

**Comprensione di un nuovo meccanismo di innesco della sclerosi multipla mediato dal batterio non-typeable *Haemophilus influenzae***

***Elucidation of a novel triggering mechanism of multiple sclerosis mediated by non-typeable *Haemophilus influenzae****

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Rosella Mechelli**

*Università Telematica San Raffaele Roma, Roma*

**I genotipi del virus di Epstein-Barr nella sclerosi multipla ed il loro ruolo funzionale nell'eziologia della malattia**

***Epstein-Barr virus genotypes in multiple sclerosis and their functional relevance in the disease etiology***

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 180.550 - 2 anni / years

**Andrea Cossarizza**

*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno Infantili e dell'Adulto, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena*

**DAMPs mitocondriali nella sclerosi multipla: uno studio pilota**

***Mitochondrial DAMPs in multiple sclerosis: a pilot study***

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Ilaria Decimo**

*Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Verona, Verona*

**Il ruolo dei progenitori neurali delle meningi nella regolazione delle cellule autoimmuni del cervello**

***The role of meningeal neural progenitor cells in brain auto-reactive immune cell regulation***

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 66.000 - 2 anni / years

**Jens Geginat**

*Istituto Nazionale di Genetica Molecolare Romeo ed Enrica Invernizzi, Milano*

**Proprietà soppressive delle cellule regolatorie di tipo 1 in risposta a cellule T patogene nella sclerosi multipla**

***Suppression of pathogenic T-cell responses by type 1 regulatory-like T-cells in multiple sclerosis***

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 300.000 - 3 anni / years

**Michela Matteoli**

Laboratorio di Farmacologia e Patologia Cerebrale,  
Università Humanitas, Milano

**Un modello umanizzato di barriera ematoencefalica per investigare l'infiltrazione di cellule del sistema immunitario nella sclerosi multipla: verso un approccio di medicina personalizzata**

*A humanized model of blood brain barrier to investigate immune cells infiltration in multiple sclerosis: toward a personalized medicine approach*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Francesco Annunziato**

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica,  
Sezione Medicina Interna, Università degli Studi di Firenze, Firenze

**Meccanismi molecolari che regolano la proliferazione e la plasticità dei linfociti T helper 17: implicazioni per la patogenesi e la progressione della sclerosi multipla**

*Molecular mechanisms that regulate T helper 17 lymphocytes proliferation and plasticity: implications for multiple sclerosis pathogenesis and progression*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 130.000 - 2 anni / years

**Laura Piccio**

Department of Neurology, Washington University,  
St. Louis, USA

**Ruolo di TREM2 nella modulazione della microglia durante demielinizzazione nel sistema nervoso centrale**

*Role of TREM2 in modulating microglia function during CNS demyelination*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 106.000 - 2 anni / years

**Giuseppina Ruggiero**

Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali,  
Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

**CuZn Superossido dismutasi (SOD-1), specie reattive dell'ossigeno intracellulari (ROS), attivazione linfocitaria T e controllo della tolleranza immunitaria nella sclerosi multipla**

*CuZn Superoxide dismutase (SOD-1), intracellular reactive oxygen species (ROS), T cell activation and immune tolerance control in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Claudio Sette**

Laboratorio di Neuroembriologia,  
Fondazione Santa Lucia, Roma

**Ruolo della IL-1 $\beta$  nella modulazione della risposta patogena delle cellule Th17 umane nella sclerosi multipla**

*Role of IL-1 $\beta$  in the modulation of the pathogenic response of human Th17 cells in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 120.000 - 2 anni / years

**Melissa Sorosina**

Divisione di Neuroscienze, Laboratorio di Genetica delle Malattie Neurologiche Complesse, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Ospedale San Raffaele, Milano

**Coinvolgimento della proteina NINJ2 nell'attività di malattia della sclerosi multipla**

*Involvement of NINJ2 protein in multiple sclerosis disease activity*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 63.000 - 1 anno / year

**Michela Spadaro**

Laboratorio di Neurobiologia Clinica,  
Centro di Riferimento Regionale per la Sclerosi Multipla, Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri Ottolenghi, AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

**La gravidanza: un potente fenomeno transitorio di immuno-soppressione nelle donne con sclerosi multipla**

*Pregnancy: a powerful transient immunosuppressive phenomenon in multiple sclerosis women*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Enzo Terreno**

Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze della Salute, Università degli Studi di Torino, Torino

**Visualizzazione simultanea di linfociti T e B mediante RM in vivo in un modello murino di sclerosi multipla: implicazioni nella patogenesi e nel trattamento terapeutico**

*In vivo dual MRI detection of T and B lymphocytes in a MS mouse model: implications in the pathogenesis and therapeutic treatment*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Tiziana Vigo**

Ospedale Policlinico San Martino, Sistema Sanitario Regione Liguria, IRCCS per l'Oncologia, Genova

**Identificazione di un circuito neurale che controlla il rilascio dal midollo osseo di cellule immunitarie rilevanti per l'induzione dell'encefalite autoimmune sperimentale**

*Identification of a neural circuit controlling the mobilization from the bone marrow of immune cells relevant for experimental autoimmune encephalomyelitis induction*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Magdalena Zoledziewska**

Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica, Consiglio Nazionale delle Ricerche Cagliari, Monserrato (CA)

**L'impatto del microbioma intestinale sulla patogenesi della sclerosi multipla a prevalenza emergente nella popolazione sarda**

*The impact of gut microbiome on multiple sclerosis pathogenesis in the population with emerging prevalence - Sardinians*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 160.000 - 2 anni / years

VERSO NUOVI TRATTAMENTI /  
TOWARDS NEW TREATMENTS

**Maria Pia Abbracchio**

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Laboratorio di Farmacologia Cellulare e Molecolare della Trasmissione purinergica, Università degli Studi di Milano, Milano

**Strategie rimielinizzanti innovative per la sclerosi multipla: focus su GPR17, nuovo recettore coinvolto nel differenziamento oligodendrocitario**

*Innovative re-myelinating strategies for multiple sclerosis via the exploitation of the new oligodendrocyte receptor GPR17*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 180.000 - 3 anni / years

**Cristina Agresti**

Dipartimento di Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Identificazione e validazione dei target rimielinizzanti dell'edaravone nei progenitori degli oligodendrociti**

*Identification and validation of edaravone remyelinating targets in oligodendrocyte progenitor cells*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 109.000 - 2 anni / years

**Santina Bruzzone**

CEBR, Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica, Università degli Studi di Genova, Genova

**L'inibizione di SIRT6 come un approccio terapeutico nel trattamento della sclerosi multipla**

*SIRT6 inhibition as a therapeutic approach for treating multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Valerio Chiurchiù**

Facoltà Dipartimentale di Medicina, Laboratorio di Biochimica, Università Campus Bio-Medico di Roma, Roma

**Mediatori lipidici pro-risolutivi specializzati come nuova strategia terapeutica per "risolvere" le risposte immunitarie dell'immunità adattativa nella sclerosi multipla**

*Specialized pro-resolving lipid mediators as a novel strategy to "resolve" the altered adaptive immune responses in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 130.000 - 2 anni / years

**Paolo Comoglio**

Gruppo di Cooperazione in Cancerologia, Candiolo (TO)

**Attivazione del recettore Met come strumento terapeutico nella sclerosi multipla: un nuovo meccanismo di neuroprotezione che coinvolge il sistema glutammatergico**

*Activation of the Met receptor as therapeutic tool in MS: a new neuroprotective mechanism involving the glutamatergic system*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 160.000 - 3 anni / years

**Alessandro Didonna**

*School of Medicine, Department of Neurology,  
MS Genetics Laboratory, University of California  
San Francisco, USA*

**MicroRNA come nuovi strumenti per modulare  
il processo di mielinizzazione nel sistema nervoso**

*MiRNAs as novel potential tools to modulate  
myelination in the CNS*

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship  
€ 100.000 - 2 anni / years

**Roberto Furlan**

*Istituto di Neurologia Sperimentale, Fondazione  
Centro San Raffaele, Milano*

**Microvesicole microgliali come vettore terapeutico  
in neuroinfiammazione**

*Microglial microvesicles as therapeutic vector  
for neuroinflammation*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 140.000 - 2 anni / years

**Nicoletta Galeotti**

*Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia,  
Area del Farmaco, Salute del Bambino,  
Università degli Studi di Firenze, Firenze*

**Aggredire il dolore neuropatico e il danno assonale  
nella sclerosi multipla tramite una modulazione  
genetica delle proteine ELAV**

*Targeting neuropathic pain and axonal damage in  
multiple sclerosis through genetic modulation of ELAV  
RNA binding proteins*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 29.500 - 1 anno / year

**Placido Illiano**

*The Miami Project to Cure Paralysis,  
University of Miami, Miami, USA*

**Potenziamento del recettore TNFR2 nel sistema  
nervoso centrale per la terapia della sclerosi multipla**

*Enhancing TNFR2 signaling in the CNS for multiple  
sclerosis therapy*

Borsa di Ricerca / Research Fellowship  
€ 83.000 - 2 anni / years

**Clementina Manera**

*Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Pisa*

**Modulazione multi-target del sistema  
endocannabinoide come innovativo approccio  
terapeutico per la sclerosi multipla**

*Multi-target modulation of the endocannabinoid  
system as an innovative therapeutic approach for  
multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 100.000 - 1 anno / year

**Luca Peruzzotti-Jametti**

*Department of Clinical Neurosciences,  
Division of Stem Cell Neurobiology,  
University of Cambridge, Cambridge, UK*

**Caratterizzazione e manipolazione in vivo del danno  
associate a succinato in condizioni di  
neuroinfiammazione**

*In vivo characterisation and manipulation of succinate-  
dependent injury in neuroinflammation*

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship  
€ 79.361 - 2 anni / years

PROGETTI SPECIALI 2017  
SPECIAL PROJECTS 2017

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ  
DELLA VITA / NEUROREHABILITATION  
AND QUALITY OF LIFE

**Alessandra Solari**

*Unità di Neuroepidemiologia,  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano*

**Linee guida EAN per le cure palliative  
nelle persone con SM grave**

***EAN Guideline on Palliative Care  
of People with Severe MS***

Progetto Speciale / Special Project  
€ 66.000 - 1 anno / year

**Maria Pia Amato**

*Dipartimento di NEUROFARBA,  
Università degli Studi di Firenze, Firenze*

**Riabilitazione cognitiva dell'attenzione,  
a domicilio con l'uso del computer, in soggetti  
con sclerosi multipla ad esordio pediatrico:  
uno studio pilota multicentrico**

***Home-based, computer-assisted cognitive  
rehabilitation for attention in pediatric onset  
multiple sclerosis using a new dedicated software:  
a pilot multicenter study***

Progetto Speciale / Special Project  
€ 220.000 - 1 anno / year

**Carla Antonini**

*Dipartimento di Economia e Management,  
Università degli Studi di Trento, Trento*

**Accountability ed approccio multi-stakeholder  
per misurare l'impatto della ricerca**

***Accountability and Multiple-Constituency  
Approach to Measure Impact of Research***

Progetto Speciale / Special Project  
€ 50.000 - 1 anno / year

**Ambra Mara Giovannetti**

*Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta,  
Milano*

**Allestimento italiano del programma  
"RESilience and Activity every DaY for MS",  
degli outcomes, e valutazione pilota di efficacia  
mediante impiego di metodologia mista  
(READY- It-MS)**

***Italian set up of the program "RESilience and Activity  
every DaY for MS", of outcomes, and pilot assessment  
of efficacy using a mixed methodology (READY-It-MS)***

Progetto Speciale / Special Project  
€ 150.000 - 3 anni / years

VERSO NUOVI TRATTAMENTI /  
TOWARDS NEW TREATMENTS

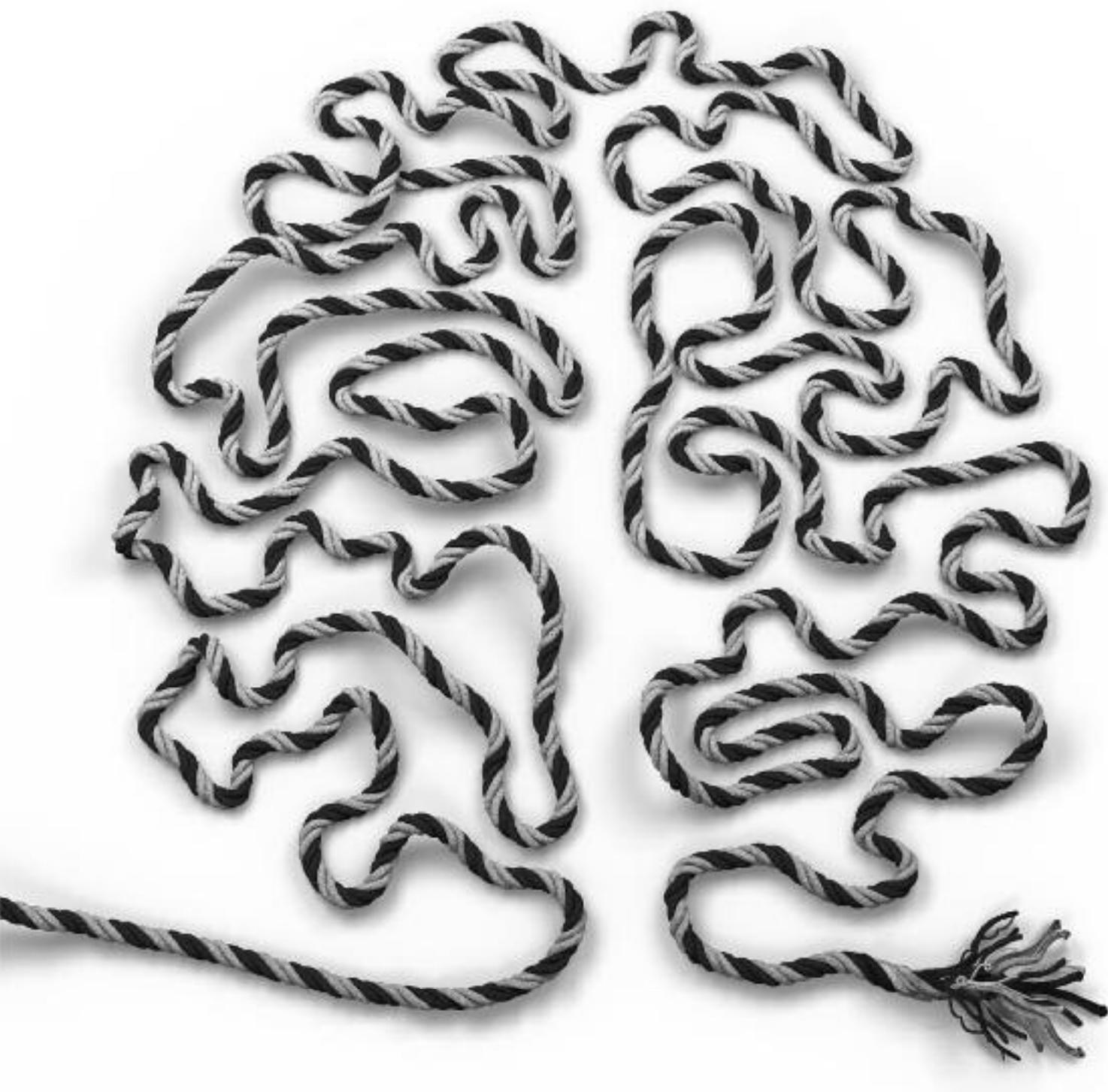
**Gianvito Martino**

*Divisione di Neuroscienze, Unità di Neuroimmunologia,  
Ospedale San Raffaele, Milano*

**Trapianto di cellule staminali neurali in pazienti  
affetti da sclerosi multipla: uno studio di fase I**

***Neural Stem Cell transplantation in MS patients:  
a phase I study***

Progetto Speciale / Special Project  
€ 600.000 - 3 anni / years



# **PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM 2016**

*FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2016*

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM 2016  
FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2016

SM PROGRESSIVA / PROGRESSIVE MS

**Marcello Pinti**

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia  
Dipartimento di Scienze della Vita, Modena

**Regolazione del metabolismo cellulare nei linfociti di pazienti con forme progressive di sclerosi multipla**

*Regulation of cell metabolism in lymphocytes from patients with progressive forms of multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 155.000 - 2 anni / years

**Stefano Carlo Previtali**

Fondazione Centro San Raffaele  
Istituto di Neurologia Sperimentale (InSpe)  
Divisione di Neuroscienze, Milano

**Ruolo di Jab1 e della senescenza nella patogenesi delle forme progressive di SM in un modello animale**

*Role of Jab1 and senescence in the pathogenesis of progressive MS in a mouse model*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 150.000 - 2 anni / years

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

**Laura Bonzano**

Università degli Studi di Genova  
Dipartimento di Neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia genetica e scienze materno-infantili (DINOEMI), Genova

**Caratteristiche temporali e spaziali del trasferimento interemisferico di informazioni nella sclerosi multipla: un approccio multimodale di coregistrazione TMS-EEG, MRI e apprendimento motorio**

*Temporal and spatial features of interhemispheric information transfer in multiple sclerosis: a multimodal approach of TMS-EEG coregistration, MRI and motor learning*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 40.000 - 1 anno / year

**Martina Borghi**

Azienda Ospedaliera Universitaria San Luigi Gonzaga  
Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla e Neurobiologia Clinica, Orbassano (TO)

**Impatto psicologico della SM negli adolescenti: sostegno alla cura e promozione del benessere nei pazienti e nei genitori**

*Psychological impact of MS in adolescents: support for the care and promotion of well-being in patients and parents*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 20.500 - 1 anno / year

**Marco Bove**

Università degli Studi di Genova  
Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES)  
Sezione di Fisiologia Umana, Genova

**Monitoraggio e supporto attraverso un ausilio protesico con biofeedback del percorso riabilitativo in persone con sclerosi multipla**

*Monitoring and integrating the rehabilitative process of persons with multiple sclerosis by means of a prosthetic aid with biofeedback*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 170.000 - 3 anni / years

**Davide Cattaneo**

IRCCS Fondazione Don Gnocchi  
Centro Santa Maria Nascente, Milano

**Identificazione dei disturbi precoci del cammino in soggetti non disabili affetti da SM: valutazione clinico-strumentale della progressione della malattia e di potenziali interventi terapeutici**

*Unraveling early walking dysfunction in non-disabled MS people: clinical and instrumental assessment of disease progression and potential therapeutic interventions*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 110.000 - 2 anni / years

**Franca Deriu**

Università degli Studi di Sassari  
Dipartimento di Scienze Biomediche  
Laboratorio di Fisiologia e Neurofisiologia Applicata, Sassari

**Efficacia dell'allenamento controlaterale nella gestione della debolezza muscolare e della fatica in persone con sclerosi multipla**

*Effectiveness of contralateral training in the management of muscle weakness and fatigue in individuals with multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 128.500 - 2 anni / years

**Ludovico Pedullà**

Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Fisiologia Umana, Genova

**Studio dei correlati comportamentali e neurali in compiti di dual task in ambiente ecologico: indagine fNIRS prima e dopo un intervento riabilitativo in persone con sclerosi multipla**

*Behavioural and neural correlates of dual tasks negotiation in ecological setting: an fNIRS study to investigate cognitive-motor interference after rehabilitation in people with multiple sclerosis*

Borsa di Ricerca / Research Fellowship  
€ 50.000 - 2 anni / years

**Giorgio Sandrini**

IRCCS Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino  
Università degli Studi di Pavia, Dipartimento di Scienze del Sistema Nervoso e del Comportamento  
Dipartimento di Neurologia e Neuroriabilitazione, Pavia

**Effetti della stimolazione cerebellare transcranica a correnti dirette su "reinforced feedback in virtual environment (RFVE)" in pazienti affetti da sclerosi multipla con atassia degli arti superiori**

*Effects of cerebellar transcranial direct current stimulation (tc-DCS) on reinforced feedback in virtual environment (RFVE) in multiple sclerosis patients with upper limb ataxia*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Vittorio Sanguineti**

Università degli Studi di Genova  
Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi (DIBRIS), Genova

**Attività di stimolazione elettrica transcranica (tES) combinata con interazione aptica mediata da robot per il miglioramento delle funzionalità dell'arto superiore nella sclerosi multipla (ROBOTES)**

*Activity of combined trans-cranial electrical stimulation (tES) and robot-mediated haptic interaction to improve upper limb function in multiple sclerosis (ROBOTES)*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Carlo Trompetto**

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

**La distonia spastica nella sclerosi multipla: il lato oscuro dell'ipertono muscolare**

*Spastic dystonia in multiple sclerosis: the dark side of muscle hypertonia*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 60.000 - 2 anni / years

DIAGNOSI E MONITRAGGIO  
DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS  
AND MONITORING OF THE DISEASE

**Linda Chaabane**

Fondazione Centro San Raffaele  
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Milano

**Fluoro (19F) RMI: un nuovo metodo di imaging per la rilevazione dell'infiammazione nel SNC in vivo**

*Fluorine (19F) MRI: a new imaging method for the detection of CNS inflammation in vivo*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Elisabetta Pagani**

Fondazione San Raffaele, Unità di Neuroimaging Quantitativo, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE)  
Divisione di Neuroscienze, Milano

**Piattaforma traslazionale per lo sviluppo di metodi di risonanza per valutare la struttura della mielina**

*A translational platform for the development of MRI methods to assess myelin architecture*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Maria Assunta Rocca**

Fondazione San Raffaele, Unità di Neuroimaging della Sostanza Bianca del Sistema Nervoso Centrale, Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Milano

**Definizione dei correlati di RM funzionale e strutturale della presenza di disabilità clinica e compromissione cognitiva nei pazienti con SM pediatrica**

*Mapping functional and structural MRI correlates of clinical disability and cognitive impairment in pediatric MS patients*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 94.000 - 1 anno / year

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO /  
PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

**Stefania Ceruti**

Università degli Studi di Milano  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari  
Laboratorio di Farmacologia Molecolare e Cellulare della Trasmissione Purinergica, Milano

**Studi sui meccanismi molecolari e cellulari alla base della neuropatia trigeminale e della maggiore suscettibilità all'emicrania nella sclerosi multipla**

*Insights into the molecular and cellular mechanisms at the basis of multiple sclerosis-related trigeminal neuropathy and increased susceptibility to migraine pain*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 29.872,5 - 1 anno / year

**Paola de Candia**

Fondazione Multimedica Onlus, Laboratorio di Immunologia, Milano

**Analisi del ruolo del miR-146a-5p extra-cellulare nella perdita di tolleranza immunologica nella sclerosi multipla**

*Unveiling the role of extracellular vesicle-associated miR-146a-5p in the loss of immune tolerance during multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Cinthia Farina**

Fondazione Centro San Raffaele, Divisione di Neuroscienze, Istituto di Neurologia Sperimentale, Milano

**Meccanismi di controllo astrocitario nella neuroinfiammazione**

*Mechanisms of astrocyte control in neuroinflammation*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 226.000 - 3 anni / years

**Roberta Felici**

University of Edinburgh  
Centre for Regenerative Medicine, Edinburgh UK

**Sviluppo di un dispositivo a microfluidi per lo studio della migrazione di cellule essenziali per la rimielinizzazione delle lesioni nella sclerosi multipla**

*Development of a microfluidic assay to study migration of cells essential for remyelination in MS lesions*

Borsa di Ricerca / Research Fellowship  
€ 81.000 - 2 anni / years

**Martina Gabrielli**

CNR Istituto di Neuroscienze  
Dipartimento di Scienze Biomediche, Laboratorio di Comunicazione intercellulare nel cervello, Milano

**Possibili effetti divergenti di microglia e macrofagi sui precursori degli oligodendrociti: ruolo delle vescicole extracellulari**

*Microglia versus macrophage effects on oligodendrocyte precursor cells: role of extracellular vesicles*

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship  
€ 68.000 - 2 anni / years

**Luisa Imberti**

Azienda Socio Sanitaria Territoriale Spedali Civili Brescia  
Laboratorio CREA, UO Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Brescia

**Identificazione di clonotipi delle cellule T in corso di leucoencefalopatia multifocale progressiva in pazienti con sclerosi multipla: ruolo nello sviluppo della malattia**

*Identification of progressive multifocal leukoencephalopathy-related T-cell clonotypes in natalizumab treated multiple sclerosis patients: role in the disease development*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 28.500 - 1 anno / year

**Roberta Magliozzi**

Università degli Studi di Verona, Sezione di Neurologia  
Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento  
Policlinico G.B. Rossi, Verona

**Componenti strutturali e infiammatori della patologia corticale nella sclerosi multipla**

*Structural and inflammatory components of cortical pathology in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 80.000 - 3 anni / years

**Giuseppe Matarese**

Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto di Endocrinologia e Oncologia Sperimentale, Napoli

**La glicolisi come nuovo determinante metabolico tra la tolleranza immunologica e la patogenesi della sclerosi multipla**

*Glycolysis as novel metabolic determinant linking immune tolerance and pathogenesis of multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 307.500 - 3 anni / years

**Simona Rolla**

Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Orbassano (TO)

**Il microbiota intestinale e la diversità metagenomica nello sviluppo della sclerosi multipla**

*Gut microbiota and metagenomic diversity in the development of multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Barbara Serafini**

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

**Studio dei meccanismi immunopatologici in tessuto cerebrale donato da persone con sclerosi multipla: focus su linfociti T citotossici EBV-specifici, cellule NK e risposta all'IFN-gamma**

*Study of immunopathological mechanisms in the multiple sclerosis brain: focus on Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes, NK cells and response to IFN-gamma*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 100.000 - 2 anni / years

**Loretta Tuosto**

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

**Ruolo del CD28 e della PI3K di classe 1A nella regolazione dei processi metabolici associati alle risposte pro-infiammatorie dei linfociti T nella SM**

*Role of CD28 and associated class 1A PI3K in the regulation of the cellular metabolic programs associated to pro-inflammatory T cell responses in MS*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 100.000 - 2 anni / years

**Claudia Verderio**

CNR, Istituto di Neuroscienze  
Dipartimento di Scienze Biomediche, Milano

**Coinvolgimento delle vescicole extracellulari rilasciate da cellule microgliali nelle disfunzioni sinaptiche nella sclerosi multipla**

*On the role of extracellular vesicles derived from inflammatory microglia in synaptic dysfunction in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Elisabetta Volpe**

Fondazione Santa Lucia  
Laboratorio di Neuroimmunologia, Roma

**Studio del potenziale ruolo neuroprotettivo della interleuchina-9 nella sclerosi multipla**

*Study of the potential neuroprotective role of interleukin-9 in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 160.000 - 3 anni / years

**Michele Zagnoni**

University of Strathclyde  
Centre for Microsystems & Photonics, Department of Electronic and Electrical Engineering, Glasgow, UK

**Quali meccanismi regolano il reclutamento delle cellule coinvolte nella riparazione di lesioni nella sclerosi multipla?**

*How are repairing brain cells successfully recruited to multiple sclerosis lesions?*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

VERSO NUOVI TRATTAMENTI /  
TOWARDS NEW TREATMENTS

**Bruno Bonetti**

Università degli Studi di Verona, Dipartimento di Neuroscienze, Biomeccanica e Movimento, Verona

**Homing e target cellulare di esosomi isolati da cellule staminali mesenchimali in un modello sperimentale di encefalomielite autoimmune**

*Homing and cell target of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 113.000 - 2 anni / years

**Alessia Capotondo**

Fondazione Centro San Raffaele, Divisione di Neuroscienze  
Unità di Neuroimmunologia, Milano

**Ingegnerizzare cellule microgliali per il rilascio di molecole terapeutiche nel SNC di topi con EAS**

*Engineering microglia cells for the delivery of therapeutic molecules in the CNS of EAE mice*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Luca D'Andrea**

Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, Napoli

**Nuove molecole sintetiche che inducono la sopravvivenza degli oligodendrociti attivando i recettori Axl**

*Novel synthetic molecules promoting oligodendrocytes survival in multiple sclerosis lesions by activation of Axl receptors*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Antonina Dolei**

Università degli Studi di Sassari  
Dipartimento di Scienze Biomediche, Sassari

**Studio dell'inibitore di JCV SF2/ASF in presenza di Natalizumab, per capire i meccanismi della PML Natalizumab-associata nei pazienti con SM**

*Study of the JCV suppressor SF2/ASF under Natalizumab, to give insights on the mechanisms of Natalizumab-associated PML of MS patients*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 60.000 - 1 anno / year

**Ivano Eberini**

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Milano

**Approfondimento e modelling dei meccanismi di rimielinizzazione indotti da antimicotici azolici in uso clinico con caratteristiche di riposizionamento**

*Deciphering and modelling remyelinating mechanisms induced by clinically-used azole antifungals with exploitable repurposing properties*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 75.000 - 1 anno / year

**Maira Gironi**

Ospedale San Raffaele, INSPE  
Unità Operativa di Neuroimmunologia Clinica  
Centro Sclerosi Multipla, Milano

**Anticorpi anti fosfolipidi ossidati: una potenziale risorsa naturale protettiva per la sclerosi multipla**

*Anti oxidized-phospholipids antibodies as inhibitors of neuroinflammation: exploiting a natural immune protective tool to fight multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 30.000 - 1 anno / year

**Francesco Ria**

Università Cattolica del Sacro Cuore, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Istituto di Patologia Generale, Roma

**Liposomi "janus-faced" come strumenti terapeutici in grado di mediare un fenotipo T soppressorio nella sclerosi multipla**

*Janus-faced liposomes as therapeutic tools to drive T suppressor phenotype in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project  
€ 300.000 - 3 anni / years

## PROGETTI SPECIALI 2016 SPECIAL PROJECTS 2016

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

#### Giampalo Bricchetto

Ricerca Scientifica, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, FISM, Genova

**Applicazione mobile per il monitoraggio dell'emozione motore-cognitiva nella sclerosi multipla**

***MAppingMS: Mobile Application for monitoring of motor-cognition-emotion in Multiple Sclerosis***

Progetto Speciale / Special Project  
€ 95.238 - 1 anno / year

### DIAGNOSI E MONITRAGGIO DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE

#### Giancarlo Comi

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

**Rischio individuale nelle sindromi clinicamente isolate di conversione a sclerosi multipla e progressione della malattia: un approccio integrato di clinica, genomica e di sanità pubblica**

***Individual risk in clinically isolated syndromes of conversion to multiple sclerosis and disease progression: an integrated public health clinical genomics approach***

Progetto Speciale / Special Project  
€ 95.238 - 3 anni / years

### VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

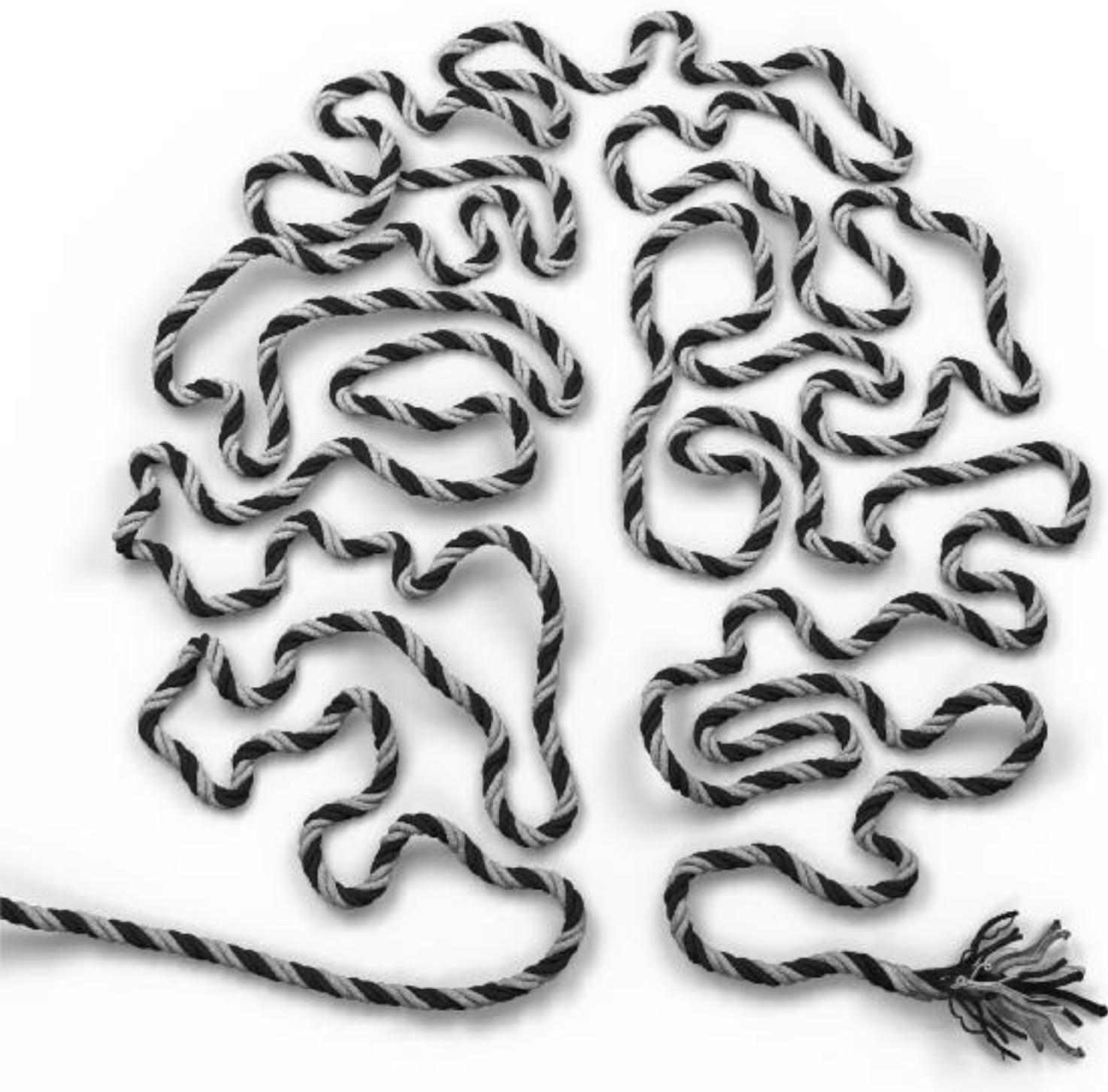
#### Giovanni Ristori

Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS) Sapienza Università di Roma, Neurologia e Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso NEMOS Ospedale Sant'Andrea, Roma

**Vaccino Bacille Calmette-Guérin (BCG) nella sindrome clinicamente isolata (RIS)**

***Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine in radiologically isolated syndrome (RIS)***

Progetto Speciale / Special Project  
€ 216.667 - 2 anni / years



# **COMITATO SCIENTIFICO FISM 2017/2016**

*FISM SCIENTIFIC COMMITTEE 2017/2016*

## BIOMEDICAL RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

**Maria Pia Abbraccio**

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, MILANO

**Luciano Adorini**

Chief Scientific Officer, Intercept Pharmaceuticals, MILANO

**Clara Ballerini**

NEUROFARBA Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Università degli Studi di Firenze, FIRENZE

**Luca Battistini**

IRCCS Santa Lucia, Unità di Neuroimmunologia, European Centre for Brain Research, ROMA

**Roberta Brambilla**

University of Miami, The Miami Project To Cure Paralysis, Miller School of Medicine, MIAMI, US

**Sandra D'Alfonso**

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi del Piemonte Orientale, NOVARA

**Raj Kapoor**

University College London Hospitals NHS, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, LONDON, UK

**Letizia Leocani**

Unità di Neurofisiologia Sperimentale e MAGICCS Center, INSPE, Ospedale San Raffaele, MILANO

**Catherine Lubetzki**

Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département des Maladies du Système Nerveux, PARIS, France

**Giuseppe Matarese**

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", NAPOLI

**Miriam Mattoscio**

Imperial College London, LONDON, UK

**Marco Salvetti**

Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS), Neurologia e Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso NESMOS, 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, US

**SOCIAL & BEHAVIOURAL SCIENCE  
RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE****Giovanni Abbruzzese**

DINOGLMI, Università degli Studi di Genova, GENOVA

**Maria Pia Amato**

NEUROFARBA Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino,  
Università degli Studi di Firenze, FIRENZE

**Roberto Bergamaschi**

Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino, IRCCS, PAVIA

**Marco Bove**

Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Università degli Studi di Genova, GENOVA

**Jürg Kesselring**

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

**Maria Assunta Rocca**

Fondazione San Raffaele, MILANO

**Alessandra Solari**

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

## BIOMEDICAL RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

**Maria Pia Abbraccio**

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, MILANO

**Luciano Adorini**

Chief Scientific Officer - Intercept Pharmaceuticals, MILANO

**Clara Ballerini**

NEUROFARBA Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Università degli Studi di Firenze, FIRENZE

**Luca Battistini**

IRCCS Santa Lucia, Unità di Neuroimmunologia, European Centre for Brain Research, ROMA

**Antonio Bertolotto**

AOU S. Luigi Gonzaga, Centro di riferimento Regionale Sclerosi Multipla (CReSM), Orbassano (TO)

**Roberta Brambilla**

University of Miami, The Miami Project To Cure Paralysis, Miller School of Medicine, MIAMI, US

**Sandra D'Alfonso**

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi del Piemonte Orientale, NOVARA

**Raj Kapoor**

University College London Hospitals NHS, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, LONDON, UK

**Letizia Leocani**

Unità di Neurofisiologia Sperimentale e MAGICCS Center, INSPE, Ospedale San Raffaele, MILANO

**Catherine Lubetzki**

Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département des Maladies du Système Nerveux, PARIS, France

**Giuseppe Matarese**

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", NAPOLI

**Miriam Mattoscio**

Imperial College London, LONDON, UK

**Marco Salvetti**

Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS), Neurologia e Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso NESMOS, 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, US

**SOCIAL & BEHAVIOURAL SCIENCE  
RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE****Giovanni Abbruzzese**

DINOGLMI, Università degli Studi di Genova, GENOVA

**Maria Pia Amato**

NEUROFARBA Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino,  
Università degli Studi di Firenze, FIRENZE

**Roberto Bergamaschi**

Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino, IRCCS, PAVIA

**Marco Bove**

Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Università degli Studi di Genova, GENOVA

**Jürg Kesselring**

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

**Maria Assunta Rocca**

Fondazione San Raffaele, MILANO

**Alessandra Solari**

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

**AISM, Associazione Italiana Sclerosi Multipla**, è l'unica organizzazione in Italia che si occupa in modo strutturato e organico di tutti gli aspetti legati alla sclerosi multipla (SM), attraverso una prospettiva d'insieme che abbraccia il tema dei diritti delle persone con SM, i servizi sanitari e socio-sanitari, la promozione, l'indirizzo e il finanziamento della ricerca scientifica.

Per la ricerca, per individuare terapie e trattamenti efficaci a rallentare il decorso della malattia e per trovare, domani, una cura risolutiva, mettiamo in campo tutte le risorse, grazie anche, dal 1998, al lavoro della **Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM)**.

**In questi ultimi 20 anni lo scenario di chi affronta ogni giorno la SM è molto cambiato**, grazie all'impatto positivo di farmaci e interventi terapeutici. A determinare questo risultato ha concorso la nostra capacità di indirizzare la ricerca scientifica verso l'eccellenza e l'innovazione, a livello nazionale e internazionale.

**AISM (Italian Multiple Sclerosis Society)** is the national charity in Italy on Multiple Sclerosis (MS) whose vision is a *world free from MS*. It was founded in 1968 by a group of people with MS and their families, neurologists, social workers and volunteers. AISM mission is to act globally to promote, drive and finance scientific research on MS; to promote and provide national and local services for people with MS; to represent and defend rights of people with MS.

AISM, through its Foundation, **FISM (Italian Multiple Sclerosis Foundation)**, is the leading funding agency of research in MS field in Italy to better understand the causes of the illness, to improve the quality of life of people with MS, to provide better treatment towards a definitive cure for a MS. The research portfolio includes intramural research (performed in rehabilitation and public health) and extramural research (performed in neurobiology, genetic, neuroimmunology, neuroimaging, biomarkers, experimental models and new therapies) through an annual call for proposals conducted by to universities, public and not-for-profit research institutes in Italy and Italian top researchers.



**Numero Verde 800 803 028**

**[www.aism.it](http://www.aism.it)**