

COMPENDIO 2019



LA RICERCA SULLA SCLEROSI MULTIPLA

Finanziata dalla **Fondazione Italiana Sclerosi Multipla**

RESEARCH ON MULTIPLE SCLEROSIS

Funded by the Italian Multiple Sclerosis Foundation

**SCLE
ROSI
MULT
IPLA**
associazione
italiana

un mondo
libero dalla SM

AISM. INSIEME, UNA CONQUISTA DOPO L'ALTRA

2019

LA RICERCA SULLA SCLEROSI MULTIPLA

Finanziata dalla
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

RESEARCH ON MULTIPLE SCLEROSIS
Funded by the Italian Multiple Sclerosis Foundation

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

Per la traduzione dell'introduzione si ringrazia

Michele Messmer Uccelli

Copyright FISM 2019

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 2019

da Ditta Lang srl - Genova

978-88-7148-140-1

Introduzione

Vogliamo “dare visibilità” alla sclerosi multipla, anche nei suoi aspetti più nascosti, perché vogliamo che le persone con SM vedano un futuro di libertà dalla malattia.

Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo definito l'Agenda della SM 2020, abbiamo raggiunto risultati importanti, dobbiamo promuovere una Ricerca e Innovazione Responsabile (RRI) che spinga a rivedere il concetto di “scienza” verso un approccio di ricerca che integri la dimensione di efficacia (missione) con quella di eccellenza, di efficienza e sociale.

Nel 2015 l'Agenda della Sclerosi Multipla 2020 ha recepito le priorità dell'Agenda Globale della ricerca e identificato le attività strategiche per declinarle nel contesto nazionale in modo da promuovere l'impatto collettivo della ricerca sulla persona.

Le iniziative di ricerca multistakeholder, quali la Progressive MS Alliance, il Progetto Registro Italiano di Sclerosi Multipla e il Network Italiano di Neuroimaging (INNI), che ci ha visti protagonisti sin dall'inizio sono figli di questo intenso desiderio di dare sostanza a un'eccellenza scientifica che si misuri con le sfide non ancora affrontate e vinte e costruisca percorsi sempre più collaborativi, vero nodo di svolta per andare avanti in una storia di successo.

Lo sguardo complessivo sul percorso che abbiamo costruito insieme, anche quando non c'erano strade tracciate, rileva la “visionarietà” dei progetti speciali sulle staminali, che oggi stanno dimostrando la sicurezza sull'uomo; dei progetti di ricerca di base come quelli su GPR17 e sulla genetica, che oggi stanno individuando innovativi percorsi terapeutici anche per le forme progressive di sclerosi multipla. Anche in questo modo, con brevetti che “capitalizzano” l'investimento fatto negli anni sulla ricerca di base, rendiamo visibile l'efficienza della ricerca che abbiamo promosso e costruiamo conoscenza da condividere.

I progetti FISM conclusi nel 2018 su patogenesi e fattori di rischio hanno prodotto 32 pubblicazioni con un impact factor notevole di 9,2. Vuol dire, certamente, che il mondo riconosce che questa nostra ricerca di base, che riceve l'investimento più corposo del Bando annuale, sta individuando meccanismi patogenetici di assoluto rilievo. Ma anche i 5 progetti sulla diagnosi e monitoraggio hanno generato 5 pubblicazioni con IF medio di 5,6. 14 sono poi le pubblicazioni dei progetti che cercano nuove vie di trattamento, con IF di 4,9. Importanti anche le 14 pubblicazioni dei progetti su neuroriabilitazione e qualità della vita, con IF medio di 3,4: sono i progetti che già oggi impattano sulla qualità della vita delle persone.

L'Impact Factor medio di 6 delle 66 pubblicazioni ottenute dai 36 progetti presentati in questo Compendio migliora le già eccellenti performance di nostri studi negli scorsi anni (5,6 nel 2017; 5,2 nel 2016).

Tutto questo testimonia la continua eccellenza e il grande potenziale di trasferimento di conoscenza della ricerca promossa da FISM.

Un risultato che conferma come i 74 milioni investiti da FISM dal 2008 e i 422 ricercatori finanziati dal 1989 stiano scrivendo una storia di eccellenza che ha pochi eguali, crediamo, nel mondo.

Ma non ci accontentiamo neppure di questa consapevolezza. Noi vogliamo una ricerca che veda ciò che ancora è invisibile, una ricerca che veda oltre l'eccellenza.

Per questo, con il progetto MULTI-ACT, di cui FISM è il coordinatore, finanziato dalla Commissione Europea come progetto di Responsible Research and Innovation (RRI), stiamo costruendo una nuova frontiera della “ricerca responsabile”.

Una ricerca per la ricerca di un nuovo modello di governance e impatto della ricerca sulla persona e sulla società.

La nostra ricerca fa da apripista anche su questa lunga strada che stiamo costruendo insieme alle stesse persone con SM. Non è possibile misurare l'impatto della ricerca senza garantire un coinvolgimento attivo della persona con SM. Un nuovo concetto: scienza con la persona e della persona.

Mario Alberto Battaglia
Presidente FISM

Paola Zarin
Direttore Ricerca Scientifica FISM

Introduction

Believing in a future free of MS requires that the disease be revealed, in all of its hidden facets.

With the definition of the 2020 MS Agenda, we have reached important goals, but now the key to revealing MS is through Responsible Research and Innovation (RRI). This concept requires a new approach to “science”, based on a clear mission integrating efficacy, excellence and efficiency, at the same time responding to the call for social responsibility.

In 2015 the 2020 MS Agenda acknowledged global research priorities as the basis for strategic actions to be carried out within a national context. The momentum behind the 2020 Agenda stems from the need to maximize the direct impact of scientific research on people living with MS.

Multistakeholder research initiatives, including the Progressive MS Alliance, the Italian MS Registry and the Italian Neuroimaging Network, for which we are having a leading role, result from a strong desire for excellence in research, measured by challenges faced and accomplishments achieved, and are built on collaborations that are the very foundation of scientific success.

Pioneering projects, including stem cell research, today proven to be safe in humans, GPR17 and gene research, both leading to innovative therapeutic solutions, including potential treatment for progressive forms of MS, mark the hallmarks of a visionary plan. Patents that capitalize on an early investment in basic research have demonstrated efficiency in the research we promote, as well as providing a means for sharing know-how.

FISM-funded research projects on pathogens and risk factors concluded in 2018, have resulted in 32 publications with a mean impact factor of 9.2. This is a testament to the fact that the scientific world recognizes that basic research being produced by Italian scientists, a substantial annual funding priority for FISM, is contributing to important knowledge of pathogenic mechanisms in MS.

The 66 publications resulting from 36 projects presented in this year’s edition of the Compendium demonstrate a steady increase in the mean impact factor over the years, reaching 6. in 2018 (compared to 5.64 in 2017 and 5.2 in 2016), a further, important testament to excellence.

FISM has demonstrated a commitment to scientific research in MS by dedicating 74 million euro since 2008 and supporting 422 scientists since 1989, results that have contributed to forging the story of excellence in science. We do not intend to rest on our laurels and the commitment continues.

One important example of pursuing the commitment towards making a contribution to new frontiers in research is the MULTI-ACT project, coordinated by FISM and financed by the European Commission as a project in Responsible Research and Innovation (RRI).

Measuring the success of research is only possible through the direct involvement of people who live with the disease every day. Our commitment to achieving success in MS research is a goal we share with each person whom we represent.

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

Aloisi Francesca	70	Gironi Maira	125
Amato Maria Pia	16, 148, 170	Imberti Luisa	87
Barnaba Vincenzo	90	Inglese Matilde	29, 161
Bassi Marta	22	Lorefice Lorena	142
Bergamaschi Roberto	163	Marfia Girolama Alessandra	54
Bonzano Laura	44	Muraro Paolo	73
Borghi Martina	19	Pagani Elisabetta	57
Boscia Francesca	110	Paolicelli Damiano	150
Capotondo Alessia	128	Patti Francesco	156, 159
Ceruti Stefania	103	Perga Simona	93
Chaabane Linda	51	Rivellini Cristina	122
Chiarugi Alberto	116	Rizzo Roberta	79
Cocco Eleonora	66	Rocca Maria Assunta	47
D'Alfonso Sandra	62	Rolla Simona	76
D'Amico Emanuele	158	Romeo Marzia	168
D'Andrea Luca	119	Sandrini Giorgio	32
de Candia Paola	97	Solari Alessandra	12
Dolei Antonina	83	Solaro Claudio	26
Eberini Ivano	113	Solito Egle	131
Fenu Giuseppe	144	Tecchio Franca	35
Filippi Massimo	136	Trojano Maria	152, 154, 165, 166
Filippini Graziella	40	Valtorta Flavia	106
Frau Jessica	146	Verderio Claudia	100

INTRODUZIONE / INTRODUCTION

Mario A. Battaglia Paola Zarin	3
---	----------

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

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Alessandra Solari	12
--------------------------	-----------

Affrontare la transizione (ManTra) -una risorsa per le persone con SM secondariamente progressiva.

Fase 1: costruzione della risorsa

Managing the transition (ManTra) - A resource for persons with secondary progressive MS.

Phase 1: Construction of the resource

Maria Pia Amato	16
------------------------	-----------

Ruolo della riserva cognitiva nella SM ad esordio pediatrico e impatto della malattia sull'inserimento sociale e lavorativo nell'età adulta

The role of cognitive reserve in pediatric onset MS and the impact of disease on social and professional performance in adulthood

Martina Borghi	19
-----------------------	-----------

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

Marta Bassi	22
--------------------	-----------

Il sistema della cura: commisurare la promozione del benessere alle esigenze di persone con SM caregiver ed operatori sanitari

The care system: Tailoring well-being promotion to the needs of people with MS, caregivers and health professionals

Claudio Solaro	26
-----------------------	-----------

La funzione dell'arto superiore in SM: creazione di un data-set per ottenere dati normativi di misure soggettive e oggettive e sviluppo di uno strumento di valutazione SM specifico

Upper limb function in MS: creation of a normative data set on subjective and objective measures and the construction of an MS-specific assessment tool

Matilde Inglese	29
------------------------	-----------

Correlati cerebrali strutturali e funzionali di riabilitazione dell'arto superiore in pazienti con SM progressiva

Structural and functional brain MRI correlates of upper limb neurorehabilitation in patients with progressive MS

Giorgio Sandrini	32
-------------------------	-----------

Effetti della stimolazione cerebellare transcranica a correnti dirette su "reinforced feedback in virtual environment (RFVE)" in pazienti affetti da SM con atassia degli arti superiori

Effects of cerebellar transcranial direct current stimulation (tc-DCS) on reinforced feedback in virtual environment (RFVE) in MS patients with upper limb ataxia

Franca Tecchio	35
-----------------------	-----------

Alleviare la fatica nella SM mediante l'applicazione domiciliare di un trattamento personalizzato di neuromodulazione

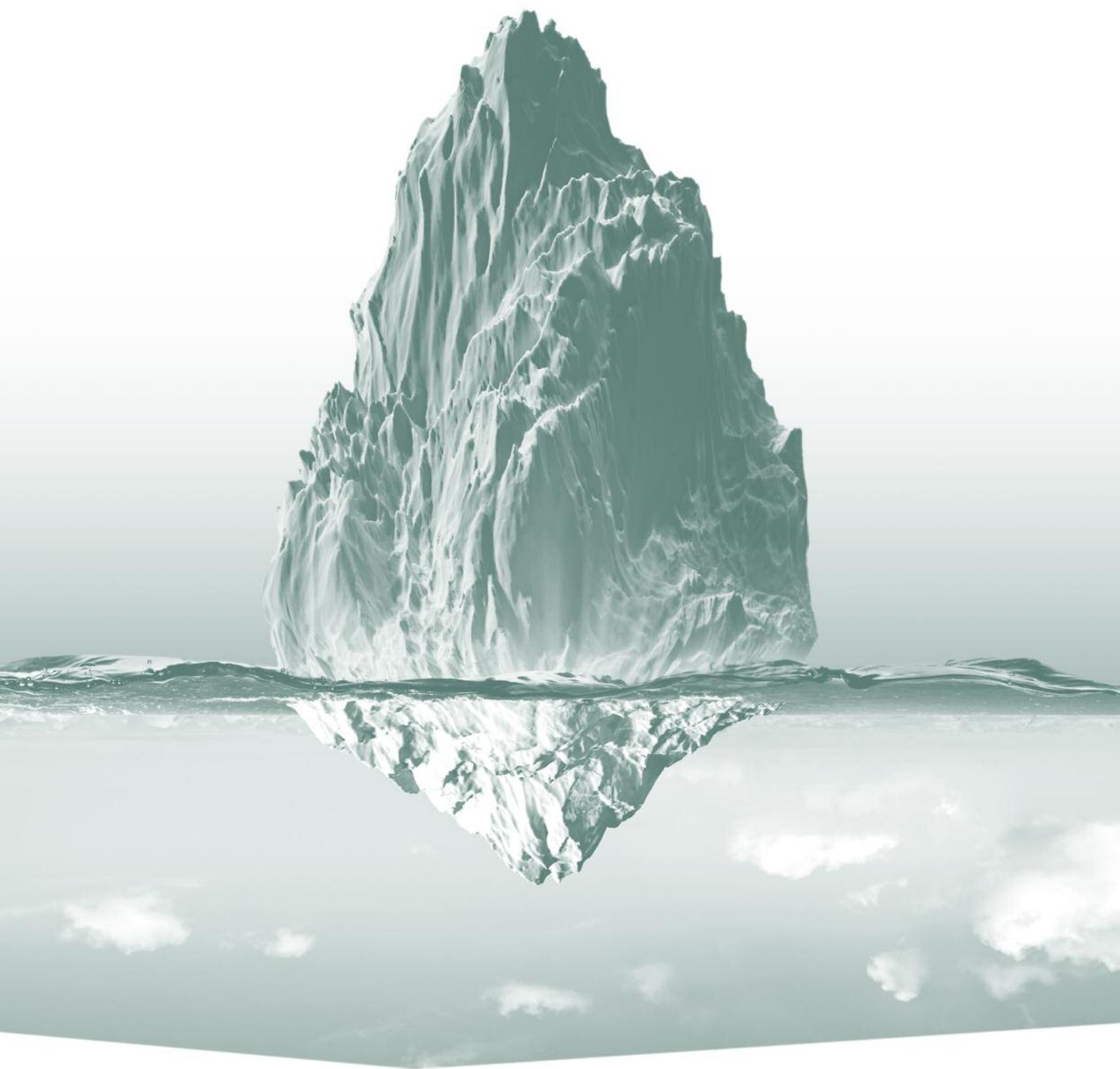
Fatigue Relief in MS by a Customized Neuromodulation treatment at Home [FaReMuS CuNe-H]

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

- Graziella Filippini** 40
IN-DEEP - Integrare le esperienze e le preferenze delle persone con SM con i risultati della ricerca per sviluppare informazioni utili per decisioni informate e condivise: i test diagnostici
IN-DEEP-Integrating and deriving evidence, experiences, preferences. Developing research-based health information applicable to decision making and self-management by people with MS: diagnostic tests
- Laura Bonzano** 44
Caratteristiche temporali e spaziali del trasferimento interemisferico di informazioni nella SM: un approccio multimodale di coregistrazione TMS-EEG, MRI e apprendimento motorio
Temporal and spatial features of interhemispheric information transfer in MS: a multimodal approach of TMS-EEG coregistration, MRI and motor learning
- Maria Assunta Rocca** 47
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
- Linda Chaabane** 51
Fluoro (19F) MRI: 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
- Girolama Alessandra Marfia** 54
Motor Unit Number Estimation (MUNE): nuova potenziale misura elettrofisiologica di neurodegenerazione infiammatoria della sostanza grigia spinale nella SM
Exploring Motor Unit Number Estimation (MUNE) as a novel measure of MS-associated inflammatory neurodegeneration in spinal cord grey matter
- Elisabetta Pagani** 57
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
- ## PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / PATHOGENESIS AND RISK FACTORS
- Sandra D'Alfonso** 62
Studio genomico e funzionale del ruolo del "pathway" di TNFSF14-TNFRSF14 nella suscettibilità alla SM
Genomic and functional evaluation of the role of the TNFSF14-TNFRSF14 pathway in susceptibility to MS
- Eleonora Cocco** 66
Geoepidemiologia della SM: i fattori ambientali
Geoepidemiology of MS: the environmental factors
- Francesca Aloisi** 70
Studio dell'espressione di geni del virus di Epstein Barr e geni cellulari in pazienti con CIS, SM recidivante remittente e SM primariamente progressiva: ricerca di biomarcatori diagnostici e prognostici
Combined analysis of EBV and cellular gene expression in clinically isolated syndrome, relapsing-remitting and primary progressive MS: search of diagnostic and prognostic biomarkers
- Paolo Muraro** 73
Risposte T cellulari citotossiche dirette contro il virus di Epstein-Barr e crossreattive con proteine della mielina in persone con la SM
Unregulated cytotoxic T cell responses to Epstein-Barr virus crossreacting to myelin proteins in people with MS
- Simona Rolla** 76
Il microbiota intestinale e la diversità metagenomica nello sviluppo della SM
Gut microbiota and metagenomic diversity in the development of MS

Roberta Rizzo	79
Attivazione e differenziamento delle cellule Natural killer in risposta alle infezioni da Herpesvirus nella SM Natural killer cell activation and differentiation in response to Herpesvirus infection in MS	
Antonina Dolei	83
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	
Luisa Imberti	87
Identificazione di clonotipi delle cellule T in corso di leucoencefalopatia multifocale progressiva in pazienti con SM: ruolo nello sviluppo della malattia Identification of progressive multifocal leukoencephalopathy-related T-cell clonotypes in natalizumab-treated MS patients: role in the disease development	
Vincenzo Barnaba	90
Ruolo delle risposte di cellule T CD8+ a epitopi associati a cellule T apoptotiche nella SM e nella encefalomielite sperimentale autoimmune Role of CD8+ T cell responses to apoptotic T cell-associated epitopes in MS and in experimental autoimmune encephalomyelitis	
Simona Perga	93
Il ruolo della deubiquitinasi A20/TNFAIP3 nell'immunopatologia della SM The deubiquitinase A20/TNFAIP3 in the immunopathology of MS	
Paola de Candia	97
Analisi del ruolo del miR-146a-5p extra-cellulare nella perdita di tolleranza immunologica nella SM Unveiling the role of extracellular vesicle-associated miR-146a-5p in the loss of immune tolerance during MS	
Claudia Verderio	100
Coinvolgimento delle vescicole extracellulari rilasciate da cellule microgliali nelle disfunzioni sinaptiche nella SM On the role of extracellular vesicles derived from inflammatory microglia in synaptic dysfunction in MS	
Stefania Ceruti	103
Studi sui meccanismi molecolari e cellulari alla base della neuropatia trigeminale e della maggiore suscettibilità all'emicrania nella SM Insights into the molecular and cellular mechanisms at the basis of MS-related trigeminal neuropathy and increased susceptibility to migraine pain	
Flavia Valtorta	106
Meccanismi omeostatici presinaptici nel corso di trattamento cronico di neuroni con citochine proinfiammatorie ed in corso di encefalite allergica sperimentale Preynaptic homeostatic mechanisms upon chronic treatments of neurons with inflammatory cytokines and in the course of EAE	
VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS	
Francesca Boscia	110
Studio del ruolo dell'isoforma dello scambiatore Na ⁺ /Ca ⁺² NCX3 nella rimielinizzazione del sistema nervoso centrale Role of the Na ⁺ /Ca ⁺² exchanger NCX3 in central nervous system remyelination	
Ivano Eberini	113
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	

Alberto Chiarugi	116
Caratterizzazione delle disfunzioni mitocondriali in modelli di SM progressiva ed effetto di farmaci potenzianti le funzioni mitocondriali Mitochondrial impairment in models of progressive MS and effects of mitochondria-boosting drugs	
Luca D'Andrea	119
Nuove molecole sintetiche che inducono la sopravvivenza degli oligodendrociti attivando i recettori Axl Novel synthetic molecules promoting oligodendrocytes survival in MS lesions by activation of Axl receptors	
Cristina Rivellini	122
Ruolo di Jab1 nella patogenesi della SM progressiva Role of Jab1 in the pathogenesis of progressive SM	
Maira Gironi	125
Anticorpi anti Fosfolipidi Ossidati: una potenziale risorsa naturale protettiva per la SM Anti oxidized-phospholipids Antibodies as inhibitors of neuroinflammation: exploiting a natural immune protective tool to fight MS	
Alessia Capotondo	128
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	
Egle Solito	131
Ruolo della annessina A1 nella SM: identificazione di un fattore endogeno che controlla la migrazione di cellule T attraverso la barriera ematoencefalica e la tolleranza immunologica Unveiling the role of annexin A1 in MS: identification of an endogenous factor decoding T cell breach of the blood brain barrier and immune tolerance	
NETWORK ITALIANO DI NEUROIMAGING (INNI) / THE ITALIAN NEUROIMAGING NETWORK INITIATIVE (INNI)	135
REGISTRO ITALIANO SCLEROSI MULTIPLA / ITALIAN MULTIPLE SCLEROSIS REGISTER	139
PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM / FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2018, 2017	173-180
COMITATO SCIENTIFICO FISM / FISM SCIENTIFIC COMMITTEE 2018, 2017	187



NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA

NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Alessandra Solari

Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Ambra Mara Giovannetti, Andrea Giordano, Andrea Fittipaldo, Giusi Ferrari, Arianna Fornari

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Claudia Borreani, Sara Alfieri, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale per la Cura dei Tumori, Milano

Lara Gitto, CEIS Economic Evaluation and HTA, Università degli Studi di Roma 'Tor Vergata', Roma

Paolo Confaloneri, Valentina Torri Clerici, Multiple Sclerosis Unit, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

Giovanna De Luca, Erika Pietrolongo, Deborah Farina, Marco Onofrij, Dipartimento di Neuroscienze e Imaging e Scienze Cliniche, Università degli Studi G. D'Annunzio Chieti-Pescara, Chieti

Christoph Heesen, Anna Barabasch, Sascha Kopke, Insa Schiffmann, Anne Christin Rahn, Institute of Neuroimmunology and Multiple Sclerosis, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Francesco Patti, Sezione Neuroscienze, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche e Tecnologie Avanzate "G.F. Ingrassia", Università degli Studi di Catania; Centro Sclerosi Multipla, PO Policlinico "G. Rodolico", Catania

Carla Tortorella, Maria Esmeralda Quartuccio, Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale San Camillo Forlanini, Roma

Maria Trojano, Pietro Jaffaldano, Alessia Manni, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Senso, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari

Michele Messmer Uccelli, Associazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova

Affrontare la transizione (ManTra) - una risorsa per le persone con sclerosi multipla secondariamente progressiva. Fase 1: costruzione della risorsa

PREMESSE E OBIETTIVI

A 15 anni dall'esordio clinico, circa metà dei pazienti con sclerosi multipla remittente (SMRR) evolvono in una forma secondariamente progressiva (SMSP). La conversione a SMSP è considerata un importante indicatore della prognosi a lungo termine della malattia. Tuttavia ad oggi non vi sono criteri radiologici né marcatori biologici in grado di distinguere SMRR e

SMSP, la cui diagnosi rimane retrospettiva, dopo un periodo di incertezza diagnostica che può protrarsi per anni.

ManTra è un progetto a metodologia mista di co-produzione della ricerca (attraverso il coinvolgimento degli attori chiave) per sviluppare e valutare l'efficacia di un intervento (risorsa) per le persone con una nuova diagnosi di SMSP.

RISULTATI

La fase di sviluppo (Fase 1) è consistita in quattro azioni. Le prime due azioni hanno permesso di identificare i bisogni e le esperienze dei pazienti che sono evoluti in una forma SMSP attraverso revisione sistematica della letteratura (quattro studi identificati da 1935 scrinati) e ricerca qualitativa condotta in Italia e Germania (29 colloqui semi-strutturati con pazienti con SMSP, cinque *focus group* - due con familiari, uno con neurologi, e due con altri professionisti sanitari). La terza azione è stata un'indagine *online* rivolta ai pazienti, per valutare le caratteristiche associate alla loro consapevolezza rispetto alla transizione a SMSP, l'esperienza della transizione, e l'importanza e prioritizzazione di 33 bisogni identificati nelle azioni precedenti.

Dei 215 partecipanti, quelli consapevoli di avere SMSP erano il 57% in Italia vs. il 77% in Germania ($p=0.004$). Di questi, oltre l'80% aveva ricevuto la diagnosi di SMSP dal neurologo, e si considerava da soddisfatto a molto soddisfatto di come la comunicazione era avvenuta. Tuttavia, il 28%–35% dei partecipanti aveva avuto ulteriori visite a parere, ed il 48%–56% riferiva di non aver ricevuto informazioni sulla SMSP. La percentuale di chi avevano ricercato attivamente informazioni era del 63% in Germania vs. 31% in Italia ($p < 0.001$). Le caratteristiche indipendentemente associate all'essere consapevole erano l'area geografica (*odds ratio*, OR 0.32, 95% CI 0.13–0.78 per Centro Italia; OR 0.21, 95% CI 0.08–0.58 per Sud Italia [vs. Germania]) e le limitazioni nell'autonomia personale (OR 7.80, 95% CI 1.47–41.37 per i pazienti dipendenti vs. quelli autonomi). I dati della *survey* sono risultati completi ed accurati; il 39% dei partecipanti ha fornito commenti sulla stessa, positivi nel 92% dei casi. Tutte i bisogni pre-specificati sono stati valutati da molto a estremamente importanti. Dei bisogni prioritizzati, due ('fisioterapia' e 'coinvolgimento attivo del paziente') erano condivisi dai pazienti italiani e tedeschi. Gli altri due differivano nei due Paesi, essendo: 'piano di cura individualizzato' e 'informazioni su diritti e politiche sociali' in Italia e 'supporto psicologico' e 'riabilitazione cognitiva' in Germania.

Nella quarta ed ultima azione, sono state delineate sei risorse, ciascuna rispondente ad uno dei bisogni prioritizzati. Il consenso sulla risorsa più appropriata è stato ottenuto mediante la tecnica della *nominal group*, in un incontro dedicato tenutosi a Milano per l'Italia e ad Amburgo per la Germania. I partecipanti erano pazienti con SMSP, familiari, professionisti sanitari, e ricercatori/rappresentanti delle organizzazioni di pazienti. I due incontri sono stati molto partecipati ed informativi. 'Un piano di cura personalizzato per le persone con SMSP' è risultata la risorsa prescelta in Italia, per la quale è stato proposto un arricchimento con contenuti relativi al coinvolgimento attivo del paziente, l'inclusione di ulteriori professionisti nel piano di cura, una maggiore caratterizzazione del ruolo dell'infermiere, una integrazione ospedale-territorio ed il monitoraggio granulare di ciascuna fase del programma. In Germania la risorsa prescelta è stata 'supporto psicologico per il paziente', da integrare per la parte di formazione degli psicologi (mirata al riconoscimento dei reali bisogni del paziente), l'inserimento di una componente di riabilitazione metacognitiva e/o fisioterapia, ed un chiaro focus su *empowerment* e autonomia del paziente.

CONCLUSIONI

È stato conseguito l'obiettivo primario dello studio, consistente nella messa a punto di una risorsa sviluppata dai suoi stessi destinatari ed attori, atta a promuovere le competenze e la qualità della vita dei pazienti che evolvono ad una forma SMSP. L'efficacia della risorsa sarà valutata nella prossima fase del progetto ManTra. Abbiamo inoltre condotto la prima indagine online sulle esperienze delle persone con diagnosi recente di SMSP, dalla quale è emerso come oltre il 40% non sia consapevole della avvenuta transizione a SMSP. Questo dato depone per la necessità di migliorare la comunicazione tra paziente e professionista sanitario e lo scambio informativo sin dal periodo di incertezza diagnostica. L'estensione ad un centro tedesco, non pianificata nel progetto iniziale, ha permesso di aumentare la validità esterna dei risultati ottenuti.

Managing the transition (ManTra) - a resource for persons with secondary progressive MS.

Phase 1: Construction of the resource

INTRODUCTION AND AIMS

About 15 years after clinical onset, around half of the patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) have developed secondary progressive disease (SPMS). Conversion to SPMS is considered a key determinant of long-term disease prognosis. However, neither imaging criteria nor biomarkers are available to objectively distinguish RRMS from SPMS, which is diagnosed retrospectively; and the period of diagnostic uncertainty may last for several years. ManTra is a mixed-method, co-production research project for developing and testing the efficacy of an intervention (resource) for newly-diagnosed SPMS patients.

RESULTS

The development phase (Phase 1) consisted of four research actions. In the first two actions, we identified the needs and experiences of patients converting to SPMS via literature review (four studies identified from 1935 screened) and qualitative research conducted in Italy and Germany (29 personal semistructured interviews with SPMS patients; five focus group meetings - two of informal carers, one of neurologists, and two of other health professionals, HPs). In action 3, an online patient survey assessed the characteristics associated to patient awareness of SPMS conversion, the experience of conversion, and importance and prioritization of the 33 needs identified in the previous actions. Of 215 participants, those aware of their SPMS diagnosis were 57% in Italy vs. 77% in Germany ($p=0.004$). Over 80% of aware participants received a SPMS diagnosis from the neurologist, and satisfaction with SPMS disclosure was moderate to high. Nevertheless, 28%–35% obtained second opinions, and 48%–56% reported they did not receive any information on SPMS. Participants actively seeking further information were 63% in Germany vs. 31% in Italy ($p<0.001$). Variables independently associated to patient awareness were geographic area (odds ratio, OR 0.32, 95% CI 0.13–0.78 for Central Italy; OR 0.21, 95% CI 0.08–0.58 for Southern Italy [vs. Germany]) and activity limitations (OR 7.80, 95% CI 1.47–41.37 for dependent vs. autonomous patients). Completeness and quality of the data were satisfac-

tory. Overall, 39% of the participants provided comments (64/141 in Italy, 19/74 in Germany) which were positive in 92%. All the pre-specified needs were scored a lot or extremely important, and two prioritized needs were shared by Italian and German patients: 'physiotherapy' and 'active patient care involvement'. The other two differed across countries: 'individualized health care plan' and 'information on social rights and policies' in Italy, and 'psychological support' and 'cognitive rehabilitation' in Germany.

In action 4, six resources were outlined, each meeting the needs prioritized by SPMS patients. Consensus on the most suitable resource was achieved via nominal group technique meetings held in Milan and Hamburg. Participants were SPMS patients, informal carers, HPs, and researchers/patient organization representatives. Both meetings were well participated and discussion-rich. In Italy the consensus resource was 'personalized care plan'. Refinements included enrichment with the patient engagement component, inclusion of additional HPs and improved definition of the MS nurse role in the interdisciplinary panel, community care integration, and careful monitoring of each timeline phase. In Germany the consensus resource was 'patient psychological support'. Refinements were psychologist training (to recognize patient's real needs), supplementation with metacognitive training and/or physiotherapy, and a focus on patient empowerment and autonomy.

CONCLUSIONS

We achieved our primary aim, i.e. the devise of a user-led resource for empowering and improving the quality of life of newly diagnosed people with SPMS (to be tested for efficacy in the next phase of the ManTra project). We also conducted the first survey assessing the experience of people recently diagnosed with SPMS. It revealed that over 40% of recently diagnosed SPMS patients were not aware of their disease form, pointing to the need of an improved patient-physician communication and information exchange, also during the period of diagnostic uncertainty. Inclusion of the German data (not planned in the original submission) increased the external validity of the findings.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Giovannetti AM, Giordano A, Pietrolongo E, Confalonieri P, De Luca G, Tortorella C, Trojano M, Messmer Uccelli M, Torri Clerici V, Gitto L, Köpke S, Borreani C, Heesen C, Solari A; ManTra project. Managing the transition (ManTra) – A resource for persons with secondary progressive multiple sclerosis and their health professionals: protocol for a mixed methods study in Italy. *BMJ Open* 2017;7(8):e017254. doi: 10.1136/bmjopen-2017-017254

Giordano A, Giovannetti AM, Pietrolongo E, Confalonieri P, Trojano M, Tortorella C, Messmer Uccelli M, De Luca G, Gitto L, Torri Clerici V, Köpke S, Borreani C, Heesen C, Solari A. Unmet needs of patients transitioning to secondary progressive multiple sclerosis: Qualitative findings for a resource development. *Cochrane Colloquium Abstracts 2018, Edinburgh*

Giovannetti AM, Pietrolongo E, Giordano A, Confalonieri P, Trojano M, Tortorella C, Messmer Uccelli M, Gitto L, Torri Clerici V, Köpke S, Borreani C, Heesen C, Solari A, ManTra project. Unmet needs of patients transitioning to secondary progressive multiple sclerosis: qualitative findings for a resource development. *Mult Scler* 2018; 24 (2) Suppl. (Abstract): P1335

Giovannetti AM, Giordano A, E Pietrolongo, Confalonieri P, De Luca G, Tortorella C, Trojano M, Messmer Uccelli M, Torri Clerici V, Gitto L, Köpke S, Borreani C, Heesen C, Solari A, on behalf of the ManTra project. Unmet needs of patients transitioning to secondary progressive MS: Qualitative findings for a resource development. *Mult Scler* 2018; 24 (6) Suppl. (Abstract): 846

Giordano A, Köpke S, Confalonieri P, De Luca G, Pietrolongo E, Trojano M, Tortorella C, Borreani B, Messmer Uccelli M, Torri Clerici V, Gitto L, Giovannetti AM, Heesen C, Solari A, ManTra Project. Managing the transition to secondary progressive multiple sclerosis: a scoping review. *Mult Scler* 2017; 23 (3) Suppl. (Abstract): EP1813

Giordano A, Köpke S, Confalonieri P, Onofri M, Pietrolongo E, Trojano M, Tortorella C, Borreani C, Messmer Uccelli M, Gitto L, Giovannetti AM, Solari A. Managing the transition to secondary progressive multiple sclerosis: a scoping review. *Mult Scler* 2017; 23(6) Suppl. (Abstract): 912

**Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni (prorogato di 9 mesi)
e l'ammontare di 77.227,50 €**

**Research project funded by FISM Grant FISM for the period of 2 years (extended by 9 months)
and the amount of € 77,227.50**

Maria Pia Amato

SOD Riabilitazione Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Firenze

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Luisa Pastò, Lorenzo Razzolini, Benedetta Goretti, Claudia Niccolai

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Angelo Ghezzi e Mauro Zaffaroni, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale di Gallarate, Varese

Maria Trojano, Dipartimento di Scienze mediche di base, neuroscienze e organi di senso, Università degli studi Bari, Bari

Maria Giovanna Marrosu, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale Binaghi, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università di Cagliari, Cagliari

Francesco Patti, Centro Sclerosi Multipla, Clinica Neurologica Ospedale Università Policlinico Vittorio Emanuele, Catania

Ruolo della riserva cognitiva nella sclerosi multipla ad esordio pediatrico e impatto della malattia sull'inserimento sociale e lavorativo nell'età adulta

PREMESSE E OBIETTIVI

La "teoria della riserva cognitiva (RC)", proposta per varie malattie, come la malattia di Alzheimer, ipotizza che soggetti con maggiore RC siano capaci di sostenere un più grave danno cerebrale prima che i deficit cognitivi compaiano. Nell'ambito della sclerosi multipla (SM) ad esordio adulto e pediatrico questa teoria sta ricevendo una crescente attenzione nella ricerca. Nonostante il deficit cognitivo (DC) sia riconosciuto nel 30 fino al 50% dei casi di SM pediatrica, ad oggi non esistono studi sul ruolo della RC nella SM pediatrica e della possibile interazione tra RC, performance cognitiva e inserimento sociale e professionale del soggetto nell'età adulta.

Gli obiettivi di questo progetto sono:

1. valutare i fattori prognostici che influenzano le attività socio-professionali nei pazienti adulti con esordio pediatrico di malattia
2. determinare l'impatto della RC nella SM ad esordio pediatrico, le possibili interazioni con la performance cognitiva e l'inserimento socioprofessionale in età adulta.

Le ipotesi sottostanti sono che l'esordio pediatrico della SM possa essere associato ad un effetto nega-

tivo sull'inserimento socioprofessionale del soggetto in età adulta, anche in funzione delle problematiche cognitive; inoltre, che la RC possa attenuare l'impatto del deficit cognitivo sulle attività socioprofessionali nell'età adulta.

Abbiamo incluso pazienti con diagnosi di SM, confermata prima dei 18 anni. Le funzioni neuropsicologiche sono state valutate su una batteria estensiva di test, la fatica e la depressione sono state auto-valutate dal soggetto, rispettivamente sulla Fatigue Severity Scale (FSS) e il Children Depressive Inventory (CDI). La RC è stata valutata misurando il quoziente intellettivo premorbo attraverso la versione Italiana del National Adult Reading Test, il "Test d'Intelligenza Breve" (TIB). Inoltre, lo stato socioeconomico (SES) dei genitori è stato stimato tramite la Barratt Simplified Measure of Social Status (BSMSS). L'inserimento socioprofessionale è stato valutato mediante la "Work and social adjustment scale" (WSAS). Quest'ultima è stata somministrata a un gruppo di adulti con SM ad esordio pediatrico e a un gruppo di confronto con SM ad esordio dopo i 18 anni. È stato infine effettuato anche un confronto con un gruppo di controlli in base ai dati ISTAT relativi alla popula-

zione Italiana. È stata effettuata un'analisi descrittiva dei dati, completata da un'analisi multivariata.

RISULTATI

115 POMS (con esordio SM pediatrico) e 111 AOMS (con esordio SM in età adulta) sono stati arruolati. I soggetti adulti con esordio pediatrico erano più giovani (32.0 +/- 9.3 vs 38.8 +/- 9.3) rispetto a quelli con esordio classico in età adulta. La proporzione di deficit cognitivo (DC) era più bassa nei soggetti POMS rispetto ai AOMS (36% vs 33%, $p = 0.64$). Non si evidenziavano differenze in termini di tasso di disoccupazione e complessità dell'attività lavorativa tra i gruppi ($p > 0.20$).

Nell'intero campione, l'analisi multivariata ha mostrato che la presenza di DC era associata a un'età maggiore (OR = 1,03 IC 95% 1,01-1,07, $p = 0,039$), EDSS più alta (OR = 1,42 IC 95% 1,15-1,76; $p = 0,001$) e più bassa CR (OR = 0,92 95% CI 0,89-0,96; $p < 0,001$).

Migliori risultati sociali e professionali sono stati associati a CR (Beta 0.98-1.35, $p < 0.01$), sesso maschile (Beta 7.79, $p = 0.005$) e EDSS più bassa (Beta 0.40, p

< 0.001).

Il tasso di disoccupazione (31,8%) è stato associato a un punteggio EDSS più alto (OR = 1,17 IC 95% 1,01-1,59, $p = 0,044$) e istruzione inferiore (OR = 0,81 95% CI 0,72-0,91, $p < 0,001$).

Una maggiore complessità del lavoro è stata associata a una istruzione superiore (B = 0.076, $p < 0.001$) e a un QI premorbo più alto (B = 0.020, $p < 0.040$).

CONCLUSIONI

Nel nostro campione, la performance cognitiva e l'inserimento lavorativo è risultato comparabile nei due gruppi. La RC risultava essere un fattore chiave, potenzialmente modificabile, protettivo per il deficit cognitivo e associato a un miglior inserimento socio-professionale del soggetto. Contemporaneamente, la RC tendeva ad essere più bassa nei soggetti POMS rispetto ai soggetti AOMS. I nostri risultati sottolineano l'importanza degli interventi precoci che si concentrano sul potenziamento dell'arricchimento intellettuale, in particolare nella popolazione pediatrica, al fine di migliorare le prestazioni cognitive, sociali e professionali nell'età adulta.

The role of cognitive reserve in pediatric onset multiple sclerosis and the impact of disease on social and professional performance in adulthood

INTRODUCTION AND AIMS

The "cognitive reserve (CR) theory", proposed for various conditions such as Alzheimer disease, posits that people with greater CR are able to withstand more severe brain disease before suffering cognitive impairment. In the setting of adult-onset and pediatric-onset Multiple Sclerosis (MS), the theory of CR is receiving growing attention in research. Cognitive impairment is appreciated in 30- 50% of subjects with paediatric-onset multiple sclerosis (POMS). However, to date, no study has focused on the interplay between CR, cognitive performance and socio-professional attainment in adult life in subjects with POMS. The objectives of this study are:

- 1) to assess prognostics factors related to socio-professional performances in adult patients with a pediatric onset of MS;
- 2) to evaluate the potential impact of CR in POMS on both cognitive status and socio-professional attainment in adulthood.

The underlying hypotheses were that, on the one

hand, POMS may be associated with poorer socio-professional achievements in adulthood also depending on cognitive issues. On the other hand, that in POMS higher CR may mitigate the impact of cognitive impairment on the socio-professional performances in adulthood. We included patients with an MS diagnosis before the age of 18 years. Neuropsychological functions were assessed on an extensive test battery; fatigue and depression were self-evaluated on the Fatigue Severity Scale (FSS) and the Children Depression Inventory (CDI). CR was estimated by measuring the premorbid Intelligent Quotient through the Italian version of the National Adult Reading Test, the "Test d'Intelligenza Breve" (TIB). We also measured the parental socioeconomic status (SES) using Barratt Simplified Measure of Social Status (BSMSS). Socio-professional performance in adulthood was assessed by "social functioning" referring to the 'Work and social adjustment scale' (WSAS). The WSAS was administered to a group of adult MS patients with pediatric onset and to a

matched group of MS patients with onset after 18 years. A comparison with a matched group of subjects from the general Italian population was also performed using ISTAT data.

A descriptive analysis was performed, completed by a multivariate analysis to specify the prognostic value of different covariates.

RESULTS

115 adult POMS and 111 adult-onset MS (AOMS) patients were enrolled. Adult subjects with a pediatric onset were younger (32.0 +/- 9.3 vs 38.8 +/- 9.3) compared with those with a classic, adult onset. Proportion of CI (cognitive impairment) was lower in adults with a pediatric onset than in AOMS subjects (36% vs 33%, $p=0.64$). There were no differences in terms of unemployment rate and work complexity between groups ($p>0.20$).

In the whole sample, the multivariable analysis showed that the presence of CI was associated with older age (OR=1.03 95%CI 1.01-1.07; $p=0.039$), higher EDSS (OR=1.42 95%CI 1.15-1.76; $p=0.001$) and lower CR (OR=0.92 95%CI 0.89-0.96; $p<0.001$). Better social and professional attainments were as-

sociated with CR (Beta 0.98-1.35, $p<0.01$), male sex (Beta 7.79, $p=0.005$) and lower EDSS (Beta 0.40, $p<0.001$).

Unemployment rate (31.8%) was associated with higher EDSS score (OR=1.27 95%CI 1.01-1.59, $p=0.044$) and lower education (OR=0.81 95%CI 0.72-0.91, $p<0.001$).

Higher work complexity was associated with higher education (B=0.076, $p<0.001$) and higher premorbid IQ (B=0.020, $p<0.040$).

CONCLUSIONS

In our sample, POMS was associated cognitive outcomes and occupational attainment comparable to those observed in AOMS subjects.

CR resulted to be a key, potentially modifiable, protective factor for the subject cognitive and socio-professional outcome. Concurrently, CR tended to be lower in POMS compared with AOMS subjects. Our findings underscore the importance of early interventions focusing on intellectual enrichment enhancement, particularly in the pediatric MS population, in order to improve cognitive, social and professional performances in adulthood.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Cognitive impairment and lower cognitive reserve increases the risk of unemployment in patients with pediatric onset multiple sclerosis. ECTRIMS 2016, 32th, 14-17 September 2016 London, United Kingdom

Cognitive reserve is associated with better cognitive outcome and socio-professional attainment in both adult and pediatric-onset multiple sclerosis. XLVIII Congresso Società Italiana di Neurologia Napoli, 14-17 Ottobre 2017

The role of cognitive reserve in pediatric onset multiple sclerosis and the impact of disease on social and professional performance in adulthood. ECTRIMS 2018; 34th, 10-12 October 2018

Cognitive reserve is associated with better employment status in both adult and pediatric-onset multiple sclerosis. IMSCOGS Day 2018 took place in Berlin, Germany, October 13, 2018

Cognitive reserve is associated with better employment status in both adult and pediatric-onset multiple sclerosis. XLIX Congresso Società Italiana di Neurologia Roma, 27-30 Ottobre 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo 2 anni (prorogato di 1 anno e 9 mesi) e l'ammontare di 250.000 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years (extended by 1 year and 9 months) and the amount of € 250,000

Martina Borghi

SCDO Neurologia - CReSM (Centro Regionale Sclerosi Multipla) AOU San Luigi
Gonzaga, Orbassano (Torino)

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Manuela Negro, Maria Luisa Perucchini, Arianna Signorino, Sara Carletto,
Serena Bailon, Antonio Bertolotto**

Impatto psicologico della sclerosi multipla negli adolescenti: sostegno alla cura e promozione del benessere nei pazienti e nei genitori

PREMESSE E OBIETTIVI

Recenti studi hanno rivelato che anche i bambini e gli adolescenti possono sviluppare la sclerosi multipla (SM). Questa malattia cronica determina uno stress significativo associato al rischio di problemi emotivi e comportamentali e interferisce con l'aderenza al trattamento.

La salute fisica e altri domini di vita (famiglia, scuola, amicizie, tempo libero) sono colpiti e possono subire importanti cambiamenti negativi a causa dell'impatto psicologico della SM.

La SM è stressante anche per gli altri membri della famiglia: lo stress derivante dalla malattia può influenzare lo stato emotivo dei genitori e dei fratelli e può cambiare il clima relazionale e affettivo dell'intera famiglia.

Questo stress può inibire l'adozione di strategie di gestione volte a promuovere il benessere dell'adolescente e aiutare i giovani a far fronte alla malattia. Le difficoltà comuni di genitori e figli nell'affrontare questa fase della vita sono ulteriormente accentuate dalla malattia. Per questo motivo è essenziale promuovere un intervento psicologico con i pazienti e le famiglie, in particolare i genitori dato che i giovani pazienti vivono con loro.

RISULTATI

Al momento dell'arruolamento, il campione di età compresa tra 10 e 18 anni era di 14 persone. Sette pazienti (quattro femmine, tre maschi) e sei genitori (due coppie, due padri) hanno preso parte alla ricerca. Tra questi: due persone con la madre e il padre, una con il padre e quattro senza genitore. Un genitore ha partecipato senza sua figlia. Le quattro femmine avevano 14, 16, 18 e 18 anni; i tre maschi avevano 16, 17 e 18 anni.

Le otto sessioni per gruppo (T1) e follow-up (T2) sono state completate e gli stessi argomenti sono stati affrontati in entrambi i gruppi.

La resilienza e le modalità per aumentarla insieme alle pratiche di mindfulness e all'EMDR (Eye Movement Desensitization and Reprocessing) sono state utilizzate per raggiungere l'obiettivo.

Il progetto originale prevedeva tre sessioni su otto coinvolgendo pazienti e genitori, per migliorare la comunicazione l'interconnessione tra i membri della stessa famiglia. Dopo l'arruolamento, il gruppo di ricerca ha optato per sessioni separate, a causa della presenza nel campione di pazienti senza genitori e viceversa. Ai pazienti e ai genitori che hanno scelto di non aderire all'intervento psicologico di gruppo è stato chiesto di compilare i questionari come gruppo di controllo, al fine di raccogliere dati per il confronto con il gruppo sperimentale.

Gli obiettivi previsti erano l'aumento dell'autoefficacia e del benessere psicologico, strategie di coping adattative, oltre a una diminuzione della depressione e dell'ansia.

Da un punto di vista psicologico, i feedback ricevuti da giovani pazienti e genitori sono stati tutti molto positivi e hanno evidenziato la necessità di confrontarsi e condividere con altre persone con SM.

Gli adolescenti hanno evidenziato la necessità di incontrare persone della stessa età per parlare della malattia e di tutti gli aspetti correlati (terapia ed effetti collaterali, regolazione delle emozioni legate ai sintomi della sclerosi multipla e alla modificazione del corpo).

Anche i genitori hanno evidenziato la necessità di incontrare altri genitori per condividere la loro esperienza.

CONCLUSIONI

Dato l'impatto che la SM ha sul benessere psicosociale del paziente adolescente e della sua famiglia, questo progetto pilota sembra aver migliorato l'adattamento alla malattia, promuovendo lo sviluppo di una maggiore resilienza all'interno del nucleo familiare, riducendo i sintomi neuropsichiatrici come si può vedere dai risultati ottenuti dai questionari self-report. I partecipanti all'intervento hanno imparato a riconoscere le loro emozioni e ad ascoltarle; i genitori hanno lavorato per migliorare la relazione con i loro figli. Tuttavia, lo studio presenta alcune limitazioni, prima fra tutte il numero di persone che hanno partecipato, che non ha permesso di determinare statisticamente la possibile efficacia dell'intervento.

Nel caso dei genitori, per alcune variabili è stato possibile suggerire che l'intervento ha svolto un ruolo fondamentale, soprattutto in termini di resilienza e

regolazione emotiva, ma per le altre variabili non è stato possibile determinare se i cambiamenti avvenuti potrebbero essere dovuti all'intervento o meno. In effetti, un campione più ampio avrebbe potuto evidenziare eventuali differenze tra il gruppo di intervento e il gruppo di controllo.

Un altro limite è la somministrazione di questionari self-report in quanto le autovalutazioni possono facilmente portare alla falsificazione delle risposte rispetto alla desiderabilità sociale, autostima o stereotipi esistenti. Un'altra possibile limitazione risiede nella chiarezza degli item, che può comportare il rischio di ottenere interpretazioni diverse dell'applicazione.

Nonostante questi limiti, la partecipazione a questo gruppo di intervento è stata essenziale per ridurre il senso di isolamento, solitudine e sofferenza nei pazienti adolescenti e nei loro genitori.

Psychological impact of MS in adolescents: support for the care and promotion of well-being in patients and parents

INTRODUCTION AND AIMS

Recent evidence has revealed that also children and adolescents may develop multiple sclerosis (MS). This chronic illness determines significant stress that is associated with risk for emotional and behavioral problems and interferes with adherence to treatment. Physical health and other life domains (family, school, friendship, free time) are affected by stress and can undergo major negative changes because of the psychological impact of MS.

MS is a stressful situation also for other family members: stress deriving from the disease can affect the emotional state of parents and siblings, and can change the relational and affective climate of the entire family.

This stress may inhibit the adoption of management strategies aimed at promoting the adolescent's well-being and helping the young to cope with the disease. The common difficulties of parents and children in addressing this phase of life are furtherly accentuated by the disease. For this reasons it is essential to promote a psychological intervention with MS patients and families, especially parents given that young patients live with them.

RESULTS

At moment of the enrollment the sample size aged between 10 and 18 years was 14 persons. Seven patients (four females, three males) and six parents (two couples, two fathers) took part to the research. Among these: two persons with their mother and father, one with her father and four without any parent. One parent participated without her daughter. The four females were 14, 16, 18 and 18 years old; the three males were 16, 17 and 18 years old.

The eight sessions per group (T1) and follow up (T2) were completed and the same topics were studied in both groups. Resilience and the ways to increase one's resilience have been deepened and mindfulness practices and EMDR (Eye Movement Desensitization and Reprocessing) have been used to reach the goal. The original project included three sessions out of the eight involving together patients and parents, to improve inter-communication and connectedness. After the enrollment the research group opted instead for having all sessions separated for patients and parents, due to the presence in the sample of patients with no parents and vice-versa. The patients and parents who choose not to join the psychological group intervention, were asked to fill-in the study questionnaires as a control group, in order to collect

data for comparison with the experimental group. Concerning the evaluation, an increase in self-efficacy, adaptive coping strategies and psychological well-being are expected, as well as a decrease in depression and anxiety.

From a psychological point of view, the feedbacks received from young patients and parents have all been very positive and have highlighted the need to compare and share with other people with MS. Adolescents have highlighted the need to meet people of their same age to talk about the disease and all related aspects (therapy and side effects; regulation of emotions related to multiple sclerosis symptoms and the modification of the body).

Also parents have highlighted the need to meet other parents to share their experience.

CONCLUSIONS

Given the impact that MS has on the psychosocial well-being of the adolescent patient and his family, this pilot project seems to have improved adaptation to the disease, promoting the development of greater resilience within the family nucleus, reducing neuropsychiatric symptoms as can be seen from the results obtained by the self-report questionnaire. Participants in the intervention learned to recognize their

emotions and to listen to them; parents worked to improve the relationship with their children.

However, the study has some limitations, first of all the number of participants, which did not allow to statistically determine the possible effectiveness of the intervention. In the case of parents, for some variables it was possible to suggest that the intervention played a fundamental role, above all in terms of resilience and emotional regulation, but for the other variables it was not possible to determine whether the occurred changes may be due to intervention or not. In fact, a larger sample could have highlighted any differences between the intervention group and the control group. Another limitation is the administration of self-report questionnaires. Because they require information on identifiable subjects, self-reports can easily lead to the falsification of responses such as social desirability, self-esteem or existing stereotypes.

Another possible limitation lies in the clarity of items, which may involve the risk of obtaining different interpretations of the application.

Despite these limitations, participation in this intervention group was essential to reduce the sense of isolation, solitude and suffering in adolescent patients and their parents.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Promoting resilience in people with chronic illness, Foundation IRCCS Neurological Institute C. Besta, Milano, 11 June 2018

Advisory Board SM Pediatrica, Milano, 2 July 2018

Meeting with adolescents and their families - Hotel CHC Airport - AISM, Genova; 6-7 October 2018

SM pediatrica - AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano (Torino) 22 November 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno l'ammontare di 20.500 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year and the amount of € 20,500

Marta Bassi

Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche Luigi Sacco, Università degli Studi di Milano, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Luca Negri, Cecilia Rassiga, Raffaella Sartori, Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche Luigi Sacco, Università degli Studi di Milano, Milano

Antonella Delle Fave, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano, Milano

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Monica Falautano, Eleonora Minacapelli, Dipartimento di Neurologia, Ospedale San Raffaele, Milano

Monica Grobberio, Miriam Benin, Samuela Turati, Manuela Valsecchi, Monica Rezzonico, Franco Di Palma, Nerina Mascoli, Elisabetta Casella, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Lariana, Como

Marianna Pattini, Beatrice Maria Allegri Rossi, Beatrice Biolzi, Ilaria Pesci, Letizia Manneschi, Angelica Guareschi, Graziella Pedà, Doriana Medici, Enrico Montanari, Centro di Sclerosi Multipla, UOC di Neurologia, Ospedale di Vaio-Fidenza, Fidenza

Claudia Nicolai, Benedetta Goretti, Maria Pia Amato, Dipartimento di Neuroscienze, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Università degli Studi di Firenze, Firenze

Maria Esmeralda Quartuccio, Claudio Gasperini, Simonetta Galgani, Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale S. Camillo-Forlanini, Roma

Erika Pietrolongo, Marco Onofri, Giovanna De Luca, Dipartimento di Neuroscienze, Imaging e Scienze Cliniche, Università degli Studi G. d'Annunzio, Chieti

Rosa Gemma Viterbo, Pietro Iaffaldano, Maria Trojano, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso, Università degli Studi di Bari, Bari

Sabina Cilia, Clara Chisari, Francesco Patti, Centro Sclerosi Multipla, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico G. Rodolico, Catania

Il sistema della cura: commisurare la promozione del benessere alle esigenze di persone con sclerosi multipla, caregiver ed operatori sanitari

PREMESSE E OBIETTIVI

La promozione del benessere rappresenta una sfida importante per la ricerca sulla sclerosi multipla (SM). Una vasta letteratura scientifica evidenzia che le per-

sone che vivono esperienze di malattia, personale o altrui, non sviluppano solo malessere, ma anche capacità, risorse e strategie che permettono loro di affrontare efficacemente la situazione. Il benessere in-

clude sia componenti fisiche che psicologiche e sociali, come la crescita personale, l'autonomia e l'integrazione nella comunità. Inoltre è un concetto soggettivo: ogni individuo valuta il proprio livello di benessere in base alla personale rappresentazione della malattia e delle proprie condizioni di vita. Infine il benessere riguarda tutti i protagonisti del sistema della cura: le persone con SM, i loro caregiver e gli operatori sanitari che le seguono. Per la prima volta nella ricerca su SM, l'obiettivo di questo studio è stato valutare il benessere percepito da tutti i protagonisti del sistema di cura, per ottenere una visione integrata dei loro punti di forza e di debolezza e sviluppare proposte d'intervento commisurate alle rispettive esigenze.

RISULTATI

Lo studio, articolato in una fase di ricerca di base e una applicata, ha coinvolto 1477 partecipanti reclutati in otto centri italiani: 680 persone con SM, 680 caregiver e 117 operatori sanitari.

Obiettivo della prima fase era individuare i principali punti di forza e di debolezza delle persone con SM, caregiver e operatori sanitari nell'affrontare la malattia, attraverso strumenti di ricerca basati su modelli teorici sviluppati nell'ambito della psicologia della salute. Sono stati ottenuti tre principali contributi innovativi.

Il primo riguarda la relazione tra le rappresentazioni personali - o credenze - sulla malattia e il benessere percepito dalle persone con SM e dai loro caregiver. È emerso che alcune credenze, come l'attribuzione di coerenza e senso alla malattia, si associano a benessere mentre altre, come la percezione di intense emozioni negative in relazione alla SM, si associano a bassi livelli di benessere. Di grande importanza è stata l'identificazione di strategie funzionali e disfunzionali adottate per affrontare la situazione; esse consistono principalmente nell'accettazione e rivalutazione positiva della malattia, ma includono anche l'evitamento e la negazione. Si è infine osservato che le credenze sulla malattia contribuiscono al benessere in modo differente, a seconda delle strategie utilizzate.

Il secondo contributo concerne la relazione tra le attività di assistenza dei caregiver e il loro benessere. I risultati mostrano che svolgere attività di assistenza

non comporta necessariamente una riduzione del benessere; anzi, se i caregiver utilizzano strategie funzionali ad affrontare la situazione, come rivalutare positivamente la malattia e dare sostegno emotivo al proprio caro, i loro livelli di benessere aumentano.

Il terzo contributo riguarda le modalità con cui gli operatori sanitari fronteggiano lo stress lavorativo. Si è osservato che nel gestire le attività medico-assistenziali gli operatori utilizzano strategie funzionali, come l'impegno nella risoluzione dei problemi e la richiesta di sostegno sociale, ma anche disfunzionali, come il disagio emotivo, che incidono negativamente sul loro livello di benessere.

Sulla base dei punti di forza e debolezza emersi nelle tre categorie di partecipanti, nella fase di ricerca applicata sono state formulate proposte d'intervento per promuovere benessere e risorse psicologiche nei protagonisti del sistema di cura. Sono state costruite griglie di problemi e soluzioni, utilizzabili in modo diverso a seconda del tipo d'intervento: divulgazione dei risultati di ricerca attraverso eventi informativi per il pubblico in generale, e per persone con MS e caregiver in particolare; corsi d'aggiornamento per gli operatori sanitari; interventi psicologici veri e propri attraverso programmi psicoeducativi, supporto e/o psicoterapia per tutti e tre i gruppi.

CONCLUSIONI

Lo studio ha evidenziato che la valutazione di risorse, punti di forza e dimensioni di benessere, in aggiunta a quella di limiti e problemi, apre nuove e promettenti prospettive per interventi centrati sulla persona nella sua interezza, con le proprie caratteristiche fisiche, psicologiche e sociali. Inoltre lo studio evidenzia la necessità di integrare le prospettive di tutti i protagonisti del sistema della cura, nonché di contestualizzare la valutazione dei punti di forza e di debolezza all'interno dei diversi ambiti di vita quotidiana, per apportare modifiche a quelli maggiormente associati a malessere e compromissione del funzionamento, ma anche per valorizzare quelli che alimentano risorse personali e sociali. Le griglie d'intervento costruite per questo scopo rappresentano un utile strumento da testare nella pratica e un primo passo verso lo sviluppo di linee guida per la promozione del benessere nel sistema di cura della SM.

The care system: tailoring well-being promotion to the needs of people with multiple sclerosis, caregivers and health professionals

INTRODUCTION AND AIMS

Well-being promotion represents an important challenge for research in multiple sclerosis (MS).

A vast scientific literature highlights that individuals experiencing personal or other people's disease do not only develop ill-being, but also capabilities, resources and strategies that allow them to effectively cope with the situation. Well-being comprises physical, as well as psychological and social components, such as personal growth, autonomy and community integration. Moreover, it is a subjective concept: individuals appraise their well-being level according to their personal representation of the illness and living conditions. Finally, well-being concerns all the characters in the care system: persons with MS, their caregivers and health professionals. For the first time in MS research, aim of this study was to provide an integrated evaluation of participants' well-being in order to identify their strengths and weaknesses and to develop suggestions for intervention tailored to their needs.

RESULTS

The study, comprising a basic and an applied research phase, involved 1477 participants who were enrolled in eight MS centers in Italy: 680 persons with MS, 680 caregivers and 117 health professionals.

Objective of the first phase was to identify main strengths and weaknesses of persons with MS, their caregivers and health professionals in coping with the illness, through research instruments based on theoretical models developed in health psychology. Three main novel contributions were obtained.

The first one concerns the relationship between illness representations - or beliefs - and well-being perceived by persons with MS and their caregivers. Results showed that some beliefs, such as the perception of high illness coherence, were pervasively related to high well-being levels, while others, e.g. the perception of intense MS-related negative emotions, were associated with lower well-being levels. Most importantly, we were able to identify the functional and dysfunctional responses adopted to face the situation; they mainly consist in coping strategies focused on illness acceptance and positive reframing, but they also include avoidance and denial. Finally, ill-

ness beliefs contribute to participants' well-being in different ways, based on the adopted strategies.

The second contribution regards the relationship between caregiving tasks and caregivers' well-being. Findings underscored that caregiving tasks do not necessarily entail a decrease in well-being; rather, if caregivers use adaptive coping strategies, like positive reframing and supportive engagement, their well-being levels increase.

The third contribution concerns the ways health professionals cope with job stressors. Besides resorting to adaptive strategies focused on problem-solving and social support in managing caring activities, health professionals also turn to maladaptive strategies based on emotional distress, which undermine their well-being levels.

Based on the strengths and weaknesses identified among the three categories of participants, suggestions for intervention were formulated in the applied phase of the project, with the aim to promote well-being and psychological resources according to participants' needs. Grids of problems and solutions were devised based on type of intervention: dissemination of research findings through informational events addressed to the wider public in general, and persons with MS and their caregivers in particular; training courses for health professionals; psychological intervention through psychoeducational programs, support and/or structured psychotherapy for all the three groups.

CONCLUSIONS

This study highlighted that the evaluation of resources, strengths and well-being dimensions, in addition to weaknesses and impairments, opens up new and promising perspectives for the development of intervention programs centered on the person as a whole, comprising physical, psychological and social characteristics. Moreover, the study underlines the need for an integrated analysis of well-being including all the stakeholders in the care system, as well as the need to contextualize the evaluation of their strengths and weaknesses within the different areas of daily life, in order to help mend areas associated with ill-being and impaired functioning, but also to enhance those areas that contribute to personal and social resources.

To this purpose, devised intervention grids represent a useful tool to be tested in practice, and the first step

towards the development of guidelines for the promotion of well-being within the MS care system.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Bassi M. La promozione del benessere nella malattia. Invited speech al 10° Convegno Nazionale Rete Psicologi dell'Associazione Italiana Sclerosi Multipla. Roma, 13-14 novembre 2018

Bassi M, Cilia S, Falautano M, Grobberio M, Niccolai C, Pattini M, Pietrolongo E, Quartuccio ME, Viterbo RG, Allegri B, Amato MP, De Luca G, Gasperini C, Benin M, Minacapelli E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. The care system approach to well-being: Giving voice to patients, caregivers and health professionals. Invited lecture in symposium at IX European Conference on Positive Psychology, Budapest, 27-30 June 2018

Bassi M, Cilia S, Falautano M, Niccolai C, Pattini M, Pietrolongo E, Quartuccio ME, Valsecchi M, Viterbo RG, Allegri B, Amato MP, De Luca G, Gasperini C, Grobberio M, Minacapelli E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. The caring experience in multiple sclerosis: Coping strategies as mediators between caregiving tasks and caregivers' well-being. Oral presentation at IX European Conference on Positive Psychology, Budapest, 27-30 June 2018

Bassi M, Allegri B, Cilia S, Falautano M, Niccolai C, Pietrolongo E, Quartuccio ME, Turati S, Viterbo RG, Amato MP, Biolzi B, De Luca G, Gasperini C, Grobberio M, Minacapelli E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. I professionisti della salute di fronte a patologie neurodegenerative: stress lavorativo, strategie di coping e benessere. Presentazione orale a IX Giornate Nazionali di Psicologia Positiva, Bari, 15-16 giugno 2018

Bassi M, Allegri B, Benin M, Cilia S, Falautano M, Niccolai C, Pietrolongo E, Quartuccio ME, Viterbo RG, Amato MP, Biolzi B, De Luca G, Gasperini C, Grobberio M, Minacapelli E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. Illness perceptions and mental health among persons with multiple sclerosis: The mediating role of coping strategies. Oral presentation at 23rd Annual RIMS Conference: MS Rehabilitation across the lifespan, Amsterdam, May 31-June 2 2018. *Multiple Sclerosis Journal*, 24, 6, 834

Bassi M, Falautano M, Cilia S, Goretti B, Grobberio M, Pattini M, Pietrolongo E, Quartuccio ME, Viterbo RG, Amato MP, Gasperini C, Onofrj M, Montanari E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. The care system: Tailoring well-being promotion to the needs of people with multiple sclerosis, caregivers and health professionals. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 28-30 May 2018

Bassi M, Falautano M, Cilia S, Grobberio M, Niccolai C, Pattini M, Pietrolongo E, Quartuccio ME, Viterbo RG, Allegri B, Amato MP, Benin M, Gasperini C, Minacapelli E, Onofrj M, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. Credenze sulla malattia e senso di coerenza in persone con sclerosi multipla. Presentazione orale al XII Congresso Nazionale della Società Italiana di Psicologia della Salute, Firenze, 3-5 novembre 2017

Bassi M, Falautano M, Cilia S, Grobberio M, Niccolai C, Pattini M, Pietrolongo E, Quartuccio ME, Viterbo RG, Allegri B, Amato MP, Benin M, Gasperini C, Minacapelli E, Onofrj M, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. The relationship between coping strategies, health-related quality of life and life satisfaction among persons with multiple sclerosis. 7th Joint ECTRIMS - ACTRIMS meeting, Paris, 25-28 October 2017

Bassi M, Falautano M, Cilia S, Goretti B, Grobberio M, Pattini M, Pietrolongo E, Quartuccio ME, Viterbo RG, Amato MP, Gasperini C, Onofrj M, Montanari E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. The care system: Tailoring well-being promotion to the needs of people with multiple sclerosis, caregivers and health professionals. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 29-31 May 2017

Bassi M, Falautano M, Cilia S, Goretti B, Grobberio M, Pattini M, Pietrolongo E, Quartuccio ME, Viterbo RG, Amato MP, Gasperini C, Lugaesi A, Montanari E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. The care system: Tailoring well-being promotion to the needs of people with multiple sclerosis, caregivers and health professionals. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 25-27 May 2016

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 3 anni e l'ammontare di 184.000 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 3 years and the amount of € 184,000

Claudio Marcello Solaro

Unità di Riabilitazione “CRRF “Mons. Luigi Novarese”, Moncrivello (VC)

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Giulia Gamberini, Rachele Di Giovanni

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Giampaolo Bricchetto, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM), Genova

Margit Mueller, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM), Genova

Francesco Patti, Angelo Pappalardo, Dipartimento Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Catania, Catania

Davide Cattaneo, Rita Bertoni, Fondazione Don Gnocchi, Milano

Davide Marengo, Dipartimento di Psicologia, Università degli Studi di Torino, Torino

Luca Prosperini, Ospedale San Camillo Forlanini, Roma

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

La funzione dell'arto superiore in SM: creazione di un data-set per ottenere dati normativi di misure soggettive e oggettive e sviluppo di uno strumento di valutazione SM specifico

PREMESSE E OBIETTIVI

La disfunzione a carico dell'arto superiore (AS) è solitamente considerata meno disabilitante di quella dell'arto inferiore nei soggetti con sclerosi multipla (SM). Nella pratica clinica, AS è valutato tramite il 9HolePegTest (9HPT), ma non sono presenti scale validate che valutino le varie dimensioni dell'AS: la forza distale è indagata attraverso il dinamometro, sebbene non vi sia una normativa di riferimento. Gli obiettivi sono quelli di sviluppare un *data set* normativo per le scale di valutazione funzionale e autosomministrata per arto superiore, di sviluppare una scala specifica per SM e correlare le suddette scale con indicatori di performance motoria.

RISULTATI

Primo step: un gruppo di esperti ha effettuato una ricerca in letteratura confermando l'assenza di specifici *patient reported outcome* (PRO) per AS nella SM. Abbiamo identificato 4 scale: Manual Ability Measure (MAM-36), Abilhand, Disabilities of The Arm, Shoulder and Hand (DASH), Motor Activity Long (MAL),

utilizzate come valutazione dei PRO dell'arto superiore in altre patologie.

Secondo step: le 4 scale sono state tradotte con valutazione dell'equivalenza semantica ottenendo una versione finale condivisa. I questionari sono stati compilati da 5 soggetti e in seguito a un secondo *expert meeting* è stata prodotta la versione finale. Per lo studio normativo sono stati inclusi 56 soggetti. Per la variabilità interindividuale, le scale sono state risomministrate a distanza di 24 ore per valutare gli effetti della variabilità giornaliera.

Terzo step: studio *cross-sectional* multicentrico coinvolgente 4 centri neurologici italiani. Sono stati esclusi i soggetti non in grado di svolgere le valutazioni strumentali. I soggetti sono stati valutati tramite: DASH, MAM-36, MAL, Abilhand, EDSS, 9HPT, Box and Block test (BB), Scripps Scale, Ashworth Scale, BICAMS, MSIS-29, MFIS, tremor Severity Scale, Hand Grip. Sono stati arruolati 218 soggetti con SM: 73 maschi e 145 femmine; età media di 48.06 anni; EDSS mediana di 4; 143 SM recidivante remittente, 52 SM secondariamente progressiva, 23 SM primariamente progressiva.

Valori ottenuti: media Hand grip (tre test): destra 37,1 kg, sinistra 34,25 kg. Media 9 HPT (due test): destra 27,6 sec., sinistra 31,1 sec. I risultati ottenuti sono (media): MAM36 (0-100): 72.77; DASH (0-100): 28.52; MFIS (fisico): 16.76; MFIS (cognitivo): 11.61; MFIS (psicosociale): 3.09; MFIS (totale): 31.46; hand grip (d): 39.86; hand grip (s): 36.86; BB(d): 45.75 BB(s): 44.93; 9HPT (d): 27.93; 9HPT (s): 30.88. Esiste una correlazione tra i valori di mano destra e sinistra per 9HPT, BB e hand grip e moderatamente negativa tra BB e 9HPT. C'è una forte correlazione negativa tra MAM-36 e DASH: i valori mostrano una correlazione più che moderata con le variabili dell'MFIS.

È presente una correlazione moderata tra DASH e MAM-36 e BB e 9HPT; risulta bassa la correlazione con l'hand grip. Si evincono correlazioni tra MFIS e BB e 9HPT.

MAM36 e DASH sembrano discriminare bene tra EDSS moderato e severo, mentre falliscono nel discriminare tra lieve e moderata disabilità. Hand grip per la mano destra varia significativamente tra lieve e severo EDSS, mentre quello sinistro non varia nei vari gruppi. BB discrimina meglio tra lieve e moderato EDSS; 9HPT varia significativamente tra EDSS

moderato e severo.

Quarto step: per valutare l'AS è stato inoltre utilizzato il 3-Space™ Wireless, un sensore inerziale triassiale che computerizza i dati tramite un apposito programma. Per la creazione del *data set* normativo, 65 soggetti sani e 54 soggetti con SM sono stati inclusi. Tutti i soggetti con SM hanno completato i seguenti test in aggiunta alla cinematica: DSS, DASH, MAM-36, Abilhand, MAL, 9HPT, BB, Scripps scale, Ashworth scale, BICAMS, MSIS-29, MFIS, Tremor Severity scale, hand grip.

Quinto step: per implementare la raccolta dati abbiamo sviluppato ABOUTCOME, un'applicazione ad hoc che permette ai pazienti di autocompilare i questionari e agli operatori di creare *database* e svolgere analisi. Abbiamo implementato: DASH, Abilhand, MAM-36, FSS, MFIS, Ashworth Modified Scale, 9HPT, Hand Grip, EDSS, 25-FWT, BICAMS.

CONCLUSIONI

La valutazione della funzionalità dell'AS ci fornirà più chiarezza riguardo il livello di disabilità nelle attività di vita quotidiana e contribuirà a una miglior pianificazione dei programmi farmacologici e riabilitativi.

Upper limb function in MS: creation of a normative data set on subjective and objective measures and the construction of an MS-specific assessment tool

INTRODUCTION AND AIMS

Upper limb dysfunction has been considered less debilitating in multiple sclerosis (MS) than lower limb impairment. In clinical practice upper limb function is scored using the 9HolePegTest (9HPT), but there are no validated scale that assess dimensions for upper limb functions. Distal strength is rated using dynamometer, but normative data are not available in MS. Aims to develop: normative data set for measures of upper limb function and a self-administered; MS-specific scale as follow-up and as an indicators of the choice of pharmacological and rehabilitative approaches.

RESULTS

First step: a panel of experts performed a literature review and confirmed that there is no specific patients reported outcome (PRO) measures for upper limb function in MS. We identified 4 scales: Manual Ability Measure (MAM-36), Abilhand, Disabilities of

The Arm, Shoulder and Hand (DASH), Motor Activity Long (MAL), used for the assessment of PRO upper limb function used in other pathologies.

Second step: the panel of expert translate the 4 scales into Italian. Translation and evaluation to ensure semantic equivalence and acceptability have been performed and a consensus version has been obtained. The questionnaire were fulfilled by 5 patients followed by second expert meeting and the final version will be tested in the final sample. For the normative data study 56 subjects have been recruited. To assess the inter-rater reliability, the measures will be repeated after 24 hours to determine the effects of daily variability.

Third step: multicentre cross-sectional study has been activated involving 4 Italian neurological centers. Subjects unable to perform the instrumental evaluation are excluded.

Subjects have been evaluated using: DASH, MAM-36, MAL, Abilhand, EDSS, 9HPT, Box and Block test (BB),

Scripps Scale, Ashworth Scale, BICAMS, MSIS-29, MFIS, tremor Severity Scale, Hand Grip. 218 subjects with MS have been enrolled: 73 male and 145 female; mean age of 48.06 years; median EDSS of 4; 143 with relapsing remitting MS, 52 secondary progressive MS, 23 primary progressive MS.

Mean Hand grip strenght (mean of three test): right hand 37,1 kg, left hand 34,25 kg.

Mean of 9 HPT test (mean of two test): right 27,6 sec., left 31,1 sec. The results obtained has been (mean): MAM36 (0-100): 72.77; DASH (0-100): 28.52; MFIS (Physical): 16.76; MFIS (Cognitive): 11.61; MFIS (Psychosocial): 3.09; MFIS (Total): 31.46; HAND-GRIP (r): 39.86; HAND-GRIP (l): 36.86; BB(r): 45.75 BB(l): 44.93; 9HPT (r): 27.93; 9HPT (l): 30.88. A strong inter-correlation exists between right and left hand scores for BB, 9HPT and hand grip and moderate negative correlation between BB and 9HPT. Strong negative correlation between MAM-36 and DASH: both scores shows moderate-to-strong correlations with MFIS variables. Moderate correlation between DASH and MAM36 with BB and 9HPT; correlation with hand-grip is small. There is correlation between MFIS variables and BB and 9HPT. MAM36 and DASH appear to discriminate well between the moderate and severe EDSS groups, while they fail discriminating between mild and moderate disability. Hand grip for right hand varies significantly between mild and severe EDSS groups, while hand-grip left-hand does

not vary between groups. BB discriminate best between mild and moderate EDSS groups; 9HPT varies significantly between moderate and severe EDSS groups. Other data analysis are ongoing.

Forth step: In order to score upper limb movement we used 3-Space™Wireless, a triaxial inertial sensor which collect the recorded data throw a computer program. For the creation of a normative data set, 65 healthy controls and 54 subjects with MS have been included. All subjects completed the following tests in addition to kinematic assessment: EDSS, DASH, MAM-36, Abilhand, MAL, 9HPT, BB, Scripps scale, Ashworth scale, BICAMS, MSIS-29, MFIS, Tremor Severity scale, hand grip.

Fifth step: to improve data collection we developed ABOUTCOME, an *ad hoc* app that allows patients to complete self-administered questionnaires and healthcare workers to create database and perform analysis. Data collection is ongoing and at the moment, we implemented: DASH, Abilhand, MAM-36, FSS, MFIS, Ashworth Modified Scale, 9HPT, Hand Grip, EDSS, 25-FWT, BICAMS.

CONCLUSIONS

Measurement of upper extremity functions will provide us better understanding of the disability level of the patients in daily living tasks and contribute to better planning of pharmacotherapy and rehabilitation programs.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Solaro C, Bricchetto G, Mueller M, Cattaneo D, Bertoni R, Patti F, Pappalardo A, Prosperini L, Castelli, D.

Upper limb function in MS correlation between instrumental and clincale scale.

Posters at 34 th Congress of the European Committee for Treatment and Rehabilitation in Multiple Sclerosis, 10-12 October 2018, Berlin

Poster at XLIX SIN National Congress, 27-30 October 2018, Rome

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

Matilde Inglese

Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica, Salute Materno Infantile, Università degli Studi di Genova e Ospedale Policlinico San Martino, Genova

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

GianLuigi Mancardi, Giulia Bommarito, Giacomo Boffa, Elvira Sbragia, Niccolò Piaggio, Simona Schiavi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Giampaolo Bricchetto, Andrea Tacchino, Gaia Girardi, Ricerca Scientifica, Associazione Italiana Sclerosi Multipla (AISM), Genova

Amgad Droby, Department of Neurology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, United States

Correlati cerebrali strutturali e funzionali della riabilitazione dell'arto superiore in pazienti con SM progressiva

PREMESSE E OBIETTIVI

La riabilitazione neurologica è di fondamentale importanza nei pazienti affetti da sclerosi multipla progressiva (SMP), poiché ad oggi esistono poche opzioni terapeutiche efficaci per questi pazienti, ed i farmaci attuali disponibili hanno un minimo effetto sulla disabilità neurologica precedentemente accumulata. Tuttavia, l'efficacia della neuroriabilitazione nei pazienti con SMP (e dei diversi protocolli riabilitativi che possono essere utilizzati) non è definitiva, così come non sono ancora del tutto noti i meccanismi di plasticità cerebrale che sottendono gli effetti riabilitativi. Pochi studi hanno inoltre indagato specificatamente la riabilitazione dell'arto superiore nei pazienti con SMP, nonostante deficit motori, sensitivi e di coordinazione a carico degli arti superiori siano molto frequenti ed invalidanti in questa popolazione.

Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato come, in pazienti affetti da SM a ricadute e remissioni (SMRR), un protocollo di riabilitazione attivo, basato su esercizi task-oriented, sia in grado di preservare nel tempo la funzionalità dell'arto superiore e l'integrità microstrutturale della sostanza bianca encefalica, in misura maggiore rispetto ad un protocollo riabilitativo basato sulla sola mobilizzazione passiva. Abbiamo pertanto disegnato il presente studio randomizzato controllato per valutare l'effetto di uno specifico protocollo di riabilitazione attiva task-oriented dedicato agli arti superiori confrontato con

un protocollo riabilitativo di mobilizzazione passiva in pazienti affetti da SMP. L'obiettivo dello studio era quello di valutare l'effetto dei due differenti protocolli riabilitativi su diversi parametri clinici e funzionali riguardanti la motilità dell'arto superiore (valutata attraverso diverse scale cliniche e con il supporto di un guanto ingegnerizzato volto a misurare la manualità fine delle dita) e su parametri di risonanza magnetica (RM) avanzata (in particolare alterazioni microstrutturali della sostanza bianca misurate con tecniche di diffusione e riorganizzazioni dei network funzionali valutati attraverso analisi di risonanza magnetica funzionale resting-state).

RISULTATI

26 pazienti sono stati arruolati in questo studio prospettico e randomizzati in due gruppi di studio: 13 pazienti sono stati sottoposti ad un trattamento riabilitativo di tipo attivo, task-oriented, specifico per gli arti superiori e 13 pazienti sono stati sottoposti ad un protocollo riabilitativo che prevedeva esclusivamente una mobilizzazione passiva degli arti superiori. Prima e dopo il trattamento i pazienti sono stati sottoposti a RM encefalica e sono stati valutati con diverse scale cliniche e valutazioni biofunzionali con un guanto ingegnerizzato.

In seguito al trattamento riabilitativo, il gruppo attivo ha mostrato un miglioramento in diversi esercizi di abilità manuale fine misurata con il guanto ingegner-

rizzato ($0.001 \leq p \leq 0.03$, $0.72 \leq \text{Cohen's } d \leq 1.22$) e ha mostrato punteggi ridotti alla scala MFIS sulla fatica rispetto al gruppo passivo ($p=0.03$). In confronto al gruppo passivo, il gruppo attivo ha inoltre mostrato alla RM funzionale resting-state una maggiore connettività funzionale all'interno dei network cerebellare e talamico ($p < 0.05$). Diverse correlazioni sono state identificate tra il miglioramento nelle prove di manualità e l'incremento della connettività funzionale *resting state* ($0.87 \leq r \leq 0.93$, $0.001 \leq p \leq 0.03$). Non si sono osservate modificazioni dei parametri di dif-

fusione sui principali tratti di sostanza bianca cerebrale, né sui volumi delle principali aree cerebrali.

CONCLUSIONI

I nostri risultati suggeriscono come un protocollo riabilitativo dedicato all'arto superiore basato su esercizi attivi, sia più efficace della sola mobilizzazione passiva in pazienti con SMP. I risultati di RM funzionale suggeriscono inoltre come, pur in presenza di malattia avanzata e disabilità rilevante, i meccanismi di plasticità cerebrale funzionale siano preservati.

Structural and functional brain MRI correlates of upper limb neurorehabilitation in patients with progressive MS

INTRODUCTION AND AIMS

Neurorehabilitation might be a particularly useful approach for MS patients with progressive disease, as treatment options are very limited. However, especially in progressive MS, there is no definite agreement on which specific exercise therapy program can improve activities of daily life. We have demonstrated that in patients with relapsing-remitting MS, task specific oriented exercises have an impact both on motor behavioral performance and on MRI-derived metrics of white matter integrity compared to passive exercises. Up to date, no studies have investigated the effect of task specific oriented rehabilitation in progressive MS patients both on behavioral performance and MRI outcomes.

We propose to investigate the motor behavioral and structural and functional brain MRI outcomes following a 3-month upper limb motor rehabilitation treatment based on task-oriented exercises in progressive MS patients. Twenty-six progressive MS patients in a stable phase of the disease presenting with mild or moderate upper limb sensorimotor deficits will be randomized into either active ($n=13$) or passive ($n=13$) treatment. Patients will undergo 36 treatment sessions, three times a week for 3 months. The active treatment group will receive an active motor rehabilitation treatment, based on voluntary exercises including task-oriented exercises, the passive treatment group will be trained with passive mobilization of the shoulder, elbow, wrist and fingers. Before (T0), after the rehabilitation protocols (T1), upper limb motor performance will be evaluated with standard clinical and instrumental measures. At the

same time points, each subject will undergo structural and functional brain MRI.

RESULTS

26 patients were prospectively enrolled and randomized into 2 groups: active treatment group (ATG, $n=13$) and passive treatment group (PTG, $n=13$). At baseline and after training, patients underwent MRI scans and were evaluated with the action research arm test (ARAT), nine-hole peg test (9-HPT), ABILHAND scale and modified fatigue impact scale (MFIS). Measures of motor finger performance were obtained by engineered glove measuring. After rehabilitation, ATG improved in several finger motor tasks ($0.001 \leq p \leq 0.03$, $0.72 \leq \text{Cohen's } d \leq 1.22$) and showed reduced MFIS scores compared to PTG ($p=0.03$). ATG showed increased functional connectivity within the cerebellar and thalamic resting state networks compared to PTG ($p < 0.05$). Correlations were found between several measures of motor improvement and thalamic and sensorimotor networks ($0.87 \leq r \leq 0.93$, $0.001 \leq p \leq 0.03$). No changes in cerebral volumes and diffusion-tensor-imaging derived measures were detected. PMS patients showed clinical improvement after task-oriented UL rehabilitation, which seems to be more efficient than passive mobilization. Despite extensive brain damage, functional neuroplasticity is preserved in PMS.

CONCLUSIONS

Our results show that PMS patients could benefit from task oriented upper limb rehabilitation, which seems to be more efficient than simple passive mobi-

lization. Despite high burden of disability and brain damage, functional adaptive capacities seem to be preserved, thus providing a rationale for the use of rehabilitative treatments in late PMS. Functional

connectivity analyses could help detecting early treatment effect and improving our knowledge about adaptive brain changes promoting motor improvement.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Boffa G, Tacchino A, Sbragia E, Schiavi S, Droby A, Piaggio N, Bommarito G, Girardi G, Mancardi GL, Bricchetto G, Inglese M. * Preserved brain functional plasticity after upper limb task-oriented rehabilitation in progressive multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, submitted

Boffa A, Tacchino, E Sbragia S, Schiavi, A, Droby, Piaggio, G, Bommarito GL, Mancardi G, Bricchetto, M, Inglese. Preserved brain functional plasticity after upper limb task-oriented motor rehabilitation in progressive MS. 34th ECTRIMS 10-12 October 2018, Berlin, Germany

Boffa A, Tacchino, E Sbragia S, Schiavi, A, Droby, Piaggio, G, Bommarito GL, Mancardi G, Bricchetto, M, Inglese. Resting-state functional connectivity increase after upper limb task-oriented motor rehabilitation in progressive MS. 49th Congresso SIN 27-30 October 2018, Roma, Italia

Sbragia E, Boffa G, Tacchino A, Piaggio N, Bommarito G, Mancardi GL, Bricchetto G, Inglese M. Task-oriented upper limb motor rehabilitation in progressive multiple sclerosis: clinical and MRI correlates. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, 2017, Roma, Italia

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM Speciale Progressive 2014 per il periodo di 1 anno (prorogato di 1 anno e 6 mesi) e l'ammontare di 75.000 €

Research project funded by FISM Special Call Progressive 2014 for the period of 1 year (extended by 1 year and 6 months) and the amount of € 75,000

Giorgio Sandrini

Dipartimento di Neuroriabilitazione, IRCCS Fondazione Mondino, Pavia

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Roberto Bergamaschi, Eliana Berra, Francesca Balsamo, Carlotta Dagna, Roberto De Icco, Mauro Fresia, Francesco Malinverno, Sara Bernini, Tommaso Milanese

Effetti della stimolazione cerebellare transcranica a correnti dirette su “reinforced feedback in virtual environment (RFVE)” in pazienti affetti da SM con atassia degli arti superiori

PREMESSE E OBIETTIVI

Il cervelletto è una tra le sedi più spesso coinvolte nella sclerosi multipla. Le lesioni cerebellari demielinizzanti sono associate alla comparsa di disturbo atassico, disturbo dell'equilibrio e deficit nelle funzioni cognitive. In letteratura sono presenti evidenze di come questi sintomi possano beneficiare del trattamento con stimolazione transcranica a correnti continue a livello cerebellare (tc-DCS), metodica in grado di modulare i circuiti cerebello-talamo-corticali coinvolti nella compromissione delle funzioni motorie e cognitive di tali pazienti. Alla luce di tali evidenze, lo scopo del presente studio è indagare l'effetto della tc-DCS sull'atassia degli arti superiori (valutata con scale cliniche e analisi computerizzata con RFVE- *Reinforced Feedback in Virtual Environment*) e sulle funzioni cognitive. Nell'ambito di uno studio randomizzato controllato in doppio cieco e crossover, sono stati arruolati 19 soggetti con diagnosi di SM, definita secondo i criteri di McDonald, con atassia degli arti superiori, una o più lesioni demielinizzanti cerebellari evidenti alla Risonanza Magnetica, in assenza di ricadute nei tre mesi precedenti all'arruolamento tali da determinare un peggioramento di almeno un punto sulla scala EDSS (*Expanded Disability Status Scale*). I pazienti arruolati, randomizzati, ricevevano due stimolazioni anodiche di tc-DCS (attiva o sham) in cieco, ciascun blocco prevedeva cinque sessioni a settimana per due settimane di fila, intervallate da un periodo di un mese. I pazienti erano poi valutati in cieco prima del trattamento (T0), dopo il trattamento (T1) e a due settimane dalla fine del trattamento (T2). La valutazione dell'atassia prevedeva l'utilizzo di scale cliniche (*Scale for Assessment and Rating of Ataxia -SARA-*, *International Cooperative Ataxia Rating Scale -ICARS*) e analisi computerizzata attra-

verso RFVE. L'aspetto cognitivo era indagato attraverso la somministrazione di test, nello specifico erano valutati apprendimento verbale e memoria (*Rey's 15 words*), velocità di processamento (SDMT, *Symbol Digit Modalities Test*), memoria di lavoro (PASAT 3, *Paced Auditory Serial Addition Test 3*), e funzioni esecutive (*Stroop Test*).

RISULTATI

Nel corso di un anno sono stati arruolati 19 pazienti, tra questi si sono verificati sette *drop out*: per riacutizzazione di malattia, comorbidità, complicanze internistiche e psichiatriche. 12 pazienti hanno completato il trattamento ricevendo due cicli di stimolazione (attiva e sham); tutti i pazienti hanno effettuato anche trattamento riabilitativo volto, principalmente, al miglioramento della deambulazione. Tutti i pazienti sono stati valutati sia dal punto di vista motorio, con le scale cliniche per l'atassia e l'analisi computerizzata attraverso RFVE (nello specifico i parametri di tempo, velocità e picchi), sia dal punto di vista dell'autonomia nelle attività quotidiane, tramite la somministrazione della scala FIM: dall'analisi statistica è emerso un miglioramento tra T0 e T2 nel tempo in entrambi i gruppi, senza differenze significative tra la stimolazione attiva e sham. Per quanto concerne i test cognitivi, invece, tutti i pazienti hanno mostrato un miglioramento significativo nell'apprendimento verbale e nella memoria, come mostrato dai punteggi al Rey test.

CONCLUSIONI

Dall'analisi dei risultati è emerso un modesto miglioramento nel tempo nei punteggi delle scale per l'atassia (SARA e ICARS), nei punteggi della FIM e dei parametri analizzati attraverso RFVE, sia dopo il trat-

tamento attivo che quello sham. L'effetto nel tempo è probabilmente attribuibile al ciclo riabilitativo che, anche se non indirizzato al trattamento del disturbo atassico, determina comunque un miglioramento globale del quadro motorio. L'analisi statistica ha invece mostrato un miglioramento statisticamente significativo nelle funzioni cognitive, in particolare per quanto concerne l'apprendimento verbale e la memoria. È emerso un miglioramento funzione-specifico nei punteggi al Rey Test tra T0 e T2 dopo il ciclo attivo di sti-

molazione tc-DCS. Il trattamento con tc-DCS è risultato inoltre ben tollerato e sicuro, aspetto che consente di ipotizzarne l'utilizzo per cicli ripetuti nel tempo. Il metodo è inoltre semplice da utilizzare, richiede poco tempo per l'applicazione e ha costi relativamente bassi. I promettenti risultati emersi pongono le basi per eventuali studi futuri sull'efficacia della tc-DCS in un più alto numero di pazienti con SM, lesioni cerebellari e deficit cognitivi, a paragone o come *add on* alla riabilitazione cognitiva.

Effects of cerebellar transcranial direct current stimulation (tc-DCS) on reinforced feedback in virtual environment (RFVE) in MS patients with upper limb ataxia

INTRODUCTION AND AIMS

The cerebellum is one of the sites vulnerable to lesion development in multiple sclerosis (MS). Cerebellar demyelinating lesions are associated with limb ataxia, but also with balance disorders and cognitive involvement. There is evidence suggesting that these symptoms can be modulated through non-invasive brain stimulation applied over cerebellum (trans-cerebellar direct current stimulation, tc-DCS). Changes in both motor and cognitive functions are physiologically plausible after stimulation of the cerebellum via electrical stimulation of the cerebello-thalamo-cortical pathway. The aim of this study is to investigate the effect of tc-DCS on upper limb ataxia (measured with clinical scales and a computerized movement analysis technique called Reinforced Feedback in Virtual Environment -RFVE-) and on cognitive functions. In a controlled, randomized, double blind, cross-over design, the study provides the recruitment, at IRCCS C. Mondino National Neurological Institute, of 20 patients with definite MS, diagnosed according to the McDonald criteria, presenting upper limb ataxia and one or more cerebellar demyelinating lesions on MRI, without relapses or a more than a one-point worsening of their Expanded Disability Status Scale (EDSS) score in the previous three months. The patients randomly received two anodal tc-DCS blocks (active and sham), each consisting of 5 sessions a week for two weeks and were held apart by 1 month. Data have been collected before treatment (T0), after 10 sessions of treatment (T1), and two weeks after the end of treatment (T2) using clinical scales for ataxia (Scale for Assessment and Rating of Ataxia -SARA-, International Cooperative Ataxia Rating Scale -ICARS) and

the RFVE system. Cognitive functions have been investigated using scales for Verbal learning and memory (Rey's 15 words), Processing speed (Symbol Digit Modalities Test), Working memory (Paced Auditory Serial Addition Test 3), and Executive functions (Stroop Test), as well as the Expanded Disability Status Scale (EDSS), Functional Independence Measure (FIM) at T0, T1 and T2.

RESULTS

During a year, 19 MS patients have been enrolled. Seven patients dropped out during the treatment: four patients had an exacerbation of their disease, one patient declines during the treatment for anxiety disorders, one patient had the first treatment and declined during the wash out, one patient had health problems and he had to drop-out the treatment. 12 patients completed the treatment and randomly received anodal tc-DCS blocks (active or sham); all the patients also received rehabilitation treatment to improve the walk. All patients were evaluated with clinical scales for ataxia, with RFVE for upper limb ataxia (in particular principal parameters: time, velocity and peaks) and with FIM scale for the independence in the daily living: the results showed an improvement over time in both group, with no significant differences between the two groups. Regarding cognitive tests, all patients treated with tc-DCS had a significant cognitive improvement in Verbal learning and memory, as demonstrated in Rey test scores.

CONCLUSIONS

The results showed a mild improvement over time in clinical scales for ataxia (SARA and ICARS), in scale

for independence in daily living activities (FIM) and in computerized movement analysis (RFVE), without significant statistical differences between DCS and control (sham) group. The explanation of the improvement of the scores over time is probably linked to the effect of rehabilitation in itself, which, even if not concentrated on the ataxic symptoms, guarantees an overall improvement of the patient's motor. However, this study suggested a significant improvement in cognitive function, in particular in Verbal learning and memory evaluated with Rey test, only in tc-DCS group from T0 to T2. This result is relevant because supports the

use of tc-DCS, well tolerated, safe method for cognitive rehabilitation in MS patients. The method is simple to dispense, could be applied for longer or repeated cycles over time, and, contrary to cognitive standard rehabilitation, requires limited time, resources and costs. The results appear to be relevant to demonstrate the role of the cerebellum in cognitive functions and they also lay the foundations for future studies in which the efficacy of tc-DCS can be evaluated in a larger population of subjects with MS, cerebellar lesions and cognitive impairment, in comparison or as add-ons to cognitive rehabilitation.

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

Berra E., Balsamo F., De Icco R., Tassorelli C., Sandrini G. Possibile effetto della stimolazione cerebellare transcranica a correnti dirette (tc-DCS) sulle funzioni cognitive in pazienti affetti da Sclerosi Multipla. Risultati preliminari di uno studio pilota. XVIII Congresso Nazionale SIRM, 5-6-7 Aprile 2018, Trieste

Berra E., Balsamo F., De Icco R., Tassorelli C., Bergamaschi R., Sandrini G. Effects of cerebellar transcranial direct current stimulation (tc-DCS) on reinforced feedback in virtual environment (RFVE) in multiple sclerosis (MS) patients with upper limb ataxia. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione ISM, 28-30 Maggio 2018, Roma

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 30,000

Franca Tecchio

Laboratory of Electrophysiology for Translational neuroscience, Istituto di Scienze e Tecnologie della Cognizione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Andrea Cancelli, Alessandro Giordani, Giampiero Asta, Arianna Pizzichino

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Ospedale Fatebenefratelli, Isola Tiberina, Roma

Fondazione Policlinico Gemelli, Roma

Alleviare la fatica nella sclerosi multipla mediante l'applicazione domiciliare di un trattamento personalizzato di neuromodulazione

PREMESSE E OBIETTIVI

Circa l'80% delle persone con sclerosi multipla (SM) lamenta un'intensa fatica, che rappresenta il sintomo più invalidante per più della metà di loro. I farmaci usati per trattare la fatica nella SM sono normalmente insufficienti, spesso senza effetto e frequentemente associati a gravi effetti collaterali. Lo scopo del presente progetto è quello di valutare l'efficacia in ambiente domestico di un trattamento di neuromodulazione che ha già dimostrato di alleviare la fatica da SM in ambiente ospedaliero. Il risultato principale è l'abbassamento del punteggio alla scala mFIS (modified Fatigue Impact Scale).

Tre considerazioni principali contribuiscono all'importanza del nostro progetto:

1. raggiungere l'ospedale o altri luoghi di trattamento su base giornaliera genera fatica, specialmente nelle aree congestionate e in condizioni climatiche estreme;
2. l'impostazione del trattamento a domicilio è semplice e facilmente gestibile dal paziente senza particolare assistenza o col supporto di un *caregiver* con competenze non specialistiche;
3. la semplicità dei trattamenti a domicilio promette di attuare ripetizioni per lunghi periodi di tempo.

RISULTATI

Abbiamo documentato (progetto FISM FaMuSNe Cod.2010/R/38, dati presentati) che l'intervento che intendiamo applicare a casa è stato utilizzato con successo in ospedale. Abbiamo implementato un trattamento di neuromodulazione per compensare specifici squilibri neuronali correlati alla stanchezza

da SM. Infatti, la letteratura indica nelle persone con SM affaticate, rispetto alle non-affaticate ed ai sani, un'alterata connettività funzionale tra le aree somatosensoriali primarie (S1) e motorie (M1), insieme ad una maggiore eccitabilità di M1 e una ridotta eccitabilità di S1. Quindi, abbiamo personalizzato l'elettrodo stimolante in forma e posizione, mirando ad aumentare selettivamente l'eccitabilità di S1 di tutto il corpo bilateralmente, senza influenzare direttamente l'eccitabilità di M1, regione corticale contigua. Tale personalizzazione è stata realizzata utilizzando l'esame di risonanza magnetica cerebrale (MRI) raccolta per la diagnosi ed il monitoraggio clinico (FaReMuS).

Il trattamento prevede una stimolazione transcranica in corrente diretta (tDCS) anodica sulla regione S1 con referenza occipitale centrale per 5 giorni consecutivi, 15 minuti al giorno. Due gruppi di dieci pazienti con SM affaticati hanno ricevuto FaReMuS con disegno dello studio clinico randomizzato (RCT), controllato con *sham*, in doppio cieco, cross-over, in ambiente clinico presso l'ospedale Fatebenefratelli-Isola Tiberina-Roma. Nei due gruppi, il trattamento ha avuto efficacia significativamente superiore da reale che da *sham*. FaReMuS ha ridotto la fatica in media del 34% del livello pre-stimolazione.

Il presente studio ha seguito lo stesso disegno, stessa dimensioni del campione (N=10) e stessi tempi dei due studi sopra. Per valutare l'affidabilità dei risultati sono stati arruolati due gruppi di pazienti indipendenti di pari dimensioni. I 20 pazienti sono stati arruolati entro il primo anno, per avere il tempo sufficiente ad attendere che il punteggio mFIS al secondo blocco

fosse simile a quello del primo blocco. Per ogni paziente, abbiamo realizzato l'elettrodo personalizzato sagomato sulle circonvoluzioni corticali del suo solco centrale bilaterale, come derivate dalla MRI cerebrale. L'elettrodo personalizzato è stato posizionato con precisione tramite neuronavigazione e fissato all'interno di una struttura ad elmetto adattabile alla testa del soggetto per consentire un affidabile riposizionamento a casa, la cui la precisione abbiamo testato con studio dedicato [1]. Questa struttura ha reso semplice il riposizionamento a casa sui 5 giorni.

Il punteggio alla mFIS è stato raccolto al momento dell'arruolamento, appena prima della stimolazione (T0) e alla fine del trattamento di 5 giorni e successivamente ogni 4 settimane, fino a che il punteggio di mFIS fosse simile al livello pre-trattamento.

FaReMuS ha prodotto un miglioramento di fatica del 30% del livello pre-trattamento, con 14 delle 20 per-

sone trattate *Responders* (con miglioramento >20%), mentre dopo Sham vi è stato un miglioramento medio dell'1% e nessuna persona *Responder*.

CONCLUSIONI

Questi risultati indicano che FaReMuS a casa è un trattamento promettente contro la fatica nelle persone con SM. Inoltre, abbiamo sviluppato nuovi progressi tecnologici, rimuovendo la neuronavigazione dall'intera procedura, in modo da consentire una facile applicazione di FaReMuS. In particolare, abbiamo identificato e testato le procedure via computerizzata dalla MRI encefalo per 1. sagomare l'elettrodo personalizzato (RePE); 2. posizionare RePE con una misure derivate dalla ricostruzione 3D della testa [1]. Queste procedure consentono l'applicazione di FaReMuS a casa del paziente e rendono FaReMuS facile da applicare in altri ospedali.

Fatigue Relief in Multiple Sclerosis by a Customized Neuromodulation treatment at Home [FaReMuS CuNe-H]

INTRODUCTION AND AIMS

Approximately 80% of individuals with multiple sclerosis (MS) complain of intense fatigue, which represents the most disabling symptom for more than half of them. Medications used to treat MS fatigue are normally insufficient, often of no effect and frequently with severe side effects. Aim of the present project is to assess the efficacy in the domestic environment of a neuromodulation treatment that has already proven to relieve MS fatigue in the hospital environment. Primary outcome is the lowering of the modified Fatigue Impact Scale (mFIS) score.

Three main considerations contribute to the importance of our project.

1. Getting to the hospital or other treatment places on a daily basis generates fatigue, especially in congested areas and in extreme climatic conditions.
2. The setting of home treatment is simple and easily managed by the patient without special assistance or with the support of a caregiver with non-specialist skills.
3. The simplicity of home treatments promises to implement repetitions over long periods of time.

RESULTS

We have documented that the intervention we in-

tend to apply at home was efficacious when applied in hospital (FISM project FaMuSNe Cod.2010/R/38). We have implemented a neuromodulation treatment to compensate for specific neuronal imbalances related to MS fatigue. In fact, the literature indicates signs in people with fatigued MS, compared to non-fatigued and healthy people, altered functional connectivity between primary somatosensory (S1) and motor (M1) areas, along with increased excitability of M1 and reduced excitability of S1. Thus, we have built custom stimulating electrode in form and position, aiming to increase selectively the excitability of S1 of the whole body bilaterally, without directly affecting the excitability of M1. This personalization was carried out using the brain magnetic resonance examination (MRI) collected for clinical diagnosis and monitoring (FaReMuS). The treatment involves a transcranial stimulation in direct current (tDCS) anodic on the S1 region with central occipital reference for 5 consecutive days, 15 minutes per day. Two groups of ten patients with fatigue MS received FaReMuS with a double-blind, cross-over clinical trial, sham-controlled, double-blind clinical trial design, at the Fatebenefratelli hospital, Tiberina Island, Rome. In the two groups, the treatment was significantly superior from real to sham. FaReMuS reduced

fatigue by an average of 34% of the pre-stimulation level.

The present study followed the same design, sample size (N = 10) and study times above. To assess the reliability of the results, we enrolled two independent groups of patients of the same size. We enrolled the 20 patients within the first year, to have enough time to wait for the mFIS score on the second block to be similar to that of the first block. For each patient, we have made the personalized regional electrode (RePE) shaped on his/her specific cortical circumvolutions of the bilateral central sulcus, as derived from the cerebral MRI. We positioned RePE precisely through neuronavigation, and we fixed it inside a helmet structure adaptable to the subject's head to allow reliable relocation at home, of which we tested the precision (*Cancelli et al FrontNeurosci 2018*). This structure made it easy to reposition RePE at home over the 5 days.

The mFIS score was collected at the time of enrollment, just before stimulation (T0) and at the end of

the 5-day treatment and subsequently every 4 weeks, until the mFIS score was similar to the pre-treatment level of the first block.

FaReMuS produced a 30% fatigue improvement of the pre-treatment level, with 14 out of the 20 treated people Responders (with improvement > 20%), whereas after Sham there was an average improvement of 1% and no person Responder.

CONCLUSIONS

These results indicate that FaReMuS at home is a promising treatment against fatigue in people with MS. Furthermore, we have developed new technological advances, removing neuronavigation from the entire procedure, to allow easy application of FaReMuS. In particular, we have defined and tested computerized procedures from the individual brain MRI for: 1) shaping RePE; 2) positioning RePE based on the 3D head reconstruction. These procedures make easier FaReMuS at patient's home and they enable to apply FaReMuS in other hospitals.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Cancelli A, Cottone C, Giordani A, Asta G, Lupoi D, Pizzella V, Tecchio F. MRI-guided regional personalized electrical stimulation in multisession and home treatments. *Front Neurosci.* 2018; 12:284. doi: 10.3389/fnins.2018.00284

Cottone C, Cancelli A, Pasqualetti P, Porcaro C, Salustri C, Tecchio F. A new, high-efficacy, non-invasive transcranial electric stimulation tuned to local neurodynamics. *J Neurosci.* 2018; 38(3):586-594. pii: 2521-16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2521-16.2017

Porcaro C, Cottone C, Cancelli A, Salustri C, Tecchio F. Functional Semi-Blind Source Separation Identifies Primary Motor Area Without Active Motor Execution. *Int J Neural Syst.* 2017 Sep 11:1750047. doi: 10.1142/S0129065717500472

Cancelli A, Cottone C, Giordani A, Migliore S, Lupoi D, Porcaro C, Mirabella M, Rossini PM, Filippi MM, Tecchio F. Personalized, bilateral whole-body somatosensory cortex stimulation to relieve fatigue in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2017 Jul 1:1352458517720528. doi: 10.1177/1352458517720528

Zappasodi F, Croce P, Giordani A, Assenza G, Giannantoni NM, Profice P, Granata G, Rossini PM, Tecchio F. Prognostic Value of EEG Microstates in Acute Stroke. *Brain Topogr.* 2017 Sep;30(5):698-710. doi: 10.1007/s10548-017-0572-0

Buyukturkoglu K, Porcaro C, Cottone C, Cancelli A, Inglesse M, Tecchio F. Simple index of functional connectivity at rest in Multiple Sclerosis fatigue. *Clin Neurophysiol.* 2017 May;128(5):807-813. doi: 10.1016/j.clinph.2017.02.010

Porcaro C, Di Lorenzo G, Seri S, Pierelli F, Tecchio F, Coppola G. O027. Sub-cortical sources of the somatosensory pathway are hypoactive in migraine interictally: a Functional Source Separation analysis. *J Headache Pain.* 2015;16 (Suppl 1):A55. doi: 10.1186/1129-2377-16-S1-A55

Mayhew SD, Porcaro C, Tecchio F, Bagshaw AP. fMRI characterisation of widespread brain networks relevant for behavioural variability in fine hand motor control with and without visual feedback. *Neuroimage.* 2017 Mar 1;148:330-342. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.01.017

Cottone C, Porcaro C, Cancelli A, Olejarczyk E, Salustri C, Tecchio F. Neuronal electrical ongoing activity as a signature of cortical areas. *Brain Struct Funct.* 2017; 222(5):2115-2126. doi: 10.1007/s00429-016-1328-4.

Vecchio F, Miraglia F, Porcaro C, Cottone C, Cancelli A, Rossini PM, Tecchio F. Electroencephalographic (EEG)-derived sensory and motor network topology in multiple sclerosis fatigue. *Neurorehabilitation & Neural Repair* 2017; 31(1):56-64

Smits FM, Porcaro C, Cottone C, Cancelli A, Rossini PM, Tecchio F. Electroencephalographic fractal dimension in healthy ageing and Alzheimer's Disease. *PLoS One* 2016; 11(2):e0149587

Tecchio F, Vecchio F, Ventriglia M, Porcaro C, Miraglia F, Siotto M, Rossini PM, Rongioletti M, Squitti R. Non-ceruloplasmin copper appears a distinct subtype of Alzheimer's disease: a study of EEG-derived brain activity. *Curr Alzh Res* 2016;13(12):1374-1384

Porcaro C, Di Lorenzo G, Seri S, Pierelli F, Tecchio F, Coppola G. Impaired brainstem and thalamic high frequency oscillatory EEG activity in migraine between Attacks. *Cephalalgia* 2016 . pii: 0333102416657146

Tecchio F, Cancelli A, Cottone C, Ferrucci R, Vergari M, Zito G, Pasqualetti P, Filippi MM, Ghazaryan A, Lupoi D, Smits FM, Giordani A, Migliore S, Porcaro C, Salustri C, Rossini PM, Priori A. Brain plasticity effects of neuromodulation against multiple sclerosis fatigue. *Frontiers in Neurology* 2015; 6:141

Cogliati Dezza I, Zito G, Tomasevic L, Filippi MM, Ghazaryan A, Porcaro C, Squitti R, Ventriglia M, Lupoi D, Tecchio F. Functional and structural balances of homologous sensorimotor regions in multiple sclerosis fatigue. *J Neurol.* 2015; 262(3):614-22. doi: 10.1007/s00415-014-7590-6

Tecchio F, Cancelli A, Cottone C, Zito G, Pasqualetti P, Ghazaryan A, Rossini PM, Filippi MM. Multiple sclerosis fatigue relief by bilateral somatosensory cortex neuromodulation. *J Neurol.* 2014 Aug;261(8):1552-8. doi: 10.1007/s00415-014-7377-9

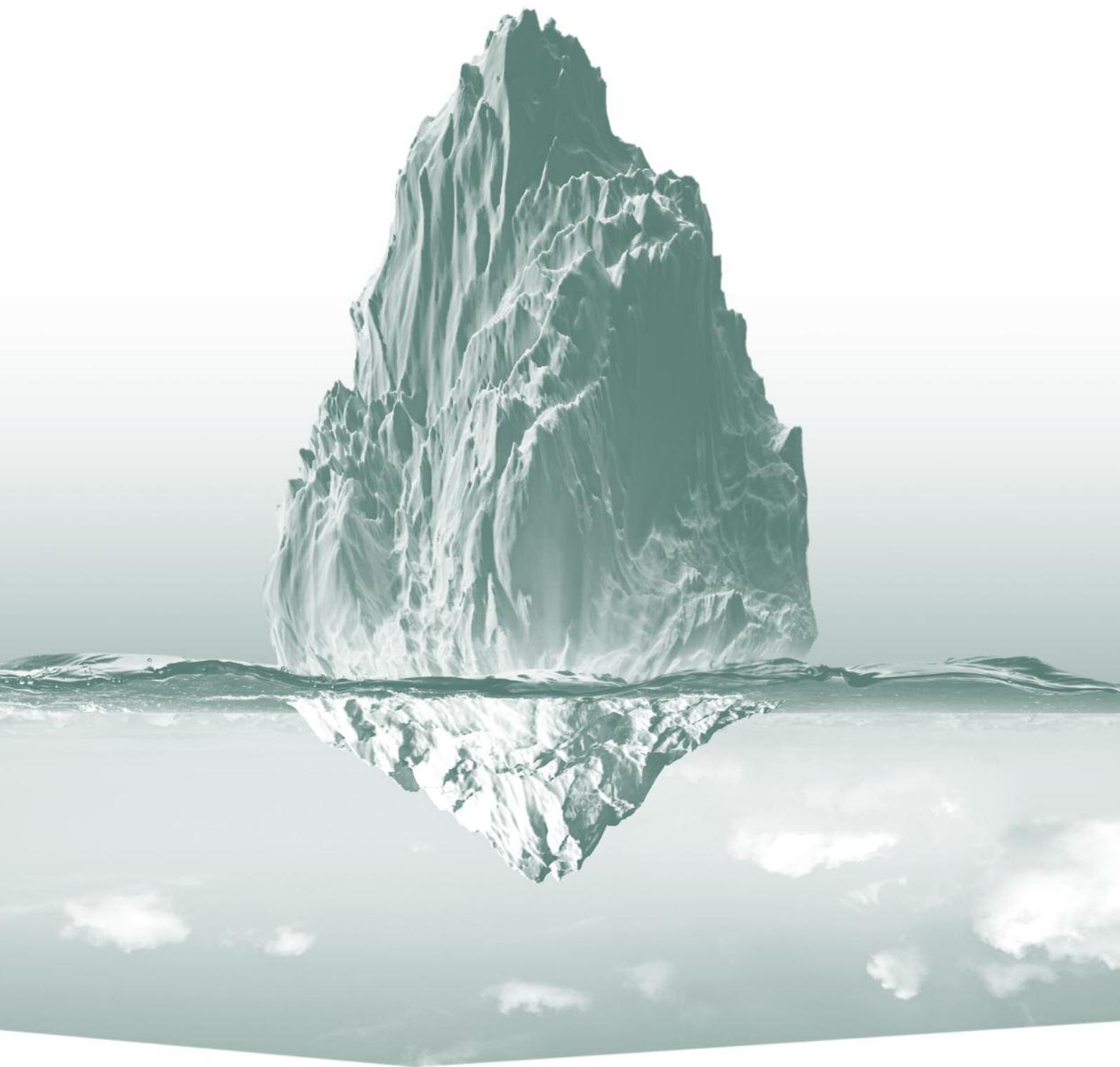
Zito G, Luders E, Tomasevic L, Lupoi D, Toga AW, Thompson PM, Rossini PM, Filippi MM, Tecchio F. Inter-hemispheric functional connectivity changes with corpus callosum morphology in multiple sclerosis. *Neuroscience.* 2014; 266:47-55. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.039

Tomasevic L, Zito G, Pasqualetti P, Filippi M, Landi D, Ghazaryan A, Lupoi D, Porcaro C, Bagnato F, Rossini P, Tecchio F. Cortico-muscular coherence as an index of fatigue in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013 Mar;19(3):334-43. doi: 10.1177/1352458512452921. PubMed PMID: 22760098

Dell'Acqua ML, Landi D, Zito G, Zappasodi F, Lupoi D, Rossini PM, Filippi MM, Tecchio F. Thalamocortical sensorimotor circuit in multiple sclerosis: an integrated structural and electrophysiological assessment. *Hum Brain Mapp.* 2010; 31(10):1588-600. doi: 10.1002/hbm.20961

Tecchio F, Zito G, Zappasodi F, Dell'Acqua ML, Landi D, Nardo D, Lupoi D, Rossini PM, Filippi MM. Intra-cortical connectivity in multiple sclerosis: a neurophysiological approach. *Brain.* 2008 Jul;131(Pt 7):1783-92. doi: 10.1093/brain/awn087

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 40.000 €
Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years (extended by 1 year) and the amount of € 40,000



DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA MALATTIA

DIAGNOSIS AND MONITORING OF THE DISEASE

Graziella Filippini

Direzione Scientifica, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Andrea Fittipaldo, Liliana Coco, Direzione Scientifica, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

Patrizia Meroni, Ufficio Relazioni con il Pubblico IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Cinzia Colombo, Paola Mosconi, Laboratorio di Ricerca per il Coinvolgimento dei Cittadini in Sanità, Dipartimento di Salute Pubblica, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Milano

Paolo Confalonieri, Centro Sclerosi Multipla, Unità di Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

Nicola De Stefano, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Neuroscienze Università degli Studi Siena, Siena

Simonetta Gerevini, Unità di Neuroradiologia, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Loredana La Mantia, Marco Rovaris, Istituto Scientifico Santa Maria Nascente, Fondazione ONLUS Don C. Gnocchi, Milano

Silena Trevisan, Paolo Galeazzi, Anita Pariani, componenti del Comitato Guida

Isabella Baroni, Roberta Guglielmino, Silvia Traversa, Paola Zaratin, AISM, Genova

IN-DEEP - Integrare le esperienze e le preferenze delle persone con SM con i risultati della ricerca per sviluppare informazioni utili per decisioni informate e condivise: i test diagnostici

PREMESSE E OBIETTIVI

Il progetto è un'estensione di IN-DEEP (Bando FISM 2010) e ha inteso sviluppare e valutare un modello informativo online per le persone con sclerosi multipla (SM) sulla Risonanza Magnetica (RM).

Gli esami medici sono una componente fondamentale dell'assistenza sanitaria. Negli ultimi anni sono aumentati gli studi su come riassumere in linguaggio semplice e in modi accessibili i risultati della ricerca sull'accuratezza e l'utilità degli esami medici. Tuttavia è stata data meno attenzione a come rendere l'informazione significativa e applicabile a livello personale.

Sono disponibili pochi dati su come le persone con sclerosi multipla integrano le informazioni scientifiche sugli esami medici con le loro preferenze per l'informazione e le loro esperienze con la ricerca online di informazioni.

Nella prima fase del progetto abbiamo esplorato con le persone con sclerosi multipla le loro esperienze con la risonanza magnetica, e come esse trovano, valutano e usano le informazioni online, cioè il ruolo dell'esame nel processo diagnostico, nel monitoraggio della malattia e delle terapie. Abbiamo sviluppato un modello informativo per sintetizzare le risposte alle

domande che le persone hanno posto e a seguire abbiamo costruito il sito web su due livelli di complessità. L'ultima fase di valutazione del sito è in corso e servirà a valutare se le informazioni che abbiamo dato rispondono ai bisogni delle persone con sclerosi multipla, se sono chiare e utili.

RISULTATI

Il sito web IN-DEEP è disponibile online (www.istituto-besta.it/in-deep-risonanza-magnetica2 -finalizzato il 10/2018). Abbiamo sviluppato i contenuti e le sezioni in base ai risultati di tre incontri con 25 persone con sclerosi multipla. Tutti i partecipanti hanno concordato sul fatto che vi è una scarsa disponibilità online di informazioni sulla risonanza magnetica che sono utili a livello personale.

Le domande sono state numerose; le più frequenti: "Qual è la relazione tra i sintomi, lo stato soggettivo e le immagini di risonanza magnetica?" "Cosa può dire la risonanza magnetica su come andrà la malattia nel tempo?" "Quali sono i rischi di ripetere la risonanza magnetica con mezzo di contrasto più volte l'anno?". Molti partecipanti hanno chiesto anche informazioni pratiche sull'esame. Abbiamo tradotto questi bisogni informativi in quesiti di ricerca. Abbiamo valutato revisioni sistematiche e linee guida di diagnosi e di prognosi sulla risonanza magnetica nella sclerosi multipla e valutato gli studi disponibili e i documenti delle agenzie regolatorie sulla sicurezza dei mezzi di contrasto con gadolinio.

Il sito IN-DEEP include quattro sezioni principali:

- 1) qual è il ruolo della risonanza magnetica nel processo di diagnosi della sclerosi multipla?
 - 2) qual è il suo valore nel corso della malattia?
 - 3) vi sono rischi con la risonanza magnetica e i mezzi di contrasto con gadolinio?
 - 4) informazioni pratiche, ad esempio come prepararsi all'esame, quali domande fare al neurologo o al radiologo.
- Nel sito vi sono anche sezioni di apprendimento, di

metodologia della ricerca sugli esami medici, un glossario, moduli per valutare le informazioni mediche, sezioni con storie personali.

Tutte le fasi del progetto sono state discusse in un Comitato Guida multidisciplinare composto da neurologi, persone con sclerosi multipla, ricercatori, esperti in comunicazione.

Nel novembre 2018, la Fondazione Besta ha lanciato un nuovo sito web e abbiamo trasferito IN-DEEP sul nuovo sito, adattandone il layout e la struttura. A seguito di questa imprevista fase di lavoro, l'indagine di valutazione del sito IN-DEEP è stata posticipata all'inizio del 2019 ed è attualmente in corso.

CONCLUSIONI

Il progetto IN-DEEP ha permesso di sviluppare una risorsa di informazione online sulla risonanza magnetica per le persone con sclerosi multipla. Abbiamo sviluppato il sito web IN-DEEP in stretta collaborazione con le persone con sclerosi multipla. Le informazioni disponibili sul sito sono il risultato di un'analisi critica delle linee guida discusse e concordate con il comitato guida del progetto. Il sito web include due livelli di complessità ed è stato sviluppato secondo i seguenti principi: 1) utilizzo di evidenze di alta qualità accessibili e significative per le persone con sclerosi multipla; 2) metodi di trasferimento delle conoscenze scientifiche (es. contenuti espressi con parole, dati, figure); 3) collaborazione con un gruppo multidisciplinare qualificato, con persone con sclerosi multipla. Gli aspetti caratteristici e innovativi del sito sono: la disponibilità di informazioni che rispondono ai bisogni informativi delle persone con sclerosi multipla, la disponibilità di una rigorosa metodologia, l'inclusione delle incertezze delle conoscenze scientifiche, la disponibilità di strumenti di apprendimento. Il sito sarà valutato da persone con sclerosi multipla per la chiarezza e utilità dei contenuti e per la sua navigabilità e i risultati saranno presentati al prossimo congresso FISM.

IN-DEEP-Integrating and deriving evidence, experiences, preferences. Developing research-based health information applicable to decision making and self-management by people with MS: diagnostic tests

INTRODUCTION AND AIMS

This project is an extension of the IN-DEEP project (FISM 2010) and aims to develop an online information resource for persons with MS (PwMS) about magnetic resonance imaging (MRI).

Medical tests are a critical component of health care. Research is growing about how to summarise evidence in lay language and accessible ways but less focus has been given to what may be needed to make evidence meaningful and applicable to one's personal

situation. There is a paucity of data on how PwMS integrate evidence-based information on medical tests with their preferences for information and experiences with information seeking.

In the first stage of the project, we explored with PwMS how they find, assess and use information on MRI, specifically information from research about explanation of MRI, how the test is performed, its role in the diagnostic process and aspects of diagnostic accuracy, disease monitoring, and treatment response. Drawing from experiences of PwMS, in the second stage we generated the themes of the information and in the third stage we developed the website that comprises two layers of complexity and is in Italian language. The fourth stage is ongoing and it aims to evaluate the website, i.e. that it is meeting information needs of PwMS and helps them to find and assess information for managing their health.

RESULTS

The IN-DEEP website is available online <https://www.istituto-besta.it/in-deep-risonanza-magnetica2> (finalized in October 2018). We developed contents and sections according to the results of three meetings with 25 PwMS. Participants described that there was little MRI information online that applied to them. The availability of up-to-date and unbiased information, including correlation between symptoms and imaging, MRI accuracy for diagnosis and prognosis, risks of gadolinium, and practical information, was important to many. Variations in information seeking behaviour was reported by some participants according to their changing information needs, their emotional state and growing expertise about MS.

These information needs were re-framed into research questions. To answer these questions, we assessed systematic reviews and guidelines on MRI as a diagnostic and prognostic tool, studies and documents from regulatory agencies on risks and safety of gadolinium.

The IN-DEEP website includes four main sections:

- 1) What is the role of MRI in the diagnostic process of MS?
- 2) What is its role during the course of the disease?

3) Is there any risk in doing MRI and receiving gadolinium contrast agents?

4) Practical information, e.g. how to prepare for an MRI exam; questions to ask to neurologist and radiologist. Additional information were added, including critical appraisal skills sections, methodological information, a glossary, forms to assess healthcare information, sections with personal stories. Each pivotal step was discussed with the multidisciplinary Advisory Board, composed by neurologists, PwMS, researchers, experts in communication.

On November 2018, the Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta launched a new website and the software company in charge of the Besta website changed. Due to this change, the IN-DEEP website had to move to the new one, adapting the contents. Due to the time needed to adapt the layout and the contents' structure, the evaluation survey of the website was moved to the beginning of 2019, and is now under development.

CONCLUSIONS

The IN-DEEP project aimed to develop an information resource for PwMS about MRI. We developed a website in close cooperation with PwMS. Content was based on evidence-based information concepts based on guidelines. The website comprises two layers of complexity and is going to be evaluated based on survey aimed at PwMS. The framework of the IN-DEEP project refers to these cornerstones: i) high-quality evidence accessible and meaningful to PwMS; ii) informed by knowledge translation principles, i.e. layered information through numbers, words and pictures; iii) partnership driven, informed by PwMS and their representatives.

Deepening methodological aspects, presenting uncertainties, providing critical appraisal tools, introducing personal stories are some of the distinctive and innovative aspects of the IN-DEEP website.

The website is going to be assessed by PwMS in terms of clarity, usefulness, and navigability. According to the results, we think this could be a useful information resource for PwMS and clinicians, to be used within the clinical encounter.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Colombo C, Filippini G, Synnot A, Hill S, Guglielmino R, Traversa S, Confalonieri P, Mosconi P, Tramacere I. Development and assessment of a website presenting evidence-based information for people with multiple sclerosis: the IN-DEEP project. *BMC Neurol.* 2016;16:30. doi: 10.1186/s12883-016-0552-0

Synnot AJ, Hill SJ, Garner KA, Summers MP, Filippini G, Osborne RH, Shapland SD, Colombo C, Mosconi P. Online health information seeking: how people with multiple sclerosis find, assess and integrate treatment information to manage their health. *Health Expect.* 2016; 19(3):727-37. doi: 10.1111/hex.12253

Colombo C, Mosconi P, Confalonieri P, Baroni I, Traversa S, Hill SJ, Synnot AJ, Oprandi N, Filippini G. Web search behavior and information needs of people with multiple sclerosis: focus group study and analysis of online postings. *Interact J Med Res.* 2014;3(3):e12. doi: 10.2196/ijmr.3034

Hill S, Filippini G, Synnot A, Summers M, Beecher D, Colombo C, Mosconi P, Battaglia MA, Shapland S, Osborne RH, Hawkins M. Presenting evidence-based health information for people with multiple sclerosis: the IN-DEEP project protocol. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2012; 12:20. doi: 10.1186/1472-6947-12-20

Colombo C, Confalonieri P, Rovaris M, La Mantia L, Galeazzi P, Trevisan S, Pariani A, Gerevini S, De Stefano N, Guglielmino R, Mosconi P, Filippini G. The IN-DEEP project "INtegrating and Deriving Evidence, Experiences, Preferences" on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. A mixed method approach to developing a research-based information website for people with multiple sclerosis. Protocol. Submitted to BMJOpen

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 3 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 150.000 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 3 years (extended by 6 months) and the amount of € 150,000

Laura Bonzano

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

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Marco Bove, Ambra Bisio, Gianluigi Mancardi, Ludovico Pedullà, Piero Ruggeri

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Marta Bortoletto, Carlo Miniussi, Claudia Fracassi, Alice Bollini, Simona Finazzi, IRCCS Centro San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia

Flavia Mattioli, Ruggero Capra, Roberto Gasparotti, ASST Spedali Civili di Brescia, Brescia

Caratteristiche temporali e spaziali del trasferimento interemisferico di informazioni nella SM: un approccio multimodale di coregistrazione TMS-EEG, MRI e apprendimento motorio

PREMESSE E OBIETTIVI

La demielinizzazione che si verifica nella sclerosi multipla (SM) causa deficit nelle proprietà conduttive degli assoni, alterando i segnali elettrici nel sistema nervoso centrale. Il Corpo Calloso (CC), un insieme di assoni commissurali che collegano i due emisferi cerebrali, è comunemente colpito nella SM; quindi, lo studio del trasferimento di informazioni interemisferiche attraverso le fibre callosali è di grande interesse per la ricerca sulla SM.

L'Imaging con Tensore di Diffusione (DTI) ha dimostrato una ridotta integrità strutturale della sostanza bianca nella SM, associata a disabilità: alterazioni del CC possono influenzare funzioni specifiche sulla base della regione coinvolta, da deficit cognitivi a sensori-motori. Tuttavia, la risonanza magnetica non spiega completamente il declino cognitivo e motorio nella SM. La coregistrazione della stimolazione magnetica transcranica e dell'elettroencefalografia (TMS-EEG) è una tecnica all'avanguardia che può tracciare connessioni interemisferiche con alta risoluzione temporale, potenzialmente rivelando l'alterazione della propagazione interemisferica del segnale in fasi iniziali della malattia.

Pertanto, il nostro progetto originale prevedeva un approccio multimodale, combinando DTI e TMS-EEG, per comprendere meglio le alterazioni anatomo-fisiologiche del CC nella SM e la loro associazione con al-

terazioni funzionali, misurate in un compito bimanuale che richiede il trasferimento di informazioni interemisferico. Nel progetto pilota di un anno che è stato finanziato, abbiamo mirato a sviluppare i paradigmi appropriati in un gruppo di volontari sani e a testare la fattibilità del progetto con persone con SM (PwMS).

RISULTATI

L'attività condotta comprende due fasi. La prima parte del progetto è stata dedicata alla configurazione della procedura sperimentale. In particolare, l'implementazione della sessione di TMS-EEG è stata impegnativa in quanto ha richiesto modifiche sostanziali all'apparecchiatura, incluse modifiche dell'hardware e la creazione di un nuovo software, al fine di registrare le risposte evocate da TMS (TEPs) durante un'attività motoria. Alla fine, abbiamo validato il protocollo sperimentale implementato su un gruppo di controlli sani sottoposti a valutazione clinica, DTI, TMS-EEG e compito motorio.

Questi dati hanno mostrato una relazione lineare tra TEPs e misure DTI, indicando che la propagazione del segnale attraverso il CC è correlata alla sua integrità strutturale. Inoltre, abbiamo trovato una direzionalità della propagazione del segnale a seconda dell'emisfero stimolato, suggerendo che i TEPs possono offrire informazioni sulla direzionalità delle fibre che

non possono essere dedotte dal DTI.

Nella seconda fase, abbiamo testato la fattibilità del paradigma nella SM reclutando un piccolo gruppo di PwMS sottoposte alle stesse sessioni. Questi pazienti sono stati in grado di eseguire i compiti e completare l'esperimento, fornendo così dati chiari. Una corretta analisi statistica per confrontare i due gruppi potrebbe essere eseguita raggiunto un numero sufficiente di pazienti; questo non era possibile nell'ambito del progetto pilota.

Tuttavia, il gruppo di PwMS ha mostrato ridotte capacità di coordinazione bimanuale rispetto al gruppo di controllo. Visivamente, i TEPs sono stati modulati dalla condizione di attività e sono risultati diversi tra i due gruppi. Il gruppo di PwMS ha mostrato alterati parametri derivati dal DTI, indicando ridotta integrità dei fasci di fibre di sostanza bianca studiati.

CONCLUSIONI

Questo innovativo approccio multimodale potrebbe consentire una valutazione diretta della funzionalità del CC nella SM e della sua relazione con il danno microstrutturale e gli esiti comportamentali. Alcune caratteristiche, come facilità di misura, non invasività,

basso costo, rendono la coregistrazione TMS-EEG particolarmente interessante. Pertanto, questo progetto potrebbe avere un impatto diretto sulla ricerca clinica nella SM fornendo uno strumento economico per valutare alterazioni strutturali e funzionali delle connessioni interemisferiche, utili per monitorare gli effetti del trattamento, con potenziale trasferimento nella pratica clinica.

Il CC è cruciale per le interazioni emisferiche che mantengono l'elaborazione indipendente e integrano le informazioni tra gli emisferi ed è una delle componenti del processo patologico alla base del declino cognitivo e sensorimotorio nella SM. La migliore comprensione della funzionalità del CC e della "patologia" è necessaria per migliorare la gestione della SM. Infatti, lo studio della velocità di trasferimento di informazioni attraverso le fibre callosali è di grande interesse per la comprensione della SM e dei substrati neurali dei deficit cognitivi e sensorimotori che possono compromettere le attività quotidiane. La nostra metodologia può far luce sulle conseguenze della degradazione della mielina e sui substrati neuro-anatomici delle disabilità cognitive e sensorimotorie nella SM.

Temporal and spatial features of interhemispheric information transfer in MS: a multimodal approach of TMS-EEG coregistration, MRI and motor learning

INTRODUCTION AND AIMS

Demyelination occurring in multiple sclerosis (MS) causes deficits in the conducting properties of axons, altering electrical signaling in the central nervous system. The Corpus Callosum (CC), a set of commissural axons connecting the two cerebral hemispheres, is commonly affected in MS; thus, the study of interhemispheric information transfer through callosal fibers is of great interest in MS research.

Diffusion Tensor Imaging (DTI) has demonstrated reduced white matter structural integrity in MS, associated with disability: CC alterations can impact specific functions on the basis of the CC region involved, ranging from cognitive to sensorimotor deficits. However, MRI does not completely explain cognitive and motor decline in MS.

The coregistration of Transcranial Magnetic Stimulation and Electroencephalography (TMS-EEG) is a cutting-edge technique that can trace interhemispheric connections with high temporal resolution, poten-

tially uncovering altered interhemispheric signal propagation at early disease stages.

Therefore, our main project employed a multimodal approach, combining DTI and TMS-EEG, to better understand the anatomo-physiological alterations of the CC in MS and their association with functional impairments, as measured in a bimanual finger tapping paradigm requiring interhemispheric information transfer. In the one-year pilot project that has been funded, we aimed at developing the appropriate paradigms in a group of healthy volunteers and testing the feasibility of the project with people with MS (PwMS).

RESULTS

The conducted activity included two phases. The first part of the project was devoted to configure the experimental procedure. Specifically, the TMS-EEG coregistration session implementation was challenging as it required substantial modifications to the equipment, including hardware changes and the cre-

ation of a new software, in order to register TMS-evoked potentials (TEPs) during a motor task. Eventually, we validated the implemented experimental protocol on a group of healthy controls (HC) who underwent clinical assessment, DTI, TMS-EEG and motor task.

Crucially, these data showed a linear relationship between TEPs and MRI measures, indicating that signal propagation through the CC was related to its structural integrity. Moreover, we found a directionality of signal propagation depending on the stimulated hemisphere, suggesting that TEPs may offer information on the directionality of fibers that cannot be inferred from DTI.

In the second phase, we tested the feasibility of the paradigms in MS by recruiting a small group of PwMS who underwent the same sessions as HC. They were able to complete the experiment and perform the tasks; the experimental paradigms were suited to obtain clear data. Proper statistical analyses to compare the two groups could be performed once a sufficient number of patients has been tested, and this was not possible within the pilot project.

However, PwMS showed decreased bimanual coordination skills than HC. Visually, TEPs in PwMS were modulated by the task condition and different from TEPs in HC. PwMS showed altered DTI-derived parameters, indicating reduced integrity of the investigated white matter fiber bundles.

CONCLUSIONS

This innovative multimodal approach could be applied to a group of people with MS to allow a direct assessment of CC functionality and its relationship with microstructural damage and behavioral outcomes. Several features like easy-to-obtain single-subject measures, non-invasiveness, low-cost, make TMS-EEG particularly attractive. Therefore, this project could have a direct impact on clinical research in MS by providing an affordable tool to assess structural and functional alterations of interhemispheric connections, useful to monitor treatment effects, with potential translation into clinical practice.

The CC is crucial for the interhemispheric interactions that maintain independent processing and integrate information between both hemispheres, and is one of the components of the complex pathological process on the basis of cognitive and sensorimotor declines in MS. The improved understanding of CC functionality and “pathology” is needed to improve the management of MS. Indeed, the study of the speed of interhemispheric information transfer through callosal fibers is of great interest for the understanding of MS and of the neural substrates of cognitive and sensorimotor deficits which can impair daily activities. Our methodology can shed light on the consequences of myelin degradation and on the neuro-anatomical substrates of cognitive and sensorimotor impairments in MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Bonzano L, Bollini A, Finazzi S, Mattioli F, Gasparotti R, Pedullà L, Bisio A, Mancardi GL, Capra R, Miniussi C, Ruggeri P, Bove M, Bortoletto M. Temporal and spatial features of interhemispheric information transfer in multiple sclerosis: a multimodal approach of TMS-EEG coregistration, MRI and motor learning. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 28-30 maggio 2018

Bortoletto M, Bollini A, Finazzi S, Mattioli F, Bisio A, Miniussi C, Ruggeri P, Bove M, Bonzano L. Temporal and spatial features of interhemispheric information transfer in the motor system: a TMS-EEG and DTI study. XXVI Congresso della Società Italiana di Psicofisiologia e Neuroscienze Cognitive (SIPF), Torino, 15-17 Novembre 2018

Bortoletto M, Bollini A, Finazzi S, Mattioli F, Bisio A, Miniussi C, Ruggeri P, Bove M, Bonzano L. Interhemispheric information transfer in the motor system: a TMS-EEG and DTI study. Transcranial Brain Stimulation in Cognitive Neuroscience Workshop, Rovereto, 6-7 Dicembre 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno (prorogato di 4 mesi) e l'ammontare di 40.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year (extended by 4 months) and the amount of € 40,000

Maria Assunta Rocca

Neuroimaging Research Unit, INSPE, Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele e Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Massimo Filippi, Andrea Falini, Giancarlo Comi, Paola Valsasina, Elisabetta Pagani, Laura Vacchi, Ermelinda De Meo

Definizione dei correlati di RM funzionale e strutturale della presenza di disabilità clinica e compromissione cognitiva nei pazienti con SM pediatrica

PREMESSE E OBIETTIVI

L'esordio della sclerosi multipla (SM) avviene durante l'infanzia in una percentuale fino al 10% dei pazienti. Nonostante il tasso di ricadute più elevato e la tendenza a formare lesioni di dimensioni maggiori rispetto alla popolazione adulta, i pazienti con SM ad esordio pediatrico (ped-SM) impiegano più tempo ad accumulare un pari grado di disabilità e ad evolvere nella forma secondariamente progressiva di malattia. In questo contesto appare interessante indagare l'impatto della SM su un cervello in via di sviluppo, e stabilire se il limitato coinvolgimento iniziale del sistema nervoso centrale (SNC) rappresenti un fattore protettivo nei confronti dell'esordio della sintomatologia clinica oppure conferisca una maggior vulnerabilità sul lungo termine. Al fine di fornire una risposta a tali quesiti, abbiamo applicato tecniche di Risonanza Magnetica (RM) avanzata, che negli ultimi anni si è dimostrata un valido strumento per esplorare *in vivo* i meccanismi patologici della SM.

Gli obiettivi del presente progetto possono essere riassunti in 3 punti:

Indagare l'“effetto maturazione” nei pazienti con ped-SM: abbiamo in programma di definire le traiettorie di maturazione dei fasci di sostanza bianca (SB) e delle strutture di sostanza grigia (SG) in un'ampia coorte di bambini sani e di stimare quindi lo scostamento da queste traiettorie dei pazienti pediatrici con SM;

Esplorare il “ruolo protettivo” del coinvolgimento funzionale e strutturale nella ped-SM: nei pazienti con ped-SM già valutati presso la nostra Unità, verrà effettuato un follow-up clinico, neuropsicologico e di RM a distanza di tre anni al fine di individuare le strutture coinvolte nella progressione di malattia e di identificare alterazioni di RM correlate al declino clinico

e cognitivo;

Valutare “la vulnerabilità tardiva al danno” nella ped-SM: saranno confrontate misure cliniche, neuropsicologiche e di RM di ped-MS e di pazienti adulti con SM (ad-SM) per definire l'estensione e la localizzazione del danno in base all'età d'esordio e la loro rilevanza clinica.

RISULTATI

“Effetto maturazione” nella SM ad esordio pediatrico: danno cerebrale e compromissione cognitiva:

- Abbiamo esplorato l'integrità strutturale e funzionale del sistema dell'attenzione sostenuta nei ped-SM ed il suo ruolo nella compromissione cognitiva, individuando in una disregolazione funzionale, a sua volta determinata da sottostanti alterazioni delle connessioni strutturali, un possibile substrato della compromissione cognitiva globale.
- Alla luce del ruolo centrale dal danno talamico nella SM, abbiamo esplorato i meccanismi patogenetici sottostanti con l'applicazione di tecniche di RM quantitativa. Le alterazioni osservate hanno suggerito l'esistenza di processi eterogenei alla base del danno talamico individuando questa struttura come un barometro della patologia neuronale nella SM.
- Abbiamo analizzato le alterazioni corticali, note per essere correlate alle funzioni cognitive, nei ped-SM. Alterazioni corticali in regioni strategiche come precuneo e corteccia del cingolo, solo parzialmente correlate alle lesioni della SB, sono apparse contribuire alla compromissione cognitiva in questi pazienti, suggerendo la presenza di una degenerazione primitiva della SG così come un effetto della malattia sullo sviluppo corticale.

“Ruolo protettivo” del coinvolgimento strutturale e funzionale nei ped-SM:

Abbiamo individuato il pattern spaziale dell’atrofia della SG nei ped-SM, i cambiamenti dinamici nel tempo e la sua rilevanza clinica. Un’alterazione nella maturazione della SG, soltanto parzialmente guidata dall’infiammazione è stata individuata nei ped-SM, suggerendo l’esistenza di fenomeni neurodegenerativi precoci alla base della disabilità clinica, tuttavia si è anche osservato che una maggior riserva cognitiva contrasta questo tipo di danno.

“Vulnerabilità tardiva”: confronto tra ped-SM e ad-SM:

Al fine di esplorare la vulnerabilità tardiva al danno nei ped-SM e quindi definire la caratterizzazione topografica del danno cerebrale a seconda dell’età di esordio abbiamo confrontato ped-SM e ad-SM. Un differente pattern di alterazioni strutturali è stato individuato a seconda dell’età di esordio, enfatizzando la presenza di una miglior risposta compensatoria nei ped-SM seppur limitata nel tempo.

Esplorando la connettività funzionale in questi pazienti abbiamo individuato la plasticità funzionale come meccanismo protettivo contro la disabilità clinica nei ped-SM.

CONCLUSIONI

I risultati di questo progetto hanno identificato l’esistenza di un danno cerebrale sin dalle fasi più precoci della SM, che vede alla base sia fenomeni infiammatori che neurodegenerativi. In aggiunta ai meccanismi patogenetici della malattia, l’esordio della SM in età pediatrica ha un impatto anche sui meccanismi di maturazione del SNC, con conseguenze in termini di performance cognitiva. Il talamo, rispecchiando ciò che avviene a livello dell’intero encefalo, è stato individuato come un potenziale target nel monitoraggio della malattia. L’esistenza di processi eterogenei alla base del danno cerebrale enfatizza la necessità di porre una diagnosi precoce e di individuare strategie neuroprotettive mirate.

Mapping functional and structural MRI correlates of clinical disability and cognitive impairment in pediatric MS patients

INTRODUCTION AND AIMS

Up to 10% of MS patients experience their first attack during childhood. Despite a relatively higher relapse rate and the tendency to form larger brain lesions compared to their adult counterparts, patients with pediatric-onset (PO) MS take longer to accrue similar levels of disability and to evolve to secondary progressive disease course. Within this framework, it appeared interesting to investigate the impact of MS on a developing brain. A fundamental point that remains to be elucidated is whether such a limited central nervous system (CNS) functional and structural involvement in POMS might protect against the onset of clinical deficits or, conversely, confers a vulnerability to accelerated CNS damage later on in the disease course. In order to explore these unresolved questions, we applied advanced magnetic resonance imaging (MRI) techniques that during the last decades have proven to be a powerful tool to investigate *in vivo* MS pathology.

In details, the aims of this project can be summarized in three points:

Investigate “maturational effects” in POMS patients: we planned to assess developmental trajectories of white

matter (WM) and gray matter (GM) structures in a large cohort of pediatric healthy subjects and to estimate the deviations of POMS from normative data;
Explore the “protective role” of functional and structural involvement in POMS: a clinical, neuropsychological and MRI follow-up after three years was performed in POMS patients already assessed at our Unit to establish the brain compartments involved with disease progression and to identify MR correlates of clinical and cognitive worsening;

Assess “later vulnerability to damage” in POMS: clinical, neuropsychological and advanced MRI measures of adult MS patients with the onset of the disease during childhood were compared to those of patients with an onset during adulthood to define the extent and topography of brain damage according to age of MS onset and their clinical relevance.

RESULTS

Investigate “maturational effects” in POMS: brain damage and its correlation with cognitive impairment:

- We explored the structural and functional integrity of the sustained attention system in patients with pediatric MS and its effect on cognitive impairment

individuating in the inefficient regulation of the functional interaction between different areas of this system, due to abnormal WM integrity, as a potential substrate of global cognitive impairment.

- Considering the central role of thalamic pathology in MS, we assessed pathological mechanisms underlying microstructural thalamic damage in POMS patients by applying quantitative MRI techniques. The abnormalities we observed suggested that thalamic damage is determined by heterogeneous pathological processes, thus individuating the thalamus as a critical barometer of diffuse neuronal pathology in MS.
- We explore the role cortical abnormalities, known to be related to cognitive performance, in POMS patients. We found that cortical abnormalities in strategic regions, such as the precuneus and cingulate cortex, contribute to cognitive impairment in these patients and are only partially related to WM lesions, thus suggesting the presence of early primary GM degeneration as well as an effect of the disease on cortical developmental trajectories.

Explore the “protective role” of functional and structural involvement in POMS:

We assessed the spatial patterns of GM atrophy in POMS patients, their dynamic changes over time and their clinical relevance. We found that impaired GM maturation – only partially driven by WM inflammation – occurs in POMS patients, suggesting that early neurodegenerative phenomena contribute to dis-

ability. Higher cognitive reserve may offer protection by promoting remodeling of GM pruning in this young age.

Assess “later vulnerability to damage” in POMS:

In order to assess “later vulnerability to damage” in POMS patients, we compared POMS to adult onset (AOMS) patients. A different pattern of structural damage according to the age at the disease onset was found thus emphasizing the presence of higher compensatory response to damage in POMS, despite limited over time. Exploring functional connectivity in these patients we found that functional brain plasticity is likely to protect POMS patients from clinical disability accrual.

CONCLUSIONS

The results of this project have allowed to demonstrate that brain damage occurs from the earliest stages of disease, including both inflammatory and neurodegenerative processes. In addition to disease-related pathological processes, the onset of MS in pediatric age also influences the maturational trajectories of the CNS, with an impact on the clinical manifestations of the disease, including cognitive abilities. The thalamus mirrors whole brain pathology, thus representing a potential target for disease monitoring. The heterogeneous processes underlying brain damage emphasize the need of making an early diagnosis and developing tailored neuroprotective strategies.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

De Meo E, Moiola L, Ghezzi A, Veggiotti P, Capra R, Amato MP, Pagani E, Fiorino A, Pippolo L, Pera MC, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. MRI substrates of sustained attention system and cognitive impairment in pediatric MS patients. *Neurology* 2017; 89: 1265-1273 [Epub ahead of print 18 August 2017; doi: 10.1212/WNL.0000000000004388]

De Meo E, Meani A, Moiola L, Ghezzi A, Veggiotti P, Filippi M, Rocca MA. Dynamic gray matter volume changes in pediatric multiple sclerosis: a 3.5 year MRI study. *Neurology* 2018 (in press)

De Meo E, Rocca MA, Pagani E, Ghezzi A, Moiola L, Veggiotti P, Capra R, Amato MP, Fiorino A, Pippolo L, Pera MC, Comi G, Falini A, Filippi M. Regional grey matter atrophy in paediatric patients with multiple sclerosis: a longitudinal MRI study. *Mult Scler* 2017; 23 (Suppl 3): 37-38. 7th joint ECTRIMS-ECTRIMS Meeting, Paris, 25-28 October 2017

De Meo E, Pagani E, Colombo B, Rodegher M, Moiola L, Ghezzi A, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Regional patterns of brain atrophy development in pediatric and adult multiple sclerosis patients: a 3.5 year study. *Mult Scler* 2017; 23 (Suppl 3): 252. 7th joint ECTRIMS-ECTRIMS Meeting, Paris, 25-28 October 2017

De Meo E, Pagani E, Colombo B, Rodegher M, Moiola L, Ghezzi A, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Regional patterns of brain atrophy development in pediatric and adult multiple sclerosis patients: a 3.5 year study. *Neurol Sci* 2017; 38 (Supplement October 2017): S198 48th Congress of Società Italiana di Neurologia, Napoli, 14-17 October 2017

De Meo E, Rocca MA, Pagani E, Ghezzi A, Moiola L, Veggiotti P, Capra R, Amato MP, Fiorino A, Pippolo L, Pera MC, Comi G, Falini A, Filippi M. Regional gray matter atrophy in pediatric patients with multiple sclerosis: a longitudinal MRI study. *Neurol Sci* 2017; 38. Supplement October 2017): S200-S201 48th Congress of Società Italiana di Neurologia, Napoli, 14-17 October 2017

De Meo E, Meani A, Moiola L, Colombo B, Rodegher M, Ghezzi A, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Pediatric and adult MS: a longitudinal multimodal MRI study to explore the substrates of the different clinical courses. *Neurology* 2018; 90 (15 Suppl): P2.308. 70th Annual Meeting of the American Academy of Neurology - Los Angeles, April 21-27, 2018

De Meo E, Moiola L, Ghezzi A, Veggiotti P, Capra R, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Imaging of the mechanisms of thalamic damage in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* 2018; 90 (15 Suppl): P2.318 (70th Annual Meeting of the American Academy of Neurology - Los Angeles, April 21-27, 2018

De Meo E, Moiola L, Ghezzi A, Veggiotti P, Capra R, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Imaging of the mechanisms of thalamic damage in pediatric multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2018; 25 (Suppl 2): 396. 4th Congress of the European Academy of Neurology - Lisbon, 16-19 June 2018

De Meo E, Rocca MA, Meani A, Moiola L, Colombo B, Rodegher M, Ghezzi A, Comi G, Falini A, Filippi M. Pediatric and adult MS: a longitudinal multimodal MRI study to explore the substrates of the different clinical courses. *Eur J Neurol* 2018; 25 (Suppl 2): 676. 4th Congress of the European Academy of Neurology Lisbon, 16-19 June 2018

De Meo E, Moiola L, Amato MP, Ghezzi A, Veggiotti P, Capra R, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Cortical abnormalities and cognitive impairment in pediatric MS patients. *Mult Scler* 2018; 24 (S2): 542-543. 34th Congress of ECTRIMS 2018 Berlin, 10-12 October 2018

De Meo E, Moiola L, Ghezzi A, Veggiotti P, Capra R, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Imaging of the mechanisms of thalamic damage in pediatric multiple sclerosis. *Mult Scler* 2018; 24 (S2): 607-608 34th. Congress of ECTRIMS 2018 Berlin, 10-12 October 2018

De Meo E, Meani A, Moiola L, Colombo B, Rodegher M, Ghezzi A, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Pediatric and adult MS: a longitudinal multimodal MRI study to explore the substrates of the different clinical courses. *Mult Scler* 2018; 24 (S2): 626-627. 34th Congress of ECTRIMS 2018 Berlin, 10-12 October 2018

De Meo E, Rocca MA, Moiola L, Amato MP, Ghezzi A, Veggiotti P, Capra R, Comi G, Falini A, Filippi M. Cortical abnormalities and cognitive impairment in pediatric MS patients. *Neurol Sci* 2018; 39 (Suppl October): S20. 49th Congress of Società Italiana di Neurologia, Rome, 27-30 October 2018

De Meo E, Moiola L, Ghezzi A, Veggiotti P, Capra R, Comi G, Filippi M, Rocca MA. Imaging the mechanisms of thalamic damage in pediatric multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2018; 39 (Suppl October): S260 (49th Congress of Società Italiana di Neurologia, Rome, 27-30 October 2018

De Meo E, Meani A, Moiola L, Colombo B, Rodegher M, Ghezzi A, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Pediatric and adult MS: a longitudinal multimodal MRI study to explore the substrates of the different clinical courses. *Neurol Sci* 2018; 39 (Suppl October): S291. 49th Congress of Società Italiana di Neurologia, Rome, 27-30 October 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 94.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year and the amount of € 94,000

Linda Chaabane

Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE) & Centro di Imaging Sperimentale,
Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Cristina Chirizzi, Davide De Battista

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Francesca Baldelli Bombelli, Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria
Chimica “Giulio Natta”, Politecnico di Milano, Milano

Roberto Furlan, Annamaria Finardi, Unità di Neuroimmunologia Clinica,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Divisione Neuroscienze,
Ospedale San Raffaele, Milano

Fluoro (^{19}F) MRI: un nuovo metodo di Imaging per la rilevazione dell'infiammazione nel SNC in vivo

PREMESSE E OBIETTIVI

Per poter monitorare la progressione di una malattia come la sclerosi multipla (SM) e supportare interventi in grado di migliorare la malattia, una tecnica di imaging non invasiva come la Risonanza Magnetica (RM) è perciò fondamentale.

Per monitorare l'infiammazione tramite la RM, le nanoparticelle a base di ossido di ferro (SPIO) sono state ampiamente utilizzate per rilevare l'attività macrofagica, ma dovuto alla non specificità del segnale, tale nanoparticelle non sono adatte per studi longitudinali. Per tali motivi, la RM basata sul Fluoro (^{19}F -RM) con nanoparticelle di perfluorocarburi (^{19}F -Np) ha acquisito molto interesse poiché l'intensità del contrasto di Fluoro dell'immagine correla specificamente con il contenuto di tale atomo senza segnale di fondo. In tal modo è possibile un suo specifico rilevamento che può anche essere combinato con l'imaging protonico classico. I perfluorocarburi sono inerti, non sono tossici e diversi di questi prodotti sono stati accettati come sostituti del sangue.

Diversi studi dimostrano come la ^{19}F -RM possa rilevare un'infiammazione. Risultati molto interessanti sono stati ottenuti in modelli di SM come l'encefalomielite autoimmune sperimentale (ESA), dove è stato osservato un intenso assorbimento di ^{19}F -Np nel cervello e nel midollo spinale. La sensibilità di tale tecnica nel tracciare le cellule immunitarie non dipende solo dal numero di cellule e dal carico di Fluoro, ma

anche dalla capacità di assorbimento cellulare, associato molto alle dimensioni delle Np. Alcune sonde fluorurate possono essere utilizzate simultaneamente e visualizzate separatamente se presentano distinte differenze chimiche nella struttura. In tal modo è possibile realizzare la ^{19}F -RM multispettrale. Lo scopo del presente progetto consisteva nel valutare la capacità della ^{19}F -RM di visualizzare in vivo le dinamiche dell'infiltrazione delle cellule immunitarie nel sistema nervoso centrale in un modello di encefalite sperimentale autoimmune (ESA) cronico utilizzando la risonanza magnetica multi-spettrale mediante due sonde di fluorocarburi.

RISULTATI

Nanoparticelle di fluoro (^{19}F -Np) prodotte con due diversi perfluorocarburi (PFCE e PERFECTA) sono state ottenute con delle dimensioni paragonabile (180-200 nm) e proprietà di RM adatte per l'imaging. La differenza di frequenze ha permesso l'acquisizione di immagini di RM di ciascuna ^{19}F -Np senza sovrapposizioni e con un segnale molto specifico e proporzionale al numero di atomi di fluoro presenti.

I dati ^{19}F -RM sono stati raccolti in vivo in diversi topi ESA e in controlli sani. Le scansioni anatomiche classiche di RM sono state acquisite parallelamente a quelle del fluoro ad ogni frequenza di ciascuna ^{19}F -Np. Gli esami RM sono stati eseguiti in fase asintomatica (da 8 a 15 dpi, giorni successivi all'induzione della ma-

lattia) e acuta (20-26 dpi) in topi ESA che avevano ricevuto entrambe le 19F-Np a diversi momenti della malattia (4, 11, 17 e 20 dpi).

Da tutti i dati-RM raccolti, l'assorbimento delle 19F-Np è stato riscontrato nel midollo spinale e anche nel cervello dei topi ESA che presentavano un grave livello di disabilità motoria. Il segnale del Fluoro nel midollo spinale era particolarmente intenso quando le 19F-Np venivano somministrate dopo l'insorgenza della malattia. La presenza di 19F-Np nel SNC è stata ulteriormente confermata da analisi di citofluorimetria su cellule derivanti sia dal cervello che dal midollo spinale. L'aumento del numero di cellule positive alle 19F-Np correlava con la gravità della patologia. Tutte le cellule positive alle 19F-Np erano principalmente monociti, neutrofili, cellule B e dendritiche. Anche i linfociti T nel midollo spinale erano positivi alle 19F-Np, in particolare negli animali con una grave disabilità motoria. Questi dati confermano che il segnale-RM delle nanoparticelle di fluoro è associato all'infiltrazione delle cellule immunitarie durante l'infiammazione.

Questo studio pilota dimostra la possibilità di trac-

ciare l'infiltrazione delle cellule immunitarie in vivo durante l'ESA con la 19F-RM e l'uso di nanoparticelle di fluoro.

CONCLUSIONI

Il metodo di imaging multispettrale proposto potrebbe essere utilizzato per tracciare la risposta immunitaria e monitorare l'efficacia terapeutica. La capacità di visualizzare la neuro-infiammazione potrebbe aiutare a definire l'approccio terapeutico più adatto e la finestra temporale più opportuna per un eventuale trattamento. Inoltre, l'utilizzo contemporaneo di una doppia sonda fluorurata potrebbe essere di grande interesse per le recenti terapie basate sulle cellule staminali che potrebbero essere marcate con le 19F-NP ed essere monitorate insieme all'attività delle cellule immunitarie. Poiché le nanoparticelle di Fluoro non sono tossiche e la risonanza magnetica del fluoro è facilmente traslabile in contesti clinici, il metodo di risonanza magnetica proposto dovrebbe supportare lo sviluppo e l'applicazione di terapie efficaci contro la SM.

Fluorine (19F) MRI: a new Imaging method for the detection of CNS inflammation in vivo

INTRODUCTION AND AIMS

An non-invasive imaging modality capable of differentiating and quantifying co-existing inflammation, axon injury and myelin loss is highly required to monitor MS progression and to support disease modifying interventions. MRI is a crucial tool for depicting MS lesions. To image inflammation, superparamagnetic-iron-oxide (SPIO) nanoparticles have been widely explored as a probe for macrophage. However, SPIO-labeled cells remain difficult to detect since image contrast is not specific and could be mistaken with vessels or blood clots for example. For these reasons, 19F-MRI with nanoparticles of perfluorocarbons (19F-NPs) has gained major interest as 19F-signal is specifically related to the fluorine content without signal background, which allow the direct detection and could also be combined with standard 1H-MR imaging. Perfluorocarbons are inert, nontoxic and different products have passed through FDA trials as blood substitutes. A growing number of studies are demonstrating the ability of MRI with 19F-NPs to highlight inflammation or to perform cell

tracking. In particular, interesting data have been obtained in MS models as the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) showing significant 19F-NPs uptake was found in the brain and spinal cord and correlated to macrophage-like cells and with T cells. Besides to advanced technology, MRI sensitivity to track immune cells is not only related to the number of cells and 19F-payload but also to the cellular uptake capacity which is strongly dependent on the nanoparticles size. Interestingly, different 19F-probes could be used simultaneously and imaged separately if they have distinct chemical shifts to able multi-spectral imaging. The aim of the present project consisted in evaluating the ability of 19F-MRI to visualize in vivo the dynamics of immune-cells infiltration in the CNS of a model of chronic-EAE by using a multi-spectral MRI with dual-fluorine probes.

RESULTS

Fluorine-nanoparticles (19F-Nps) produced with two different perfluorocarbons (PFCE and PERFECTA) were obtained with the same range of size (180-

200nm) and with MR properties suitable for imaging. The fluorine resonance frequencies of both ¹⁹F-Nps were well defined and stable. The difference in frequencies allowed the acquisition of MR images of each ¹⁹F-Np without overlaps and with a signal highly specific and proportional to the number of fluorine atoms.

Using a 7Tesla MRI scanner for small animals, ¹⁹F-MRI data collected in vivo in different EAE mice and healthy controls. Standard anatomical MRI scans were acquired together with fluorine MRI scans at each frequencies of ¹⁹F-Np. Serial MRI acquisitions were done at pre-onset (8 to 15 dpi, days post disease induction) and acute phase (20-26 dpi) of EAE in mice that received both ¹⁹F-Nps at different phase (4, 11, 17 and 20 dpi).

From all acquired MRI data, ¹⁹F-NPs uptake was found in the spinal cord and also in the brain of EAE mice that presented a severe level of motor disability. In particular, fluorine signal in the spinal cord was high when ¹⁹F-NPs was administrated after EAE onset. The presence of ¹⁹F-NPs in CNS was further confirmed by cytofluorimetric analysis on cells extracted from both brains and spinal cords. As expected, leukocytes were significantly increased in the CNS (+17 to 70%) upon disease severity with a particular increase of T-cells and dendritic cells (DCs). The number of cells positive to ¹⁹F-Nps was also increased with EAE severity, which was associated with

the increase of leukocytes infiltration into the CNS. Interestingly, all cells positives to ¹⁹F-NPs were mainly monocytes, neutrophils, DCs and B cells. In addition, T-cells in the spinal cord were found positive to ¹⁹F-NPs in particular in animals with a severe level of motor disability. These data confirms that the MRI signal of fluorine nanoparticles is associated to immune cells infiltration during severe inflammation.

Overall results of the present pilot project demonstrate the possibility to track immune cells infiltration in vivo during EAE with ¹⁹F-MRI and fluorine nanoparticles.

CONCLUSIONS

The proposed multi-spectral Fluorine MR imaging method could be used to track immune responses and to monitor therapeutic efficacy. The ability to visualize neuroinflammation could help to define the suitable therapeutical approach and the time-window for which the treatment is required. Moreover, ¹⁹F-MRI with dual probe could be of great interest for recent advanced therapies with stem cells that could be labeled with ¹⁹F-NPs and monitored over-time together with the immune cells activity. Since fluorine nanoparticles are non-toxic and fluorine MRI is easily translatable into clinical settings, the proposed fluorine MRI method should support the development and application of efficient therapies against multiple sclerosis.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Chirizzi C, De Battista D, Furlan R, Metrangolo P, Comi G, Baldelli Bombelli F, Chaabane L, - Multicolor ¹⁹F-MRI for in vivo Imaging of immune cells activity. 13th annual meeting of the European Society for Molecular Imaging - ESMI -European Molecular Imaging Meeting (EMIM), San Sebastian, Spain, 20-23 March 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

Girolama Alessandra Marfia

UOSD, Unità Operativa Semplice Dipartimentale Sclerosi Multipla, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Giorgia Mataluni, UOSD Sclerosi Multipla, Dipartimento di Medicina di Sistemi, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

Diego Centonze, IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed, Pozzilli (Is), Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

Antonietta Gentile, Laboratorio di Neuroimmunologia e Plasticità Sinaptica, Fondazione Santa Lucia /Centro Europeo per la Ricerca sul Cervello-CERC, Roma

Raffaele Mancino, Emiliano Di Carlo, Unità di Oftalmologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

Motor Unit Number Estimation (MUNE): nuova potenziale misura elettrofisiologica di neurodegenerazione infiammatoria della sostanza grigia spinale nella SM

PREMESSE E OBIETTIVI

È ormai documentato il ruolo determinante della neurodegenerazione spinale nell'accumulo di disabilità clinica permanente nel paziente con sclerosi multipla (SM). Alla luce dei risultati ottenuti dagli studi di tomografia oculare computerizzata nella SM, dove le misure di danno assonale retinico rispecchiano il processo di neurodegenerazione diffusa che avviene a livello cerebrale, con questo studio si propone una potenziale corrispettiva misura di neurodegenerazione della sostanza grigia spinale. La tecnica di stima delle unità motorie (MUNE) è una nota ed affidabile misura elettrofisiologica del numero di unità motorie presenti in un determinato muscolo. Praticata similmente alla convenzionale elettroencefalografia, consiste nella registrazione con elettrodi di superficie, dai muscoli delle estremità, dell'attività dei neuroni che popolano il midollo spinale. La tecnica MUNE è già stata utilizzata nello studio di malattie neurodegenerative ed ha fornito dati utili sulla progressione clinica e sul monitoraggio dell'efficacia di nuove terapie. Alla luce di queste considerazioni questo studio si propone di: confrontare i parametri del MUNE tra il gruppo di pazienti ed il gruppo di controllo; studiare il comportamento del MUNE nei diversi sottotipi di malattia e definirne l'eventuale relazione con misure note di severità di malattia e di disabilità clinica; ana-

lizzare l'eventuale relazione con la presenza o meno di lesioni spinali.

RISULTATI

Lo studio ha previsto la partecipazione di 117 pazienti con SM e 113 controlli sani. I 117 pazienti sono stati arruolati dal Centro di Riferimento Regionale per la SM del Policlinico Tor Vergata di Roma, diagnosticati secondo i criteri di Mc Donald (2014). I pazienti partecipanti allo studio erano in remissione clinica e si sono sottoposti alla valutazione clinica attraverso la scale di valutazione della disabilità, della forza muscolare e della fatica. Le valutazioni strumentali hanno previsto una risonanza magnetica cerebrale e del midollo spinale ed il MUNE. In linea con la letteratura scientifica il numero di unità motorie è risultato diminuire con l'aumentare dell'età sia nei pazienti che nei controlli. È stato riscontrato un numero di unità motorie significativamente ridotto nei pazienti con SM rispetto ai controlli. La perdita di unità motorie era correlata ad una maggior disabilità clinica, alla perdita di forza ed alla presenza di maggior fatica. I pazienti con presenza di lesioni demielinizzanti nel midollo spinale hanno mostrato una riduzione del numero delle unità motorie. Tuttavia i pazienti con forma progressiva di malattia presentavano una maggior perdita di unità motorie indipendentemente dall'età, dalla disa-

bilità clinica, dal deficit di forza e dalla presenza di lesioni spinali. Il riscontro di questa riduzione delle unità motorie funzionanti potrebbe descrivere la disfunzione sinaptica causata dalle lesioni in quelle porzioni di midollo spinale. Tuttavia i risultati complessivi delle analisi statistiche suggeriscono che il declino delle unità motorie nei pazienti di questo studio potrebbe essere causato prevalentemente dal processo maladattativo che segue la formazione dei lesioni infiammatorie e ne influenza negativamente il recupero, piuttosto che dalla presenza delle lesioni stesse.

CONCLUSIONI

Il declino delle unità motorie registrato dal MUNE in questi pazienti con SM, potrebbe essere descrittivo della quota di atrofia del midollo spinale. Questa perdita di neuroni nella sostanza grigia del midollo spinale può essere legata all'effetto combinato dei processi di

disfunzione delle sinapsi e di demielinizzazione che, protratti nel tempo, conducono a processi patologici che promuovono la neurodegenerazione cronica. A causa del suo decorso estremamente eterogeneo, una volta formulata la diagnosi di SM, rimane la difficoltà di fornire informazioni rispetto alla possibile evoluzione della malattia e questo contribuisce significativamente allo stato di ansia del paziente. Identificare quei pazienti che potrebbero sviluppare una forma più invalidante di malattia è di cruciale importanza nella sfida della cura per la SM. Questo studio propone il MUNE come un potenziale marker di progressione di malattia. Essendo una metodica accessibile nella pratica clinica, non invasiva e ben tollerata, il MUNE potrebbe rivelarsi uno strumento utile per il disegno di studi longitudinali e per migliorare la previsione degli outcome e delle risposte terapeutiche nel percorso di cura del paziente affetto da SM.

Exploring Motor Unit Number Estimation (MUNE) as a novel measure of MS-associated inflammatory neurodegeneration in spinal cord grey matter

INTRODUCTION AND AIMS

Although the role of spinal grey matter damage in multiple sclerosis (MS) progression has been extensively reported, a full characterization of the relationships between spinal cord damage and clinical disability is still lacking, due to technical limitations in assessing spinal grey matter atrophy. The inherent difficulty of studying tissue changes have already led to the search for surrogate biomarkers for neurodegeneration. Whereas the ocular computerized tomography is a reliable window on brain grey matter pathology, an analogous marker of spinal axonal loss and related disease progression is still missing. Motor Unit Number Estimation (MUNE) is the best validated and reliable electrophysiological tool to track motor unit loss secondary to axonal damage in diseases affecting motor system. Instead of measuring grey matter anatomic volumes, this electrophysiological technique allows an estimate of actual motor axon function. The authors of this study presume that motor units count, acquired at limbs could represent a peripheral marker of spinal grey matter pathology in MS patients.

RESULTS

117 MS patients, diagnosed according to revised McDonald criteria (2014), were recruited by the MS

Center of Tor Vergata University Hospital of Rome. The control group consisted of 113 age and sex-matched volunteers. Only patients in clinical remission were included. All enrolled patients has performed evaluation of clinical condition, by administering clinical scales to measures disability, global strength and fatigue. Instrumental evaluation provided for brain and spinal cord magnetic resonance (MR) and MUNE for each patient. In line with scientific literature, number of motor units showed a decrease with elderly in both healthy controls and MS patients. MUNE described a lower monto units number in patients with MS versus control group. Loss of motor units were correlated with more severe clinical disability and fatigue in upper and lower limbs; with loss of focal strength of the MUNE target muscle, as much as with loss of global strength. MS patients with spinal demyelinating lesions showed a lower motor units number. However, loss of motor units is predicted by progressive phenotypes independently from age, EDSS, the presence of cervical demyelinating lesions and the presence of focal motor deficit. The lower motor units number could be the result of synaptic dysfunction caused by inflammatory lesions, located in spinal tracts analyzed by MUNE. However, the ability of progressive

phenotype to predict motor units decrease independently from the presence of spinal cord lesions suggest that motor unit decline in our cohort of MS patients, could reflect the maladaptive processes, that influence the synaptic plasticity and the recovery after inflammatory lesion, rather than the existence of demyelinating lesion itself.

CONCLUSIONS

In the present study atrophy of the anterior horns in the spinal cord is described from MUNE decline in MS patients. The motor units decline in these patients can be due to a combination of long-lasting synaptic dysfunction and demyelination, that lead to maladaptive processes which promote chronic neurodegeneration and axonal loss in spinal grey matter. After being informed about a diagnosis of MS, patients are naturally concerned over the future course, severity of the disease, and likely disability. The actual

difficulties in providing an accurate prognosis of disease course lead to uncertainty and contribute to patient anxiety. Therefore, the development of new strategies to forecast patients with an aggressive disease are needed. The focus on patients with poorest outcome would be settling for MS cure: including MUNE in the clinical diagnostic work-up could be promising for treatment-making decisions. In line with this, MUNE could turn out as a novel measure to forecast those MS patients with poorest long term outcome. Being an accessible, non invasive and well tolerated tool, MUNE application could be critical both for the design of clinical trials and to provide prognostic information in routine medical practice. Future longitudinal studies will be needed to elucidate spinal grey matter changes over time and their relationship with disability evolution, to determine whether MUNE assessments are suited as a biomarker for MS progression.

Elisabetta Pagani

Unità di Neuroimaging Quantitativo, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE),
Divisione di Neuroscienze, Fondazione San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Massimo Filippi, Maria Assunta Rocca, Simonetta Gerevini, Linda Chaabane, Angelo Quattrini, Maria Rosa Terreni

Piattaforma traslazionale per lo sviluppo di metodi di risonanza per valutare la struttura della mielina

PREMESSE E OBIETTIVI

La mielina è essenziale per il corretto funzionamento del sistema nervoso centrale e periferico ed un suo danno è una delle caratteristiche fondamentali della sclerosi multipla (SM). Attualmente, sono in fase di studio diverse strategie di trattamento che si focalizzano sulla riparazione del danno mielinico. C'è quindi una crescente necessità di tecniche non invasive che forniscano un'analisi accurata della struttura e della composizione della mielina e che diano informazioni su come la malattia e gli eventuali trattamenti agiscano su di essa. Nonostante ci siano tecniche di Risonanza Magnetica (RM) disponibili per la quantificazione del contenuto mielinico, queste metodiche non forniscono informazioni sulla struttura mielinica.

In questo progetto ci siamo proposti di sviluppare un metodo di RM in grado di differenziare la struttura della mielina. Il razionale alla base dello studio è stato che, sfruttando due caratteristiche delle molecole d'acqua intrappolate tra gli strati mielinici, sia possibile studiare selettivamente la struttura della mielina. La prima di queste caratteristiche è costituita dal valore del tempo di rilassamento trasversale del segnale di RM, particolarmente corto per le molecole d'acqua della mielina; la seconda si riferisce alla diffusione, che è rallentata a causa del susseguirsi di barriere ravvicinate. Lo scopo principale di questo progetto è stato di caratterizzare le proprietà di RM della mielina, in modo di sviluppare un metodo sensibile al danno strutturale; di validare il metodo e confrontare i risultati con metodi per la quantificazione del contenuto mielinico.

RISULTATI

Durante la prima fase del progetto il servizio di Patologia ha fornito campioni autoptici, prelevati da un

singolo soggetto, che includevano i nervi ottici ed olfattivi, ed il midollo spinale. Abbiamo acquisito i campioni sia con RM con magnete ad alto campo (7 Tesla) che a 3 Tesla, con l'intento di ottimizzare le procedure necessarie per la fissazione e la conservazione dei campioni e la loro caratterizzazione con RM.

Lo scopo principale dello studio era caratterizzare la struttura della mielina. Il metodo è stato prima implementato a 7 Tesla, con due sequenze finalizzate a caratterizzare i tempi di rilassamento trasversale e la diffusione delle molecole d'acqua nei tre compartimenti principali del tessuto nervoso (extra ed intra assonale, mielinico). Da questo primo tentativo è emerso che, la stima del tempo di rilassamento trasversale, misurato affinché fosse integrabile con la diffusione, risultava in una perdita di informazioni, rendendo questa strada non percorribile.

Sulla base di dati recenti pubblicati in letteratura, abbiamo cominciato ad analizzare l'evoluzione temporale del segnale di diffusione in RM e abbiamo confermato una dipendenza dal tempo. Una spiegazione per questa associazione è la presenza nello stesso tessuto di compartimenti con tempi di rilassamento diversi che messi in comunicazione attraverso lo scambio di molecole d'acqua contribuiscono nel tempo in modo diverso al segnale di diffusione. Tale andamento temporale potrebbe essere modulato dalla presenza di mielina. Abbiamo quindi esplorato questo comportamento anche in vivo in tre soggetti sani, confermando questa associazione, la cui intensità dipende dal tipo di regione analizzata.

Per meglio comprendere l'influenza della mielina sulla dipendenza temporale delle metriche di diffusione, abbiamo implementato un simulatore del segnale RM di diffusione, basato sul modello Monte Carlo degli spostamenti delle molecole d'acqua. Ca-

ratteristiche chiave del simulatore sono la possibilità di modellizzare aspetti diversi della composizione microstrutturale, quali il numero e la dimensione degli assoni e il grado di mielinizzazione, e delle proprietà magnetiche e di diffusione dei compartimenti considerati. Abbiamo già testato il corretto funzionamento del simulatore e lo stiamo utilizzando per esplorare come la demielinizzazione influisca sulla dipendenza del segnale RM di diffusione dal tempo.

CONCLUSIONI

Lo scopo di questo progetto era di impostare una piattaforma per lo sviluppo di un metodo per la caratterizzazione della struttura mielinica e per la traslazione

del metodo all'applicazione *in vivo* su persone con SM. La piattaforma traslazionale è stata impostata e dai dati prodotti stiamo consolidando la nostra ipotesi sulle informazioni che l'applicazione di questo metodo può offrire, prima di passare all'applicazione del metodo su persone con SM. Monitorare i cambiamenti strutturali della mielina è importante per capire non solo le modalità e le fasi di degenerazione patologica della mielina, ma anche quelle di remielinizzazione. Infatti, la remielinizzazione è favorita da una efficace rimozione dei detriti di mielina, a conferma che questo tipo di indagine possa risultare in una miglior comprensione delle condizioni che facilitano la remielinizzazione.

A translational platform for the development of MRI methods to assess myelin architecture

INTRODUCTION AND AIMS

Myelin is essential for the proper functioning of the central and peripheral nervous system and myelin damage is one of the hallmarks of multiple sclerosis (MS). Treatment strategies to repair damaged myelin are currently under investigation. As a consequence, there is the need of non invasive techniques for an accurate analysis of myelin sheath structure and composition and for the assessment of its involvement in the course of the disease and its modifications following treatment. Although several Magnetic Resonance Imaging (MRI) methods have been used for myelin content quantification, they are still not specific to myelin structure.

In this project, we wished to develop an MRI method sensitive to myelin structure. The rationale behind this possibility is to exploit two characteristics of water molecules entrapped between myelin layers to selectively investigate myelin structure. The first characteristic is related to the short transverse relaxation of the MR signal originating from myelin-water molecules; the second is the slow diffusion of myelin-water molecules due to the presence of tight barriers. The first aim was to fully characterize myelin MR properties in order to develop an imaging method sensitive to myelin structure; then to validate the method and compare the results with established methods for myelin content quantification.

RESULTS

During the first phase, pathological samples from one subject have been collected at the service of Pathology: these included optic and olfactory nerves and spinal cord tissue. Samples were imaged both at 7 and 3 Tesla MRI scanners. This phase was used to implement procedures for post-mortem sample fixation and conservation, and MR characterization.

The primary aim of the study was to develop a method to study myelin structure. The method was first implemented at 7 Tesla and consisted of two sequences aimed at characterizing the transverse relaxation and the behavior of diffusion within intra- and extra-axonal tissue and within myelin. However, the relaxation analysis that could be integrated with diffusion data only partially overlapped with that optimized for myelin content analysis. This hampered our idea of separating diffusion characteristic of myelin by incorporating transverse relaxation information.

Based on some recent published findings, we decided to analyze the temporal evolution of the diffusion weighted MR signal, and found a dependency of diffusivity metrics from time. One of the explanations for this association is the influence of the concomitant presence within the voxel of different transverse relaxation times and the role of myelin during water exchange between compartments. For this reason, the study of time dependency is relevant for this

study. We proceeded exploring this dependency in vivo in three healthy subjects and confirmed this association, that showed a strength depending on the central nervous system area analyzed.

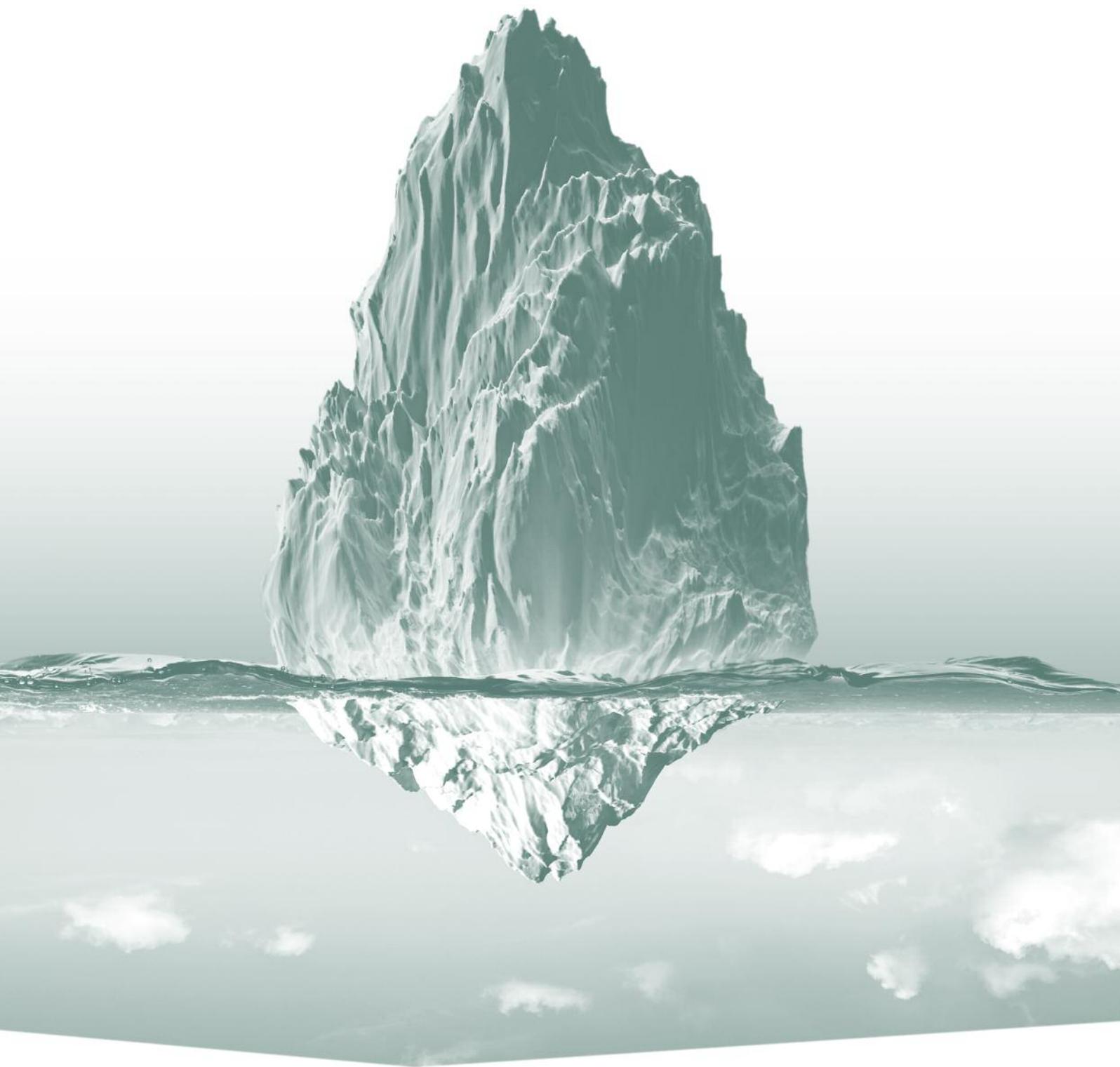
To better understand the influence of myelin on the dependency of diffusion metrics from time, we implemented a simulator based on Monte Carlo model of the random displacements of water molecules. Key characteristics of the simulator refer to the possibility of considering different aspects of tissue microstructure, such as the size and number of axons and degree of myelination. In addition, it allows changing sequence parameters, thus permitting the investigation of diffusion weighted signal dependency from time due to differences in transverse relaxation between compartments. The correct functioning of the simulator was first tested and it is now used to explore how demyelination and water accumulation within myelin affect time dependency of diffusion metrics.

CONCLUSIONS

Aim of this pilot project was to set up a translational platform to develop a method for the characterization of myelin structure with MRI.

We explored the relationship of the MR diffusion signal and time with a simulator, in post mortem and in vivo MRI acquisitions of healthy subjects. The translational platform was set and from these data we wish to consolidate our hypothesis about the information that the proposed method can offer, before moving to a research project on people with MS.

Monitoring structural myelin changes could improve our understanding of mechanisms of myelin disruption and repair. It is in fact known that re-myelination is favored by a proper cleaning of disrupted myelin sheaths; this supports the concept that studying myelin structural changes might help understanding the severity of damage within active lesions following an acute attack, but also the processes and degree of re-myelination.



PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

Sandra D'Alfonso

Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Nadia Barizzone, Lucia Corrado, Miriam Zuccalà, Chiara Basagni, UNINO1-Unità di Genetica, Università del Piemonte Orientale, Novara

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Umberto Dianzani, Luca Gigliotti, Elena Boggio, UNINO2-Unità di Immunologia, Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara

Filippo Martinelli Boneschi, Ferdinando Clarelli, Melissa Sorosina, Federica Esposito, Unità di Patologie Infiammatorie del Sistema Nervoso Centrale, Divisione di Neuroscienze e INSPE, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Studio genomico e funzionale del ruolo del “pathway” di TNFSF14-TNFRSF14 nella suscettibilità alla sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è caratterizzata da eziologia multifattoriale e ereditabilità poligenica. Recenti studi di associazione genomica (GWAS) sono riusciti a scoprire molteplici varianti genetiche che influenzano la suscettibilità alla SM. A questo proposito, sono stati identificati un totale di 32 antigeni leucocitario umano (HLA) e 200 fattori di rischio genetici non HLA per la SM. Sebbene diversi segnali siano vicini a geni coinvolti nei processi immunologici, i meccanismi effettori per la maggior parte delle associazioni rimangono sconosciuti. Ad oggi, ci sono state solo poche analisi di mappatura fine di loci GWAS di suscettibilità alla SM volte ad identificare la variante causale primaria. Questi sforzi sono particolarmente rilevanti per caratterizzare il meccanismo molecolare alla base del segnale di associazione. Lo scopo di questo progetto è stato quello di indagare il ruolo funzionale delle varianti genetiche associate alla suscettibilità alla SM nei geni coinvolti nella via funzionale o “pathway” di TNFSF14 (TNFSF14, TNFRSF14, STAT3) per identificare il meccanismo funzionale alla base dei segnali di associazione derivati da precedenti GWAS. Questi sono 3 geni con associazione confermata alla SM, ma le varianti genetiche principalmente responsabili dell'associazione e dei meccanismi molecolari della malattia controllati da questi geni sono sconosciute. Il presente progetto è stato condotto da un gruppo di ricerca interdiscipli-

nare con consolidata esperienza in genetica della SM (UNINO1, HSR) e immunologia cellulare e molecolare applicata all'identificazione di meccanismi alla base della SM (UNINO2) e si avvale di grandi coorti di Pazienti SM italiani e controlli abbinati già raccolti e caratterizzati per caratteristiche cliniche dai centri UNINO1 e HSR: 4000 pazienti SM e 4000 controlli analizzati in studi pubblicati e non pubblicati per varianti comuni del genoma e varianti rare derivate dal sequenziamento profondo, un sottogruppo di cui già campionati anche per cellule e siero.

RISULTATI

Lo studio è stato condotto seguendo le fasi e gli obiettivi del progetto originale:

a) *Analisi genetiche e selezione di varianti primariamente associate nei geni appartenenti al pathway TNFSF14 (TNFSF14-TNFRSF14-STAT3).*

Abbiamo combinato i dati di 4 piattaforme di genotipizzazione (per un totale di 3314 pazienti MS e 3272 controlli sani (HC)) con dati di sequenziamento NGS (Next Generation Sequencing) da 1092 MS e 912 HC. Questa strategia ci ha permesso di mappare con precisione le regioni TNFSF14 e TNFRSF14, mentre l'associazione nella regione STAT3 nella nostra popolazione era troppo debole per eseguire una mappatura fine. Abbiamo identificato la variante principalmente associata in TNFSF14. Questa è una variante intronica e l'analisi *in silico* indica che può es-

sere coinvolta nella regolazione dell'espressione del gene TNFSF14. Questi dati sono stati confermati anche nel nostro laboratorio valutando il livello di trascrizione di TNFSF14 in 83 MS e 80 HC. Il migliore SNP associato nella regione TNFRSF14 è una variante intronica all'interno del gene MMEL1 ($p = 6.27e-8$), parte di un cluster di *linkage disequilibrium* (LD) (96 SNP con $r^2 > 0.8$). A causa dell'elevato LD non siamo stati in grado di identificare una singola variante principalmente associata all'interno di questo blocco LD con analisi condizionale, pertanto, abbiamo condotto analisi *in silico* usando diversi strumenti di predizione per identificare effetti putativi all'espressione e / o livelli di proteine. Almeno 3 SNP in alto LD, incluso il migliore associato, sono potenzialmente coinvolti nella regolazione dell'espressione del gene TNFRSF14 a causa della localizzazione genomica (promotore del TNFRSF14) e / o della loro significativa associazione con l'espressione di TNFRSF14 (eQTL) nei tessuti cerebrali e in linfociti trasformati con EBV, quindi abbiamo scelto uno di questi per l'analisi funzionale. Inoltre, abbiamo esteso l'analisi agli altri interattori di TNFSF14 e TNFRSF14, analizzando sia le varianti comuni che rare. I nostri risultati forniscono ulteriori prove dell'importanza di questa via nella suscettibilità alla SM. In dettaglio, riportiamo un effetto significativo per il ruolo cumulativo delle varianti di suscettibilità alla SM in questi geni, un onere delle varianti normative rare per un gene (CDC37), che è coinvolto nella via TNFSF14-TNFRSF14-NFkB e nell'interazione gene-gene tra TNFRSF14 e PTPN11, un regolatore di attivazione STAT3.

b) *Analisi funzionali.*

Per caratterizzare funzionalmente la variante primariamente associata alla SM nel gene TNFSF14 e la variante selezionata nella regione TNFRSF14 abbiamo

analizzato l'espressione di superficie della proteina LIGHT (codificata dal gene TNFSF14) e il suo ligando HVEM (codificato da TNFRSF14) mediante immunofluorescenza e citometria a flusso in diversi tipi di cellule immunitarie dal sangue periferico di 20 HC. Osserviamo una percentuale più elevata di cellule che esprimono LIGHT nelle MDC (cellule dendritiche mieloidi) di omozigoti per l'allele di rischio di TNFSF14 (CC), mentre un livello di espressione di RNA inferiore in PBMC e sangue intero, suggerendo un'influenza specifica della TNFSF14 principalmente associata alla espressione di LIGHT.

Abbiamo analizzato anche l'espressione di LIGHT e HVEM in 5 tipi di MDC, in vitro maturato in condizioni diverse. La percentuale di cellule che esprimono LIGHT era maggiore negli omozigoti CC rispetto agli altri individui e questa differenza era statisticamente significativa nelle cellule MDC maturate con GM-CSF + IL-15 ($p = 0.04$). Non è stata trovata alcuna associazione per l'espressione superficiale della proteina HVEM e il genotipo di rischio TNFRSF14 mediante analisi citometrica a flusso in diversi tipi di cellule del sangue, né in cellule MDC in vitro.

CONCLUSIONI

In conclusione, abbiamo eseguito una mappatura fine di due regioni associate alla SM e siamo riusciti a identificare la variante principalmente associata e il suo possibile ruolo funzionale almeno per TNFSF14. Per la regione TNFRSF14, mappiamo la variante principalmente associata in un cluster LD e proponiamo per questo SNP un ruolo regolativo.

Questi risultati suggeriscono che una regolazione geneticamente associata di TNFSF14 / TNFRSF14 è coinvolta nella patogenesi della SM e questo può essere rilevante in futuro per lo sviluppo di nuove terapie.

Genomic and functional evaluation of the role of the TNFSF14-TNFRSF14 pathway in susceptibility to multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is characterized by multifactorial etiology and polygenic heritability. Recent genome-wide association studies (GWAS) have succeeded in uncovering multiple genetic variants influencing MS susceptibility. In this regard, a total of 32 human leukocyte antigen (HLA) and 200 non-HLA genetic risk factors for MS have been identified. Al-

though several signals are near genes involved in immunologic processes, the effector mechanisms for most associations remain unknown. To date, there have been only a few fine-mapping analyses of MS susceptibility GWAS loci aimed to identify the primary causal variant or gene. These efforts are particularly relevant to characterize the molecular mechanism underlying the association signal. The aim

of the project was to investigate the functional role of the genetic variants associated with MS susceptibility mapping to genes involved in the TNFSF14 pathway (*TNFSF14*, *TNFRSF14*, *STAT3*) to identify the functional mechanism behind the association signals derived from previous GWAS. These are 3 confirmed MS-associated genes but the genetic variants primarily responsible of the association and the disease molecular mechanisms controlled by these genes are unknown.

The present project has been conducted by an interdisciplinary research group with consolidated expertise in genetics of MS (UNINO1, HSR), and cellular and molecular immunology applied to the identification of mechanisms at the basis of MS (UNINO2) and takes advantage of large cohorts of Italian MS patients and matched controls already collected and characterized for clinical features by UNINO1 and HSR centers: 4000 MS patients and 4000 controls analysed in published and unpublished studies for genome wide common variants and rare variants derived from deep sequencing, a subset of which already sampled also for cells and serum.

RESULTS

The study was conducted following the phases and the objectives of the original project:

a) *Genetic analyses and selection of primarily associated variants on the genes belonging to the TNFSF14 pathway (TNFSF14-TNFRSF14-STAT3).*

We combined data from 4 genotyping platforms (totaling 3314 MS and 3272 healthy controls (HC)) with NGS (Next Generation Sequencing) sequencing data from 1092 MS and 912 HC. This strategy allowed us to fine map *TNFSF14* and *TNFRSF14* regions, while the association in *STAT3* region in our population was too weak to perform a fine mapping. We identified the primarily associated variant in *TNFSF14*. This is an intronic variant and *in silico* analysis indicated that may be involved in the regulation of expression of *TNFSF14* gene. These data were confirmed also in our lab by transcription level evaluation on 83 MS and 80 HC. The best associated SNP in *TNFRSF14* region is an intronic variant within *MMEL1* gene ($p=6.27e-8$), part of an LD cluster (96 SNPs with $r^2>0.8$). Due to high LD we were not able to identify a single primarily associated variant within this LD block with conditional analysis, therefore, we predicted the possible functional sequence variations with *in silico* analysis using different prediction tools to identify putative effects at the expression and/or protein levels. At least 3 SNPs in high LD, including the best associated one, are potentially involved in the regulation of the

TNFRSF14 gene expression because of the genomic location (*TNFRSF14* promoter) and/or their significant association with *TNFRSF14* expression (eQTL) in brain tissues and in EBV-transformed lymphocytes, hence we chose one of these for the functional analysis. Furthermore, we extended the analysis to the other interactors of *TNFSF14* and *TNFRSF14*, analyzing both common and rare variants. Our results provide further evidence of the importance of this pathway in MS susceptibility. In detail, we report a significant effect for the cumulative role of MS susceptibility variants in these genes, a burden of rare regulatory variants for a gene (*CDC37*), which is involved in the *TNFSF14*-*TNFRSF14*-NF κ B pathway and a gene-gene interaction between *TNFRSF14* and *PTPN11*, a regulator of *STAT3* activation.

b) *Functional analyses.*

To functionally characterize (WP3) the primary MS associated variant in *TNFSF14* gene and the best associated SNP in *TNFRSF14* region we analyzed surface expression of LIGHT (*TNFSF14*) and its ligand HVEM (*TNFRSF14*) by immunofluorescence and flow cytometry in several types of immune cells from the peripheral blood of 20 HC. We observe a higher percentage of LIGHT positive cells in MDC (myeloid dendritic cells) in homozygotes for the *TNFSF14* risk allele (CC), while a lower RNA expression level in PBMC and whole blood, suggesting a cell specific influence of the *TNFSF14* primarily associated variant on LIGHT expression.

We analyzed also LIGHT and HVEM expression in 5 types of MDC, *in vitro* matured in different conditions. The percentage of LIGHT positive cells was higher in CC compared to the other individuals and this difference was statistically significant in MDC cells matured with GM-CSF+IL-15 ($p=0.04$). No association was found for the surface expression of HVEM protein and the risk *TNFRSF14* genotype by flow cytometry analysis in different blood cell types, nor in *in vitro* MDC cells.

CONCLUSIONS

In conclusion, we performed a fine mapping of two MS associated regions and managed to identify the primarily associated variant and to identify its possible functional role at least for *TNFSF14*. For *TNFRSF14* region, we map the primarily associated variant in a LD cluster and propose for this SNP a regulatory role.

These results suggest that a genetically associated regulation of *TNFSF14*/*TNFRSF14* is involved in MS pathogenesis and this may be relevant for the development of future therapies.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. NR1H3 p.Arg415Gln Is Not Associated to Multiple Sclerosis Risk. *Neuron*. 2016 Oct 19;92(2):333-335. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.052

Anand S, Mangano E, Barizzone N, Bordoni R, Sorosina M, Clarelli F, Corrado L, Martinelli Boneschi F*, D'Alfonso S*, De Bellis G*. Next Generation Sequencing of Pooled Samples: Guideline for Variants' Filtering. *Sci Rep*. 2016 Sep 27;6:33735. doi: 10.1038/srep33735

George MF, Briggs FB, Shao X, et al. Multiple sclerosis risk loci and disease severity in 7,125 individuals from 10 studies. *Neurol Genet*. 2016 Aug 4;2(4):e87. doi: 10.1212/NXG.0000000000000087

Keshavan A, Paul F, Beyer MK, et al. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hauser SL, Oksenberg JR, Henry RG. Power estimation for non-standardized multisite studies. *Neuroimage*. 2016 Jul 1;134:281-94. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.03.051

Steri M, Orrù V, Idda ML, Pitzalis M, Pala M, Zara I, Sidore C, Faà V, Floris M, Deiana M, Asunis I, Porcu E, Mulas A, et al Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *N Engl J Med*. 2017 Apr 27;376(17):1615-1626. doi: 10.1056/NEJMoa1610528

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk. *Cell*. 2018 Nov 29;175(6):1679-1687.e7. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.049. Epub 2018 Oct 18

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. The Multiple Sclerosis Genomic Map: Role of peripheral immune cells and resident microglia in susceptibility. (*Science*, in revision)

MSGC : A Systems Biology approach uncovers cell-specific gene regulatory effects of genetic associations in multiple sclerosis" *Nature Communications* (in press)

Zuccalà M *, Barizzone N *, Boggio E *, Gigliotti L *, Sorosina M, Bordoni R, Clarelli F, Basagni C, Anand S, Mangano E, Vecchio D, Esposito F, Perga S., Martire S, Corsetti E, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, Predebon G, Cantello R, Martinelli V, Comi G, Leone M, De Bellis G, Dianzani U, Martinelli-Boneschi F *, D'Alfonso S *. Genomic and functional evaluation of the role of TNFSF14 gene in susceptibility to multiple sclerosis. Submitted to *Human Molecular Genetics*

Zuccalà M *, Barizzone N *, Sorosina M *, Bordoni R, Clarelli F, Anand S, Mangano E, Esposito F, Corsetti E, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, Vecchio D, Predebon G, Cantello R, Martinelli V, Comi G, Leone M, De Bellis G, Martinelli-Boneschi F *, D'Alfonso S. Association Analysis Of The Multiple Sclerosis Susceptibility Gene *Tnfsf14* In The Italian Population: High Density Fine Mapping And Functional Analysis Of The Identified Primary Associated Variant. BLUEPRINT / IHEC conference, September 8-9, 2016 - Brussels, Belgium

Zuccalà M *, Barizzone N *, Sorosina M, Bordoni R, Clarelli F, Anand S, Mangano E, Mallantsa K , Listonb A, Gorisa A , Esposito F, Corsetti E, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, D. Vecchio D, Predebon G, Cantello R, Martinelli V, Comi G, Leone M, De Bellis G, Martinelli-Boneschi F *, D'Alfonso S. The Functional Role Of A Non Coding Variant Associated To Multiple Sclerosis Susceptibility: A Functional Genomics Approach. SIGU 2016, Torino , 23-26 novembre 2016

Barizzone N *, Leone M *, Vecchio D, Naldi P, Guerini FR Salvetti M, Cavalla P, Zuccalà M, Benedetti MD, Di Sapio A, Caputo D, Bergamaschi R, Cantello R, Galimberti D, Scarpini E, Rosso G, Cordera S Cavallo R, D'Alfonso S. The Contribution Of Genetic Factors Associated With Multiple Sclerosis Susceptibility To Clinical Phenotypes . SIGU 2016, Torino, 23-26 novembre 2016

Sorosina M Barizzone N, Clarelli F., Anand S, Lupoli S, Esposito F, Mangano E, Bordoni R, PROGEMUS, PROGRESSO, Martinelli V, Comi G, Leone M, Cusi D, Patsopoulos NA, De Jager P De Bellis G, D'Alfonso S*, Martinelli Boneschi F*. Identification and characterization of Multiple Sclerosis associated loci in the Continental Italian population. ECTRIMS 2016, London 14-17 September 2016 London, UK

The functional role of a non-coding variant associated to multiple sclerosis susceptibility: a functional genomics approach. 23-26 November 2016 - XIX National Congress SIGU (Società Italiana Genetica Umana), Rimini, Italy.

Genomic and functional evaluation of the role of the TNFSF14-TNFRSF14 pathway in susceptibility to multiple sclerosis. 17-21 October 2017 - International Congress of American Society of Human Genetics (ASHG), Orlando, USA.

Zuccalà M *, Barizzone N *, Boggio E*, Gigliotti L, Sorosina M *, Bordoni R, Clarelli F, Anand S, Mangano E, Vecchio D, Esposito F, Basagni C, Corsetti E, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, Predebon G, Cantello R, Martinelli V, Comi G, Leone M, De Bellis G, Dianzani U * Martinelli-Boneschi F * D'Alfonso S *. Genomic and functional evaluation of the role of TNFSF14 gene in susceptibility to multiple sclerosis. SIGU 2017, Napoli 15-18 Novembre 2017.

Barizzone N *, Clarelli F *, Mangano E*, Basagni C, Zuccalà M, Anand S, Sorosina M, Mascia E, De Bellis G, Esposito F, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, Vecchio D, Predebon G, Comi C, Cantello R, Martinelli V, Comi G, Leone M, Bordoni R, Martinelli-Boneschi F * D'Alfonso S *. Cumulative effect of rare functional variants in Multiple Sclerosis associated genes. ESHG 2018, Milano, 16-19 giugno 2018.

Zuccalà M *, Barizzone N *, Basagni C *, Boggio E *, Gigliotti L*, Sorosina M *, Bordoni R, Clarelli F, Anand S, Mangano E, Vecchio D, Esposito F, Basagni C, Corsetti E, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, Predebon G, Cantello R, Martinelli V, Comi G, Leone M, De Bellis G, Dianzani U * Martinelli-Boneschi F * D'Alfonso S *. Genomic and functional evaluation of the role of TNFSF14 gene in susceptibility to multiple sclerosis. ESHG 2018, Milano, 16-19 giugno 2018.

Zuccalà M *, Barizzone N *, Basagni C *, Boggio E *, Gigliotti L*, Sorosina M *, Bordoni R, Clarelli F, Anand S, Mangano E, Vecchio D , Esposito F, Basagni C, Corsetti E, PROGEMUS, PROGRESSO, IMSGC, Predebon G, Cantello R, Martinelli V, Comi G, Leone M, De Bellis G, Dianzani U * Martinelli-Boneschi F * D'Alfonso S *. Genomic and functional evaluation of the role of TNFSF14 gene in susceptibility to multiple sclerosis. AINI congress (7-10 May 2018, Trieste, Italy). Oral presentation

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 185.000 €

Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 185,000

Eleonora Cocco

Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Jessica Frau, Lorena Loreface, Giuseppe Fenu, Giancarlo Coghe, Isabella Gessa, Gianna Costa, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

Maria Cristina Monti, Cristina Montomoli, Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università degli Studi di Pavia, Pavia

Paolo Valera, Alessandro Sanna, Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e Architettura, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

Leonardo Sechi, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Alberto Ascherio, Department of Epidemiology, Harvard School of Public Health, Boston, USA

Centri SM e Reparti di Neurologia della Sardegna

Regione Autonoma della Sardegna (RAS)

Geoepidemiologia della sclerosi multipla: i fattori ambientali

PREMESSE E OBIETTIVI

La prevalenza della sclerosi multipla (SM) segue un gradiente legato alla latitudine, aumentando con essa. Un'eccezione è rappresentata dalla Sardegna che presenta un'alta prevalenza nonostante la sua localizzazione geografica. L'isola sembra essere un'area ideale per studiare le cause della SM considerando le peculiarità genetiche e ambientali che la caratterizzano. L'obiettivo del progetto è stato quello di mappare la SM in tutta l'isola, identificare le aree ad alto e basso rischio e cercare di capire quali fattori ambientali possano influenzare l'insorgenza della malattia e la sua distribuzione geografica. Lo scopo ultimo è stato quello di proporre un modello multifattoriale capace di predire il rischio di SM.

RISULTATI

Lo studio è stato suddiviso in 3 fasi. Nella prima fase

è stato svolto uno studio epidemiologico in cui sono state identificate tutte le persone affette da SM presenti in Sardegna al 31 Marzo 2016. A quella data la prevalenza di SM aggiustata per genere ed età era di 360 persone su 100.000 abitanti. È stato costruito quindi un modello statistico geoepidemiologico nel Sud ovest della Sardegna in cui i dati epidemiologici sono stati sovrapposti ai dati geoambientali delle stesse aree (metalli e metalloidi, esposizione solare, urbanizzazione). Il modello ha suggerito un possibile ruolo del rame e del genere sulla prevalenza di SM. Il modello riguardante l'intera isola è pronto e verrà applicato appena la Regione Autonoma della Sardegna (RAS) darà l'autorizzazione all'utilizzo dei dati. Nella seconda parte dello studio sono stati confrontati i fattori ambientali in persone con SM (pSM) e controlli sani (C). Un questionario sui fattori ambientali è stato adattato

alla popolazione italiana partendo da studi internazionali (Nurse's health study- Harvard Medical school) ed è stato somministrato a 449 pSM e 540 HC.

L'analisi delle risposte ottenute ha confermato il ruolo protettivo dell'esposizione solare sia durante la stagione estiva che invernale mentre la presenza della mononucleosi o l'aver avuto una madre fumatrice durante la gravidanza si sono confermati essere dei fattori di rischio significativi. L'abitudine attiva al fumo di sigaretta (essere fumatori) non è invece risultata essere differente tra pSM e C. Sono stati valutati i livelli nel sangue della vitamina D in 976 pSM e 472 C utilizzando la metodica RIA. Considerando 35ng/ML come valore soglia per la vitamina D, il 29% di pSM e il 24% di C sono risultati essere carenti. Inoltre, considerando esclusivamente le pSM i livelli di vitamina D risultavano essere inferiori in persone con livelli più alti di disabilità misurati con la scala EDSS.

Nella parte geochimica dello studio è stata definita in maniera più dettagliata la geochimica della Sardegna e sono stati ottenuti nuovi risultati analitici da campionamenti su acque sorgive e fluviali. In contemporanea il livello ematico dei seguenti elementi: Li, Co, Cu, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Ba, Tl, Pb, Bi, CA, Na, Mg, K, Fe, B, Zn, Mn, Hg, e Cr è stato analizzato in un gruppo di persone con SM e controlli.

Sono stati inoltre studiati alcuni fattori infettivi potenzialmente associati alla SM. Il virus di Epstein-Barr virus (EBV) agente causale della mononucleosi infettiva e il Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) associato ad alcune patologie umane come il morbo di Crohn e riscontrato in associazione con la SM in Sardegna.

Tali agenti sono stati ricercati nel sangue e nel liquido cerebro spinale di pSM e C e si è cercato di capire con quali meccanismi questi agenti potessero influenzare la presenza della SM. In particolare, delle componenti specifiche di entrambi gli agenti si sono dimostrati essere simili a componenti proprie dell'organismo ed essere capaci di stimolare una risposta auto-reattiva (rivolta nei confronti di componenti proprie del corpo) con dei meccanismi cosiddetti di mimetismo molecolare.

A questo punto sono state studiate le interazioni tra alcuni fattori genetici associati alla SM in Sardegna (aplotipi HLA di classe seconda) e il MAP. Una frequenza minore di Anticorpi verso MAP è stata evidenziata in pSM che presentavano dei fattori genetici HLA protettivi a indicare l'esistenza di un'interazione tra i due fattori.

Tutti i fattori genetici e ambientali disponibili sono stati inseriti in un database ideato ad hoc ed è stato costruito un modello predittivo di rischio di SM. La validità di tale modello sarà testata in studi successivi.

CONCLUSIONI

Lo studio ha permesso di confermare la Sardegna come una regione ad alto rischio di SM, presentando essa una delle prevalenze più alte al mondo. Alcuni fattori ambientali noti come predisponenti alla SM in generale sono importanti anche nella popolazione Sarda. Lo studio ha permesso di saggiare dei nuovi modelli per studiare i fattori che influenzano l'insorgenza della SM e la possibilità di modelli individualizzati per valutare il rischio.

Geoepidemiology of multiple sclerosis: The environmental factors

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) prevalence follows a latitudinal gradient increasing with latitude; an exception is Sardinia, which represents a high-risk area in spite of its geographical location. Sardinia seems to be an ideal setting to study MS considering the high homogeneous genetic background and the numerous environmental peculiarities.

To clarify MS etiopathogenesis we propose a study of the geo-epidemiology of MS exploiting the peculiarity of Sardinia. In particular we aimed to identify high-

risk areas in the island and environmental factors that could influence disease occurrence and frequency and create a multifactorial predictive model of MS risk.

RESULTS

We performed an epidemiological study to identify the entire MS population in Sardinia. The age and gender adjusted prevalence rate was 360/100,000 (95%CI 352-369). We evaluated the MS risk of specific metals (M) and geographical factors (solar UV

exposure and urbanization) by undertaking a population-based cross-sectional study in South West Sardinia (SWS). The analysis highlighted Cu and gender as MS risk factors. The already tested statistical model in SWS could be applied to data coming from the whole island when RAS will give the authorization, in order to evaluate the connection between the environmental factors distribution and the geographical distribution of MS.

In the second part of the study we compared environmental factors in 449 Sardinian person with MS (pMS) and 540 healthy controls (HC) by using a standardized questionnaire for environmental factors, adapted from international studies (the Nurses' Health Study, Harvard Medical school). All the relevant predictors obtained from univariate analyses were tested in a multivariable framework; the ultimate model confirmed the significant protective effect of sun exposure during summer or winter, while presence of mononucleosis or having a mother who had smoked during pregnancy were confirmed as significant risk factors. Active smoking habits were not significantly different between MS and HC. Vitamin D (VD) levels were measured in 976 MS and 472 HC by RIA. Considering the 35 ng/mL as the cut-off for normal VD levels 29% and 24% of MS and HC respectively presented low vitamin D level. Considering the clinical MS features, there was a negative correlation between VD level and EDSS.

In the geochemical part we further defined the geochemistry of Sardinia with analytical data from stream sediment samples and with a new geochemical campaign on water samples. Moreover, the blood sample pMS and HC have been collected and the analysis of the following heavy metals levels: Li, Co, Cu, Ga, Sr, Ag, Cd, In, Ba, Tl, Pb, Bi, CA, Na, Mg, K, Fe, B, Zn, Mn, Hg, and Cr ions have been performed.

We also studied two infective agents potentially involved in MS predisposition: the Epstein-Barr virus (EBV) and Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP). They were studied in biological samples (blood and/or Cerebro Spinal Fluid) of MS patients and HC or people with other neurological conditions trying to understand their role in MS pathogenesis. In particular, some parts of the two infective agents seem to be similar to myelin or neuronal component thus to induce an auto directed immune response by a mechanism known as "molecular mimicry".

Moreover, we studied the interaction between genetic factor already known to be associated in a positive or negative way with MS in Sardinians (the HLA class II haplotypes) and Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP). We showed a lower frequency of Abs in patients with protective HLA suggesting an interaction between the two factors in MS predisposition. The conclusive step of the project was the creation of a multifactorial (genetic and environmental) predictive model. A database ideated ad hoc has been created, tested and implemented to store and organize all the data and a model has been created. The model will be validated in future studies.

CONCLUSIONS

The study confirmed Sardinia as an "hot spot" for MS showing one of the highest prevalence in the world. Environmental factors already associated with the disease in other populations seem to have a role also in the island. The study allowed to propose different statistical and epidemiological model to search factors which could be associated with MS and allowed to propose multifactorial model to evaluate individual MS risk.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Sechi LA, Dow CT. Mycobacterium avium ss. paratuberculosis Zoonosis - The Hundred Year War - Beyond Crohn's Disease. *Front Immunol.* 2015 Mar 4;6:96. doi: 10.3389/fimmu.2015.00096. eCollection 2015. Review

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

Frau J, Cossu D, Sardu C, Mameli G, Coghe G, Loreface L, Fenu G, Tranquilli S, Sechi LA, Marrosu MG, Cocco E. Combining HLA-DRB1-DQB1 and Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis (MAP) antibodies in Sardinian multiple sclerosis patients: associated or independent risk factors? *BMC Neurol.* 2016 Aug 23;16(1):148. doi: 10.1186/s12883-016-0669-1

Mameli G, Cocco E, Frau J, Arru G, Caggiu E, Marrosu MG, Sechi LA. Serum BAFF levels, Methyprednisolone therapy, Epstein-Barr Virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in Multiple Sclerosis patients. *Sci Rep.* 2016 Jul 7;6:29268

Mameli G, Cossu D, Caggiu E, Arru G, Niegowska M, Cocco E, Frau J, Marrosu MG, Sechi LA. Soluble BAFF Level Is Not Correlated to Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis Antibodies and Increases After Interferon- β Therapy in Multiple Sclerosis Patients. *J Mol Neurosci.* 2016 Sep;60(1):91-3

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

Monti MC, Guido D, Montomoli C, Sardu C, Sanna A, Pretti S, Loreface L, Marrosu MG, Valera P, Cocco E. Is Geo-Environmental Exposure a Risk Factor for Multiple Sclerosis? A Population-Based Cross-Sectional Study in South-Western Sardinia. *PLoS One.* 2016 Sep 26;11(9):e0163313

Frau J, Cossu D, Coghe G, Loreface L, Fenu G, Porcu G, Dessì E, Sardu C, Melis M, Murru M, Tranquilli S, Marrosu MG, Sechi L, Cocco E. Interaction between mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and HLA in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2014 (oral communication SIN Congress Cagliari 2014)

Coghe G, Pau M, Melis M, Frau J, Loreface L, Dessì E, Porcu G, Atzeni F, Mariotti S, Cocco E, Marrosu MG. Vitamin D serum levels and balance are not related in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2014 (SIN Congress Cagliari 2014)

Sanna A, Loreface L, Mazzella A, Frau J, Coghe G, Fenu G, Marrosu MG, Cocco E, Valera P. (2015). Assessment of geochemical factors in multiple sclerosis distribution in the south-western Sardinia. 6th International Conference on Medical Geology - MEDGEO'15: 26 July to 1 August, Aveiro (Portugal). Abstract book, pp 105, ISBN 978-972-789-449-

Frau J, Mameli G, Cossu D, Arru G, Caggiu E, Coghe G, Loreface L, Fenu G, Secci M, Melis M, Marrosu M, Sechi L, Cocco E. EBV and mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis peptides induce a diffuse immune response against myelin basic protein and human interferon regulatory factor 5 in MS patients. *Neurol Sci* 2015; S148 (SIN Genova 2015)

Frau J, Mameli G, Cossu D, Arru G, Caggiu E, Coghe G, Loreface L, Fenu G, Secci M, Melis M, Marrosu M, Sechi L, Cocco E. EBV and mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis peptides induce a diffuse immune response against myelin basic protein and human interferon regulatory factor 5 in MS patients. *Multiple Sclerosis Journal* 2015; 21: (S11) 654-779. EP1295. (ECTRIMS Barcellona 2015)

Loreface L, Frau J, Dessì E, Monti MC, Sardu C, Fenu G, Coghe G, Marrosu MG, Cocco E. Smoking Exposure and multiple sclerosis in Sardinia. *Neurol Sci* 2015; S290 (SIN Genova 2015)

Loreface L, Frau J, Dessì E, Monti MC, Sardu C, Fenu G, Coghe G, Marrosu MG, Cocco E. Smoking Exposure and multiple sclerosis in Sardinia. *Mult. Scler.* 2015 Oct. (ECTRIMS Barcellona 2015)

Lachowicz J, Valera P, Sanna A, Cocco E, 2016. Geoepidemiology of Multiple Sclerosis: the environmental factors. 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC 13), 28 August - 1 September 2016, Budapest, Hungary

Lachowicz, J, Valera P, Sanna A, Nurchi, VM, Crisponi, G, Loreface, L, Cocco, E., 2016. Multiple Sclerosis and environmental factors. Atti del XXVI Congresso della Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana ISBN: 978-88-86208-91-8. Giardini di Naxos, Messina, 18-22 Settembre 2016

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2012 per il periodo di 3 anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 220.000 €

Research project funded by FISM Grant 2012 for the period of 3 years (extended by 1 year) and the amount of € 220,00

Francesca Aloisi

Dipartimento di Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Caterina Veroni, Dipartimento di Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Corrado Fagnani, Centro per le Scienze Comportamentali e la Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Fabiana Marnetto, Antonio Bertolotto, Marzia Caldano, Federica Brescia, Alessia Balbo, Jessica Bertolo, Andrea Marcinnò, Francesca Sperli, Centro di Riferimento Regionale per la Sclerosi Multipla, Istituto di Neuroscienze Cavalieri Ottolenghi, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

Clara Ballerini, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Annamaria Repice, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

Luca Massacesi, Alessandra Aldinucci, Dipartimento di Neuroscienze, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Eleonora Cocco, Giuseppe Fenu, Giancarlo Coghe, Gianna Costa, Cristina Melis, Lucia Schirru, Maria Antonietta Secci, Marta Melis, Lorena Lorefice, Jessica Frau, Centro di Sclerosi Multipla, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

Studio dell'espressione di geni del virus di Epstein-Barr e geni cellulari in pazienti con CIS, SM recidivante remittente e SM primariamente progressiva: ricerca di biomarcatori diagnostici e prognostici

PREMESSE E OBIETTIVI

Si ritiene che la sclerosi multipla (SM) sia innescata da molteplici, ancora poco comprese, interazioni tra fattori di rischio genetici e ambientali. Tra questi ultimi, il virus di Epstein-Barr (EBV), un herpes virus molto diffuso nella popolazione, è l'agente infettivo che mostra l'associazione più forte con la SM sulla base di solide e indiscusse evidenze: la mononucleosi infettiva, una malattia acuta causata da EBV, aumenta il rischio di SM; le persone con SM hanno livelli più elevati di anticorpi contro EBV. Questi dati suggeriscono che un alterato controllo di EBV da parte del sistema immunitario possa essere implicato nel processo infiammatorio che colpisce il sistema nervoso centrale nella SM. Questo studio ha indagato le pos-

sibili associazioni tra stato dell'infezione con EBV, attivazione immunitaria nel liquor e nel sangue periferico e parametri clinici e radiologici in persone con SM al fine di acquisire informazioni sulle interazioni virus-ospite ed esplorare la potenziale rilevanza clinica delle associazioni rilevate.

RISULTATI

Le persone che hanno consentito di partecipare allo studio hanno ricevuto la diagnosi di SM e sono state seguite nei tre Centri clinici di SM afferenti al progetto. Per il mancato arruolamento nello studio di un numero congruo di persone con sindrome clinicamente isolata e SM primariamente progressiva lo studio è stato circoscritto a 79 persone con SM

recidivante remittente. I campioni analizzati sono stati prelevati al momento della diagnosi (liquor e sangue) e, in 38 pazienti, a intervalli di sei mesi nel corso di due anni (sangue). Sono state utilizzate metodiche altamente specifiche e sensibili per quantificare il DNA di EBV e l'espressione di 7 geni virali e 57 geni cellulari implicati nella funzione del sistema immunitario in campioni appaiati di cellule mononucleate del liquor e del sangue periferico. Lo studio di EBV nel sangue ha coinvolto anche 28 donatori sani. Nel confronto tra persone con SM e donatori sani non sono state riscontrate differenze significative nella percentuale di campioni ematici contenenti DNA o RNA virale e nella quantità di DNA virale rilevata. Tuttavia, nelle persone con SM è stata evidenziata sia una maggiore espressione di geni di EBV associati con attivazione dell'infezione virale (rilevati nel 25.3% dei campioni di sangue da persone con SM rispetto al 3.6% dei campioni da soggetti sani) sia una associazione positiva tra livelli di DNA ed espressione di geni della riattivazione virale. Nelle persone con SM l'espressione di geni virali è stata rilevata in una piccola percentuale di campioni di liquor (7%) con un profilo invariabilmente compatibile con l'attivazione dell'infezione.

Lo studio combinato di geni virali e geni cellulari implicati nella funzione del sistema immunitario ha permesso di identificare gruppi di geni espressi in maniera coordinata e riconducibili a specifici processi biologici quali: nel liquor, immunità antivirale mediata da interferone di tipo 1 e da linfociti T citotossici, attivazione virale e meccanismi di citotossicità, produzione di molecole proinfiammatorie; nel sangue, immunità citotossica associata al riconoscimento di

acidi nucleici virali, attivazione virale associata con marcatori di attivazione linfocitaria e/o immunità antivirale mediata da interferone di tipo 1, infiammazione. In base alla differente espressione di geni cellulari e/o virali nel liquor e nel sangue è stato possibile distinguere sottogruppi di persone con SM nell'ambito della coorte studiata, indipendentemente dalle loro caratteristiche cliniche. Ad oggi, nessuna associazione è stata rilevata tra sottogruppi di pazienti o di geni e parametri demografici, clinici, radiologici o liquorali. Il possibile significato prognostico dei risultati ottenuti alla diagnosi e la rilevanza clinica della misurazione longitudinale di geni virali e cellulari verranno valutati nello studio prospettico ancora in corso.

CONCLUSIONI

I risultati del progetto confermano e ampliano le evidenze esistenti a favore dell'attivazione persistente, e quindi del controllo inadeguato dell'infezione con EBV nella SM, rafforzando il concetto che questo virus sia coinvolto nei meccanismi della malattia. I dati preliminari sulla presenza di geni espressi durante l'attivazione dell'infezione con EBV e sulla loro associazione con alcuni geni cellulari sono potenzialmente rilevanti per l'identificazione di nuovi biomarcatori di malattia nel sangue delle persone con SM. In particolare, la valutazione combinata di un numero ristretto di geni virali e di geni implicati nella funzione immunitaria potrebbe rappresentare uno strumento più adeguato, sensibile e informativo per studiare la relazione tra evoluzione della malattia, risposta alla terapia e cambiamenti nell'interazione tra EBV e sistema immunitario nella persona con SM.

Combined analysis of EBV and cellular gene expression in clinically isolated syndrome, relapsing-remitting and primary progressive multiple sclerosis for the identification of diagnostic and prognostic biomarkers

INTRODUCTION AND AIMS

The current belief is that multiple sclerosis (MS) is initiated by multiple, still poorly understood, interactions between genetic and environmental risk factors. Among the latter, Epstein-Barr virus (EBV), an ubiquitous herpesvirus, is the infectious agent that shows the strongest association with MS based on solid, widely accepted evidences: infectious mononucleosis, an acute disease caused by EBV, increases the risk of MS; persons with MS have higher levels of antibodies against EBV

than healthy individuals. These data suggest that defective EBV control by the host's immune system might be implicated in the inflammatory process that targets the central nervous system in MS. This study has investigated the possible associations between EBV infection status, immune system activation in cerebrospinal fluid (CSF) and peripheral blood, and clinical and radiological parameters in persons with MS aiming to gain insights into virus-host interactions and explore the potential clinical relevance of these associations.

RESULTS

The persons who agreed to participate in the study received a diagnosis of MS and were monitored in the three MS Clinical Centers involved in the project. Due to difficulties in enrolling in the study an appropriate number of persons with clinically isolated syndrome and primary progressive MS, the study was limited to 79 persons with MS with a relapsing onset. The samples analysed were drawn at MS diagnosis (CSF and blood) and, in 38 patients, at 6-month intervals for a period of two years (blood). Highly specific and sensitive methods were used to quantify EBV DNA load and expression of seven viral genes and 57 cellular genes implicated in immune system function in matched samples of mononuclear cells isolated from the CSF and the peripheral blood. The EBV study in blood samples also involved 28 healthy donors.

No differences were found in the frequency of blood cell samples with detectable EBV DNA or RNA or in the amount of EBV DNA in peripheral blood cells between persons with MS and healthy donors. However, EBV genes known to be associated with an activated viral infection were expressed in a substantial proportion of blood cell samples from persons with MS (25.3%) but were only rarely detected in samples from healthy controls (3.6%); a positive association was found between EBV DNA levels and expression of viral genes involved in EBV activation in persons with MS. Expression of EBV genes was detected in a small fraction of CSF cell samples from persons with MS (7%) and was invariably compatible with activation of viral infection.

The combined study of EBV and cellular genes involved in immune system function allowed to identify groups of genes expressed in a coordinated manner and imputable to specific biological processes, includ-

ing: in CSF, antiviral immunity mediated by type-1 interferon and cytotoxic T lymphocytes, viral activation and cytotoxicity mechanisms, production of pro-inflammatory molecules; in blood, cytotoxic immunity associated with sensing of viral nucleic acids; viral activation associated with markers of lymphocyte activation and/or antiviral immunity mediated by type 1 interferon, inflammation. Based on the differential expression of cellular and/or viral genes in CSF and peripheral blood cells, persons with MS were grouped into clusters, irrespective of their clinical characteristics. So far, no association was found between patient or gene clusters and demographic, clinical, radiological or CSF inflammatory parameters. The possible prognostic significance of the results obtained at MS diagnosis and clinical relevance of the longitudinal assessment of viral and cellular genes will be investigated in the prospective study that is still ongoing.

CONCLUSIONS

The results of this project confirm and extend the existing evidence supporting persistent activation and, hence, inadequate immune control of EBV infection in MS, strengthening the concept that this virus might be involved in disease mechanisms. The preliminary data on the expression of genes associated with EBV activation and their association with specific immune-related cellular genes are potentially relevant for the identification of new disease biomarkers in the peripheral blood of persons with MS. In particular, the combined evaluation of a restricted number of viral and immune-related genes could be a more adequate, sensitive and informative tool to investigate the relationship between disease course, response to therapy and changes in EBV-immune system interactions in persons with MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Veroni C, Marnetto F, Bertolotto A, Frau J, Cocco E, Repice A, Ballerini C, Aloisi F. Altered EBV transcriptional profile in the peripheral blood of CIS and MS patients. 34th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Berlino, 10-12 Ottobre 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 3 anni (prorogato di 10 mesi) e l'ammontare di 161.752,50 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 3 years (extended by 10 months) and the amount of € 161,752.50

Paolo Muraro

Department of Brain Sciences, Imperial College London, London, UK

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Maria Teresa Cencioni

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Richard Nicholas, Department of Brain Sciences, Imperial College London, London UK

Richard Reynolds, Department of Medicine, Imperial College London, London UK

Roberta Magliozzi, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia

Luca Battistini, Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma, Italia

Risposte T cellulari citotossiche dirette contro il virus di Epstein-Barr e crossreattive con proteine della mielina in persone con la SM

PREMESSE E OBIETTIVI

Diversi studi hanno mostrato una predisposizione di alcuni individui a sviluppare la sclerosi multipla (SM) dopo un'infezione da virus di Epstein Barr (EBV). Inoltre, cellule capaci di riconoscere e distruggere la mielina, un'importante proteina dei neuroni, sono state isolate dal sangue ed identificate attraverso tecniche istologiche in biopsie e autopsie di cervelli con diagnosi di SM.

Abbiamo ipotizzato che un'infezione da EBV induce una risposta immune non adeguatamente controllata in persone con SM. Alcuni importanti meccanismi di immuno regolazione, in particolare "programmed death" (PD-1) e "activation-induced cell death" (AICD), sono difettosi e permettono alle cellule prolungata sopravvivenza, persistente attivazione e capacità ad uccidere cellule bersaglio generando persistente infiammazione e cronicità. La capacità di alcune cellule, conosciute come cellule T CD8, di riconoscere EBV e di cross reagire con proteine della mielina è già stata precedentemente dimostrata ed è razionale supporre che quelle cellule che sono sopravvissute a meccanismi regolatori di morte cellulare possono mantenere un danno infiammatorio nel sistema nervoso centrale (SNC). Noi intendiamo verificare se meccanismi regolatori conferiti dall'espressione del PD-1 e AICD in cellule CD8 T EBV specifiche sono disfunzionali in pazienti con SM. Vogliamo inoltre verificare che queste cellule possono cross-reagire alle proteine della

mielina e vice versa; e valutarne la resistenza alla morte cellulare in persone con SM e donatori sani e verificarne la correlazione all'attività di malattia.

I risultati preliminari indicano che CD57 è espresso su cellule T CD8 EBV specifiche isolate dal sangue periferico di persone con SM. Questa popolazione di cellule è capace di uccidere cellule autologhe infettate da EBV in un processo chiamato citotossicità.

Una riduzione della citotossicità e dell'attivazione è regolata dall'espressione del PD-1. Sulla base di questi risultati, ipotizziamo che una ridotta risposta al PD-1 può favorire la sopravvivenza di cellule reattive al self che generano in risposta al virus. Noi ci aspettiamo che i risultati di questo progetto possano chiarire i meccanismi attraverso i quali l'interazione di EBV con un sistema immunitario suscettibile può scatenare lo sviluppo della SM.

RISULTATI

Un significativo aumento dell'espressione del PD-1 è stato osservato su cellule CD8+CD57+ in persone con SM stabile rispetto a donatori sani (**p<0.01). L'espressione del PD-1 in pazienti con SM in fase attiva di malattia non è significativamente differente da quella osservata nei donatori sani. L'alta espressione del PD-1 osservata in pazienti con forma stabile di malattia è correlata, inoltre, ad una diminuzione di attività delle cellule T CD8+CD57+. Inoltre, osserviamo una significativa induzione di morte in cellule T

CD8+CD57+ indotta da AICD in donatori sani ma non nelle persone con SM. I nostri risultati confermano che cellule T CD8+CD57+ in persone con SM mostrano più resistenza a morte indotta da AICD rispetto ai donatori sani e pertanto potrebbero persistere nel periferico dopo un'infezione virale. Cellule T CD8+CD57+ e cellule T CD3+CD57+ sono state evidenziate con tecniche istologiche negli infiltrati meningei e perivascolari in autopsie di cervelli di pazienti con diagnosi di forma secondaria progressiva (SP) di malattia indicando un'associazione tra la frequenza delle cellule T CD57+ e la rapidità della progressione di malattia. Inoltre, diverse cellule PD-1+ sono state individuate nelle meningei e una proporzione sostanziale (20-40%) delle cellule PD-1 infiltranti le meningi sono CD57+PD-1+. Considerando la maggiore frequenza di cellule PD-1+ rilevate negli infiltrati meningei rispetto al numero più basso di cellule CD57+, numerose cellule PD-1+ CD57- sono state rilevate in tutti i casi di SM secondariamente progressiva esaminati post-mortem. Tuttavia, la maggior parte delle cellule CD57+ rilevate esprimono PD-1 sulla loro superficie.

Le cellule T CD8+ CD57+ EBV specifiche hanno mostrato di cross reagire con diversi componenti della mielina e di esprimere CD57, CD27, CD5 e PD-1. Alti livelli di CD27 solubile sono presenti nel liquido cerebrospinale di una coorte di 80 pazienti con SM recidivante remittente in fase attiva di malattia. Inoltre, i livelli di CD27 solubile sono stati osservati correlare all'attività della malattia in sei persone con SM in uno studio di follow-up. Abbiamo anche mostrato che la forma solubile di CD27 è rilasciata da cellule T CD4+ e CD8+ dopo stimolazione.

CONCLUSIONI

In questo progetto abbiamo chiarito il meccanismo di risposta delle cellule T CD8 + CD57+ a EBV in persone con SM. Abbiamo studiato due biomarcatori espressi in cellule T EBV specifiche, PD-1 che aumenta in fase stabile di malattia e CD27 solubile che invece correla all'attività della malattia. Sebbene sia necessario analizzare il CD27 solubile in periferia e correlare i livelli periferici con l'attività intratecale, entrambi potrebbero essere considerati potenzialmente biomarcatori nella sclerosi multipla.

Unregulated cytotoxic T cell responses to Epstein Barr virus cross-reacting to myelin proteins in people with MS

INTRODUCTION AND AIMS

Several evidences support the association of risk for developing multiple sclerosis (MS) to infection by Epstein Barr virus (EBV). Also, cells of the immune system capable to recognise and destroy the myelin, an essential component of neurons, have been detected in the blood and observed histologically in the biopsy and in post mortem examination of brains with a diagnosis of MS. We hypothesized that EBV infection induces an immune response not efficiently controlled in people with multiple sclerosis (pwMS). We further hypothesized that certain important mechanisms of immune regulation, specifically the programmed death (PD-1) and activation-induced cell death (AICD) pathways, are defective and allow the cells prolonged survival, persistent activation and ability to kill target cells generating persistent inflammation and chronicity.

The capacity of some cells defined as CD8 T cells to recognise EBV and to cross-react with myelin proteins has been previously demonstrated and it is rea-

sonable to postulate that those cells that have escaped regulatory death might perpetuate inflammatory damage in the central nervous system.

We intend to test whether regulatory mechanism conferred by PD-1 expression and AICD in EBV specific CD8 T cells are impaired in pwMS. We also want to ascertain that EBV specific CD8 T cells can cross-react to myelin peptides and vice versa; and evaluate these cross-reactive T cells' resistance to death in pwMS and healthy controls and ascertain whether that is correlated to the disease activity.

Our preliminary results indicate that CD57, is expressed in EBV specific CD8 T cells detected in peripheral blood of pwMS. This population of cells is able to kill own EBV infected cells in a process called cytotoxicity. The decrement of the cytotoxicity and activation is regulated by the expression of PD-1. Based on this evidence, we hypothesize that a decreased responsiveness to PD-1 dependent regulatory mechanisms can favour the survival of cells reactive against the self that can be generated in re-

sponse to the virus. We expect the results from this project to enlighten the mechanisms through which interaction of EBV with a susceptible immune system may initiate the development of MS.

RESULTS

Significantly increased expression of PD-1 was observed on CD8+CD57+T cells in patients with stable MS compared to healthy controls (**p<0.01). The expression of PD-1 in pwMS with active disease was not significantly different from that of healthy controls. The high expression of PD-1 observed in patients with stable disease is correlated also to decrement of activity of CD8+CD57+T.

Also, we observed significant induction of death in CD8+CD57+T cells undergoing AICD from healthy controls but not in pwMS. Our results confirm that CD8+CD57+T cells from pwMS show more resistance to AICD than those from healthy donors and they should persist in the periphery after virus infection.

CD8+CD57+T and CD3+CD57+ T cells have been detected histologically in post mortem examination of brains in meningeal and perivascular infiltrates from patients with a diagnosis of secondary progressive multiple sclerosis with rapidly aggressive disease indicating an association of relative frequency of CD57+ T cells with the rapidity of the disease progression. Also, several PD1+ cells were detected in particular in meningeal infiltrates and a substantial proportion (20-40%) of the PD1+ cells infiltrating the

meninges were CD57+ PD1+ cells. Considering the higher frequency of PD1+ cells detected in the meningeal infiltrates compared to the lower number of CD57+ cells, numerous PD1+ CD57- cells have been detected in all the examined post-mortem Secondary Progressive MS cases. However, most of the detected CD57+ cells express PD1 on their surface. EBV specific CD8+CD57+ T cells proliferating in response to EBV infected B cells have showed to recognise also several components of the myelin and to express markers as CD57, CD27, CD5 and PD-1. High levels of soluble CD27 have been detected in the cerebrospinal fluid (CSF) collected from a cohort of 80 patients with relapsing remitting MS in active disease. Furthermore, levels of soluble CD27 have been observed to correlate to disease activity in six pwMS in a follow up study. We also showed that soluble form of CD27 is release from activated CD4+ and CD8+ T cells.

CONCLUSIONS

In this project we have elucidated the mechanism of response of CD8+CD57+T cells to EBV in pwMS. We have investigated two biomarkers express in EBV specific T cells PD-1 that increase in stable disease and soluble CD27 that is correlated to disease activity and intrathecal inflammation. Although we need to validate these observations, soluble CD27 could be considered a promising potential biomarker of disease severity in multiple sclerosis.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Cencioni MT, Magliozzi R, Nicholas R, Ali R, Malik O, Reynolds R, Borsellino G, Battistini L, Muraro PA. Programmed death 1 is highly expressed on CD8₊ CD57₊ T cells in patients with stable multiple sclerosis and inhibits their cytotoxic response to Epstein-Barr virus. *Immunology*. 2017 Dec;152(4):660-676. doi: 10.1111/imm.12808. Epub 2017 Sep 21

Cencioni MT, Magliozzi R, Nicholas R, Ali R, Malik O, Reynolds R, Borsellino G, Battistini L, Muraro PA. PD 1 inhibits CD8+CD57+T response to EBV and is highly expressed on CD8+CD57+T cells in pwMS. MS: Immunopathology session at MS Frontiers 2017 29-30 June 2017

Cencioni MT, Yang C-Y, Abrahamsson S, Nicholas R, Muraro P. Mechanisms of dysfunction of regulatory B cell activity in Multiple Sclerosis ECTRIMS 2018 10 - 12 October 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 210.000 €

Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years and the amount of € 210,000

Simona Rolla

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

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Valentina Bardina, Ilario Ferrocino, Stefania De Mercanti, Marinella Clerico

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Luca Simone Cocolin, Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Torino

Alessio Signori, Dipartimento di Scienze della salute (DISSAL), Sezione di Biostatistica, Università degli Studi di Genova, Genova

Roberta Lanzillo, Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

Il microbiota intestinale e la diversità metagenomica nello sviluppo della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cause che scatenano l'insorgere della sclerosi multipla (SM) non sono ancora del tutto chiare. La combinazione di fattori ambientali e genetici sembra però giocare un ruolo importante nell'attivare quei linfociti autoreattivi, normalmente presenti ma ben controllati da vari meccanismi, che sono in grado di riconoscere e aggredire le strutture della mielina nel sistema nervoso centrale (SNC). In questo contesto un'alterazione del microbiota intestinale, comunemente conosciuto come flora batterica intestinale che è propria di ciascun individuo, è stata suggerita come uno dei possibili fattori ambientali che potrebbero contribuire allo sviluppo della SM. Il microbiota intestinale consiste in una grande comunità di microrganismi che svolgono funzioni essenziali per l'organismo ospite: funzioni di tipo metabolico, di tipo enzimatico, di protezione e di stimolazione del sistema immunitario. Dal punto di vista immunologico, il microbiota intestinale costituisce infatti un'importante barriera tra l'ambiente esterno e il sistema immunitario, nonché il più grande sito di esposizione verso un'ampia gamma di antigeni patologici ed intrinseci. Relativamente alla SM, i primi dati arrivano dallo studio dei modelli murini, dove è stato osservato come diversi batteri, normalmente presenti nel microbiota intestinale, fossero in grado di indurre le cellule infiammatorie Th17, o le

cellule "protettive" T regolatorie (Treg) a livello dell'intestino. Queste cellule riuscivano poi a passare nel circolo periferico e raggiungere il SNC, regolando quindi l'insorgenza della malattia.

Ci siamo quindi chiesti se esistesse un'alterazione nella composizione e nelle funzioni del microbiota intestinale, cosiddetta disbiosi, anche nei pazienti con SM, focalizzandoci su quelli con sindrome clinicamente isolata (CIS), ovvero che presentano il primo evento di demielinizzazione.

RISULTATI

In questo progetto abbiamo raccolto e analizzato i campioni di una piccola coorte di pazienti con sindrome clinicamente isolata (CIS) e di volontari sani per capire se esistesse un'alterazione nel microbiota intestinale all'esordio della SM, e se questo correlasse con l'attivazione della risposta immunitaria infiammatoria. Siccome la composizione del microbiota intestinale è influenzata da diversi fattori tra cui l'età, l'etnia, la dieta e lo stile di vita, abbiamo reclutato pazienti e volontari che fossero il più possibile simili per questi fattori, in modo da evitare variabili confondenti e rendere il nostro studio più efficace. La composizione del microbiota intestinale è stata studiata mediante sequenziamento delle popolazioni microbiche presenti nei campioni di feci. In particolare, in questo stu-

dio, abbiamo utilizzato un approccio di sequenziamento metagenomico di nuova generazione chiamato “shotgun” che ci ha permesso di esplorare simultaneamente le popolazioni microbiche presenti e le loro funzioni, caratterizzando così il microbioma, ovvero il patrimonio genetico posseduto dal microbiota, dei pazienti con CIS e dei volontari sani. Parallelamente abbiamo analizzato l’attivazione dei linfociti T nel sangue periferico.

Confrontando il microbioma dei pazienti con CIS con quello dei volontari sani, abbiamo evidenziato la presenza di una moderata disbiosi intestinale nei pazienti con CIS. Questa è determinata da una minore ricchezza in alcune specie microbiche, specialmente in quelle popolazioni deputate alla produzione degli acidi grassi a catena corta, conosciuti anche con l’acronimo SCFA dall’inglese “short chain fatty acid”. Gli SCFA sono composti prodotti dal metabolismo del microbiota intestinale derivanti dalla fermentazione delle fibre alimentari e hanno un ruolo fondamentale sia nel mantenimento dell’omeostasi intestinale che nella modulazione del sistema immunitario: sono infatti conosciuti per avere con un’azione anti-infiammatoria in grado di promuovere il differenziamento

dei Treg e la produzione di citochine anti-infiammatorie, come l’Interleuchina-10 (IL-10). Abbiamo quindi fatto una preliminare analisi del volatiloma fecale, ovvero dei metaboliti volatili presenti nelle feci, e abbiamo riscontrato nei pazienti con CIS una diminuzione degli SCFA. Questo dato correla, non solo con la minor abbondanza di batteri produttori SCFA, ma anche con la diminuzione di cellule Treg che producono IL-10, e quindi con funzioni soppressive in grado di regolare l’attivazione delle cellule infiammatorie, osservata nel sangue periferico dei pazienti con CIS.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questo progetto saranno la base per ulteriori studi volti ad identificare quali consorzi microbici influenzino il decorso della malattia, quali siano le funzioni di questi consorzi e come influenzino il sistema immunitario, definendo così nuovi aspetti della patogenesi della malattia. Inoltre, grazie a questi studi, nel futuro sarà possibile attuare una terapia, di accompagnamento alle attuali presenti, in grado di agire sul microbiota intestinale per modulare la risposta immunitaria e il decorso della SM.

Gut microbiota and metagenomic diversity in the development of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Relatively little is known about what might trigger or facilitate the onset of multiple sclerosis (MS). The combination of environmental and genetic factors, however, seems to play an important role in activating self-reactive lymphocytes, normally present but well controlled by several mechanisms, which are able to recognize and attack the myelin structures in the central nervous system (CNS). In this context, an alteration of gut microbiota, commonly known as gut flora, that is unique for each individual, has been suggested as one of the possible environmental factors that could contribute to the development of MS. The gut microbiota consists of a large community of microorganisms with essential functions for the host organism that include: metabolic, enzymatic, protection from pathogen colonization and stimulation of the immune system. From an immunological point of view, the gut microbiota represents an important boundary between the environment and the immune

system, and a major site for exposure to a wide range of both pathologic and intrinsic antigen. The first evidences of the importance of gut microbiota in the context of MS come from studies in the mouse model, where different bacteria, normally present in the gut microbiota, were able to induce Th17 inflammatory cells, or “protective” T regulatory cells (Treg) at the intestinal level. These cells were then able to migrate into the peripheral circulation and reach the CNS, thus regulating the onset of the disease.

We therefore asked if an alteration in the composition and functions of the gut microbiota, so-called dysbiosis, exist also in patients with MS, focusing our study on those with clinically isolated syndrome (CIS), i.e. presenting the first episode of demyelination.

RESULTS

In this project we collected and analyzed samples of a small cohort of patients with CIS and healthy volunteers (HV) to understand if an alteration of the gut mi-

crobiota composition exist at the onset of MS, and if it is correlated with the activation of the inflammatory immune response. We recruited patients and volunteers who were highly matched for age, demographic origin, lifestyle and diet, factors that were the strength of our study as all of them strongly impact the composition of gut microbiota. Gut microbiota composition was studied by sequencing the microbial populations present in the stool samples. In particular, we used the new metagenomic sequencing approach called "shotgun" that allowed us to simultaneously explore the microbial populations present in the gut and their functions, thus characterizing the microbiome, the genetic heritage of the microbiota, of patients with CIS and of HV. At the same time we analyzed the activation of T lymphocytes in the peripheral blood. A moderate gut dysbiosis was observed in patients with CIS compared to HV. This was characterized by a lower amount in some bacteria, especially in those aimed to the production of short-chain fatty acids (SCFA). SCFA are metabolic compounds deriving from the fermentation of dietary fibers in the gut microbiota and have a fundamental role both in the maintenance of intestinal homeostasis and in the modulation of the immune response: they are known

to have anti-inflammatory properties able to promote the differentiation of Treg cells and the production of anti-inflammatory cytokines, such as interleukin-10 (IL-10). A preliminary analysis of the fecal volatiloma, i.e. of the volatile metabolites present in the feces, showed a lower SCFA amount in the feces of patients with CIS. This data correlates not only with the lower abundance of bacteria producing SCFA, but also with the decrease, of IL-10 producing-Treg cells, those cells with suppressive functions able to regulate the activation of inflammatory cells, in the peripheral blood of patients with CIS.

CONCLUSIONS

The results obtained in this project will be the basis for further studies aimed to identify which microbial consortium could influence the course of the disease, which are the functions of this consortium and how it affects the immune response, thus providing new insights into the pathogenesis of the disease. Moreover, information obtained at the end of these studies will be useful to find new therapeutic approaches, accompanying the present therapies, able to manipulate the gut microbiota in order to modulate the immune response and the course of MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Clerico M, Bardina V, Ferrocino I, De Mercanti S, Cianflone A, Lanzillo R, Durelli L, Coccolin L and Rolla S.- Gut microbiota in the development of MS: a pilot study - XXVI AINI Congress and 16th ESNI Course, San Servolo, Venice, Italy, June 26-30, 2017

Clerico M, Bardina V, Ferrocino I, De Mercanti S, Cianflone A, Lanzillo R, Manfredi F, Coccolin L, Durelli L, and Rolla S. -Clinically Isolated Syndrome: any correlation with gut microbiota? A pilot study- XLVIII Congresso Società Italiana di Neurologia, Napoli, Italy, October 14-17, 2017

Rolla S, Bardina V, Ferrocino I, De Mercanti S, Ferraro M, Cianflone A, Lanzillo R, Durelli L, Coccolin L and Clerico M. -Gut microbiota alteration in Clinically Isolated Syndrome: a pilot study- MSParis2017, 7th Joint ECTRIMS - ACTRIMS Meeting, Paris, France, October 25-28, 2017.

Ferrocino I, Bardina V, Lanzillo R, De Mercanti S, Coccolin L, Clerico M and Rolla S. -Could gut microbiota help in triggering Multiple Sclerosis?- Seventh Gut Microbiota for Health World Summit, Roma, Italy, March 10-11, 2018

Rolla S, Ferrocino I, Bardina V, Ferraro M, Cianflone A, Lanzillo R, De Mercanti S, Coccolin L, Clerico M. -Gut microbiota and metagenomic diversity in Clinically Isolated Syndrome- 70th Annual AAN Meeting, Los Angeles, CA, April 21-27, 2018

Bardina V, Ferrocino I, Ferraro M, Giai Via A, Lamberti A, Lanzillo R, Coccolin L, Clerico M and Rolla S. -Alteration of the human gut microbiome in Clinically Isolated Syndrome- XXVII AINI Congress, Trieste, Italy, May 07 - 10, 2018

Rolla S, Bardina V, Ferrocino I, De Mercanti S, Giai Via A, Lamberti A, Lanzillo R, Esposito S, Bonavita S, Coccolin L and Clerico M. -Alterations in gut microbiome are associated with the onset of Multiple Sclerosis: an Italian pivotal study- 34th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) Berlin, Germany, October 10-12, 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

Roberta Rizzo

Dipartimento Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Dario Di Luca, Antonella Rotola, Daria Bortolotti, Valentina Gentili, Silvia Bolzani

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Maria Rosaria Tola, Eleonora Baldi, Luisa Maria Caniatti, Valeria Tugnoli, Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Ferrara

Enrico Granieri, Maura Pugliatti, Ilaria Casetta, Elisabetta Groppo, Elena Della Coletta, Castellazzi Massimiliano, Dipartimento di Scienze della Chirurgia Biomedica e Specialistica, Centro per la Sclerosi Multipla, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara

Enrico Fainardi, Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione, Sezione di Neuroradiologia Università degli Studi di Ferrara, Ferrara

Attivazione e differenziamento delle cellule Natural killer in risposta alle infezioni da Herpesvirus nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa verso le infezioni virali. Risultati ottenuti di recente nel nostro laboratorio hanno mostrato come alcuni pazienti con sclerosi multipla (SM) presentino una maggiore suscettibilità nei confronti delle infezioni da herpesvirus. Lo studio di questo fenomeno ci ha portato all'identificazione del recettore KIR2DL2, espresso dalle cellule NK del sangue, come responsabile di questo difetto. Le cellule NK sono importanti nel controllo delle infezioni virali e risultati pubblicati recentemente ne dimostrano l'implicazione nello sviluppo delle malattie autoimmuni. In questo studio ci siamo proposti di studiare:

- 1) per quali motivi le cellule NK di pazienti con SM hanno una risposta deficitaria nei confronti dell'infezione da herpesvirus;
- 2) le conseguenze che questa condizione può avere sull'esito di malattia.

RISULTATI

Abbiamo arruolato 40 pazienti con SM, 40 soggetti sani e 40 pazienti con altre malattie neurologiche (pazienti Neuro-LUPUS della clinica SLE - Unità di

reumatologia - Ospedale universitario di Ferrara). Abbiamo evidenziato la presenza del gene KIR2DL2 nel 53% dei pazienti con SM e nel 42% dei soggetti di controllo. Abbiamo valutato l'effetto sull'attivazione delle cellule NK dell'espressione del recettore KIR2DL2 durante l'infezione da herpesvirus (HSV-1, HHV-6A, -6B ed EBV). Abbiamo osservato un'aumentata attivazione delle cellule NK che non esprimono il recettore KIR2DL2 in presenza di cellule infettate da herpesvirus, mentre le cellule NK positive per KIR2DL2 non erano in grado di attivarsi. Abbiamo osservato titoli di Immunoglobuline G (IgG) anti-herpesvirus più elevati nel sangue di pazienti SM rispetto ai controlli (N: 5 vs 1). In particolare, abbiamo trovato titoli IgG più elevati verso EBV (EBNA1 + VCA +) e HHV-6 in pazienti SM rispetto ai controlli. Quando abbiamo suddiviso i pazienti SM in base all'espressione di KIR2DL2, abbiamo riscontrato che i pazienti con SM con titolo di IgG anti-herpesvirus aumentato erano prevalentemente positivi a KIR2DL2. Andando ad analizzare lo stato di malattia, abbiamo osservato una correlazione positiva tra l'aumento dei titoli anticorpali verso HHV-6 e la gravità della malattia. La valutazione delle modificazioni

epigenetiche, in particolare lo stato di metilazione, nella modulazione dell'espressione di KIR2DL2 in pazienti SM, ha mostrato una correlazione tra la metilazione del promotore KIR2DL2, che porta al silenziamento genico di KIR2DL2 e una migliore prognosi di malattia. Poiché l'espressione di KIR2DL2 è anche controllata da fattori di trascrizione, abbiamo studiato una loro possibile implicazione nella modulazione dell'espressione di KIR2DL2. Abbiamo trovato un ruolo significativo per Sp1 e PKA nella regolazione dell'espressione di KIR2DL2. Abbiamo osservato un'aumentata attività di PKA e dello stato di fosforilazione di Sp1 e una corrispondente up-modulazione di KIR2DL2 in linfociti infettati da herpesvirus, che è parzialmente ripristinata aggiungendo KT5720, inibitore PKA e l' inibitore di Sp1, WP631. Abbiamo, inoltre, identificato una differenza nell'immuno-fenotipo delle cellule NK tra le cellule KIR2DL2 positive e KIR2DL2 negative. Abbiamo identificato un profilo di espressione di citochine Th17 in cellule NK positive per KIR2DL2 e un aumento di cellule NK CD160 + CD2 + in pazienti con

SM negativi per l'allele KIR2DL2 quando co-coltivati con linfociti infettati con herpesvirus.

CONCLUSIONI

Il raggiungimento di tutti gli obiettivi di questa proposta ha permesso di chiarire alcuni meccanismi rilevanti per definire una condizione che è peculiare solo per la SM.

La possibilità di fornire una caratterizzazione completa della risposta delle cellule NK in ciascun paziente SM potrebbe aiutare ad aumentare la sicurezza della terapia con farmaci biologici e immunosoppressivi (ad esempio Fingolimod, Natalizumab), che potrebbero riattivare l'infezione da herpesvirus. Inoltre, la disponibilità di Lirilumab (IPH2102 / BMS-986015), un anticorpo monoclonale umano che blocca l'interazione del recettore KIR2DL2 e dei suoi ligandi, con uno studio randomizzato di fase II in tumori, potrebbe consentire un approccio terapeutico per promuovere l'attivazione delle cellule NK verso l'infezione da herpesvirus nei pazienti con SM con un possibile effetto positivo nel decorso della malattia.

Natural killer cell activation and differentiation in response to Herpesvirus infection in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Innate immunity is the first line of defense against viral infections. Recent results in our laboratory have shown that some patients with multiple sclerosis (MS) have a greater susceptibility to herpesvirus infections. The study of this phenomenon led us to the identification of the KIR2DL2 receptor, expressed by NK blood cells, as responsible for this defect. NK cells are important in the control of viral analysis and published results recently demonstrated their implication in the development of autoimmune diseases. In this study we set out to study:

- 1) for what reasons the NK cells of MS patients have a deficient response towards herpesvirus infection;
- 2) the consequences that this condition can have on the outcome of the disease.

RESULTS

We enrolled 40 MS patients, 40 healthy control subjects and 40 patients with other neurological diseases (Neuro-LUPUS patients from the SLE clinic – Rheumatology Unit - University Hospital of Ferrara).

We evidenced the presence of KIR2DL2 gene in the 53% of MS patients and 42% of control subjects. We have analysed the effect on NK cell activation of the expression of KIR2DL2 receptor during herpesvirus (HSV-1, HHV-6A, -6B and EBV) infection. We have observed an increased activation of NK without KIR2DL2 expression in the presence of herpesvirus infected cells, whereas KIR2DL2+ NK cells were not able to activate. We found a higher frequency of the number of simultaneously-increased specific anti-herpesvirus IgG titers in the blood of MS patients in comparison with controls (N: 5 vs 1). In particular, we found higher IgG titers towards EBV (EBNA1+VCA+) and HHV-6 in MS patients in comparison with controls. When we subdivided MS patients according with KIR2DL2 expression, we found that the MS patients with simultaneously-increased specific anti-herpesvirus IgG titers were predominantly KIR2DL2 positive. When we looked at disease activity, we found a positive correlation between the increased endpoint antibody titers towards HHV-6 and disease severity.

The evaluation of epigenetic modifications, in particular, methylation, in modulating the expression of KIR2DL2 in MS patients, showed a correlation between KIR2DL2 promoter methylation, leading to KIR2DL2 gene silencing, and a better MS prognosis. Since KIR2DL2 expression is also controlled by transcription factors, we investigated a possible implication in modulating KIR2DL2 expression. We have found a significant role for Sp1 and PKA in regulating KIR2DL2 expression. We observed an increase in PKA activities and Sp1 phosphorylation and a corresponding KIR2DL2 up-modulation in HHVs infected lymphocytes, that is partially reverted to adding KT5720, PKA inhibitor, and WP631, Sp1 inhibitor. We recognized a difference in NK cell immune-phenotype between KIR2DL2+ and KIR2DL2- NK cells. We identified a Th17 cytokine expression profile in KIR2DL2 positive NK cells and an increase in CD160+CD2+ NK cells from MS patients negative for KIR2DL2 allele when co-cultured with her-

pesvirus infected lymphocytes.

CONCLUSIONS

The fulfillment of all the objectives of this proposal allowed the elucidation of several mechanisms that are relevant to define a condition that is peculiar only for MS disease.

The possibility to give a complete characterization of NK cell response in each MS patient could help in increasing the safety of therapy with biological and immune-suppressive drugs (e.g. Fingolimod, Natalizumab), that could reactivate herpesvirus infection. Moreover, the availability of Lirilumab (IPH2102/BMS-986015), a human monoclonal antibody that blocks the interaction of KIR2DL2 receptor and its ligands, with an ongoing randomized Phase II trial in tumours, could allow a therapeutic approach to promote NK cell activation towards herpesvirus infection in MS patients with a possible rebound in disease outcome.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Rizzo R, D'Accolti M, Bortolotti D, Caccuri F, Caruso A, Di Luca D, Caselli E. Human Herpesvirus 6A and 6B inhibit in vitro angiogenesis by induction of Human Leukocyte Antigen G. *Sci Rep.* 2018; 8(1):17683

Rizzo R, Soffritti I, D'Accolti M, Bortolotti D, Di Luca D, Caselli E. HHV-6A/6B Infection of NK Cells Modulates the Expression of miRNAs and Transcription Factors Potentially Associated to Impaired NK Activity. *Front Microbiol.* 2017;8:2143

Eliassen E, Di Luca D, Rizzo R, Barao I. The Interplay between Natural Killer Cells and Human Herpesvirus-6. *Viruses.* 2017; 9(12). pii: E367. doi: 10.3390/v9120367

Caselli E, Bortolotti D, Marci R, Rotola A, Gentili V, Soffritti I, D'Accolti M, Lo Monte G, Sicolo M, Barao I, Di Luca D, Rizzo R. HHV-6A Infection of Endometrial Epithelial Cells Induces Increased Endometrial NK Cell-Mediated Cytotoxicity. *Front Microbiol.* 2017;8:2525

Rizzo R, Bortolotti D, Fainardi E, Gentili V, Bolzani S, Baldi E, Casetta I, Granieri E, Rotola A, Furlan R, Di Luca D. KIR2DL2 inhibitory pathway enhances Th17 cytokine secretion by NK cells in response to herpesvirus infection in Multiple Sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2016;294:1-5

Ben Fredj N, Sakly K, Bortolotti D, Aissi M, Frih-Ayed M, Rotola A, Caselli E, Cura F, Sakly N, Aouni M, Di Luca D, Rizzo R. The association between functional HLA-G 14bp insertion/deletion and +3142 C>G polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *Immunol Lett.* 2016; 180:24-30

Rizzo R, Pietrobon S, Mazzoni E, Bortolotti D, Martini F, Castellazzi M, Casetta I, Fainardi E, Di Luca D, Granieri E, Tognon M; Emilia-Romagna network for Multiple Sclerosis (ERMES) study group. Serum IgG against Simian Virus 40 antigens are hampered by high levels of sHLA-G in patients affected by inflammatory neurological diseases, as multiple sclerosis. *J Transl Med.* 2016; 14(1):216

Bortolotti D, Rotola A, Baldi E, Bortoluzzi A, Straus S, Di Luca D, Rizzo R. Herpesvirus infections in KIR2DL2 positive Multiple Sclerosis patients: mechanism triggering autoimmunity? II SIV-ISV 2018. Rome 28-30 November 2018

Bortolotti D, Rotola A, Baldi E, Bortoluzzi A, Straus S, Di Luca D, Rizzo R. Herpesvirus infections in KIR2DL2 positive Multiple Sclerosis patients: mechanism triggering autoimmunity? XXXVI SIM 2018. Palermo 26-29 September 2018

Bortolotti D, Sicolo M, Baldi E, Pugliatti M, Bortoluzzi A, Govoni M, Fainardi E, Di Luca D, Rizzo R. Natural Killer/B cells interactions in neurological diseases: role of KIR2DL2 and CD40/CD40L in Herpesvirus infections. XXVII AINI Congress 2018. Trieste, May 7-10 2018

Bortolotti D, Sicolo M, Baldi E, Pugliatti M, Bortoluzzi A, Govoni M, Fainardi E, Di Luca D, Rizzo R. Herpesvirus infections in KIR2DL2 positive Multiple Sclerosis patients: mechanism triggering autoimmunity? VI EuSeV 2018. Berinoro, 22-24 June 2018

Bortolotti D, Gentili V, Sicolo M, Baldi E, Pugliatti M, Fainardi E, Di Luca D, Rizzo R. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi Natural killer cell subset in MS patients during EBV infection. XXVI AINI Congress 2017. Venice 26-30 June 2017

Bortolotti D, Caselli E, Sicolo M, Soffritti I, D'Accolti M, Barao I, Di Luca D, Rizzo R. STING-STAT6 signaling control NK cell activation and cytokine production during HHV-6A, HHV-6B and HHV-7 infection. X HHV-6 Congress 2017. Berlin 23-26 July 2017

Bortolotti D, Gentili V, Sicolo M, Rotola A, Baldi E, Pugliatti M, Fainardi E, Di Luca D, Rizzo R. Espansione di un subset di cellule Natura killer CD57+NKG2Chi durante l'infezione de EBV nei pazienti con Sclerosi Multipla. I SIV-ISV 2017. Milan 25-28 June 2017

Bortolotti D, Caselli E, Sicolo M, Soffritti I, D'Accolti M, Barao I, Di Luca D, Rizzo R. Il signaling STING-STAT6 controlla l'attivazione delle cellule NK e la produzione di citochine durante l'infezione da HHV-6A. I SIV-ISV 2017. Milan 25-28 June 2017

Caselli E, Bortolotti D, Sicolo M, Soffritti I, D'Accolti M, Barao I, Di Luca D, Rizzo R. DNA sensor signaling in NK cells during HHV-6A and HHV-6B infection. XXXV SIM 2017. Genova 27-30 settembre 2017

Rizzo R, Bortolotti D, Gentili V, Bolzani S, Caselli E, Rotola A, Di Luca D. KIR2DL2 activation by Human Herpesviruses determines viral escape to innate immunity. VI ECV 2016. Hamburg 19-22 October 2016

Rizzo R, Bortolotti D, Gentili V, Bolzani S, Rotola A, Di Luca D. Herpesviruses and NK cells: characterization of KIR2DL2 antiviral activity. XXXIV SIM 2016. Pisa 25-28 September 2016

Gentili V, Bortolotti D, Bolzani S, Rotola A, Di Luca D, Rizzo R. KIR2DL2 expression influences NK cell response and cytokine secretion to herpesvirus infections. International Summer Course "Intrinsic and Innate Immunity to Pathogens". Granozzo con Monticello Novara 23-25 June 2016

Rizzo R. Role of Natural Killer cells in the antiviral response of Multiple Sclerosis patients. XXXIII SIM 2015. Napoli 27-30 September 2015

Rizzo R, Bortolotti D, Fainardi E, Gentili V, Bolzani S, Baldi E, Casetta I, Granieri E, Rotola A, Furlan R, Di Luca D. KIR2DL2 expression influences NK cell response and cytokine secretion to herpesvirus infection in Multiple Sclerosis patients. XIII SIV 2015. Orvieto 14-16 September 2015

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di 82.000 €

Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years (extended by 3 months) and the amount of € 82,000

Antonina Dolei

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Caterina Serra, Elena Uleri, Maurizio Caocci, Gabriele Ibba, Claudia Piu, Edmondo Manca, Giuseppe Delogu, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari

Eduarda DePalma Gomes, Unità di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASL1, Sassari

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Luisa Imberti, Centro di Ricerca Emato-oncologica AIL (CREA), ASST Spedali Civili di Brescia

Diego Bertoli, Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia, Brescia

Roberto Capra, Centro di Sclerosi Multipla, Spedali Civili, Montichiari, Brescia

Studio dell'inibitore di JCV SF2/ASF in presenza di natalizumab, per capire i meccanismi della PML natalizumab-associata nei pazienti con SM

PREMESSE E OBIETTIVI

Natalizumab è molto efficace contro la sclerosi multipla (SM), ma il suo uso aumenta il rischio di leucoencefalopatia progressiva multifocale (PML), fatale malattia neurodegenerativa dovuta alla riattivazione del virus JCV, in soggetti immunocompromessi. Inoltre, la presenza di anticorpi anti-JCV non riesce ad identificare tutti i pazienti a rischio di riattivazione di JCV e di PML.

SF2/ASF (splicing factor2/alternative splicing factor) è un potente inibitore cellulare della replicazione di JCV. Ci siamo chiesti se SF2/ASF cambi nel sangue di pazienti trattati con natalizumab, e se ciò influenzi la riattivazione di JCV, dato che il signaling attivato dal legame di natalizumab alla cellula è connesso con quelli della regolazione di SF2/ASF.

Scopo: Ridurre il rischio di PML natalizumab-associata in pazienti SM, chiarendo se natalizumab alteri i livelli di SF2/ASF in cellule ematiche implicate nella replicazione di JCV e/o neuroinvasione, e se causi la perdita del controllo di JCV da SF2/ASF, e la riattivazione virale.

Obiettivo: verificare in cellule del sangue di pazienti SM durante terapia con natalizumab e di controlli: a) i

livelli di SF2/ASF. b) presenza e espressione di JCV. c) le relazioni tra livelli di SF2/ASF e di JCV, e dati clinici.

RISULTATI

Abbiamo analizzato campioni seriali di sangue di pazienti SM trattati con natalizumab per un periodo fino a 3 anni. I livelli di SF2/ASF cambiano durante la terapia, con andamento a campana: aumentano molto a 6 mesi dall'inizio della terapia, crescono fino ai 12 mesi, e si riducono nei due anni successivi, mentre i livelli della proteina JCV-T-Ag sono inversamente correlati a quelli di SF2/ASF. Punto chiave per chiarire il ruolo di SF2/ASF contro JCV durante terapia con natalizumab è valutare SF2/ASF e JCV in campioni di pazienti SM che sviluppino PML in corso di terapia. Abbiamo avuto la rara opportunità di analizzare campioni seriali da 2 pazienti SM in terapia con natalizumab, che hanno sviluppato PML durante lo studio osservazionale. I loro livelli di SF2/ASF nel tempo sono stati comparati a quelli degli altri pazienti, nell'arco di ~3 anni. Abbiamo anche valutato prelievi singoli di casi di PML. Il dato più eclatante nei due pazienti che hanno poi avuto la PML, è stato un brusco calo dei livelli di SF2/ASF nei primi 6-12 mesi di terapia, anziché un au-

mento. In generale, tutti i loro campioni (prima e dopo l'esordio della PML) avevano livelli di SF2/ASF più bassi degli altri pazienti SM sotto natalizumab. Le differenze sono ancora maggiori se si stratificano i dati per tempi, pre e post-esordio di PML (i pazienti MS in terapia che svilupperanno PML hanno 1/3 dei valori di SF2/ASF dei pazienti che non la svilupperanno).

Come controllo della relazione inversa tra livelli di SF2/ASF e JCV T-Ag, in corso di terapia con natalizumab, abbiamo valutato SF2/ASF e JCV T-Ag in campioni appaiati sano/malato di mucosa di pazienti con carcinoma colorettole, in cui JCV è presente, ma non si replica. In questa patologia non abbiamo trovato la relazione inversa tra SF2/ASF e JCV osservata con il natalizumab.

Dato che SF2/ASF ha un ruolo nella replicazione di retrovirus, e data la mole di studi, tra cui i nostri, sul contributo del retrovirus endogeno HERV-W/MSRV alla patogenesi della SM, ed i trials clinici di fase 2 contro HERV-W/MSRV in MS nei pazienti MS, abbiamo valutato MSRV in pazienti SM in terapia. I dati indicano che, in parallelo con i benefici della terapia, l'espressione di MSRV viene inibita dal natalizumab, come anche dal fingolimod.

CONCLUSIONI

1) La terapia con natalizumab inizialmente stimola (6-

12 mesi), ma poi riduce (18-36 mesi), i livelli di SF2/ASF, proteina cellulare che inibisce la replicazione di JCV, il virus che, nell'immunocompromesso, si riattiva e causa la PML, il cui rischio è aumentato nei pazienti trattati con natalizumab. Ciò può spiegare l'aumentato rischio di PML associata al natalizumab, rilevato dopo 2 anni di terapia.

2) I pazienti che svilupperanno PML, all'inizio della terapia con natalizumab non presentano l'aumento dei livelli di SF2/ASF, che invece sono molto inferiori ai valori normali dei pazienti SM sotto terapia con natalizumab, che non svilupperanno PML. Dato che SF2/ASF blocca la replicazione di JCV, i ridotti livelli di SF2/ASF possono spiegare la riattivazione di JCV, che può portare alla PML.

3) La riduzione dei livelli di SF2/ASF (anziché l'aumento) avviene molto precocemente (entro i primi sei mesi di natalizumab), cioè 18-30 mesi prima dell'esordio della PML. Anche se questa caduta precoce di SF2/ASF non fosse responsabile della riattivazione di JCV, essa potrebbe costituire un utile parametro da valutare per monitorare il rischio di sviluppare PML nei pazienti SM trattati con natalizumab.

Siamo consapevoli dei limiti del nostro studio, dovuti al basso numero di pazienti con PML in corso di natalizumab, ma sottolineiamo la rarità di studi longitudinali di pazienti con PML in corso di terapia.

Study of the JCV suppressor SF2/ASF under natalizumab, to give insights on the mechanisms of natalizumab-associated PML of MS patients

INTRODUCTION AND AIMS

Natalizumab is an effective therapy against multiple sclerosis (MS). Unfortunately, its use is associated with the risk of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), fatal brain disease due to local activation of the JCV polyomavirus, in a context of immunosuppression. Importantly, anti-JCV serostatus does not identify all patients at risk of JCV reactivation and PML.

The SF2/ASF (splicing factor2/alternative splicing factor) is a potent cellular inhibitor of JCV replication, also in glial cells. We wondered about SF2/ASF modulation in the blood of natalizumab-treated patients, and if this could influence JCV reactivation in blood and in brain.

Molecularly, this effect is conceivable, since the signaling pathways activated by the binding of natal-

izumab to alpha4integrins are linked deeply to the patterns of SF2/ASF regulation.

Aim: to reduce the risk of natalizumab-associated PML in MS patients, by elucidating if natalizumab affects the production of SF2/ASF in blood cells relevant for JCV replication and/or brain invasion, that could lead to the loss of JCV control by SF2/ASF, and consequent JCV reactivation, in blood cells from MS patients under therapy.

Objectives: to verify in blood cells from MS patients along therapy with natalizumab (and controls): a) SF2/ASF expression. b) JCV presence and expression. c) the relationships between SF2/ASF expression and JCV DNA replication, in comparison with clinical data.

RESULTS

Serial blood samples of MS patients under natal-

izumab were analysed during up to three years. The blood SF2/ASF expression varied during therapy, with a bell-shaped pattern, showing a maximum increase after six months of therapy, up to twelve months, and a decline in the following two years. The levels of the JCV T-Ag protein were inversely related to those of SF2/ASF protein.

The key point in defining the role of SF2/ASF in regulating JCV during natalizumab therapy was expected to derive from the analysis of SF2/ASF and JCV expression in samples from MS patients with PML developed during the therapy with natalizumab.

We had the unique opportunity to analyze serial samples of two MS patients from Brescia, who developed PML while enrolled in the observational study. The expression of SF2/ASF during three years of observation of these PML patients was compared to that of the natalizumab-treated patients. Additional PML cases, without time course, were also analyzed.

The most apparent finding in these two patients, was a drop in SF2/ASF levels in the first 6-12 months of therapy. Overall samples from them (before and after PML onset) had much less SF2/ASF than overall samples from the other MS patients under natalizumab. When stratified by timing, pre-onset and after onset, the differences between the two groups were much more pronounced (in the patients who later will undergo PML, the SF2/ASF levels were only 1/3 with respect to those of the control natalizumab-treated patients).

As a control of the inverse relationship between SF2/ASF and JCV T-Ag, we analyzed paired samples of lesional and normal colonic mucosa from patients affected by colon-rectal carcinoma, for JCV markers and levels of SF2/ASF. In these patients we did not observe the inverse relationship between SF2/ASF and JCV.

Since SF2/ASF was found to be relevant in the replication of retroviruses, and given the bulk of studies, including ours, on the role of the HERV-W/MSRV endogenous retrovirus, as contributor to MS pathogenesis, and the ongoing Phase 2 clinical trials against HERV-W/MSRV in MS patients, we measured MSRV expression in the samples from MS patients of the two cohorts. Data indicate that, parallel to the benefits of the therapy, in both cases MSRV expression is reduced, both with natalizumab and with fingolimod.

CONCLUSIONS

1) Natalizumab therapy firstly stimulates, then reduces the levels of SF2/ASF, potent cellular inhibitor of JCV, the virus that causes PML, whose risk is increased by natalizumab. This new finding may contribute to the increased risk of natalizumab-associated PML after 2 years of therapy.

2) The patients, who later will develop PML, do not have the initial increase of SF2/ASF, and their SF2/ASF concentration in the blood is much less than the normal values of the natalizumab-treated MS patients, who will not develop PML. Since SF2/ASF blocks JCV replication, SF2/ASF reduction may explain JCV reactivation, which may lead to PML.

3) Since the drop in SF2/ASF levels (instead of increase) occurs very EARLY (within the first six months of therapy), this is a consistent period of time (18-30 months) before PML onset). Even if unrelated to JCV reactivation, it could be a useful parameter to be evaluated, to monitor PML risk in natalizumab-treated patients.

We are well aware of the limitations of our study, due to the low numbers of patients studied, but we must stress the uniqueness of time-courses of PML patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Dolei A. The aliens inside us: HERV-W endogenous retroviruses and multiple sclerosis. *Mult Scler* 2017, Invited Topical Review, 2018 Jan;24(1):42-47

Uleri E, Ibba G, Piu C, Caocci M, Leoni S, Arru G, Serra C, Sechi G, Dolei A. JC polyomavirus expression and bell-shaped regulation of its SF2/ASF suppressor during the follow-up of multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *J Neurovirol.* 2017; 23:226-238

Dolei A. The aliens inside us: HERV-W endogenous retroviruses and multiple sclerosis. Invited speaker ACTRIMS Forum 2017, Orlando (USA), 23-25 February 2016.
<http://app.core-apps.com/actrims2017/abstract/baccd6fc0dbffd1a1543999bb47611bc>

Dolei A. HERV epigenetic dysregulation and transactivation by environmental viruses. Invited speaker, HERVs & Disease, Second International Workshop on Human Endogenous Retroviruses and Diseases, Washington DC, USA, 13-14 March 2017.
<https://www.hervanddisease.com/article/herv-epigenetic-dysregulation-transactivation-environmental-viruses/>

Dolei A. Endogenous retroviruses and neurodegenerative syndromes. Invited speaker, Virus infections of the nervous system, 5th European Seminars in Virology 2017, Bertinoro, Italy, June 16-18, 2017

Uleri E, Piu C, Caocci M, Ibba G, Sangez F, Pira G, Murgia L, Barmina M, Giannecchini S, Porcu A, Serra C, Scanu AM, De Miglio MR, Dolei A. Presence and expression of genes and proteins of the JC polyomavirus in paired colorectal cancer and adenomatous polyps, and the possibility of a hit-and-run mechanism. *Proc. 2nd SIV/ISV Natl Meeting p62, Rome, November 20-30, 2018*

Piu C, Ibba G, Bertoli D, Capra R, Uleri E, Serra C, Imberti L, Dolei A. MS patients under Natalizumab therapy undergo a drop of SF2/ASF, cellular inhibitor of the JCV polyomavirus, before the onset of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc. 2nd SIV/ISV Natl Meeting OC60, Rome, November 20-30, 2018*

Uleri E, Piu C, Caocci M, Ibba G, Sangez F, Pira G, Barmina M, Giannecchini S, Porcu A, Serra C, Scanu AM, De Miglio MR, Dolei A. Uleri E, Piu C, Caocci M, Ibba G, Sangez F, Pira G, Barmina M, Giannecchini S, Porcu A, Serra C, Scanu AM, De Miglio MR, Dolei A. Multiparametric detection of JC polyomavirus in paired colorectal cancer and adenomatous polyps suggests the possibility of a hit-and-run role. Multiple signatures of the JC polyomavirus in paired normal and altered colorectal mucosa indicate a link with human colorectal cancer, but not with cancer progression. *Submitted*

Piu C, Ibba G, Bertoli D, Capra R, Uleri E, Serra C, Imberti L, Dolei A. Reduced levels of the splicing factor2/alternative splicing factor, potent inhibitor of the JC polyomavirus, in Natalizumab-treated MS patients, before the onset of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Submitted*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 60.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year and the amount of € 60,000

Luisa Imberti

Centro di Ricerca Emato-oncologica AIL (CREA), Dipartimento di Diagnostica, ASST Spedali Civili di Brescia, Brescia

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Diego Bertoli, Alessandra Sottini

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Ruggero Capra, Centro Sclerosi Multipla, ASST Spedali Civili di Brescia, Brescia

Simonetta Gerevini, Dipartimento di Neuroradiologia, Ospedale San Raffaele, Milano

Cristina Scarpazza, Dipartimento di Psicologia Generale, Università degli Studi di Padova, Padova

Roberto Bresciani, Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia, Brescia

Luigi Notarangelo, Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

Identificazione di clonotipi delle cellule T in corso di leucoencefalopatia multifocale progressiva in pazienti con SM: ruolo nello sviluppo della malattia

PREMESSE E OBIETTIVI

Il virus JC (JCV) può mantenersi in forma latente nel corpo, ma può riattivarsi e causare la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) quando l'equilibrio del sistema immunitario viene meno. Non è noto come la risposta immunitaria nei confronti del JCV evolva nel tempo, ma si sa che i linfociti T e B sono cruciali per il controllo dell'infezione. Stabilire la qualità e la quantità delle cellule T e B al momento dello sviluppo della PML, verificare se esse si espandano clonalmente e se mostrino specificità ed analogie tra pazienti diversi e con terapie diverse potrebbe aiutare a capire perché il sistema immunitario non elimina il JCV nei pazienti con sclerosi multipla (SM) in terapia.

Lo studio è stato possibile grazie alla disponibilità di linfociti di due pazienti con SM, congelati prima dell'inizio della terapia con natalizumab, a 6 e 12 mesi dall'inizio della terapia ed al momento dell'esordio della PML. Altri campioni di pazienti con SM, due trattati con natalizumab, uno con alemtuzumab al momento della PML, e due pazienti che non hanno

sviluppato PML, raccolti longitudinalmente, sono stati anche utilizzati per valutare se le risposte immunitarie fossero PML/JCV-specifiche. L'analisi fenotipica dei linfociti B e T e del repertorio T con spectratyping è servita a misurare la quantità e la qualità della risposta immunitaria durante la terapia ed all'esordio della PML. Il sequenziamento di nuova generazione (NGS) del recettore delle cellule T (TR) e B (BCR) è stato utilizzato nel tentativo di identificare i cloni espansi.

Una caratteristica chiave dello studio è stata la caratterizzazione del TR e BCR eseguita senza alcuna manipolazione *in-vitro*, che potrebbe influenzare i risultati.

RISULTATI

Il primo caso di PML associata ad alemtuzumab è stato identificato una donna con SM di 31 anni, che ha presentato convulsioni tonico-cloniche generalizzate due mesi dopo il secondo ciclo del farmaco. Infatti, la risonanza magnetica era indicativa di PML e il liquor era positivo per il DNA di JCV.

All'esordio della PML, l'output timico era alterato in quattro dei cinque pazienti analizzati. La ridotta produzione di nuove cellule era controbilanciata dall'espansione di linfociti T memoria, in particolare delle cellule TEMRA specialmente nel paziente che aveva sviluppato la PML da alemtuzumab. In tutti i pazienti con PLM l'incremento delle cellule memoria era responsabile delle espansioni oligoclonali delle cellule T, dimostrate dalla presenza di numerosi picchi allo spectratyping. Tuttavia, i picchi trovati all'esordio della PML erano già presenti prima dell'inizio del trattamento e durante la terapia e la quantità delle perturbazioni del TR erano simili a quella dei pazienti che non avevano sviluppato PML. I valori bassi di entropia di Shannon delle sequenze ottenuti in NGS dimostrano che i pazienti con PML avevano un repertorio T più ristretto. I cloni espansi (> 0.5%) erano presenti preferenzialmente alla PML, ma l'analisi del CDR3 ha rivelato l'assenza di specifiche espansioni clonali all'esordio della PML, in quanto i cloni identificati erano già presenti sia prima che durante la terapia con natalizumab. Tutti i pazienti con PML condividevano alcuni cloni, ma tali cloni sono stati identificati anche nei pazienti che non hanno sviluppato PML e anche nei controlli sani. Infine, solo nel pool dei clonotipi di

PML (sequenze trovate esclusivamente all'esordio di PML e presenti in almeno due pazienti) è stata trovata una sequenza comune ed esclusiva composta da cinque aminoacidi, che però includeva aminoacidi codificati da una porzione di TRBJ 2-1, che è il gene "joining" più utilizzato in tutte le sequenze. Pertanto è improbabile che questa sequenza possa essere stata specificatamente indotta da JCV.

L'analisi del repertorio BCR ha evidenziato repertorio diversificato in tutti i campioni, nessuna sequenza condivisa, ma solo un utilizzo preferenziale di certe catene.

CONCLUSIONI

Complessivamente, i nostri dati dimostrano che, sebbene vi siano diverse alterazioni delle sottopopolazioni di linfociti T e B, diversi tipi di restrizioni del repertorio del TR e BCR, nessun clone specifico o comune è stato identificato all'esordio della PML nel sangue periferico. In particolare, i dati di follow-up indicano che, nel corso della PML, non ci sono espansioni di cellule T e B che sembrano correlate alla presenza di JCV.

Tuttavia, i nostri risultati migliorano la nostra comprensione sull'infezione da JCV e sulla PML.

Identification of progressive multifocal leukoencephalopathy-related T-cell clonotypes in natalizumab-treated MS patients: role in the disease development

INTRODUCTION AND AIMS

JC virus (JCV) establishes lifelong latency in the body but it can reactivate and cause progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) when the balance with the immune system is lost. It is not known how the immune response against JCV evolves over time, but it is well recognized that T cells are crucial for infection control. B cells may also play a significant role in JCV control through cytokine production.

Understanding the quality and quantity of T- and B-cells characterizing PML development in multiple sclerosis (MS) patients might help to know why the immune system does not clear JCV and to check if immune cells clonally expand at the PML onset, and if they show specific and common features across different patients and different therapies.

The study was feasible thanks to the availability of lymphocytes of two MS patients frozen before natal-

izumab initiation, at 6 and 12 months post-therapy, and at the moment of PML onset. Samples from two other MS patients treated with natalizumab and one with alemtuzumab were obtained at the time of PML development. Longitudinal samples of MS patients that did not develop PML, collected at the same time points were also evaluated to investigate whether immune responses were PML/JCV-specific.

T- and B-lymphocyte subsets phenotyping and spectratyping analysis served to measure the quantity and quality of immune response during treatment and at PML onset. Next generation sequencing (NGS) was utilized in the attempt to identify T-cell receptor (TR) and B-cell receptor (BCR) clonotypes.

A key feature of the study was that the characterization of the TR and BCR signatures was performed without any *in-vitro* manipulation, that may bias the results.

RESULTS

We identify a 31-year-old woman with MS who presented, two months after the second cycle of alemtuzumab injections, with generalized tonic-clonic seizures. The MRI scan was suggestive of PML and CSF was positive for JCV-DNA. This was the first case of alemtuzumab-related PML.

We found that at the PML onset the thymic output was impaired in four out five PML patients.

This reduced production of new T cells was counterbalanced by the peripheral expansion of memory lymphocytes and, in particular, of TEMRA cells in the patients that developed PML after alemtuzumab. According with the increase of memory cells, oligoclonal T-cell expansions, demonstrated by the presence of several dominant peaks after spectratyping analysis, were detected in all PML patients. However, the expanded picks found at the PML onset, were already present before treatment initiation and during therapy. In addition, the total TR perturbations were similarly restricted in patients who did or did not develop PML.

By NGS analysis, we found that PML patients showed a slightly restricted TR variable beta (TRBV) repertoire compared to MS patients, as showed by lower normalized Shannon entropy values; moreover, expanded clones, i.e. with a productive frequency >0.5%, were present only in PML patients. However, the analysis of single TRBV CDR3 sequences revealed the absence of specific clonotypic expansions at PML onset because the most expanded clones found at the time of PML were already present before natalizumab initiation and during therapy. Even if we found that all PML patients shared sequences with identical CDR3 amino acidic composition and

identical variable and joining chains, these sequences were not exclusive for the PML onset, since they were also found in the two MS patients who did not develop the disease and/or in healthy controls. Finally, the pool of public PML clonotypes, defined as sequences exclusively found at PML onset and shared by at least two patients, displayed a very similar amino acidic composition when compared to those identified in the two patients who did not develop PML. However, a common and exclusive five amino acid long motif was observed within some expanded clones at PML onset, but it also included amino acids codified by a portion of TRBJ 2-1 that, accordingly, was the most used TRBJ gene in all sequences. Therefore, it is unlikely that this motif could be specifically selected by JCV.

NGS BCR repertoire analysis suggested a diverse repertoire in all samples, no common sequences shared by the five patients at the PML onset, but only preferential usage of variable and joining genes. Due to this feature, and to the finding that public clonotypes tend to be extremely rare in BCR heavy chain, we did not search for public clonotypes in our patients.

CONCLUSIONS

Altogether, our data demonstrated that, although there are several alterations of T-and B-cell subsets, as well as different type of restrictions of TR and BCR repertoire, no specific or common clonotypes were identified in peripheral blood at the PML onset. In particular, follow-up data indicated that no JCV-related specific T- and B-cell expansions were mounted at the time of PML. However, our results enhance our understanding of JCV infection and PML.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Gerevini S, Capra R, Bertoli D, Sottini A, Imberti L. Immune Profiling of a Patient with Alemtuzumab-associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy submitted to Multiple Sclerosis Journal

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 28.500 €
Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 28,500

Vincenzo Barnaba

Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Sapienza Università di Roma, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Daniele Accapezzato, Ilenia Cammarata, Neda Feizi, Chiara Focaccetti, Alessio Grimaldi, Carmela Martire, Ilenia Pacella, Silvia Piconese

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Marco Salvetti, Sapienza Università di Roma, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Roma

Diego Centonze, Università Tor Vergata, Roma

Rosetta Pedotti, Massimo Costanza, Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

Ruolo delle risposte di cellule T CD8+ a epitopi associati a cellule T apoptotiche nella sclerosi multipla e nella encefalomielite sperimentale autoimmune

PREMESSE E OBIETTIVI

Nel corso delle malattie infiammatorie croniche, tra cui le malattie autoimmuni, i linfociti T attivati vanno incontro a morte cellulare programmata, o apoptosi. Tale processo induce nelle cellule T lo svelamento di nuovi antigeni che vengono cross-presentati dalle cellule dendritiche ad altri linfociti T specifici, promuovendone l'attivazione: si genera in questo modo un circuito continuo di attivazione/apoptosi che potrebbe contribuire al mantenimento dell'immunopatologia. In altre malattie, come le infezioni virali croniche, abbiamo dimostrato che cellule T specifiche per antigeni derivati dall'apoptosi si espandono e correlano con la severità delle manifestazioni patologiche. Nella sclerosi multipla (SM), abbiamo pubblicato che queste risposte non solo sono maggiori nei pazienti con SM rispetto ai controlli sani, ma sono anche arricchite nel liquor, e queste ultime correlano in modo diretto con gli indici di progressione della malattia. In questo progetto, ci siamo proposti di studiare la risposta CD8 specifica per antigeni derivati dall'apoptosi dal punto di vista meccanicistico e funzionale, valutando se tale risposta viene modulata in risposta ad alcune terapie come l'interferone. Abbiamo valutato inoltre se queste cellule sono sottoposte al controllo delle cellule T regolatorie, che rappresentano un importante baluardo nella protezione dell'autoimmunità. Avvalendoci di un modello murino di SM, abbiamo studiato se queste risposte immunitarie dirette contro antigeni legati all'apoptosi possano effettivamente contribuire ad aggravare il decorso della malattia.

RISULTATI

Abbiamo arruolato per il nostro studio pazienti con SM recidivante-remittente che non avevano risposto al trattamento con interferone, confrontandoli con pazienti che non avevano ricevuto alcuna terapia e con donatori sani. In primo luogo abbiamo osservato che la frequenza delle cellule T CD8 specifiche per antigeni associati all'apoptosi era maggiore nei pazienti trattati con interferone rispetto ai pazienti non trattati e ai controlli sani, e questa differenza era particolarmente accentuata nei pazienti che erano stati testati durante la fase di remissione della malattia. La percentuale delle cellule T CD8 specifiche correlava inversamente con alcuni parametri clinici di gravità della malattia. Quando abbiamo analizzato la popolazione di Treg, abbiamo scoperto che il sottogruppo delle Treg attivate, dotate di maggiori capacità immunosoppressive, tendeva ad essere correlato con l'entità dell'attivazione delle cellule T CD8 apoptosi-specifiche, dall'analisi condotta *ex vivo* dal sangue periferico dei pazienti. Esperimenti *in vitro* hanno suggerito che le Treg mantenevano cellule T CD8 autoreattive in uno stato *naïve* e non condizionavano le cellule T CD8 già differenziate. Analisi nel modello murino di encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA) hanno rivelato che le cellule T CD8 effettrici e di memoria erano arricchite nel sistema nervoso centrale di topi malati ed erano in grado di produrre diverse citochine che possono contribuire all'immunopatologia. Anche le cellule T CD8 specifiche per antigeni associati all'apoptosi sono risultate arricchite nel SNC di topi con ESA e la

loro produzione di citochine è parallela a quella della popolazione generale delle cellule CD8. Questo risultato supporta l'ipotesi che queste cellule T CD8 autoreattive, specifiche per antigeni associati all'apoptosi, possano contribuire all'immunopatologia nel modello murino di SM.

CONCLUSIONI

Il nostro studio ha fornito nuove informazioni sulle funzioni messe in atto dalle cellule T CD8 autoreattive, specifiche per antigeni derivati dall'apoptosi dei linfociti T attivati. Abbiamo ottenuto nuove informazioni sui meccanismi con cui l'apoptosi delle cellule T può indurre uno stato di attivazione immunitaria "bystander" in grado di contribuire all'infiammazione cronica e al danno tissutale nel contesto della SM. Strategie immunoterapiche volte a indurre

tolleranza specifica agli antigeni patogeni sono state proposte come approcci potenzialmente efficaci nel trattamento di malattie autoimmuni, inclusa la SM: il risultati di questo studio suggeriscono che non solo gli antigeni correlati alla mielina ma anche gli antigeni derivati dalle cellule T apoptotiche possono contribuire all'immunopatologia e quindi rappresentare potenziali bersagli per strategie terapeutiche basate sull'induzione di tolleranza. L'osservazione dell'interazione tra cellule T CD8 specifiche per l'apoptosi e cellule T regolatorie potrà gettare nuova luce sui meccanismi mediante i quali le terapie basate su Treg possono controllare l'autoreattività. In conclusione, il nostro studio potrebbe gettare le basi per lo sviluppo di nuovi approcci immunoterapeutici per la SM volti a bloccare l'immunoattivazione cronica.

Role of CD8+ T cell responses to apoptotic T cell associated epitopes in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis

INTRODUCTION AND AIMS

During chronic inflammatory diseases, such as autoimmune diseases, activated T lymphocytes undergo programmed cell death, or apoptosis. This process unveils in T cells new antigens that are cross-presented by dendritic cells to other specific T lymphocytes, promoting their activation: in this way a continuous activation/apoptosis circuit is generated that could contribute to the maintenance of immunopathology. In other diseases, such as chronic viral infections, we have shown that T cells specific for antigens derived from apoptosis expand and correlate with the severity of pathological manifestations. In multiple sclerosis (MS), we have published that these responses are not only higher in MS patients than in healthy controls, but are also enriched in the cerebrospinal fluid, and these relate directly to disease progression indices. In this project, we proposed to study the CD8 response specific for apoptosis-derived antigens from a mechanistic and functional point of view, assessing whether this response is modulated in response to some therapies such as interferon. We also evaluated whether these cells are controlled by regulatory T cells, which are an important player in protection from autoimmunity. Using a mouse model of MS, we investigated whether these immune responses directed against

apoptosis-related antigens may actually contribute to aggravate the course of the disease.

RESULTS

We enrolled in our study relapsing-remitting MS patients that did not respond to interferon treatment, in comparison to patients that did not receive any therapy and to healthy donors. We first observed that the frequency of CD8 T cells specific for apoptosis-associated antigens was higher in interferon-treated patients than untreated patients and healthy controls, and this was especially true in patients who were tested during the remitting phase of the disease. The percentage of the specific CD8 T cells correlated inversely with some clinical parameters of disease severity. When we analyzed the Treg population, we found that the subset of activated Tregs, endowed with stronger immune suppressive abilities, tended to be correlated with the extent of the activation of the apoptosis antigens-specific CD8 T cells *ex vivo* from the peripheral blood of patients. *In vitro* experiments suggest that Tregs maintained autoreactive CD8 T cells in a naïve status and did not condition the already differentiated CD8 T cells. Analyses in the EAE mouse model has revealed that effector memory CD8 T cells were enriched in the central nervous system of diseased mice and were capable to produce

several cytokines that may contribute to immunopathology. Also the CD8 T cells specific for apoptosis-associated antigens were enriched in the CNS of mice with EAE, and their cytokine production parallels the one of the general CD8 population. This result supports the hypothesis that these autoreactive CD8 T cells, specific apoptosis-associated antigens, may contribute to immunopathology in the MS mouse model.

CONCLUSIONS

Our study has provided novel insights into the functions operated by autoreactive CD8 T cells, specific for antigens derived from the apoptosis of activated T lymphocytes. We have obtained novel information about the mechanisms by which T cell apoptosis may induce a status of bystander immune activation able

to contribute to chronic inflammation and tissue damage in the context of MS. Immunotherapeutic strategies aimed at inducing specific tolerance to pathogenic antigens have been proposed as potentially successful approaches in treating autoimmune diseases including MS: here we suggest that not only myelin-related but also apoptotic T cell-related antigens may contribute to immunopathology and thus represent potential targets for tolerization strategies. The observation of an interplay between apoptosis-related epitope-specific CD8 T cells and regulatory T cells may shed new light on the mechanisms by which possible Treg-based therapies may control autoreactivity. In conclusion, our study could lay the groundwork for the development of new immunotherapeutic approaches for MS aimed at blocking chronic immunoactivation.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Feizi N, Focaccetti C, Pacella I, Costanza M, Pedotti R, Piconese S, Barnaba V. CD8 T cell responses to apoptosis-associated antigens in EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis), the mouse model of Multiple Sclerosis. XV Congresso della Federazione Italiana di Scienze della Vita (FISV), Roma, 18-21 Settembre 2018

Feizi N, Focaccetti C, Pacella I, Costanza M, Pedotti R, Piconese S, Barnaba V. CD8 T cell responses to apoptosis-associated antigens in EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis), the mouse model of Multiple Sclerosis. Scuola Superiore di Immunologia Ruggero Ceppellini "T cell memory", Anacapri, 12-15 Ottobre 2018

Focaccetti C, Cammarata I, Martire C, Pacella I, Feizi N, Salvetti M, Centonze D, Costanza M, Pedotti R, Piconese S, Barnaba V. Role of CD8+ T cell responses to apoptotic T cell-associated epitopes in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. Congresso Scientifico Annuale AISM e sua Fondazione, Roma, 28-30 Maggio 2018

Martire C, Pacella I, Cammarata I, Feizi N, Focaccetti C, Salvetti M, Centonze D, Costanza M, Pedotti R, Piconese S, Barnaba V. Role of CD8+ T cell responses to apoptotic T cell-associated epitopes in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. Congresso Scientifico Annuale AISM e sua Fondazione, Roma, 28-30 Maggio 2017

Cammarata I, Martire C, Citro A, Albanese M, Buscarinu C, Centonze D, Salvetti M, Barnaba V. CD8+ T cell reactivity against apoptotic self-epitopes in multiple sclerosis. X Congresso Nazionale della Società Italiana di Immunologia, Immunologia Clinica e Allergologia (SIICA), Abano Terme, 25-28 Maggio 2016

Citro A, Barnaba V*, Martini H. From T Cell Apoptosis to Chronic Immune Activation in Inflammatory Diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014 Jul 2;164(2):140-146. PMID: 24993617

Lolli F, Martini H, Citro A, Franceschini D, Portaccio E, Amato MP, Mechelli R, Annibali V, Sidney J, Sette A, Salvetti M, Barnaba V*. Increased CD8+ T cell responses to apoptotic T cell-associated antigens in multiple sclerosis V. *J Neuroinflammation.* 2013 Jul 27;10:94. doi: 10.1186/1742-2094-10-94.

Barnaba V*. Tuning cross-presentation of apoptotic T cells in immunopathology. *Adv Exp Med Biol.* 2013;785:27-35. doi: 10.1007/978-1-4614-6217-0_3. Review.

Meloni F, Accapezzato D, Agresti C, Aloisi F, Ristori G, Salvetti M, Furlan R, Martino G, Barnaba V*, Paroli M. Dendritic cells loaded with apoptotic oligodendrocytes as a source of myelin T-cell epitopes in multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 129: 286-94, 2008

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 222.000 €
Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 222,000

Simona Perga

Unità di Neurobiologia Clinica, Centro di Riferimento Regionale per la Sclerosi Multipla (CReSM), Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri Ottolenghi (NICO), AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Antonio Bertolotto, Francesca Montarolo, Serena Martire, Michela Spadaro, Federica Brescia, Marianna Lo Re

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Roberta Magliozzi, Dipartimento delle Scienze Neurologiche e Motorie, Università di Verona, Verona, Neuroimaging Unit, Euganea Medica, Padova, Italia

Sandra D'Alfonso, Dipartimento di Scienze Mediche Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università del Piemonte Orientale, Novara

Manuela Iezzi, Aging Research Centre, Università degli Studi G. d'Annunzio Chieti e Pescara, Chieti

Annalisa Buffo, Alessandra Oberto, Enrica Boda, Roberta Parolisi, Dipartimento di Neuroscienze "Rita Levi Montalcini", Università di Torino; Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), Orbassano, Torino

Il ruolo della deubiquitinasi A20/TNFAIP3 nell'immunopatologia della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'enzima A20, codificato dal gene TNFAIP3, ha un ruolo fondamentale nel controllo dell'infiammazione, grazie alla sua capacità di porre un freno ai segnali pro-infiammatori ed inibire la via di NF-kB. Varianti genetiche nella regione del gene TNFAIP3 e alterazioni a carico dell'espressione e della funzione di A20 sono associate a diverse malattie autoimmuni, tra cui la sclerosi multipla (SM). Inoltre, il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che le cellule del sangue dei pazienti con SM, ed in particolar modo i monociti, esprimono bassi livelli di A20. Al di là di queste evidenze, il contributo di A20 alla malattia non è ancora chiaro, motivo per cui questo progetto prevedeva di approfondire le implicazioni della deregolazione di A20 nella SM: da una parte, tramite lo studio *ex vivo* ed *in vivo* di A20 nelle cellule di derivazione monocitaria, e dall'altra, tramite l'analisi dell'espressione di A20 nel tessuto cerebrale umano.

RISULTATI

Per comprendere come un'alterata espressione di A20 potesse influenzare i monociti, abbiamo realizzato colture *ex vivo* di cellule dendritiche (CD) e macrofagi polarizzati in senso M1 pro-infiammatorio ed M2 anti-infiammatorio a partire da monociti di donatori sani, e le abbiamo caratterizzate a diversi stadi di maturazione misurando l'espressione di A20, marcatori di superficie, citochine e vie di segnalazione attivate. Abbiamo dimostrato che A20 è sovra-espresso nelle CD mature e nei macrofagi M1 in seguito all'attivazione delle vie di NF-kB, STAT1 e p38, e che un deficit parziale dell'espressione di A20 nelle CD mature è in grado di influenzare la proliferazione dei linfociti T, promuovendo vie di segnale pro-infiammatorie e una risposta di tipo Th17. Esperimenti sulle cellule M1 sono ancora in corso ma ci attendiamo di riscontrare lo stesso tipo di effetto. Per confermare ulteriormente il ruolo di A20 nelle cellule di derivazione monocitaria abbiamo realizzato esperimenti *in vivo*

su modelli murini transgenici deficitari del gene TNFAIP3 in macrofagi e microglia, chiamati topi Cx3Cr1-cre KO. Abbiamo dimostrato che questi topi sono vitali e fertili, ma hanno un tasso di mortalità del 50% dopo il primo mese di vita e pesano meno rispetto ai topi senza genotipo alterato (WT). L'analisi citofluorimetrica sulle milze dei topi di 3 mesi hanno evidenziato che la percentuale di monociti, macrofagi, CD e linfociti B è ridotta nei topi KO rispetto ai topi WT, mentre l'analisi istologica ha mostrato ipertrofia nelle milze dei topi KO. Per approfondire le implicazioni di questi risultati nello sviluppo della malattia, abbiamo in programma di indurre l'encefalite sperimentale autoimmune (ESA) nei topi Cx3Cr1-cre KO e nei topi Cd11c-cre KO, deficitari di A20 nelle CD. Infine, abbiamo dimostrato che A20 è presente nel tessuto cerebrale di persone senza SM sia nella sostanza bianca che in quella grigia, espresso principalmente da astrociti parenchimali e cellule neuronali. Nel tessuto cerebrale di persone con SM, invece, A20 è presente ad alti livelli in tutte le lesioni attive o cronicamente attive della sostanza bianca, principalmente espresso da macrofagi infiltrati, astrociti residenti attivati e microglia, e dalla maggior parte delle lesioni nella sostanza grigia, espresso da astrociti attivati.

CONCLUSIONI

Questi risultati forniscono importanti informazioni sulle implicazioni fisiopatologiche dell'espressione cellulo-specifica di A20, e affermano il ruolo cruciale dell'enzima nel controllo dell'omeostasi delle cellule mieloidi. In primo luogo, abbiamo dimostrato che la riduzione o l'assenza di A20 nelle cellule di derivazione monocitaria umane e murine determina una loro aberrante attivazione, contribuendo allo sviluppo e/o cronicizzazione di un ambiente pro-infiammatorio e quindi all'instaurarsi dell'autoimmunità. In secondo luogo, abbiamo documentato per la prima volta un'alta espressione di A20 nelle lesioni cerebrali attive dei pazienti con SM, probabilmente determinata da un tentativo di porre freno all'infiammazione. Resta da chiarire se l'espressione di A20 nel tessuto cerebrale dei pazienti sia alterata, e se tale alterazione sia in grado di determinare un'infiammazione cronica. È comunque ragionevole ipotizzare che la deregolazione di A20 nelle cellule residenti nel sistema nervoso, tanto quanto quella nelle cellule ematiche di derivazione monocitaria, rivesta un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione della SM. Questi risultati aprono la strada a nuovi risvolti terapeutici, dal momento che l'attività di A20 e delle molecole che collaborano alla sua funzione potrebbe essere manipolata per regolare l'infiammazione.

The deubiquitinase A20/TNFAIP3 in immunopathology of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The A20 ubiquitin-ending enzyme, codified by the TNFAIP3 gene, is a potent molecular brake for inflammation and it plays a crucial role in immunity by restricting and terminating a number of pro-inflammatory signals, through the inhibition of the NF-κB pathway. Genetic variants within the TNFAIP3 locus, as well as alterations of the A20 expression and functions, have been associated with several inflammatory and autoimmune disorders, including multiple sclerosis (MS). To this regard, we demonstrated a significant decrease of A20 transcriptional level in peripheral blood cells from MS patients, especially in monocytes. In the present project we aimed to deepen the implications of the A20 deregulation in the MS pathology. First, we sought to investigate the role of A20 in monocyte-derived cells and the effect

of its altered expression on cell behavior. To address this issue we took advantage of *ex vivo* culture of human monocyte-derived macrophages and dendritic cells (DC) in which the expression of A20 protein was reduced, as well as mouse models lacking the A20 gene in myeloid cells. Recently, a role of A20 in the central nervous system (CNS) was also suggested by several evidences obtained in murine models. Thus, we characterized for the first time the A20 expression in human post-mortem brain tissues of control cases (CC) and MS patients to unveil a possible contribution of A20 to the CNS pathology.

RESULTS

To elucidate whether a reduction of the A20 expression in monocytes could influence their behavior, we established *ex vivo* cultures of DC, pro-inflammatory

M1 and anti-inflammatory M2 polarized macrophages derived from monocytes isolated from healthy donors' buffy coats. We characterized cell cultures at different maturation stages for the presence of specific markers, the expression of A20 and cytokines and the activation of signaling pathways. We demonstrated that A20 is rapidly up-regulated in mature DC (mDC) and M1-polarized macrophages, upon the induction of important cytokines-activated pathways such as the ones involving NF- κ B, STAT1 and p38. mDC with a partial repression of A20 expression influenced the proliferation rate of T lymphocytes, mainly promoted a Th17 response and induced an over-activation of the above-mentioned pro-inflammatory pathways. Experiments on A20-deficient M1 cells are ongoing but we expect to obtain similar results.

We further corroborated the regulatory role of A20 in monocyte-derived cells by *in vivo* experiments. We generated conditional transgenic mice lacking A20 in macrophages including microglia (Cx3Cr1-cre knock-out (KO)). We showed that these mice are viable and fertile but have a mortality rate of 50% after the first month of life and a lower weight compared to wild-type (WT) littermates. Flow cytometry analysis performed on spleens obtained from 3-months old mice highlighted that percentages of monocyte, macrophages, dendritic cells and B cells are reduced in KO mice compared to WT. Consistently, histological analysis revealed that the A20 loss in myeloid cells induces the hypertrophy of the spleen. To further investigate potential implications in the MS disease we plan to induce Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in the Cx3Cr1-cre KO mice, as well as in the Cd11c-cre KO mice lacking A20 in DC. As a second aim, we demonstrated that A20 is pres-

ent in CC brain tissues in both white matter (WM) and grey matter (GM), mainly expressed by few parenchymal astrocytes and some population of neuronal cells. Conversely, in MS brain tissues, we observed A20 in all active or chronic active lesions of WM, over-expressed by perivascular infiltrating macrophages, resident activated astrocytes and some population of microglia. A20 was highly expressed also in most active GM lesions, particularly by activated astrocytes.

CONCLUSIONS

Our findings provide relevant insights into the relative contribution of cell-specific A20 expression to the pathophysiology of MS disease, and support the crucial role of A20 in controlling the homeostasis of myeloid cells. First, we demonstrated that the reduction or absence of A20 in monocyte-derived cells in humans or mice could result in an aberrant activation of these cells. This contributes to the development and/or the chronicity of a pro-inflammatory environment leading to autoimmunity. Second, we demonstrated for the first time the A20 is highly expressed in the CNS active lesions of MS patients, maybe due to an attempt to tone down inflammation. It is still unknown whether A20 expression in the CNS of MS patients is impaired and whether an A20 impairment in the CNS-resident cells could lead to chronic unsolved inflammation. However, it is reasonable to hypothesize that an A20 deregulation in non-haematogenous CNS-resident cells, as well as in monocyte-derived cells, plays a key role in the MS development and progression. These findings also have therapeutic implications, as the activity of A20 or molecules in its pathway could be boosted to tone down inflammation.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Perga S, Martire S, Montarolo F, Giordani I, Spadaro M, Bono G, Corvisieri S, Messuti I, Panzica G, Orlandi F, Bertolotto A. The Footprints of Poly-Autoimmunity: Evidence for Common Biological Factors Involved in Multiple Sclerosis and Hashimoto's Thyroiditis. *Front Immunol.* 2018 Feb 20;9:311

Montarolo F, Perga S, Martire S, Brescia F, Caldano M, Lo Re M, Panzica G, Bertolotto A. Study of the NR4A family gene expression in patients with multiple sclerosis treated with Fingolimod. *Eur J Neurol.* 2018 Nov 22. [Epub ahead of print]

Perga S, Martire S, Montarolo F, Spadaro M, Bonaldo B, Malucchi S, D'Alfonso S, Bertolotto A. Genetic modulation of TNFAIP3 expression in Multiple Sclerosis patients and healthy controls. *Manuscript in preparation*

Perga S, Montarolo F, Bono G, Bertolo J, Bonaldo B, Martire S, Magliozzi R, Bertolotto A. A20 is overexpressed in glia cells in human Multiple Sclerosis brain lesions. *Manuscript in preparation*

Perga S, Martire S, Montarolo F, Spadaro M, Navone ND, D'Alfonso S, Bertolotto A. "Role of single nucleotide polymorphisms and haplotype variants in TNFAIP3 expression modulation in multiple sclerosis patients". *Manuscript in preparation*

Perga S, Montarolo F, Vitacolonna A, Parolisi R, Martire S, Boda E, Buffo A, Bertolotto A. The ubiquitin-editing enzyme A20 in a murine model of the demyelination. *Manuscript in preparation*

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, Italia, 11-14 Maggio 2016.

Montarolo F, Perga S, Martire S, Navone DN, Marchet A, Leotta D, Bertolotto A. Altered anti-inflammatory NR4A subfamily gene expression level in peripheral blood of Parkinson's and Alzheimer's disease patients. XXV AINI Congress, Lecce, Italia, 11-14 Maggio 2016

Perga S, Montarolo F, Bonaldo B, Martire S, Bono G, Bertolotto A. Moving from systemic to central nervous system inflammation: the role of A20 in the neuropathology of Multiple Sclerosis. More than Neurons: toward a less neurocentric view of brain disorders. 1-3 Dicembre 2016, Torino, Italia

Perga S, Montarolo F, Martire S, Spadaro M, Bono G, Giordano I, Orlandi F, Bertolotto A (2016). Multiple sclerosis and Hashimoto's thyroiditis: differences and similarities in the immune regulation. *Multiple Sclerosis Journal*, ECTRIMS Online Library 2016; meeting abstract: P436, vol. 22 (3), 32nd ECTRIMS Congress, Londra, Regno Unito, 14-17 Settembre 2017

Perga S*, Martire S*, Montarolo F, Navone ND, Calvo A, Fuda G, Marchet A, Leotta D, Chiò A, Bertolotto A (2016). A20 in Parkinson's disease and multiple sclerosis: a common deregulated mechanism for resolution of peripheral inflammation. *Multiple Sclerosis Journal*, ECTRIMS Online Library 2016. Meeting abstract: eP1415, vol 22 (3), 32nd ECTRIMS Congress, Londra, Regno Unito, 14-17/09/2017. * equally contributing authors.

Perga S, Montarolo F, Martire S, Bonaldo B, Bodo G, Panzica G, Bertolotto A (2017). Moving from systemic to central nervous system inflammation: the role of A20 in the neuropathology of Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, ECTRIMS Online Library. Oct 25, 2017; meeting abstract: EP1505, ePoster. MSParis2017 - 7th Joint ECTRIMS-ACTRIMS Meeting, Parigi, Francia, 25-28 ottobre 2017

Montarolo F, Perga S, Spadaro M, Martire S, Iezzi M, Panzica G, Bertolotto A. Evaluation of the impact of reducing A20 expression in myeloid cells: study in a murine model. *Multiple Sclerosis Journal*, ECTRIMS Online Library. 23, 494-495, Oct 27, 2017; meeting abstract: P955. MSParis2017 - 7th Joint ECTRIMS-ACTRIMS Meeting, Parigi, Francia, 25-28 ottobre 2017

Perga S, Montarolo F, Vitacolonna A, Parolisi R, Martire S, Boda E, Buffo A, Bertolotto A. The ubiquitin-editing enzyme A20 in a murine model of the demyelination. More than Neurons: toward a less neurocentric view of brain disorders (II edizione), Torino, Italia, 30 Novembre 2018 - 2 Febbraio 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 3 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 100.000 €
Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 3 years (extended by 6 months) and the amount of € 100,000

Paola de Candia

Fondazione Multimedica ONLUS, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Giulia Frazzei

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Laura Cantone, Valentina Bollati, Laboratorio di Epidemiologia Molecolare e Epigenetica Ambientale, Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano, Milano

Ilaria Giusti, Vincenza Dolo, Dipartimento di Medicina Clinica, Sanità Pubblica, Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi dell'Aquila, L'Aquila

Donatella Carpi, Joint Research Centre, Ispra, Varese

Fabio Buttari, Diego Centonze, IRCCS Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed, Pozzilli, IS

Analisi del ruolo del miR-146a-5p extra-cellulare nella perdita di tolleranza immunologica nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Nonostante le componenti infiammatorie coinvolte nella sclerosi multipla (SM) siano numerose, sia i modelli murini che la patologia umana implicano un difetto di una popolazione linfocitaria (le T regolatorie, o Treg) come uno dei maggiori fattori patogenetici. L'alterata capacità, da parte delle cellule Treg, di crescere e controllare le cellule T convenzionali (Tconv) pro-infiammatorie che distruggono la guaina mielinica nella SM è stata collegata sia a una diminuzione sia ad un esaurimento funzionale di cellule Treg nella malattia. Ma, nonostante i grandi avanzamenti nella comprensione delle cause della SM, il meccanismo alla base della perdita della tolleranza immunologica non è ancora completamente chiarito. Mentre da un lato è molto ben caratterizzata la funzione delle citochine nell'azione delle cellule Treg, molto meno si conosce del ruolo di piccolissime vescicole extracellulari (intorno ai 100 nanometri di diametro), chiamate anche esosomi, rilasciate nell'ambiente extracellulare dalle Treg dopo attivazione. Tali vescicole contengono proteine che esercitano un effetto su cellule target con conseguente attivazione o inibizione dell'infiammazione; esse, inoltre, trasportano molecole di RNA, tra cui i microRNA (miRNA), che, a livello

intracellulare, esercitano un'importante funzione di regolazione dell'espressione genica. Il principale obiettivo di questo progetto pilota era di testare l'ipotesi che, oltre ai meccanismi di soppressione delle Tconv da parte delle Treg già noti, esista anche un meccanismo basato sul rilascio di vescicole contenenti variabili livelli di miRNA. In particolare, dal momento che avevamo precedentemente dimostrato come il miRNA (miR)-146a-5p partecipi direttamente all'inibizione (mediata da vescicole) di importanti geni legati all'attivazione delle cellule Tconv, abbiamo qui analizzato se questo miRNA fosse disregolato nelle vescicole rilasciate dalle Treg nei pazienti con SM. Abbiamo inoltre cominciato a valutare se il rilascio di questo miRNA (o anche altri miRNA, come poi sperimentalmente verificato) abbia un ruolo nel difetto funzionale delle cellule Treg nei pazienti con SM.

RISULTATI

Le vescicole extracellulari rilasciate dalle cellule Treg (da pazienti con SM, e relativi controlli sani) sono state isolate e il loro contenuto in miRNA quantificato. L'espressione differenziale ipotizzata per il miR-146a-5p in condizioni di SM non è stata confermata dall'evidenza sperimentale; abbiamo invece rison-

trato un significativo abbassamento dei miRNA-142-3p e -142-5p (miR-142-3p/-5p) nelle vescicole rilasciate dalle cellule Treg in persone con SM, rispetto a persone sane.

Questo risultato inatteso è interessante, dato che questi due miRNA sono noti per avere un importante ruolo nella regolazione delle cellule del sistema immunitario. Abbiamo inoltre trovato che, in individui sani, le vescicole rilasciate da cellule Treg sono specificamente capaci di sopprimere geni coinvolti nel processo di catabolismo delle proteine, processo noto per essere necessario alla crescita ed alla piena attivazione funzionale delle cellule Tconv. Aumentando in maniera esogena il livello dei miR-142-3p/-5p nelle vescicole, siamo riusciti ad aumentare la loro capacità di sopprimere geni (target putativi di questi miRNA) che partecipano al processo di catabolismo delle proteine. Riassumendo, gli esperimenti svolti durante questo progetto pilota suggeriscono che la diminuzione dei miR-142-3p/-5p, inaspettatamente osservata nelle vescicole rilasciate dalle cellule Treg di pazienti con SM, potrebbe diminuire la capacità di queste vescicole, rispetto a individui sani, di inibire specifici processi biologici legati all'azione pro-infiammatoria delle cellule Tconv.

CONCLUSIONI

Mentre la maggior parte degli studi dei processi patogenetici nella SM si focalizzano sulla disregolazione di meccanismi intrinseci alla cellula o su segnali extracellulari di tipo proteico (come le citochine), noi abbiamo iniziato uno studio focalizzato sulla descrizione di un ruolo biologico dei miRNA rilasciati nell'ambiente extracellulare dalle cellule Treg. L'identificazione di un nuovo meccanismo di soppressione della risposta immune mediato dal rilascio, da parte delle cellule Treg, di specifici miRNA potrà dare un forte impulso alla comprensione della perdita della tolleranza immunologica e della patogenesi della SM. Il nostro studio ha anche evidenziato la possibilità di sviluppare nuovi metodi di diagnosi (basati sulla quantificazione dei miRNA rilasciati dalle cellule Treg) e/o nuovi potenziali trattamenti terapeutici basati sul ristabilire il controllo sulle cellule Tconv auto-reattive mediato da miRNA extracellulari. In particolare, le implicazioni neuro-protettive associate alle vescicole rilasciate dalle cellule Treg sono clinicamente rilevanti rispetto all'obiettivo ultimo di sviluppare nuove strategie terapeutiche per mitigare la degenerazione assonale nei pazienti con SM.

Unveiling the role of extracellular vesicle-associated miR-146a-5p in the loss of immune tolerance during multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Although the inflammatory components involved in multiple sclerosis (MS) are numerous, mouse models and human disease clearly implicate a defect in a lymphocyte population (called T regulatory or Treg cells) that protects us from MS, as one of the major pathogenic factors. The altered capacity of Treg cells to grow and control the pro-inflammatory T conventional (Tconv) cells that destroy the myelin sheath in MS has been connected to both a reduced number and a functional decline of Treg cells in disease. Notwithstanding the increasing knowledge of the causes of MS, the mechanism involved in the loss of immune tolerance has not been completely clarified. While the action of Treg cell-derived cytokines is well characterized, scant information is available on the role of very small vesicles (with a diameter

around 100 nanometers), also called exosomes, released in the extracellular space by Treg cells (but also other lymphocytes) upon activation. These vesicles contain proteins that affect target cells, with consequent activation or inhibition of the immune response; moreover, they transport RNA molecules, including microRNAs (miRNAs), that play a pivotal intracellular role in the regulation of gene expression. The main aim of this pilot project was to test the hypothesis that, in addition to already described mechanisms of immune suppression by Treg cells, there may also exist a mechanism based on the release of vesicles containing different levels of miRNAs. In particular, since we had shown miR-146a-5p to directly participate in Treg vesicle-mediated suppression of important genes linked to Tconv cell growth and activation, we have here verified

whether this miRNA in particular, would be dysregulated in Treg-derived vesicles in conditions of MS. Our project also allowed us to start evaluating whether the release of this miRNA (or other miRNAs, for that matter, as then experimentally verified) has a role in the functional impairment of Treg cells in MS patients.

RESULTS

Extracellular vesicles released by Treg cells (from MS patients and healthy individuals as control) were isolated and their miRNA content quantified. The hypothesized dysregulation of miR-146a in MS vesicles was not confirmed by experimental evidence. We instead found a significant decrease of miR-142-3p and miR-142-5p (miR-142-3p/-5p) in Treg-derived vesicles from MS patients compared to controls. This unexpected result was very intriguing, since these miRNAs are known to exert a relevant role in the regulation of immune cells. We found that, in healthy conditions, Treg-derived vesicles are specifically able to coordinately suppress genes involved in the pathway of protein catabolism in Tconv cells, a pathway described to be necessary for the growth and full functional activation of Tconv cells. By exogenously increasing the level of miR-142-3p/-5p in vesicles, we achieved to actually increase the capability of these vesicles to suppress genes (known to be gene targets of these miRNAs) participating in the pathway of protein catabolism. To summarize, the experiments per-

formed in this pilot work suggest that the unexpected decrease of miR-142-3p/-5p observed in Treg-derived vesicles in MS, compared with healthy conditions, may diminish the capability of these vesicles to inhibit specific biological processes and thus suppress pathological Tconv cell action.

CONCLUSIONS

While most of the investigation aimed at finding the pathogenic processes in MS focuses on dysregulation of cell intrinsic mechanisms or alterations in protein based extracellular signals (such as cytokines), we have here started a study focused on the identification and description of a biological role of miRNAs released in the extracellular environment by Treg cells. The identification of a novel molecular mechanism of Treg cell-mediated immune suppression based on the release of specific miRNAs may give a strong impulse to dissecting the complexity of tolerance loss and MS pathogenesis. Our study has also revealed the possibility of developing novel methods of diagnosis (through the assessment of Treg cell-derived miRNAs circulating in blood) and/or treatment via enhancing and re-establishing extracellular miRNA-mediated control over self-reactive Tconv cells. In particular, the implications of Treg cell-derived vesicles (specifically of their miRNA content) in neuroprotection is of clinical relevance to achieve the ultimate goal of developing novel therapeutic strategies mitigating axonal degeneration in MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Garavelli S, De Rosa V, de Candia P. The Multifaceted Interface Between Cytokines and microRNAs: An Ancient Mechanism to Regulate the Good and the Bad of Inflammation. *Front Immunol.* 2018 Dec 21;9:3012. doi: 10.3389/fimmu.2018.03012. eCollection 2018. Review

de Candia P, Matarese G. Leptin and ghrelin: Sewing metabolism onto neurodegeneration. *Neuropharmacology.* 2018 Jul 1;136(Pt B):307-316. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.12.025. Epub 2017 Dec 15. Review. Poster presentation at the 5th European Congress of Immunology (ECI) in Amsterdam from September 2-5, 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno (prorogato di 4 mesi) e l'ammontare di 30.000 €
Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year (extended by 4 months) and the amount of € 30,000

Claudia Verderio

Istituto di Neuroscienze, CNR, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Ilaria Prada, Marta Lombardi, Martina Gabrielli

Coinvolgimento delle vescicole extracellulari rilasciate da cellule microgliali nelle disfunzioni sinaptiche nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia sinaptica caratterizzata da attivazione cronica delle cellule microgliali, le cellule immunitarie del nostro cervello, e aumentata secrezione di vescicole extracellulari (EVs), mediatori di segnalazione intercellulare, con esordio precoce rispetto ad altre malattie neurodegenerative. Nonostante un quarto dei soggetti affetti da SM soffrano di sintomi dovuti a disfunzione neuronale, come disturbi della memoria episodica, e mostrino un danno microstrutturale dell'ippocampo manca ancora una piena comprensione di come le alterazioni sinaptiche insorgano e siano legate all'attivazione della microglia. L'idea alla base di questo progetto è stata valutare la possibilità che le EVs microgliali possano danneggiare la struttura e la funzione delle sinapsi, i siti di comunicazione neuronale. Questa ipotesi è stata suggerita da nostri dati preliminari che indicavano che le EVs contengono piccole molecole di RNA, chiamate micro-RNA, che controllano l'espressione di proteine sinaptiche fondamentali per il funzionamento della sinapsi eccitatoria.

Obiettivi specifici del progetto sono stati studiare nel dettaglio gli effetti indotti dalle EVs secrete da microglia reattiva sulla struttura/funzione delle sinapsi (obiettivo 1) e verificare se il trasferimento di miRNA dalla EV al neurone fosse necessario per le alterazioni strutturali e funzionali delle sinapsi indotte dalle EVs (obiettivo 2).

RISULTATI

In relazione al primo obiettivo, i risultati ottenuti hanno confermato pienamente i dati preliminari dimostrando che le EVs secrete da microglia infiammata causano alterazioni importanti nella struttura e funzione della sinapsi eccitatoria.

Trasfettando neuroni ippocampali in coltura primaria con un sensore luminoso specifico per miR-146a-5p,

un microRNA arricchito nelle cellule microgliali, abbiamo ottenuto una prova di principio che le EVs infiammate trasferiscono il loro contenuto di miRNA ai neuroni. Il trasferimento del miR-146a-5p è stato inibito prevenendo l'interazione EV-neurone con un bloccante farmacologico (annexin-V), dimostrando che il trasferimento di microRNA richiede il contatto fisico tra EVs e neuroni e avviene in modo specifico. Tramite analisi di western blot abbiamo dimostrato che il miR-146a-5p trasferito ai neuroni è biologicamente attivo, in grado di silenziare neuroligin1 (Nlg1), una proteina coinvolta nella formazione e stabilità delle spine dendritiche. Inoltre, tramite analisi morfologica di neuroni esprimenti una proteina fluorescente citosolica e marcati per proteine pre- e post-sinaptiche abbiamo dimostrato che l'esposizione prolungata alle EVs (tre giorni di trattamento) porta a una significativa riduzione della densità delle spine dendritiche e dei terminali pre- e post-sinaptici affacciati, ovvero delle sinapsi potenzialmente funzionali. La perdita delle spine è stata recuperata tramite trasfezione nei neuroni di una forma di Nlg1 non sensibile al miR-146-5p, dimostrando il coinvolgimento della Nlg1 nelle disfunzioni sinaptiche indotte dalle EVs infiammate. Questi dati sono stati confermati *in vivo* nella regione CA1 dell'ippocampo dove la somministrazione cronica di EVs (trattamento di 4 giorni) ha prodotto una diminuzione del ~ 30% nella densità di spine dendritiche, colorate con il metodo di Golgi. Abbiamo infine osservato che le EVs infiammate riducono la forza delle trasmissione sinaptica, come indicato dalla ridotta frequenza e ampiezza dei minis eccitatori.

Il secondo obiettivo del progetto è stato raggiunto con due approcci diversi.

In primo luogo, abbiamo esposto i neuroni a EVs contenenti miR-146a-5p inattivo, rilasciate da cellule gliali trasfettate con un anti-miR-146a-5p. Questo

trattamento non ha indotto alterazioni nell'espressione dei geni sinaptici bersaglio dell'azione del miR-146a-5p. In secondo luogo, i neuroni sono stati esposti a EVs prodotte da microglia pro-rigenerativa, polarizzata con una citokina anti-infiammatoria IL-4, in cui i livelli di miR146a-5p sono fortemente diminuiti. Queste EVs non hanno alterato l'espressione di Nlg1 nei neuroni riceventi, come indicato dall'analisi di western blot. Inoltre non hanno alterato la densità delle spine dendritiche e dei terminali pre- e post-sinaptici giustapposti, confermando il ruolo cruciale della miR-146a-5p vescicolare nella perdita delle sinapsi funzionali.

CONCLUSIONI

Nel complesso questi dati indicano che le cellule microgliali infiammate, trasferendo miR-146a-5p ai neuroni via EVs ostacolano la corretta stabilità e funzione delle sinapsi eccitatorie. Il iR-146a-5p viene identificato come un nuovo bersaglio per promuovere l'integrità neuronale nella SM, aprendo la strada allo sviluppo di nuove strategie per trattare o prevenire i sintomi cognitivi nella malattia. Lo stesso miRNA viene suggerito come un potenziale biomarcatore dei sintomi cognitivi in soggetti con MS, unitamente ad altri microRNAs vescicolari che controllano l'espressione di geni sinaptici presenti nel CSF o nel plasma.

On the role of extracellular vesicles derived from inflammatory microglia in synaptic dysfunction in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a synaptic disorder characterized by chronic activation of microglia, the immune brain cells, and enhanced secretion of extracellular vesicles (EVs) with early onset compared to other neurodegenerative diseases. Despite a quarter of MS patients suffer symptoms arising from neuronal dysfunction, such as episodic memory impairment, already at the first clinical episode and show hippocampal microstructural damage, we still lack a full understanding of how synaptic alterations start and how they are linked to microglia activation. The driving question behind this project was to explore whether EVs derived from inflammatory microglia (inflammatory EVs) induce synaptic dysfunction. This possibility was supported by our preliminary experiments showing that microglial EVs upregulate among their cargoes few small non-coding RNAs (miRNAs) which silence the expression of key synaptic genes. Specific aims of the project were to elucidate the effects of EVs secreted by inflammatory microglia on the function/structure of excitatory synapses (aim1) and to explore whether EVs-mediated miRNA transfer was necessary for synaptic dysfunction (aim2).

RESULTS

With respect to AIM 1 results obtained during the project fully confirmed our preliminary data revealing that EVs secreted from inflammatory microglia cause important alterations of synaptic structure and

function. By transfecting neurons with a luminescence reporter specific for miR-146a-5p, a microglia-enriched miRNA upregulated in inflammatory EVs, we obtained formal proof that inflammatory EVs transfer miR146a-5p to hippocampal neurons. The EV-neuron adhesion blocker annexin V prevented the miRNA transfer, showing that EV action was specific and required contact between EVs and neurons. By western blot analysis we showed that inflammatory EVs deliver to neurons bioactive miR-146a-5p, able to silence its validated target neuroligin1 (Nlg1), a protein involved in spinogenesis and synapse maintenance. In addition, morphological analysis of neurons transfected with RFP and stained for pre- and post-synaptic markers revealed that prolonged exposure to inflammatory EVs led to significant decrease in the density of dendritic spines and of juxtaposed pre- and post-synaptic terminals in cultured neurons. This suggested a loss of functional synapses in EVs-treated neurons. Importantly, loss of dendritic spines induced by inflammatory EVs was rescued *in vitro* by neuron transfection with a miR-146-insensitive Nlg1 form, implicating Nlg1 in synaptic dysfunctions caused by inflammatory EVs. These data were confirmed *in vivo* in the CA1 hippocampal region, where chronic administration of inflammatory EVs (4 days treatment) produced a decrease of ~30% in spine density, stained by Golgi method. Finally, electrophysiological recordings showed that inflammatory EVs decrease the strength of excitatory synapses, as

indicated by reduced mEPSC frequency and amplitude in neurons exposed to the inflammatory EVs. The second aim of the project was assessed by two different approaches. Firstly, we exposed hippocampal neurons to EVs containing inactive miR-146a-5p, released from glial cells transfected with an anti-miR-146a-5p. Secondly, neurons were exposed to EVs produced by pro-regenerative microglia, polarized with the anti-inflammatory cytokine IL-4, in which miR146a-5p levels are strongly decreased. Both treatments did not decrease Nlg1 expression in receiving neurons, as indicated by western blot analysis. Moreover both types of EVs, miR-146a-5p depleted, did not alter the density of dendritic spine and of juxtaposed pre- and post-synaptic terminals, revealing the crucial role of miR-146a-5p in the loss of functional synapses.

CONCLUSIONS

Overall our data indicate that inflammatory microglia, by delivering miR-146a-5p to neurons via EVs, hamper proper stability and function of excitatory synapses. Results of this study identify miR-146a-5p as a novel target to promote neuronal integrity in MS, paving the way to novel epigenetic options to treat or prevent cognitive symptoms in MS subjects. Furthermore, our results point to miR-146a-5p released in association to EVs of myeloid origin and circulating in body fluids (CSF, blood) as a potential biomarker of cognitive symptoms in MS along with other miRNAs controlling key synaptic genes that may be enriched in inflammatory EVs.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Prada I, Gabrielli M, Turola E, Iorio A, D'Arrigo G, Parolisi R, De Luca M, Pacifici M, Bastoni M, Lombardi M, Legname G, Cojoc D, Buffo A, Furlan R, Peruzzi F, Verderio C. Microglia-To Neuron Transfer Of Mirnas Via Extracellular Vesicles: A New Mechanism Underlying Inflammation-Induced Synaptic Alterations. *Acta Neuropathol.* 2018 135(4):529-550

Verderio C, Gabrielli M and Giussani P. Role For Sphingolipids In The Biogenesis And Biological Activity Of Extracellular Vesicles. *Journal of Lipid Research* 2018 59(8):1325-1340

Drago F, Lombardi M, Prada I, Gabrielli M, Joshi P, Cojoc D, Franck J, Vizioli J, Verderio C. ATP Stimulation Modifies The Proteome Of Extracellular Vesicles Released By Microglia And Influences Their Action On Astrocytes. *Front Pharmacol.* 2017 Dec 13;8:910

Verderio C. "Functional roles of extracellular vesicles derived from microglia with diverse activation states". XIII European Meeting on Glial Cells in health and disease, Edinburgh, UK. July 2017

Verderio C. "Microglia-to-neuron shuttling of miRNAs via extracellular vesicles modulate synapse stability and function". Jacques Monod Conference Glial Cells at the crossroad of innate immunity and brain function, Roscoff, France. June 2017

Verderio C. "Microglia extracellular vesicles in white and grey matter lesions in multiple sclerosis" CNR Immunology Network – Cin li networking meeting, Rome 2017

Verderio C. "Multimodal microglia modulation of neuronal function via extracellular vesicles: role of lipids, microRNAs and protein cargoes" (plenary lecture). Portuguese Glial Network, III Symposium, Porto, Portugal May 18 2018

Verderio C. "Multimodal microglia modulation of neuronal function via extracellular vesicles: implications in neuroinflammatory diseases"(plenary lecture). Convegno monotelmatico SIF Glial Cells and therapeutic perspective , Florence, June 29 2018

Verderio C. Multimodal microglia modulation of neuronal function via EVs: role of microRNAs and protein cargoes. BBEV 2018, University of Padua, September 2018

Verderio C & Gabrielli M. Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. *Giornata Sphingolipidi Italia*, 5 October 2018

Verderio C. Multimodal microglia modulation of neuronal function via EVs (plenary lecture). More than neuron II edition, Turin. 29th November-1st December 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

Stefania Ceruti

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Nico Mitro, Giulia Magni, Silvia Pedretti, Simona Giani

Studi sui meccanismi molecolari e cellulari alla base della neuropatia trigeminale e della maggiore suscettibilità all'emicrania nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'obiettivo di questo progetto pilota era identificare le vie biochimiche, molecolari e cellulari alla base dello sviluppo e della cronicizzazione del dolore trigeminale correlato a sclerosi multipla (SM). Questo tema è poco affrontato dalla comunità scientifica che si occupa di SM, nonostante fino al 10% dei pazienti sviluppi attacchi di dolore trigeminale ad ogni stadio della malattia. Inoltre, i pazienti con SM sono più suscettibili ad attacchi ricorrenti di emicrania, un'altra forma di dolore trigeminale, che spesso precedono le manifestazioni cliniche e la diagnosi della patologia. Entrambi i tipi di dolore sono poco controllati dagli analgesici disponibili; si devono così assumere farmaci, come gli antiepilettici, con gravi effetti collaterali. Dati di letteratura suggeriscono che il dolore trigeminale nella SM non sia legato alla demielinizzazione in aree del sistema nervoso centrale coinvolte nella trasmissione del dolore, quali il tronco encefalico e il talamo, e che nello sviluppo e nella cronicizzazione del dolore siano quindi coinvolti altri meccanismi biochimici e/o altri tipi cellulari. Ci siamo quindi proposti di mettere a punto un modello di Encefalomielite Sperimentale Autoimmune (ESA) attraverso immunizzazione con una porzione di una proteina della mielina e di condurre alcuni esperimenti focalizzati ad analizzare meccanismi specifici legati alla nostra esperienza pluriennale sulla trasmissione del dolore, come l'attivazione di astrociti e cellule della microglia. Inoltre, ci siamo proposti di identificare alterazioni di vie metaboliche non ancora studiate che si possano correlare al dolore trigeminale nella SM, grazie ad un approccio ad ampio spettro con analisi lipidomiche, metabolomiche e trascrittomiche.

L'obiettivo finale è individuare i bersagli più interessanti che possano essere sfruttati in futuri esperi-

menti farmacologici, per lo sviluppo di farmaci innovativi e più efficaci che possano essere in seguito resi disponibili ai pazienti.

RISULTATI

Come indicato nel piano sperimentale del nostro progetto pilota, abbiamo messo a punto il modello di ESA in ratti maschi di ceppo Dark Agouti, dimostrando un tipico andamento recidivante-remittente dei sintomi motori con esordio intorno all'ottavo giorno dopo immunizzazione. Il dato più interessante riguarda la comparsa di dolore trigeminale (misurato come alodinia facciale, una risposta dolorosa a stimoli normalmente innocui) già al sesto giorno dopo immunizzazione, cioè prima della comparsa dei sintomi motori. Inoltre, il dolore trigeminale aumenta con il tempo e persiste negli animali anche durante la fase di remissione della patologia. Le analisi istochimiche e biochimiche dei tessuti espuntati dagli animali ESA dopo 21 giorni dall'immunizzazione ci hanno permesso di evidenziare attivazione delle cellule della microglia e degli astrociti nel tronco encefalico, un'area del sistema nervoso centrale che controlla e trasmette le sensazioni dolorose dal nervo trigemino verso il cervello, in assenza di segni di demielinizzazione. Abbiamo inoltre osservato un piccolo ma significativo aumento dell'espressione del recettore di tipo 1 della sfingosina-1-fosfato (S1P1), il bersaglio di fingolimod, uno dei più recenti farmaci modificanti la malattia. Infine, l'analisi dei metaboliti cellulari presenti nel nervo trigemino ha mostrato una riduzione altamente significativa di tutte le classi di lipidi e secondi messaggeri ed un aumento dei metaboliti energetici dopo induzione di ESA. A causa di problemi tecnici, le analisi dei metaboliti del ganglio trigemino dei medesimi animali sono attualmente in corso, mentre abbiamo deciso di non condurre le ana-

lisi di lipidomica e trascrittomica a causa della scarsità di tessuto a disposizione.

CONCLUSIONI

Abbiamo gettato le basi per l'identificazione di nuovi meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo di dolore trigeminale nella SM recidivante-remittente, confermando l'ipotesi che lo sviluppo di sensitizzazione trigeminale sia guidato da vie indipendenti e parallele rispetto a quelle che controllano la comparsa dei sintomi motori dell'ESA. Inoltre, la presenza di astrogliosi e microgliosi reattive dopo 21 giorni dall'immunizzazione suggerisce che le cellule della glia giocano un ruolo chiave nel processo di cronicizza-

zione del dolore. Farmaci che ne riducano lo stato reattivo, anche attraverso la modulazione del recettore S1P1, potrebbero quindi essere utili nel controllare il dolore trigeminale intrattabile. Infine, abbiamo identificato una serie di metaboliti, inclusi fosfolipidi, sfingomieline e ceramidi, che sono significativamente meno espressi negli animali ESA. Stiamo conducendo analisi di conferma, ma i dati disponibili suggeriscono che strategie atte a normalizzarne l'espressione potrebbero rappresentare ulteriori opzioni interessanti per la scoperta di nuovi farmaci efficaci contro il dolore nella SM, da testare inizialmente sul modello animale e da rendere in un futuro disponibili per i pazienti.

Insights into the molecular and cellular mechanisms at the basis of multiple sclerosis-related trigeminal neuropathy and increased susceptibility to migraine pain

INTRODUCTION AND AIMS

This pilot project had the aim of identifying the biochemical, molecular and cellular pathways at the basis of the development and chronicization of trigeminal-related pain during the course of multiple sclerosis (MS). This topic represents a rather neglected area of research in the MS community, although a significant percentage (up to 10%) of patients experience trigeminal pain at any disease stage. Moreover, MS patients are significantly more susceptible to recurrent attacks of migraine, another form of trigeminal-related pain, which often precede the onset and diagnosis of the disease itself. Both conditions are poorly controlled by available analgesics, and other drugs with significant side effects, like antiepileptics, should be often utilized to get some relief. Currently available literature data suggest that trigeminal pain in MS is not simply a reflection of central demyelination in areas involved in pain transmission, like the brainstem or the thalamus, and that other yet-to-be identified biochemical pathways and/or cellular players are involved in pain onset and chronicization. We aimed at setting up a rat model of chronic relapsing/remitting Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) through immunization with a peptide of a myelin protein, and at performing a limited number of very focused experiments that rest on targets (i.e., analysis of the activation of astrocytes and microglia cells) related to our expertise and to the availability of specific tools.

Moreover, thanks to a broad and unbiased approach that will employ lipidomic, metabolomic and transcriptomic analyses we aimed at identifying previously unforeseen altered pathways at the basis of the development of trigeminal pain in MS. The final goal is to identify the most interesting targets to be exploited in future pharmacological experiments, leading to the development of innovative and more effective drugs to be later made available to patients.

RESULTS

As originally included in our experimental plan, we successfully set up the relapsing-remitting model of EAE in Dark Agouti male rats, showing a mean onset of symptoms at around day eight post immunization. The most interesting result is represented by the appearance of trigeminal pain starting from six days post immunization, i.e. before the onset of motor symptoms, as measured by the development of orofacial allodynia (a painful reaction to normally non-painful stimuli). Furthermore, trigeminal pain increases with time and persists even during the remission phase of the pathology. Histochemical and biochemical analyses of tissues from EAE animals at 21 days post immunization highlighted microglia and astrocyte activation in the brainstem, a central nervous system area devoted to the integration and transmission of trigeminal pain sensations to the brain, in the absence of signs of demyelination. Moreover, we observed a small but significant increase in the ex-

pression of the sphingosine-1-phosphate type1 receptor (S1P1), the target of fingolimod, one of the most recent disease-modifying drugs. Finally, the evaluation of the cellular metabolites in the trigeminal nerve showed a highly significant reduction of all classes of lipids and second messengers and an increase in energy metabolites after EAE induction. Due to technical problems, analyses of metabolites in the trigeminal ganglia of the same animals are currently ongoing, whereas we have decided to exclude lipidomics and transcriptomics analyses due to the scarcity of available tissue.

CONCLUSIONS

With this pilot project, we have set the basis for the identification of new pathogenic mechanisms that regulate the development of trigeminal pain in relapsing-remitting MS. We have confirmed our hypothesis that the development of trigeminal sensitization is driven by pathways which are parallel

and likely independent from those controlling the appearance of the motor symptoms of EAE. Additionally, glial cells seem to play a key role in pain chronicization, with the presence of reactive astrogliosis and microgliosis at later time points after immunization. Thus, drugs aimed at reducing their reactive state could prove beneficial in managing untreatable trigeminal pain, also likely through the modulation of S1P1 activity. Finally, we have identified a number of metabolites, including phospholipids, sphingomyelins and ceramides, which are significantly downregulated in the trigeminal nerve of EAE animals. Confirmatory experiments are currently under analysis, but available data already suggest us that strategies aimed at normalizing their expression could therefore represent additional interesting options for the discovery of new and effective drugs to manage pain in MS, to be tested in animals in the short term and to be later made available to patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Ceruti S. *What role does multiple sclerosis play in the development of untreatable painful conditions?* Pain Manag. 2018 Jan;8(1):37-44. doi: 10.2217/pmt-2017-0038. [Epub 2017 Nov 28]. Invited review.

Magni G., Pedretti S., Mitro N., Ceruti S. *Development of Orofacial Pain Precedes the Appearance of Motor Symptoms in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Molecular and Cellular Mechanisms.* 17th IASP World Congress on Pain, Boston, MA, USA, 12-16 September 2018

Magni G., Pedretti S., Mitro N., Ceruti S. *Development of orofacial pain precedes the appearance of motor symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis: role of glial cells.* II Edition – “More than neurons: toward a less neuronocentric view of brain disorders”, Turin, Italy, 29 November- 1 December 2018

Magni G., Pedretti S., Mitro N., Ceruti S. *Trigeminal pain in an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): molecular and cellular mechanisms.* Accepted in the Symposium: “New horizons in pain treatment”. 39^o National Congress of the Italian Pharmacological Society, Florence, Italy, 20-23 November 2019

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno (prorogato di 5 mesi) e l'ammontare di 29.872,50 €
Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year (extended by 5 months) and the amount of € 29,872.50

Flavia Valtorta

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

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Stefano Comai, Fabrizia Guarnieri, Romina Cervigni, Elena Monzani

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Stefano Taverna, Luca Muzio, Gianvito Martino, Unità di Neuroimmunologia, Divisione di Neuroscienze, Ospedale San Raffaele, Milano

Meccanismi omeostatici presinaptici nel corso di trattamento cronico di neuroni con citochine proinfiammatorie ed in corso di encefalite allergica sperimentale

PREMESSE E OBIETTIVI

Alla base dei sintomi motori e cognitivi che compromettono la qualità della vita delle persone con sclerosi multipla (SM) vi è la progressiva alterazione del funzionamento dei neuroni, parzialmente dovuta alla perdita di mielina, erroneamente attaccata dal sistema immunitario. Recenti ricerche hanno però evidenziato che alcuni sintomi si manifestano prima della perdita di mielina, suggerendo che altri fattori determinino un danno neuronale.

Scopo di questo progetto era studiare gli effetti delle molecole rilasciate dal sistema immunitario sul funzionamento dei neuroni, indipendentemente dall'azione sulla mielina, e in particolare sul funzionamento dell'unità strutturale alla base della comunicazione tra neuroni, la sinapsi. Studi preliminari che ci hanno portato ad elaborare questo progetto suggerivano che una proteina sinaptica, denominata sinapsina I, potesse essere un mediatore importante della risposta neuronale a molecole infiammatorie. Il nostro obiettivo è stato quindi quello di meglio caratterizzare il ruolo di sinapsina I nella progressione della malattia, in modo da capire se le vie di segnalazione in cui è coinvolta possano costituire bersagli farmacologici utili allo sviluppo di nuovi trattamenti. In particolare, il progetto si proponeva di studiare gli effetti della delezione di sinapsina I nel modello animale di patologia ESA (encefalomielite sperimentale autoimmune) e di valutare gli effetti sinaptici dell'esposizione cronica a un ambiente infiammatorio.

RISULTATI

Per studiare dal punto di vista molecolare gli effetti

sinaptici di un ambiente infiammatorio ci siamo avvalsi di colture neuronali ippocampali primarie derivate da topo. I neuroni cresciuti *in vitro*, una volta maturati, sono stati incubati con citochine pro-infiammatorie per tempi brevi (5-60 minuti). Abbiamo osservato che questo trattamento determina l'attivazione della chinasi ERK e la fosforilazione del suo bersaglio sinapsina I. Quest'ultima è una proteina in grado di regolare il numero di vescicole sinaptiche disponibili per la fusione, modulando così il rilascio di neurotrasmettitore. In accordo a ciò, il trattamento con citochine pro-infiammatorie determina un aumento nella frequenza di eventi di rilascio spontaneo di vescicole sinaptiche, ma questo effetto è assente in neuroni deleti per sinapsina I.

Ci siamo quindi chiesti se l'assenza di sinapsina potesse modificare il decorso della malattia. Abbiamo indotto il modello di ESA in topi *wild-type* e topi deleti per il gene *Syn1* e monitorato il decorso clinico della patologia. Topi deleti per sinapsina I presentano un miglioramento del decorso patologico nella fase cronica della malattia. Questo si accompagna ad una riduzione del danno assonale e della demielinizzazione misurati mediante analisi istopatologiche del midollo spinale. Inoltre, tale fenotipo protettivo non è dovuto ad un difetto del sistema immunitario nei topi deleti, in accordo al fatto che sinapsina I non è espressa in cellule immunitarie.

Per capire come la delezione di sinapsina I possa portare ad un miglioramento del fenotipo clinico di ESA, abbiamo messo a punto dei saggi di elettrofisiologia *in vivo*, volti a caratterizzare l'attività elettrica neuronale in varie aree cerebrali di topi ESA *wild-type* e de-

leti per il gene *Syn1*. Per il momento ci siamo focalizzati sullo studio della trasmissione serotonergica e dopaminergica, due sistemi rilevanti in relazione alla sintomatologia cognitiva ed emotiva che interessa le persone con SM. I dati raccolti mostrano che l'induzione della malattia modifica la trasmissione serotonergica nella fase cronica, sia in topi *wild-type* che in topi deleti per sinapsina 1. L'induzione di ESA determina altresì una modificazione della trasmissione dopaminergica nella fase cronica, ma questo effetto è assente in topi deleti per sinapsina I.

Infine, per meglio caratterizzare dal punto di vista molecolare il possibile effetto protettivo dell'assenza di sinapsina I sulla struttura e funzionalità sinaptica a seguito di esposizione prolungata ad un ambiente infiammatorio, abbiamo trattato neuroni in coltura con

citochine pro-infiammatorie per cinque giorni. Abbiamo così osservato che il trattamento prolungato con citochine pro-infiammatorie induce modificazioni sinaptiche differenti in neuroni *wild-type* e neuroni deleti per sinapsina 1, suggerendo nuovamente la rilevanza di questa proteina nella risposta neuronale ad un ambiente infiammatorio.

CONCLUSIONI

Grazie a questo progetto abbiamo potuto identificare sinapsina I come un mediatore importante della risposta neuronale ad un ambiente pro-infiammatorio, sia *in vitro* che *in vivo*. Ciò rappresenta un primo passo verso l'identificazione di un possibile nuovo meccanismo patogenetico e di conseguenza un nuovo possibile bersaglio farmacologico.

Presynaptic homeostatic mechanisms upon chronic treatments of neurons with inflammatory cytokines and in the course of EAE

INTRODUCTION AND AIMS

Recent research has evidenced that a progressive alteration of the functioning of neurons is at the basis of the motor and cognitive symptoms that compromise the quality of life of people with multiple sclerosis (MS). This is partly due to the loss of myelin, aberrantly attacked by the immune system. However, some symptoms occur before the loss of myelin, suggesting that other factors cause neuronal damage.

The aim of this project was to study the effects of the molecules released by the immune system on the functioning of the neurons, independently of the action on myelin, and in particular on the functioning of the synapse, the structural unit at the basis of the neuronal communication. Preliminary studies performed in our laboratory suggested that a synaptic protein, called synapsin I, may be an important mediator of the neuronal response to inflammatory molecules. Therefore, our aim was to better characterize the role of synapsin I in the progression of the disease, in order to understand if the signaling pathways in which it is involved can constitute pharmacological targets for the development of new treatments. In particular, the project aimed at studying the effects of synapsin I deletion in the EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) animal model of MS and to evaluate the synaptic effects of chronic exposure to an inflammatory environment.

RESULTS

In order to study the synaptic effects of an inflammatory environment from a molecular point of view, we used primary murine hippocampal neurons in culture. One mature, neurons were incubated with pro-inflammatory cytokines for short periods (5-60 minutes). We observed that this treatment determines the activation of the ERK kinase and the phosphorylation of its target synapsin I. The latter is a protein able to regulate the number of synaptic vesicles available for fusion, thus modulating neurotransmitter release. Accordingly, treatment with pro-inflammatory cytokines causes an increase in the frequency of synaptic vesicles spontaneous release events, but this effect is absent in synapsin I-deleted neurons.

We therefore wondered if the absence of synapsin could modify the course of the disease. We induced EAE in *wild-type* and *Syn1*-deleted mice and monitored the clinical course of the disease. Mice deleted for synapsin I show an improvement of the clinical course in the chronic phase of the disease. This is accompanied by a reduction in axonal damage and demyelination measured by histopathological analysis of the spinal cord. Furthermore, this protective phenotype is not due to a deficiency of the immune system in these animals, according to the fact that synapsin I is not expressed in immune cells.

To understand how the deletion of synapsin I can lead

to an improvement in the clinical phenotype of EAE, we developed *in vivo* electrophysiological assays, aimed at characterizing neuronal electrical activity in various brain areas of wild-type and *Syn1*-deleted EAE mice. We focused our attention on serotonergic and dopaminergic transmission, two systems that are particularly relevant for the cognitive and emotional symptoms that affect people with MS. Our data show that the induction of EAE causes a modification of the serotonergic transmission in the chronic phase, both in wild-type mice and in mice deleted for synapsin I. The induction of EAE also causes a modification of the dopaminergic transmission in the chronic phase, but this effect is absent in mice deleted for synapsin I. Finally, to better characterize the possible protective effects of the absence of synapsin I on synaptic structure and function upon prolonged exposure to an in-

flammatory environment, we treated neurons in culture with pro-inflammatory cytokines for five days. We observed that prolonged treatment with pro-inflammatory cytokines induces synaptic modifications that differ in wild-type and synapsin-deleted neurons, suggesting again the relevance of this protein in the neuronal response to an inflammatory environment.

CONCLUSIONS

Thanks to this project we identified synapsin I as an important mediator of the neuronal response to a pro-inflammatory environment, both *in vitro* and *in vivo*. This represents a first step towards the identification of a possible new pathogenetic mechanism and consequently a new possible pharmacological target.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

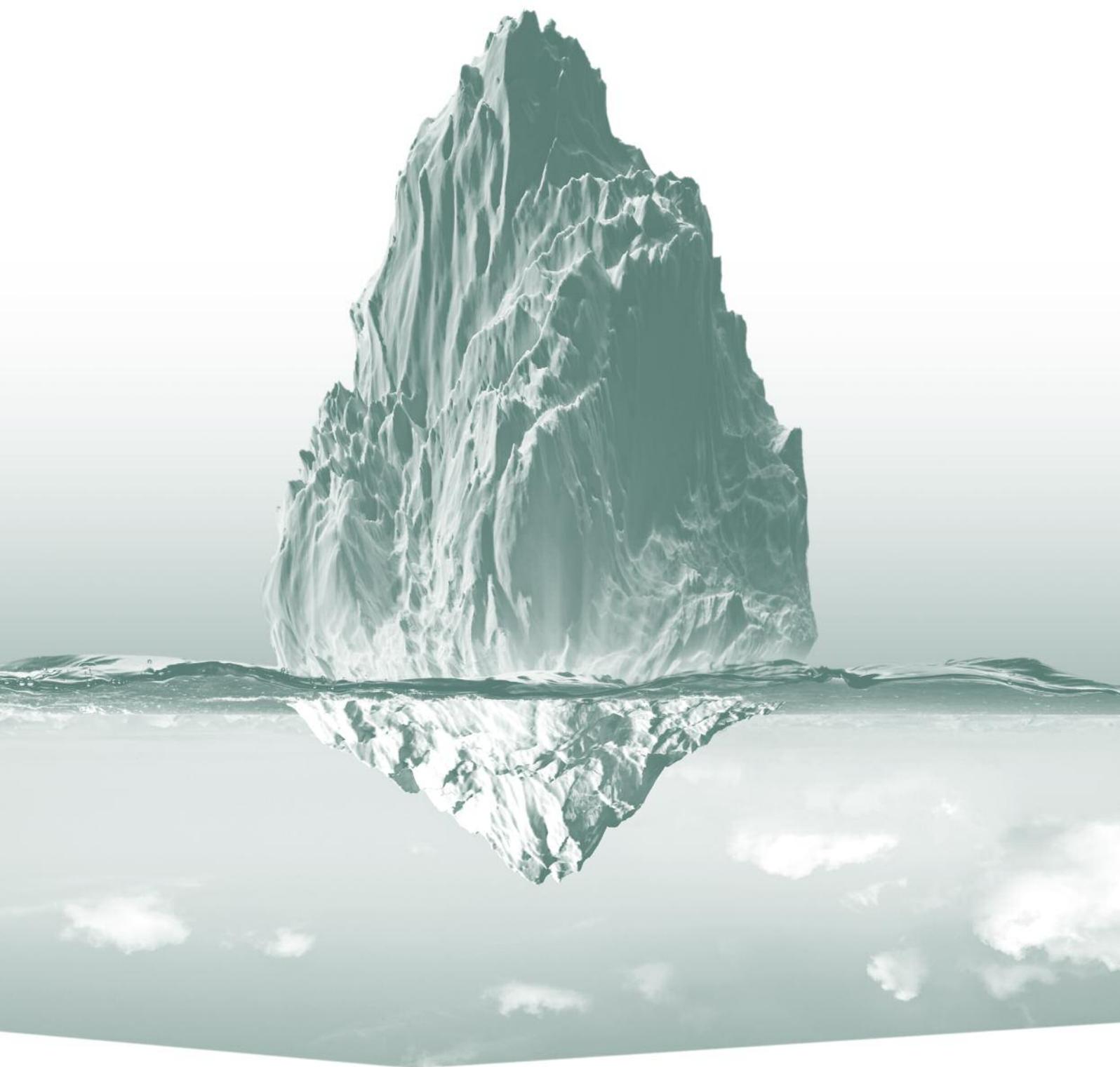
Guarnieri FC, Bellani S, Yekhelef L, Bergamaschi A, Finardi A, Fesce R, Pozzi D, Monzani E, Fornasiero EF, Matteoli M, Martino G, Furlan R, Taverna S, Muzio L, Valtorta F. Synapsin I deletion reduces neuronal damage and ameliorates clinical progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 2018 Feb;68:197-210. doi: 10.1016/j.bbi.2017.10.018. Epub 2017 Oct 21.

Presynaptic mechanisms in multiple sclerosis: studies in neuronal cultures and in experimental autoimmune encephalomyelitis", presented by Fabrizia Guarnieri, awarded best presentation. Conference of the Italian Society of Pharmacology "Controversies in Neurodegeneration 2016, 9-10 June, Catania, Italy

Presynaptic mechanisms in multiple sclerosis: studies in neuronal cultures and in experimental autoimmune encephalomyelitis. Presented by Fabrizia Guarnieri, awarded best presentation. Conference of the Italian Society of Pharmacology "XIX SIF Seminar on Pharmacology and similar sciences for PhD students, fellows, postdoc and specialist trainees" 2016, 20-22 September, Rimini, Italy

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 210.000 €

Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 210,000



VERSO NUOVI TRATTAMENTI

TOWARDS NEW TREATMENTS

Francesca Boscia

Divisione di Farmacologia, Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Napoli

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Valeria de Rosa, Mariarosaria Cammarota, Agnese Secondo, Anna Pannaccione, Luigi Formisano

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Roman Polischuk, Istituto Telethon di Genetica e Medicina (TIGEM), Napoli

Annalisa Fico, Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati-Traverso”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli

Studio del ruolo dell'isoforma dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX3 nella rimielinizzazione del sistema nervoso centrale

PREMESSE E OBIETTIVI

La terapia rimielinizzante per la sclerosi multipla (SM) rappresenta una promettente strategia terapeutica utile non solo ad accelerare il ripristino di una efficiente velocità di conduzione assonale in seguito ad un insulto demielinizzante ma anche per promuovere un'azione neuroprotettiva in grado di prevenire la progressione della SM e la disabilità clinica.

Recenti studi hanno dimostrato come i segnali mediati dalla neurotrasmissione glutammatergica a livello delle sinapsi asso-mieliniche regolano i meccanismi di rimodellamento e di riparo della mielina. In accordo, un numero sempre crescente di studi suggerisce che i segnali di calcio intracellulari $[\text{Ca}^{2+}]_i$; attraverso l'attivazione dei recettori ionotropici del glutammato e dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX3 possa influenzare la maturazione degli oligodendrociti e la sintesi della mielina. Studi precedenti condotti nei nostri laboratori di ricerca hanno dimostrato che l'assenza del gene *ncx3* in topi *knock-out* pregiudica, riducendola significativamente, la risposta degli oligodendrociti all'insulto demielinizzante e determina un peggioramento della sintomatologia dell'encefalite autoimmune sperimentale, un modello murino di SM.

L'obiettivo generale del nostro progetto è stato la comprensione del ruolo funzionale dei segnali di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediati da NCX3 durante il differenziamento degli oligodendrociti per stabilire se la sua modulazione possa rappresentare una nuova strategia tera-

peutica per promuovere la rimielinizzazione in seguito ad un insulto demielinizzante.

Per il raggiungimento di tale obiettivo abbiamo utilizzato sia il modello dei topi *ncx3*^{-/-} *knock-out* sia approcci farmacologici per ridurre l'espressione e l'attività di NCX3 in modelli *in vitro* ed *in vivo* di danno e riparo alla mielina. Inoltre, alla luce della recente dimostrazione che il D-Aspartato, un D-aminoacido in grado di esercitare un'azione modulatrice a livello delle sinapsi glutammatergiche, è in grado di stimolare l'attività dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, abbiamo dapprima analizzato il ruolo funzionale di NCX3 negli OPC in presenza di D-Aspartato e, successivamente, gli effetti del trattamento con D-Aspartato nel modello murino del cuprizone, un modello sperimentale di danno e riparo della mielina.

RISULTATI

I risultati dei nostri studi hanno dimostrato che l'assenza della proteina NCX3 nelle colture primarie di OPC ottenute da topi *ncx3*^{-/-} *knock-out* altera significativamente il differenziamento degli oligodendrociti, come dimostrato dalla ridotta espressione dei marcatori della mielina e ridotta complessità morfologica. Successivamente abbiamo dimostrato che l'esposizione dei precursori degli oligodendrociti al D-Aspartato determina un aumento dell'espressione e dell'attività funzionale di NCX3 e promuove il differenziamento degli OPC e la mielinizzazione asso-

nale in colture organotipiche cerebellari di ratto. Il blocco farmacologico dell'attività di NCX3 negli OPC previene significativamente l'aumento di espressione dei marcatori della mielina indotto dal D-Aspartato. Studi funzionali hanno dimostrato che l'esposizione degli OPC al D-Aspartato promuove un aumento di $[Ca^{2+}]_i$ seguito da un *pattern* oscillatorio che coinvolge una orchestrata attivazione dei trasportatori del glutammato, dei recettori ionotropici del glutammato AMPA ed NMDA, e dello scambiatore NCX3. In particolare, utilizzando sia approcci farmacologici che transgenici per modulare NCX3 in esperimenti di microfluorimetria, abbiamo dimostrato che la presenza dello scambiatore NCX3 è indispensabile per il mantenimento delle oscillazioni di $[Ca^{2+}]_i$ durante il differenziamento degli oligodendrociti.

In accordo con il ruolo importante di tali oscillazioni, è stato recentemente dimostrato che negli oligodendrociti differenzianti, le oscillazioni di calcio, incluse quelle evocate dall'attività neuronale, promuovono la formazione e l'assemblamento della guaina mielinica. Alla luce di questi risultati, abbiamo verificato se il trattamento con D-Aspartato, attraverso una stimolazione dell'attività di NCX3

negli OPC potesse accelerare la rimielinizzazione. Pertanto, utilizzando un modello murino di danno e riparo alla mielina abbiamo dimostrato che la somministrazione del D-Aspartato durante la rimielinizzazione era in grado di migliorare la coordinazione motoria, accelerare la rigenerazione della mielina, ed aumentare il numero di assoni mielinizzati di piccolo diametro.

CONCLUSIONI

Nel loro insieme, i nostri dati rappresentano un avanzamento nella comprensione di come i segnali di $[Ca^{2+}]_i$ mediati dallo scambiatore NCX3 possono influenzare la rimielinizzazione assonale. Essi rivelano, inoltre, un nuovo ruolo biologico del D-Aspartato nel sistema nervoso centrale e suggeriscono che la somministrazione di D-Aspartato, attraverso una orchestrata stimolazione dei segnali di $[Ca^{2+}]_i$ attraverso lo scambiatore NCX3 ed i recettori del glutammato può rappresentare una nuova strategia per promuovere la (ri)mielinizzazione. Ulteriori studi saranno necessari per identificare nuove strategie per modulare selettivamente l'espressione e l'attività funzionale di NCX3 durante un insulto demielinizzante.

Role of the Na^+/Ca^{2+} exchanger NCX3 in central nervous system remyelination

INTRODUCTION AND AIMS

Remyelination therapy is emerging as promising strategy not only for restoration of axonal conduction properties that are lost following demyelination, but also to afford neuroprotection thereby preventing multiple sclerosis (MS) progression and clinical disability.

In recent years, glutamatergic signaling at axo-myelinic synapses was suggested to regulate myelin remodeling and repair. In line, mounting evidence suggests that the activation of Ca^{2+} -dependent pathways through glutamate receptors and the Na^+/Ca^{2+} exchanger NCX3 may influence oligodendrocyte maturation and myelin synthesis. We previously demonstrated that knocking out *ncx3* gene impairs oligodendrocyte lineage response, increases disease susceptibility and worsens clinical symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of MS. The general aim of this project has been the comprehension of the role of NCX3 cal-

cium signaling during oligodendrocyte development to establish whether its functional modulation may represent a novel strategy to promote remyelination. To achieve this aim we employed both transgenic and pharmacological approaches to modulate NCX3 expression and activity both in *in vitro* and *in vivo* models of myelin damage and repair. As previous findings demonstrated that D-Aspartate, a D-amino acid exerting a modulatory action at glutamatergic synapses, may stimulate NCX activity in oligodendrocyte precursor cells, we investigated the functional role of NCX3 under D-Aspartate exposure in OPC and we also explore the effect of exogenous D-Aspartate treatment in an animal model of myelin damage and repair.

RESULTS

We provided evidence that knocking out *ncx3* gene in OPC cultures significantly alter oligodendrocyte differentiation, as revealed by the reduced expres-

sion of myelin markers and altered morphological complexity during OPC development. D-Aspartate exposure upregulated NCX3 expression and activity and promoted OPC differentiation and myelination in cerebellar organotypic slices. Pharmacological blockade of NCX3 activity significantly prevented myelin markers increase after D-Aspartate exposure in OPC cultures. Functional studies demonstrated that D-Aspartate-evoked calcium transients in OPC involved a concerted actions of glutamate transporters, AMPA and NMDA receptors, and NCX3 exchanger. In particular, by using pharmacological and transgenic approaches in functional microfluorimetric studies we established that NCX3 is required for sustaining calcium oscillations during oligodendrocyte differentiation.

Very recently, it has been shown that calcium oscillations in developing oligodendrocytes, including those evoked by neuronal activity, drive myelin sheath elongation and assembly. Based on these observations, we also investigated whether D-Aspartate treat-

ment, by stimulating NCX3 activity in OPC may accelerate remyelination. By using an *in vivo* model of myelin damage and repair, we found that administration of D-Aspartate during remyelination improved motor coordination, accelerated myelin recovery and significantly increased the number of small-diameter myelinated axons.

CONCLUSIONS

Collectively, our findings represent an advance in understanding how signaling through NCX3 may influence axonal remyelination. Furthermore, beside unveiling a novel biological role for D-Aspartate in the central nervous system, they also suggest that D-Aspartate treatment, by promoting calcium signaling through glutamate receptors and NCX3 in oligodendrocytes may represent a novel strategy to promote (re)myelination. Further studies are necessary to identify novel strategies to selectively modulate NCX3 expression and functional activity under demyelinating conditions.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

De Rosa V, Secondo A, Pannaccione A, Ciccone R, Formisano L, Guida N, Crispino R, Fico A, Polishchuk R, D'Aniello A, Annunziato L, Boscia F. (2019) D-Aspartate treatment attenuates myelin damage and stimulates myelin repair. *EMBO Molecular Medicine*, 11(1), pii: e9278

Criscuolo C, Cianflone A, Lanzillo R, Carrella D, Carissimo A, Napolitano F, De Candia P, La Rocca C, Tiziana Petrozziello, Matarese G, Boscia F, Secondo A, Di Bernardo D, Brescia Morra V. (2019) Glatiramer Acetate modulates ion channels expression and calcium homeostasis in B-cell of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (2019). *Scientific Report*, 9:4208

Boscia F, Begum G, Pignataro G, Sirabella R, Cuomo O, Casamassa A, Sun D, Annunziato L. (2016) Glial Na⁺-dependent ion transporters in pathophysiological conditions *Glia*, 64:1677-97

De Rosa V, Secondo A, Pannaccione A, Ciccone R, Formisano L, Guida N, Crispino R, D'Aniello A, Polishchuk R, Annunziato L, Boscia F. Effects of D-Aspartate on oligodendrocytes during differentiation, demyelination and remyelination processes. *Convegno Nazionale dei Dottorandi di Neuroscienze. New Perspectives in Neuroscience: Research Results of Young Italian Neuroscientists. February, 24th, 2017, Naples, Italy*

De Rosa V, Secondo A, Pannaccione A, Ciccone R, Formisano L, Guida N, Crispino R, D'Aniello A, Polishchuk R, Annunziato L, Boscia F. XIII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. Effects of D-Aspartate on oligodendrocytes during differentiation, demyelination and remyelination processes. *Edinburgh, July, 8-11th, 2017*

Casamassa A, Pannaccione A, Secondo A, Formisano L, Guida N, de Rosa V, La Rocca C, Matarese G, Annunziato, Boscia F. Emerging role of the sodium calcium exchanger NCX3 in oligodendrocytes during CNS myelination and remyelination. *6th International Conference of the Mediterranean Neuroscience Society. June, 12-15th, 2017, Malta*

De Rosa V, Secondo A, Pannaccione A, Ciccone R, Formisano L, Guida N, Crispino R, D'Aniello A, Polishchuk R, Annunziato L, Boscia F. National Congress of the Italian Society for Neuroscience (SINS). D-Aspartate treatment stimulates differentiation of oligodendrocyte precursors, prevents demyelination and accelerates remyelination in the cuprizone mouse model of Multiple Sclerosis. *October 1-4th, 2017, Lacco Ameno, Ischia, Naples, Italy*

Casamassa A, Pannaccione A, Secondo A, Formisano L, Guida N, de Rosa V, La Rocca C, Matarese G, Annunziato, Boscia F. National Congress of the Italian Society for Neuroscience (SINS). Chairman of the symposium: New disease modifying therapies and emerging targets for neuroprotection and repair in Multiple Sclerosis. Title of the presentation: "Targeting the Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX3 in Multiple Sclerosis". *October 1-4th, 2017, Lacco Ameno, Ischia, Naples, Italy*

Casamassa A, La Rocca C, Matarese G, Annunziato L, Boscia F. Ncx3 gene ablation impairs oligodendrocyte precursor response and increases susceptibility to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Gordon Conference "Myelin", May 15-20th, 2016 Lucca (Barga), Italy*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2015 per il periodo di 1 anno, (prorogato di un anno e 4 mesi) e l'ammontare di 98.000 €

Research project funded by FISM Grant 2015 for the period of 1 year (extended by 1 year and 4 months) and the amount of € 98,000

Ivano Eberini

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Elena Menegola, Chiara Parravicini, Marta Fumagalli, Uliano Guerrini, Francesca Di Renzo, Renato Bacchetta, Luca Palazzolo, Elisabetta Bonfanti, Tommaso Laurenzi, Maria Battistoni

Approfondimento e modelling dei meccanismi di rimielinizzazione indotti da antimicotici azolici in uso clinico con caratteristiche di riposizionamento

PREMESSE E OBIETTIVI

Uno degli stimoli fisiologici alla produzione della mielina è l'esposizione dei precursori degli oligodendrociti all'acido retinoico, che, modulando l'espressione di parecchi geni, ne promuove la maturazione e il differenziamento. Nel sistema nervoso, la concentrazione di acido retinoico, che deriva dalla vitamina A, è regolata dal bilancio tra sintesi e catabolismo. Il catabolismo avviene ad opera di enzimi della famiglia dei citocromi P450, specificamente del CYP26. Inibire l'enzima responsabile del catabolismo diventa quindi un modo per aumentare la concentrazione locale di acido retinoico e favorirne la sua attività promielinizzante.

Lo scopo della nostra ricerca è stato trovare inibitori di CYP26, partendo da farmaci già in commercio ma caratterizzati da differenti indicazioni terapeutiche, per accelerare il possibile utilizzo di questi in una terapia riparativa della sclerosi multipla.

Sono già stati descritti farmaci con queste caratteristiche: uno di questi è il miconazolo, ampiamente utilizzato per disturbi comuni, quali le infezioni micotiche. La scelta di valutare molecole già in terapia, in questo caso della stessa famiglia del miconazolo (azolici), è legata al fatto che sono già disponibili studi clinici di sicurezza a breve e lungo termine.

La strategia di impiegare un farmaco già in commercio con una nuova indicazione d'uso viene definita tecnicamente *riposizionamento* e potrebbe permettere la rapida identificazione di molecole utili nella terapia riparativa della sclerosi multipla, con forti riduzioni dei costi della ricerca e sviluppo.

RISULTATI

Abbiamo studiato le proprietà di sette azolici, usando

una combinazione di procedure al computer e su colture cellulari: le prime per selezionare i composti più promettenti; le seconde per verificare le nostre previsioni e valutarne attività ed efficacia.

Per valutare la capacità di aumentare la concentrazione locale di acido retinoico, abbiamo, prima di tutto, costruito dei modelli tridimensionali del CYP26, studiando la loro interazione con gli azolici. Questa interazione è stata valutata attraverso una tecnica chiamata *docking* molecolare. In tutti i casi abbiamo osservato che il farmaco entra nell'enzima ed è capace di bloccarne la sua attività catabolica. Itraconazolo e posaconazolo, molto attivi secondo le nostre previsioni, e fluconazolo, preso come riferimento, sono stati quindi scelti per le prove su cellule in coltura.

Nel primo di questi saggi sui precursori degli oligodendrociti, abbiamo valutato l'effetto di due diverse dosi di azolici, da soli o in combinazione con un noto inibitore della sintesi di acido retinoico. Il numero di cellule positive per la produzione di mielina è sempre stato superiore rispetto ai controlli.

Anche in un secondo saggio, più specifico per l'attività di mielinizzazione, basato sulla coltura di precursori degli oligodendrociti con neuroni, abbiamo ottenuto con i medesimi azolici selezionati gli stessi risultati positivi.

Nel terzo saggio abbiamo invece incubato *micromasse* cerebrali con gli azolici più attivi, che avevamo selezionato nei passaggi precedenti (itraconazolo e fluconazolo), anche dopo arresto del differenziamento cellulare con serotonina. Fluconazolo si è dimostrato in grado di promuovere il differenziamento, mentre itraconazolo, alle concentrazioni provate, si è dimostrato tossico, bloccando proliferazione e differenziamento delle cellule che compongono le micromasse.

CONCLUSIONI

Le nostre indagini hanno preso in considerazione tutte le attività indicate nella proposta finanziata. I nostri risultati forniscono infatti la prova concettuale dell'attività mielinizzante degli azoli, noti farmaci antimicotici, attraverso l'inibizione della degradazione di acido retinoico. Specificamente, i nostri risultati suggeriscono che questi farmaci, in quanto efficaci inibitori di CYP26, potrebbero essere utili per favorire la riparazione della mielina nelle persone con sclerosi multipla. Tra i sette farmaci valutati, fluconazolo si è dimostrato molto efficace in tutti i saggi, in-

cluso il test delle micromasse, che è il più complesso tra quelli adottati. Questo saggio permette infatti di riprodurre in maniera molto semplificata l'organizzazione tridimensionale tipica del sistema nervoso centrale.

È nostra intenzione proseguire lungo questa linea di ricerca, individuando altri farmaci già in commercio capaci di indurre formazione di mielina, al fine di sfruttarne le capacità additive o sinergiche con gli azoli, per ridurre le dosi. In questo modo, sarà possibile ridurre anche la tossicità e gli effetti avversi della somministrazione cronica di questi farmaci.

Deciphering and modelling remyelinating mechanisms induced by clinically-used azole antifungals with exploitable repurposing properties

INTRODUCTION AND AIMS

One of the physiological stimuli driving myelin production is the exposition of oligodendrocytes precursor cells to retinoic acid, which promotes their maturation and differentiation by modulating the expression of several genes. In the nervous system, the concentration of retinoic acid, a derivative of vitamin A, is regulated by the balance between its synthesis and catabolism. Retinoic acid catabolism is mediated by CYP26 enzymes, members of the cytochrome P450 superfamily. Inhibition of catabolic enzymes may then represent a strategy to raise retinoic acid local concentration and favor its pro-myelinating activity.

The aim of our research was to identify CYP26 inhibitors, starting from drugs already marketed for other therapeutic indications to accelerate their possible repurposing in multiple sclerosis reparative therapy.

Drugs with these characteristics have already been described: one of these is miconazole, widely employed for fungal infections. The choice of evaluating molecules already of clinical use, specifically of the same family of miconazole (azoles), is tied to the abundance of data regarding their short and long term safety.

The strategy of employ an already marketed drug with a different therapeutic indication is technically defined as *repurposing*, and could permit a rapid identification of useful molecules in multiple sclerosis reparative therapy, with strong reduction in research and development costs.

RESULTS

We studied the properties of seven azoles, using a combination of computational procedures and cell cultures: the former to identify the most promising compounds, the latter to validate our predictions and assess their efficacy.

To evaluate compounds ability to increase the local concentration of retinoic acid, we have first built three-dimensional models of CYP26 and studied their interactions with azoles. These interactions were evaluated by a computational technique named *molecular docking*. For all the tested compounds, we observed that the drug is able to bind the enzyme and impair its catabolic activity. Itraconazole and posaconazole, very active according to our predictions, and fluconazole, taken as a reference, were selected for further experiments on cell cultures.

In the first of the assays on oligodendrocytes precursor cells, we evaluated the effects of two different doses of azoles, administered alone or in combination with a known inhibitor of retinoic acid biosynthesis. The number of cells positive for myelin synthesis was always greater for treated cells compared to controls. In a successive assay, more specific for the myelinating activity, based on a co-culture of neurons and oligodendrocytes precursor cells, we obtained the same positive results when testing the same selected azoles.

In a third experiment, we incubated cerebral organoids (*micromasses*) with the most active azoles (itraconazole and fluconazole), that were identified in the previous steps, even after cellular differentiation interruption

induced by serotonin. Fluconazole was able to promote cellular differentiation, while itraconazole, at the tested concentrations, had a toxic activity and blocked cellular proliferation and differentiation of micromass cells.

CONCLUSIONS

Our investigation took into account all the activities indicated in the granted proposal. Our results provide a proof of concept of the myelinating activity of azoles, known antifungals, by inhibition of retinoic acid catabolism. Specifically, our results suggest that these drugs, efficient CYP26 inhibitors, could be used to promote myelin regeneration in people affected by

multiple sclerosis. Among the eight evaluated drugs, fluconazole was proven to be effective in all our experiments, including the micromass assay, the most complex among the employed assays. This experiment, in fact, allows to reproduce the three-dimensional tissue organization of the central nervous system in a simplified manner.

It's our intention to continue along this line of research, by individuating other marketed drugs able to promote myelination mechanisms, with the goal to exploit their additive or synergistic properties with azoles. In this way, it will be possible to lower azole doses and reduce the toxicity and the adverse effects of chronic administration of these drugs.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Parravicini C, Palazzolo L, Bonfanti E, Raffaele S, Laurenzi T, Fumagalli M, Guerrini U, Di Renzo F, Bacchetta R, Menegola E, Eberini I. Deciphering and modelling remyelinating mechanisms induced by clinically-used azole antifungals with exploitable repurposing properties. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 28-30 maggio 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno (prorogato di 5 mesi) e l'ammontare di 75.000 €
Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year (extended by 5 months) and the amount of € 75,000

Alberto Chiarugi

Dipartimento di Scienze della Salute Sezione di Farmacologia Clinica,
Università degli Studi di Firenze, Firenze

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Daniela Buonvicino, Giuseppe Ranieri

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Sara Pratesi, Centro di Ricerca Immunologica DENOTHE, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Daniele Guasti, Unità di Ricerca di Istologia e Embriologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Caratterizzazione delle disfunzioni mitocondriali in modelli di sclerosi multipla progressiva ed effetto di farmaci potenzianti le funzioni mitocondriali

PREMESSE E OBIETTIVI

Sebbene oltre una dozzina di farmaci siano stati approvati per il trattamento della sclerosi multipla (SM) recidivante-remittente, le evidenze cliniche dimostrano che gli stessi perdono di efficacia quando la malattia evolve verso una forma progressiva. Inoltre, anche i composti quali ocrelizumab e il siponimod che hanno dato risultati positivi in trials clinici su pazienti affetti da SM progressiva (SMP) mostrano nel complesso una efficacia limitata. L'identificazione di nuovi farmaci per la SMP è limitata dal fatto che ancora non si conoscono i meccanismi responsabili della morte neuronale che causa la progressione della disabilità. La disfunzione mitocondriale è stata proposta come uno degli eventi responsabili della morte assonale, ipotesi supportata da numerose evidenze anche cliniche che dimostrano una disfunzione dei parametri mitocondriali in pazienti con SMP. Nel tentativo di validare tale ipotesi, il nostro progetto si propone di approfondire in un modello animale murino il ruolo eziopatogenetico della disfunzione mitocondriale nei processi di progressione della SMP e di definire il potenziale terapeutico di alcuni farmaci potenzianti le funzioni mitocondriali stesse.

RISULTATI

Nello studio è stato utilizzato il modello di SMP ottenuto immunizzando topi NOD con il peptide MOG₃₅₋₅₅. Abbiamo innanzitutto caratterizzato tale modello poiché, pur trattandosi di un modello animale già utilizzato in letteratura, molti aspetti cel-

lulari e molecolari rimanevano ancora inesplorati. Dal nostro studio emerge che in seguito a immunizzazione i topi NOD sviluppano una forma di SM che ha le caratteristiche della forma primariamente progressiva. Analizzando gli infiltrati infiammatori nel midollo spinale è emerso che la componente linfocitaria T, a differenza della componente linfocitaria B, aumenta linearmente durante la progressione della malattia. L'analisi istologica del midollo ha evidenziato una demielinizzazione e una neurodegenerazione sempre più marcate con il progredire della malattia. In particolare, la costante co-localizzazione delle aree di demielinizzazione e di perdita assonale, suggeriscono che la morte neuronale è un evento che segue rapidamente o addirittura precede la demielinizzazione. In accordo con la clinica, abbiamo inoltre osservato che l'utilizzo del desametasone come potente immunosoppressore pur riducendo gli infiltrati infiammatori midollari non è in grado di arrestare l'inesorabile progressione della malattia. L'analisi dei parametri mitocondriali ha inoltre evidenziato che la quantità di DNA mitocondriale (indice di disfunzione mitocondriale) si riduce nel midollo durante la progressione della malattia. In particolare la riduzione precede l'infiltrato infiammatorio e il danno neuronale, suggerendo che la neurodegenerazione sia causata da una disfunzione mitocondriale piuttosto che dalla risposta autoimmune. Abbiamo inoltre osservato che nel corso della malattia si ha una riduzione dell'area delle creste mitocondriali e dei livelli trascr-

zionali di alcune subunità della catena respiratoria mitocondriale, eventi che tipicamente caratterizzano una minore produzione energetica. Inoltre, è stato osservato nel midollo una riduzione dei livelli di PGC1 α , proteina fondamentale nella regolazione della mitocondriogenesi. Abbiamo quindi valutato gli effetti sulla progressione della malattia del bezafibrato, farmaco largamente utilizzato come ipolipemizzante ma capace di indurre mitocondriogenesi agendo proprio su PGC1 α . Purtroppo il bezafibrato, pur ripristinando i livelli di PGC1 α e l'area delle creste mitocondriali, non è in grado di rallentare la progressione della malattia quando somministrato giornalmente alla dose di 100mg/kg. Alla luce dei recenti trials clinici con la biotina per il trattamento della SMP, abbiamo per la prima volta testato gli effetti della vitamina in un modello animale di SMP. Il trattamento giornaliero con alte dosi di biotina (50mg/kg, equivalente della dose di 300 mg utilizzata nei pazienti) non ha mostrato nessun tipo di rallentamento nella progressione della malattia. Infine, nel tentativo di comprendere se un deficit mitocondriale preesistente a livello del SNC possa predisporre a una

malattia più severa, abbiamo immunizzato con MOG₃₅₋₅₅ topi Ndufs4^{+/-} che presentano una mutazione del complesso I mitocondriale. La stessa progressione della malattia è stata osservata negli Ndufs4^{+/-} rispetto ai controlli con lo stesso background C57Bl6, suggerendo che questa mutazione clinicamente silente non predispone a uno sviluppo più severo della malattia.

CONCLUSIONI

Nel complesso questo progetto ha permesso di evidenziare che il modello di ESA nei topi NOD riassume molte caratteristiche che si riscontrano nei pazienti con SMP quali progressivo aumento della disabilità, diffusa neurodegenerazione, inefficacia dei cortisonici, multiple disfunzioni mitocondriali. Lo studio rafforza inoltre l'ipotesi che i mitocondri possano essere un potenziale target terapeutico in pazienti con SMP. Pertanto, stiamo testando in topi NOD con ESA progressiva altri farmaci che potenziano le funzioni mitocondriali, tra cui MitoQ, composti benzotiazolici e edaravone, al fine di identificare farmaci con un reale potenziale di trasferibilità clinica.

Mitochondrial impairment in models of progressive multiple sclerosis and effects of mitochondria boosting drugs

INTRODUCTION AND AIMS

Over a dozen anti-inflammatory therapies approved for RRMS have not demonstrated benefit in progressive MS. Even the positive results recently obtained in clinical trials with siponimod and ocrelizumab in patients presenting PPMS are quantitatively limited, and might be restricted to a specific subgroup of MS patients with ongoing CNS inflammatory activity. The unknown pathophysiology of progressive MS limits the identification of treatments for progressive MS. Mitochondrial dysfunction has been detected in the grey matter of patients affected by MS. The progressive exhaustion of the mitochondrial capacity to provide a sufficient energetic support for neuronal activity, was proposed as one of the key events in the pathogenesis of axonal degeneration. The present research proposal is intended to further our understanding of the pathogenetic role of mitochondrial derangements during MS progression, and the therapeutic relevance of mitochondria boosting drugs to treatment of progressive MS.

RESULTS

Although NOD mice with EAE are a relevant model of PMS, information regarding several parameters of disease evolution is lacking. We found that NOD mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ displayed a primary progressive pattern of encephalomyelitis. We evaluated neuroimmune infiltrates in NOD mice at different stages of neurological impairment and we found that T, but not B, cell spinal cord infiltrates linearly increase with disease progression. According to progressive neurological worsening, spinal cord myelin loss as well as axonal degeneration increased during disease progression. Importantly, we found a similar temporal and locoregional pattern of demyelination and neurodegeneration, suggesting that the latter rapidly occurs upon or even precedes loss of oligodendrocytes. In keeping with the inability of immune-suppressing drugs to counteract disease progression in PMS patients, we found that treatment with dexamethasone did not alter disease progression in NOD mice although neuroinflammatory infiltrates

were significantly reduced in spinal cords of dexamethasone-treated animals. We found that mitochondrial DNA copy number, a prototypical index of mitochondrial functioning, is already reduced when CNS immune infiltrates are minimal and neurodegeneration not detectable. This suggests that neurodegeneration originates from primary dysfunctional homeostasis within neural cells and is not a consequence of the prolonged neuroinflammatory response. We also found a decrease of mitochondrial cristae area, as well as reduced transcripts for respiratory complex subunits in the spinal cord of NOD mice, suggesting an impairment in mitochondrial energy production. Additionally, in the spinal cord of NOD mice we found reduced levels of PGC1 α , a key protein regulating mitochondrial biogenesis. We therefore studied the effects on disease evolution of the antidyslipidemic drug bezafibrate, a potent inducer of the PPAR-PGC1 α axis and promoter of mitochondrial biogenesis. Unfortunately, daily treatment with bezafibrate (100mg/kg) did not affect disease progression in NOD mice, despite restoring PGC1 α levels and the mitochondrial cristae area in the spinal cord. Remarkably, for the first time we tested the effects of biotin in a PMS animal model, in light of its current testing in patients with progressive MS. We found that at the daily dose of 50 mg/kg (con-

sistent with that adopted in PMS patients) biotin did not affect disability progression in EAE mice. Finally, in order to understand whether preexisting mitochondrial dysfunction can prime the CNS to MS/EAE, we evaluated whether mice bearing a single copy of the Complex I respiratory subunit Ndufs4 (Ndufs4+/-) are sensitized to EAE. We found the same kinetics of disease progression in Ndufs4 +/- compared to C57Bl background, suggesting that clinically silent mitochondrial dysfunction does not predispose to EAE.

CONCLUSIONS

The present study furthers our understanding of EAE in NOD mice and provides several lines of evidence that this disease model recapitulates PMS. Indeed, progressive accumulation of disability, substantial neurodegeneration, insensitivity to corticosteroids and mitochondrial dysfunction are typical features of PMS patients. Our study also confirmed an early mitochondrial dysfunction during EAE progression, thereby corroborating the hypothesis that mitochondria represent a relevant therapeutic target in PMS therapy. Experiments aimed at identifying the therapeutic potential of mitochondria boosting drugs such as MitoQ, benzothiazole analogues and edaravone are currently undertaken in PEAE NOD mice.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Buonvicino D, Felici R, Ranieri G, Caramelli R, Lapucci A, Cavone L, Muzzi M, Di Pietro L, Bernardini C, Zwergel C, Valente S, Mai A, Chiarugi A. Effects of Class II-Selective Histone Deacetylase Inhibitor on Neuromuscular Function and Disease Progression in SOD1-ALS Mice. *Neuroscience* 2018. 379:228-238

Buonvicino D, Mazzola F, Zamporlini F, Resta F, Ranieri G, Camaioni E, Muzzi M, Zecchi R, Pieraccini G, Dölle C, Calamante M, Bartolucci G, Ziegler M, Stecca B, Raffaelli N, Chiarugi A. Identification of the Nicotinamide Salvage Pathway as a New Toxication Route for Antimetabolites. *Cell Chem Biol* 2018.4:471-48

Buonvicino D, Urru M, Muzzi M, Ranieri G, Luceri C, Oteri C, Lapucci A, Chiarugi A. Trigeminal ganglion transcriptome analysis in 2 rat models of medication-overuse headache reveals coherent and widespread induction of pronociceptive gene expression patterns. *Pain*. 2018. 10:1980-1988

Muzzi M, Buonvicino D, Urru M, Tofani L, Chiarugi A. Repurposing of dexpropamipexole to treatment of neonatal hypoxic/ischemic encephalopathy. *Neurosci Lett* 2018. 687:234-240

Coppi E, Lana D, Cherchi F, Fusco I, Buonvicino D, Urru M, Ranieri G, Muzzi M, Iovino L, Giovannini MG, Pugliese AM, Chiarugi A. Dexpropamipexole enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in the rat. *Neuropharmacology* 2018. 18:30748-2

Buonvicino D, Ranieri G, Pratesi S, Guasti D, Chiarugi A. Effects of the bioenergetic boosting drugs bezafibrate and biotin in a mouse model of primary progressive multiple sclerosis. *Submitted*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 2 anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di € 86.500

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 2 years (extended by 1 year) and the amount of € 86,500

Luca D. D'Andrea

Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Rossella Di Stasi, Lucia De Rosa

Nuove molecole sintetiche che inducono la sopravvivenza degli oligodendrociti attivando i recettori Axl

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurodegenerativa demielinizzante, caratterizzata dallo sfaldamento della guaina di mielina che riveste i neuroni del sistema nervoso centrale (SNC), generando delle caratteristiche lesioni. Una classe di cellule che compone la guaina mielinica è rappresentata dagli oligodendrociti (OD). È stato osservato che, in corrispondenza di lesioni di nuova formazione in pazienti con SM, gli OD vanno incontro a morte cellulare e tale fenomeno prelude la comparsa di ampie regioni di demielinizzazione. Riuscire a contrastare tale fenomeno può risultare una valida strategia terapeutica per prevenire o fronteggiare la degenerazione della guaina mielinica che si verifica a livello delle cellule del SNC in pazienti con SM. Il recettore Axl è una proteina espressa sulla membrana degli OD ed è direttamente coinvolto nel meccanismo di mielinizzazione neuronale in quanto la sua attivazione mediante dimerizzazione del recettore induce una risposta intracellulare che stimola la sopravvivenza degli OD. Pertanto, nuovi farmaci in grado di indurre la dimerizzazione e, dunque, l'attivazione del recettore Axl possono favorire la preservazione dell'integrità della guaina delle cellule nervose nonché la formazione di nuova mielina in pazienti con SM. L'obiettivo di questo progetto pilota è quello di sviluppare molecole capaci di legare selettivamente il recettore Axl inducendone la dimerizzazione e l'attivazione. Per sviluppare tali molecole, è stato adottato un approccio di *drug-discovery* innovativo e dal grande potenziale, ovvero il "*mirror-image phage display library screening*". Tale metodologia consente di selezionare molecole di natura peptidica in grado di riconoscere selettivamente una proteina bersaglio, in questo caso il recettore Axl, e dotate di un profilo farmacologico superiore perché metabolicamente molto stabili.

RISULTATI

La tecnica del *mirror-image phage display* richiede la preparazione della proteina bersaglio, da adoperare come esca in esperimenti di *screening* di collezioni fagiche, nella sua conformazione enantiomerica D, ovvero nella sua conformazione speculare a quella naturale. Tali proteine non possono essere ottenute *per via* ricombinante ma possono essere preparate esclusivamente *per via* chimica, adoperando i cosiddetti approcci di *chemical ligation*. Obiettivo principalmente perseguito nell'ambito del progetto è dunque stata la messa a punto di un valido protocollo di sintesi chimica utile per la preparazione di uno dei domini extracellulari del recettore Axl in conformazione enantiomerica D.

In particolare, è stato sintetizzato l'enantiomero D del dominio Ig2 del recettore (D-Axl-2, 88 amminoacidi), un dominio direttamente coinvolto nell'attivazione di Axl perché in grado di mediare il riconoscimento molecolare del suo ligando naturale, la proteina Gas6. D-Axl-2, una volta ottenuta per via sintetica, è stata sottoposta ad una accurata caratterizzazione biochimica e adoperata come esca in esperimenti di *mirror-image phage display library screening*. Tali esperimenti hanno portato alla selezione di una serie di molecole peptidiche, metabolicamente stabili, che sono state preparate mediante sintesi chimica in fase solida. Sono attualmente in corso esperimenti *in vitro* volti a confermare la capacità di tali molecole di legare il recettore Axl e a determinare la loro affinità per esso. Le molecole dotate della migliore affinità e specificità di legame saranno coniugate ad unità di dimerizzazione per sviluppare molecole in grado di attivare il recettore Axl.

CONCLUSIONI

L'obiettivo a lungo termine del progetto è quello di fornire una nuova opportunità terapeutica per il trat-

tamento farmacologico di pazienti con SM, sviluppata andando a bersagliare un nuovo sistema molecolare coinvolto nella patogenesi della SM e non ancora esplorato, ovvero quello rappresentato dal recettore Axl e il suo ligando Gas6. Trattandosi di un progetto pilota, il lavoro svolto ha consentito di gettare le basi per raggiungere tale obiettivo, consentendo di met-

tere a punto un utile protocollo biochimico per la selezione di molecole metabolicamente stabili in grado di legare il recettore Axl. Tali molecole rappresentano il punto di partenza per lo sviluppo di attivatori del recettore Axl, i quali verranno saggiati per la loro capacità di ostacolare la degenerazione della guaina mielinica riducendo i sintomi della malattia.

Novel synthetic molecules promoting oligodendrocytes survival in multiple sclerosis lesions by activation of Axl receptors

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating, neurodegenerative disease causing the progressive loss of the myelin sheath which covers neurons of the central nervous system and leading to the formation of characteristic lesions. Oligodendrocytes (ODs) are a class of glial cells composing the neuronal myelin. It was found that, prior to the onset of extensive demyelination, ODs death could be detected in newly-forming lesions from MS patients. This evidence suggests that ODs death plays an important role in the initial development of a MS lesion and, thus, ODs survival could be a potential strategy for preventing or counteracting demyelination in MS patients. Axl receptor is a protein expressed on the surface of ODs and is directly involved in myelin formation, as its activation through receptor dimerization leads to ODs survival. Thus, new drugs able to induce Axl receptor activation may contribute to preserve myelin integrity and induce remyelination of the lesions in MS patients. The aim of this pilot project is to develop novel molecules able to selectively bind Axl receptor and induce its dimerization and activation. An innovative approach in drug discovery, termed "mirror-image phage display library screening", was used to identify new peptide molecules targeting Axl receptor. Such approach allows to select peptide molecules endowed of an improved pharmacological profile due to their high metabolic stability.

RESULTS

The mirror-image phage display library screening methodology requires the preparation of the protein target, to be used as a bait in the phage libraries screening experiments, in its D enantiomeric conformation, that is the mirror-image conformation of the

natural protein target. A mirror protein cannot be obtained by using recombinant DNA-technology but can only be prepared by chemical route, using chemical ligation approaches. Thus, the major challenge of this project was to set up a synthetic procedure for the preparation of the mirror-image form of an extracellular domain of Axl receptor. To this aim, we developed a successful protocol for the preparation of the Ig2 domain of Axl (D-Axl-2, 88 amino acids) in its D-enantiomeric form. Such domain is directly involved in Axl activation as it mediates the binding of the natural receptor ligand, i.e. the protein Gas6. Once chemically synthesized, D-Axl-2 was carefully biochemically characterized and used to perform mirror-image phage display library screening experiments. Such experiments led to the selection of a series of metabolically stable peptide molecules able to target Axl receptor. The selected metabolically stable peptide molecules were chemically synthesized on solid phase and ongoing studies are now aimed at evaluating their specificity and affinity for Axl receptor. The best peptide molecule, able to selectively recognize Axl with high affinity, will be conjugated to a dimerization unit in order to obtain a molecule able to dimerize and thus activate Axl receptor.

CONCLUSIONS

The long-term aim of this project is to provide the community of MS patients with a novel pharmacological therapy developed by targeting Axl receptor/Gas6, a new and not yet explored molecular system involved in MS pathogenesis. The research activity carried out within this pilot project paved the way to the proposed long-term aim, allowing to set up a successful biochemical procedure for the selection of metabolically stable peptide binders of Axl receptor. Such molecules represent the starting point for the development of re-

ceptor activating molecules, which will potentially be able to induce remyelination of damaged neurons re-

ducing the MS lesions and ameliorating the symptoms of the disease.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

De Rosa L, Di Stasi R, D'Andrea LD. Total chemical synthesis by native chemical ligation of the all-D immunoglobulin-like domain 2 of Axl. *Tetrahedron*. 2019 75:894-905. doi: 10.1016/j.tet.2019.01.005

De Rosa L, Di Stasi R, D'Andrea LD. Chemical Synthesis of a mirror image protein by native chemical ligation. *Convegno Nazionale della Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici*. Caserta, 26-28 Settembre 2018

De Rosa L, Di Stasi R, D'Andrea LD. Chemical Synthesis of a mirror image protein by native chemical ligation. *XXXVIII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana*. Milano, 9-13 Settembre 2018

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno (prorogato di 4 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year (extended by 4 months) and the amount of € 30,000

Cristina Rivellini

Dipartimento di Neuroscienze, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE),
Unità Rigenerazione Neuromuscolare, Ospedale San Raffaele, Milano

MENTORE/MENTOR:

Stefano Previtali

Ruolo di Jab1 nella patogenesi della sclerosi multipla progressiva

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata da un danno progressivo della guaina mielinica. Nelle forme progressive di SM è presente neurodegenerazione primaria o secondaria che correla con la disabilità del paziente. Mentre nelle forme classiche la demielinizzazione è una conseguenza dell'infiammazione, nelle forme progressive la neurodegenerazione spesso precede il processo infiammatorio. Tessuti di pazienti SM progressiva (tipo III e IV) infatti mostrano distrofia/degenerazione degli oligodendrociti (OL), e solo successivamente una risposta infiammatoria.

In passato abbiamo descritto il ruolo della molecola Jab1 nella mielinizzazione del sistema nervoso periferico. Jab1 è una molecola nucleare che agisce a livello trascrizionale e post-trascrizionale regolando diversi aspetti del differenziamento e della sopravvivenza cellulare. Inoltre abbiamo visto che Jab1 è espresso negli OL, regolato nel decorso dell'encefalite autoimmune sperimentale (ESA) ed è espresso in biopsie di pazienti con SM.

In questo progetto di ricerca abbiamo analizzato topi mutanti in cui abbiamo deletato Jab1 negli OL. Questi topi mostrano una demielinizzazione progressiva del SNC, degenerazione assonale, associato ad infiltrato infiammatorio. Abbiamo dimostrato che questo processo neurodegenerativo è la conseguenza di un danno del DNA negli OL e della conseguente attivazione di un *pathway* di senescenza che innesca neurodegenerazione e infiammazione.

Obiettivi del progetto sono 1) valutare il *pathway* di senescenza nel topo mutante; 2) analizzare se il trattamento di topi mutanti con minociclina abbia un effetto sulla neurodegenerazione; 3) valutare il ruolo di Jab1 nella rigenerazione nel modello animale di ESA.

RISULTATI

Per analizzare il ruolo di Jab1 nel SNC abbiamo generato topi con la delezione di Jab1 specifica (condizionale) negli OL. Questi topi si sviluppano normalmente fino a venti giorni dopo la nascita e successivamente mostrano una progressiva demielinizzazione e degenerazione assonale del SNC con attivazione di microglia/macrofagi, e solo successivamente presenza di linfociti T. Tuttavia, gli OL mutanti differenziano, proliferano e sopravvivono. I nostri risultati suggeriscono che questo fenotipo è la conseguenza del progressivo danno al DNA negli OL mutati e dell'attivazione di *pathway* di senescenza. Gli OL mutanti, infatti, mostrano *marker* di senescenza quali l'attività della β -Galattosidasi, stress ossidativo e l'aumento dei livelli proteici e di mRNA di inibitori del ciclo cellulare, quali p16^{INK4} e p21^{Cip1}.

Per analizzare il ruolo dell'infiammazione e il suo contributo nella demielinizzazione abbiamo analizzato gli effetti del trattamento con minociclina nei topi mutanti. La minociclina è stato visto attenuare i sintomi nel modello animale di ESA per mancato reclutamento di monociti dal circolo periferico. Tuttavia nel topo Jab1 mutante dopo trattamento con minociclina non sono stati osservati miglioramenti morfologici del SNC e dell'infiammazione. Questi dati suggeriscono che l'infiammazione nel SNC dei topi mutanti è primariamente conseguenza dell'attivazione della microglia.

Infine, per analizzare il ruolo di Jab1 nella rimielinizzazione abbiamo utilizzato animali condizionali inducibili, nei quali viene eliminato Jab1 nella linea oligodendrocitaria nei topi adulti dopo somministrazione di tamoxifene. Questi animali mostrano un normale morfologia del SNC e nessun segno di infiammazione. Abbiamo quindi indotto l'ESA nei topi mutanti inducibili, dopo 15 giorni dall'eliminazione di

Jab1. Nessun differenza significativa è stata osservata dopo 40 giorni dall'induzione della malattia tra topi mutanti e controlli, forse per la gravità di malattia. Per valutare meglio se vi fossero problemi di rigenerazione abbiamo indotto demielinizzazione mediante dieta con cuprizone. Dopo una settimana di sospensione della dieta, gli animali di controllo presentavano una significativa rimielinizzazione, che non era presente nei topi Jab1 mutati. Questo dimostra che Jab1 svolge un ruolo nei processi rigenerativi del SNC dopo un danno.

Al posto dello studio di proteomica, che presentava problemi tecnici di esecuzione, abbiamo eseguito uno studio di trascrittomica che ha mostrato la disregolazione di numerosi *pathway* e molecole, che sono in corso di conferma ed analisi.

CONCLUSIONI

Nell'insieme i nostri risultati mostrano che l'assenza di Jab1 negli OL causa spontaneo danno al DNA (e difetti nella riparazione del danno) con la conseguente attivazione di meccanismi di senescenza negli OL, causando demielinizzazione, degenerazione assonale e infiammazione prevalentemente microgliale. La degenerazione neuronale è conseguenza di un danno ossidativo e porta a morte dell'animale.

Con questo progetto vogliamo quindi proporre il topo Jab1 mutante come nuovo modello animale per caratterizzare i meccanismi molecolari coinvolti nelle forme progressive di SM.

Inoltre, il topo Jab1 mutante potrebbe essere un modello animale per analizzare nuovi *target* farmacologici per prevenire e/o contrastare la progressione della demielinizzazione del SNC e la degenerazione assonale inibendo meccanismi di senescenza e lo stress ossidativo.

Role of Jab1 in the pathogenesis of progressive multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) characterized by progressive damage of the myelin sheaths. Moreover, primary or secondary neurodegeneration is also present and correlates with patient disability in progressive forms of MS. Although demyelination is usually a consequence of the inflammatory damage in MS, some reports describe neurodegeneration preceding autoimmune inflammation in progressive MS, and pathological findings in MS subtypes III and IV show primary oligodendrocyte (OL) dystrophy/degeneration rather than inflammation.

In previous studies, we identified Jab1 (Jun activated binding protein 1) as a molecule involved in PNS myelination and axonal degeneration. Jab1 is a nuclear molecule acting at transcriptional and post-transcriptional level, regulating several aspects of the cell differentiation and survival. Interestingly, we observed that Jab1 is expressed in OLs, modulated during experimental autoimmune encephalitis (EAE) and in human MS plaques.

In this project, we generated mice with selective deletion of Jab1 in OLs (by CNP-cre transgene). These

mice show progressive demyelination of the CNS, axonal degeneration with associated inflammatory infiltration. Our findings suggest that this is the consequence of progressive DNA damage in OLs and subsequent activation of the senescence molecular pathway, which promotes neurodegeneration and inflammation.

In this proposal we plan 1) to evaluate the senescence pathway in Jab1 null mice; 2) to investigate whether attenuation of inflammation has any effect on neurodegeneration of Jab1 null mice; 3) to evaluate the role of Jab1 in secondary axonal degeneration in EAE model.

RESULTS

In this research project we investigated the role of Jab1 in CNS by generating conditional mutant mice with the CNP-cre/LoxP technology, which allows the specific deletion of Jab1 in the OL lineage. Mice with conditional inactivation of Jab1 in OLs develop normally until post natal day twenty. Subsequently, mice present progressive CNS demyelination and axonal degeneration associated with inflammatory infiltration mainly composed by microglia/macrophages, and later T lymphocytes. Surprisingly, mutant OLs

normally differentiate, proliferate and survive. Our findings also showed that this phenotype is the consequence of progressive DNA damage in OLs and consequent activation of the senescence molecular pathway. We characterized senescence in mutant OLs, which showed β -Galactosidase activity, oxidative stress production and increasing levels of the cell cycle inhibitors p16^{INK4} and p21^{Cip1}.

To assess the role of inflammation in demyelination and neurodegeneration, we treated mice with minocycline. Minocycline is known to attenuate CNS inflammation in EAE by inhibiting peripheral monocyte recruitment. Minocycline treatment of *Jab1* null mice did not ameliorate neither demyelination and neurodegeneration nor inflammation. These data suggest that CNS inflammation in *Jab1* null mice is consequence of pure microglia activation.

Finally, to assess the role of *Jab1* in remyelination we used inducible conditional mutant mice PLP^{cre}^{ERT2} *Jab1*^{fl/fl}, in which we deleted *Jab1* in the OL lineage in adult mice after tamoxifen administration. Inducible *Jab1* null mice display normal CNS morphology. To study remyelination we induced EAE with MOG₃₅₋₅₅ in 2-month-old *Jab1* inducible mutant mice, 15 days after *Jab1* deletion. The analysis of remyelination 40 days after EAE induction did not show significant differences between *Jab1* null and control mice, probably due to the severity of the damage. To better evaluate the role of *Jab1* in remyelination we induced

demyelination in inducible *Jab1* null mice by the cuprizone diet. One week after cuprizone interruption we observed remyelination in control mice whereas mutant mice showed significant demyelination. This data suggest a role of *Jab1* in CNS remyelination after damage.

Instead of proteomic analysis, which presented some technical problems, we performed transcriptomic analysis in *Jab1* null as compared to control mice. This study revealed the dysregulation of several pathways and molecules, which are under investigation.

CONCLUSIONS

Our results show that loss of *Jab1* in OLs induces spontaneous DNA damage with subsequent activation of the senescence pathway, which is responsible for CNS demyelination, axonal degeneration and inflammation. CNS inflammation is predominantly due to activated microglia, whereas neuronal degeneration is a consequence of the oxidative stress and causes mouse death.

With this study, we propose *Jab1* null mice as a new animal model to characterize pathogenic mechanisms involved in progressive form of MS.

These mice may also offer a new animal model to find new druggable targets to prevent and/or counteract progressive CNS demyelination and axonal degeneration by inhibiting senescence pathways and oxidative stress.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Rivellini C, Porrello E, Dina G, Nave KA, Lappe-Siefke C, Pardi R, Quattrini A, Previtali SC 2015 Role of Jun activating binding protein 1 (*Jab1*) in Central Nervous System (CNS) myelination. XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Bilbao, 15-18 July 2015

Rivellini C, Porrello E, Dina G, Anna Maria Finardi, Roberto Furlan, Bernd Kieseier, Nave KA, Lappe-Siefke C, Pardi R, Quattrini A, Previtali SC Role of Jun activating binding protein 1 (*Jab1*) in Central Nervous System (CNS) myelination. San Raffaele Scientific Retreat, Baveno, Italy, 18-20 March 2016

Previtali SC, Rivellini C, Porrello E, Dina G, Anna Maria Finardi, Roberto Furlan, Bernd Kieseier, Nave KA, Lappe-Siefke C, Pardi R, Quattrini A, Role of Jun activating binding protein 1 (*Jab1*) in Central Nervous System (CNS) myelination. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 25-27 May 2016

Rivellini C, Porrello E, Dina G, Finardi A, Nave KA, Suter U, Pardi R, Furlan R, Quattrini A, Previtali SC. Role of *Jab1* in the pathogenesis of progressive MS. AISM Annual Scientific Congress, Rome, Italy, 29-31 May 2017

Rivellini C, Porrello E, Dina G, Nave KA, Lappe-Siefke C, Suter U, Pardi R, Quattrini A, Previtali SC Role of Jun activating binding protein 1 (*Jab1*) in Central Nervous System (CNS) myelination. European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Edinburgh, 8-11 July 2017

Rivellini C, Porrello E, Dina G, Finardi A, Chaabane L, Suter U, Pardi R, Furlan R, Quattrini A, Previtali SC. Role of *Jab1* in the pathogenesis of progressive MS. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 28-30 May 2018

Rivellini C, Porrello E, Dina G, Leocani L, Chaabane L, Vezzoli A, Mrakic-Sposta S, Nave K, Suter U, Pardi R, Quattrini A, Previtali SC. Role of *Jab1* and senescence in the pathogenesis of progressive MS in a mouse model. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, Roma, 28-30 May 2018

Borsa di Studio finanziata con il Bando FISM 2015 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 50.000 €

Research Fellowship funded by FISM Grant 2015 for the period of 2 years and the amount of € 50,000

Maira Gironi

OSR, Unità Neuroimmunologia Clinica, INSPE, Divisione di Neuroscienze, Milano
Synlab-Cam, Monza

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Roberto Furlan, Annamaria Finardi, Martina Diceglie, Tommaso Croese, Giancarlo Comi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Ingrid Yao Mattisson, Gunilla Nordin Fredrikson, Jan Nilsson,
Experim Cardiovasc Research Unit Lund University, Sweden

Anticorpi anti fosfolipidi ossidati: una potenziale risorsa naturale protettiva per la sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Lo stress ossidativo ed il conseguente danno macromolecolare rientrano tra i fattori cruciali nella neurodegenerazione presente nella sclerosi multipla (SM), spesso fin dall'esordio. Le lipoproteine ossidate (OxLDL) sono il prodotto più comune della perossidazione lipidica associata allo stress ossidativo. Le OxLDL sono fattori chemiotattici per cellule infiammatorie, inducono l'espressione di molecole di adesione che a loro volta permettono il processo di emigrazione di queste cellule infiammatorie dal sangue all'organo target. I dati di letteratura ne dimostrano un coinvolgimento eziopatogenetico in malattie come l'Artrite Reumatoide Giovanile, il Lupus, l'Aterosclerosi. In queste due ultime patologie, inoltre, si è descritta una associazione inversa tra livelli di Anticorpi anti-oxLDL e disabilità.

Diversi sono stati i tentativi di vaccinare con differenti epitopi delle LDL o di trasferire passivamente anticorpi specifici anti LDL per trattare l'aterosclerosi. I dati preclinici sull'animale sembrano essere molto promettenti, mentre i trials clinici sull'uomo, di cui alcuni in corso, pur confermando la validità di questa strategia fanno emergere alcune controversie.

In un nostro precedente lavoro abbiamo trovato un alto titolo di ANTICORPI anti-oxLDL in forme di sclerosi multipla ad andamento favorevole.

RISULTATI

Per testare l'ipotesi di una possibile protezione esercitata da questi anticorpi verso la malattia abbiamo condotto uno studio preclinico preliminare.

In questo studio sono stati vaccinati dei topi C57BL6 con LDL ossidate. Come gruppi controllo sono stati studiati animali immunizzati solo con PBS, oppure con PBS+CFA. I diversi trattamenti sono stati ripetuti sia prima della comparsa di malattia (preventivo) sia successivamente (terapeutico). Il trattamento preventivo con OxLDL ha dimostrato di essere altamente protettivo verso la EAE: 9 topi su 10 immunizzati con MOG non hanno presentato alcun segno di malattia ($p=0.0134$ vs CFA). Il trattamento terapeutico con OxLDL ha mitigato la severità di malattia, evidenziando una differenza verso CFA e PBS ma non statisticamente significativa. I dati di protezione clinica dall'EAE sono risultati coerenti con quelli relativi agli infiltrati infiammatori, alla demielinizzazione ed alla perdita assonale. Tutti questi parametri sono risultati significativamente ridotti nei topi vaccinati attivamente in preventivo ($p<0.05$), ridotti ma non significativamente nei topi trattati con protocollo terapeutico. Nei topi tratti sia in preventivo che in terapeutico con oxLDL si è riscontrata la presenza di anticorpi IgG anti OxLDL. Tali anticorpi risultavano ancora presenti nel siero dell'animale dopo 48 giorni dalla vaccinazione specifica.

CONCLUSIONI

I risultati non così brillanti emersi dal protocollo terapeutico della vaccinazione possono essere spiegati da differenti ipotesi. Il nostro è stato un trial pilota, il primo in assoluto ad esplorare nel modello animale di SM la possibile protezione indotta dalla vaccinazione con fosfolipidi ossidati. Gli obiettivi che ci eravamo

posti e le risorse disponibili non hanno consentito di utilizzare dosaggi più elevati sia di anticorpo che di antigene, né di ristimolare gli animali. Adottando un protocollo più completo, potrebbero emergere dei risultati di maggiore impatto clinico.

Sembra quindi doveroso proseguire questa linea di ricerca esplorando le possibilità terapeutiche con un

protocollo per esempio più simile a quello utilizzato per la vaccinazione con OxLDL nell'aterosclerosi.

Successivi studi potrebbero permettere di capire quanto precoce è la risposta protettiva, quanto si mantiene nel tempo, come viene influenzato il relapse rate e la severità della malattia.

Anti oxidized-phospholipids Antibodies as inhibitors of neuroinflammation: exploiting a natural immune protective tool to fight multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Oxidative stress is unequivocally involved in Multiple Sclerosis pathogenesis. As well, lipids contribute to this disease regardless of their oxidation state.

Oxidized-Low-Density-Lipoprotein (oxLDL) is the major product of lipid peroxidation and, in turn, by activation of Endoplasmic Reticulum stress, enhances free radical production.

OxLDL plays pleiotropic functions ranging from mitochondria-mediated apoptosis, chemotaxis of inflammatory cells and release of pro-inflammatory molecules but also dampening of inflammatory innate immune response and tolerance induction. Several data show that oxLDL are implicated in the pathophysiology of different immune-mediated diseases such as early rheumatoid arthritis (ERA) atherosclerosis (AT) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Moreover, in the last two conditions, antibodies against oxLDL (anti-oxLDL Abs) have been associated to a protective role. In Multiple Sclerosis (MS) oxLDL could play pathogenic role acting either directly or through immune-mediated mechanism.

We previously shown that anti-Oxidized-Low-Density-Lipoprotein (oxLDL) antibodies(abs) were elevated in "mild" course of disease and inversely correlated with a pro-inflammatory phenotype of cells.

RESULTS

In order to verify the hypothesis that synthetic Oxidized LDL vaccination can prevent EAE (preventive protocol) or ameliorate established disease (therapeutic protocol), we run a preclinical study. Animals affected with EAE, a murine model of MS, were vaccinated with commercial murine oxLDL. Clinical score, histological analyses, oxLDL abs titers, mRNA levels of inflammatory/ antiinflammatory and apoptotic markers were recorded in oxLDL vaccinated

mice as well as in CFA treated and controls animals. Preventive oxLDL vaccination protects mice from EAE: cumulative, maximum and survival score were statistically different from other groups. Mice therapeutically vaccinated display a milder disease course, although the difference is not statistically significant vs CFA mice. Histological findings mirror clinical ones. In OxLDL treated mice, infiltration, demyelination and axonal loss were reduced. OxLDL IgG were increased in both preventively and therapeutically oxLDL vaccinated animals. These data suggest that the presence of anti-oxLDL Abs at the time of EAE induction plays a beneficial effect. This effect might be achieved by oxLDL reduction, immune cell trafficking inhibition and/or myelin debris removal. Alternatively, the presence of oxLDL itself could promote immune regulatory mechanism and dampen inflammatory features of innate immune cells as previously shown. As far as regard brain tissue, markers of Th1, Th17, M1, M2, Treg activation (IL1B,GM-CSF, IFNg, IL17, IL-6, iNOS, TNFa Ym1, Arginase, CD206 and FOXP3 respectively) were not significantly changed by different treatments. A global decrease of the same markers even if not statistically significant, was recorded in spinal tissue of animals treated with OxLDL. Remarkably we measured a statistically significant increase of AFT6 in animals treated with OxLDL. AFT6 is a booster of a protective response, aimed at maintaining protein homeostasis and cell survival.

This finding, together with the increase of OxLDL IgG could be the mechanisms underpinning the favourable clinical results.

CONCLUSIONS

Ours pilot study is the first trial exploring in a mouse model of MS the effect of oxidized phospholipids vaccination.

We found a protection for preventive vaccination and encouraging results from therapeutic protocol. What is the optimal dosage? How early start the protection achieved? how long does it last?

Some crucial questions remains unanswered. Overall we might speculate that this alternative treatment could dig up new ways to provide neuro-protection in MS.

Alessia Capotondo

Unità di Neuroimmunologia, INSPE, Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Elena Brambilla Tiziano Di Tomaso, Andrea Bergamaschi, Luca Muzio, Gianvito Martino

Ingegnerizzare cellule microgliali per il rilascio di molecole terapeutiche nel SNC di topi con ESA

PREMESSE E OBIETTIVI

La microglia cellula immunitaria del sistema nervoso centrale (SNC), esercita sia ruoli benefici che deleteri in diverse malattie neurologiche. La sua sostituzione, dopo trapianto, si è rivelata una potenziale strategia terapeutica in studi pre-clinici e clinici in pazienti affetti da disordini della mielina. Abbiamo infatti dimostrato che la microglia può essere efficacemente sostituita in seguito a Trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) utilizzando il busulfano (BU) come regime di condizionamento. Inoltre, il TCSE effettuato per via intracerebroventricolare (ICV) promuove una sostituzione di microglia più robusta e rapida rispetto al trapianto sistemico.

In questo progetto, abbiamo valutato la possibilità di portare, attraverso cellule staminali ematopoietiche modificate, molecole terapeutiche immunomodulanti e pro-rimielinizzanti nel SNC di topi con encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), il modello animale della sclerosi multipla (SM). Tra quelle anti-infiammatorie abbiamo testato l'interleuchina (IL)-4, la cui efficacia è già stata dimostrata nell'ESA (7-8). Abbiamo scelto la Semaforina-3F come molecola pro-rimielinizzante, che se super-espressa nel SNC promuove il reclutamento dei precursori oligodendrocitici e la rimielinizzazione.

RISULTATI

Di seguito sono riportati i risultati dei relativi obiettivi:

Obiettivo 1: Validazione della secrezione di IL-4 and Semaforina3f da microglia primaria.

Abbiamo messo a punto il protocollo per esprimere i transgeni in modo regolato, usando il sistema Cre/LoxP. La MG è stata isolata da topi CX3CR1Cre-ERT2-EYFP e trasdotte con vettori lentivirali (LVs) codificanti i geni IL-4 or Semaforina-3F sotto il con-

trollo del sistema Cre/loxp. Dopo trattamento con 4-hydroxy (4-OH) tamoxifen (TAM), è stata confermata l'efficacia di ricombinazione e di espressione del transgene misurando il suo livello nel terreno di coltura. Il dato è stato confermato anche nelle CSE CX3CR1-CreERT2-EYFP.

Purtroppo, non siamo riusciti a dosare la Semaforina3f, per cui abbiamo deciso di testare un'altra molecola rimielinizzante, l'Attivina-A che promuove il differenziamento di precursori oligodendrocitici durante la demielinizzazione.

Obiettivo 2: Ingegnerizzare CSE per esprimere IL-4 e/o la Semaforina 3f nel cervello di topi non trattati o immunizzati con ESA in seguito a trapianto e ricostituzione della MG.

Abbiamo effettuato il TX ICV di CSE CX3CR1Cre-ERT2-EYFP in topi trattati con BU. Abbiamo confermato la sostituzione della MG in SNC, la ricombinazione e l'espressione di IL-4 dopo trattamento con TAM. Sessanta giorni dopo il TX ICV, abbiamo indotto l'ESA. Purtroppo, l'80% dei topi trapiantati, trattati o no con TAM, sono morti 12 giorni dopo l'immunizzazione. Abbiamo deciso di utilizzare la formulazione clinica del BU, il Busilvex®. La mortalità è stata ridotta, ma ancora presente, forse a causa della stagione in cui è stato effettuata tutta la procedura. Abbiamo potuto analizzare solo l'efficacia del trattamento terapeutico, non preventivo, confermando che i topi trapiantati sono più soggetti a morte dopo ESA, ma i topi in cui viene indotta l'espressione di IL-4 hanno un grado di malattia inferiore rispetto ai non trattati. Abbiamo confermato che IL-4 fosse espressa e funzionante tramite marcatura delle sezioni di tessuto per la proteina STAT-6 che viene fosforilata in seguito al legame di IL-4 con il suo recettore. Inoltre, la MG sostituita è in grado di esprimere anche marcatori

anti-infiammatori come Fizz1, risposta propria delle cellule mieloidi e non della MG, in seguito ad attivazione con IL-4.

CONCLUSIONI

I dati raccolti *in vivo* suggeriscono che in situazioni patologiche, come l'ESA, la MG sostituita può esercitare le tipiche funzioni delle cellule mieloidi, con effetti deleteri sull' SNC. Dati preliminari hanno confermato infatti che in topi trapiantati ICV con CSE modificate con GFP-LV e poi immunizzati, il decorso clinico e la

patologia, valutata come numero di infiltranti e grado di demielinizzazione, sono peggiori rispetto ai topi non trapiantati. Ipotizziamo che la MG sostituita durante l'infiammazione si comporti in un modo più simile ai macrofagi, ma al contempo riesca a rispondere all' IL-4, acquisendo un profilo anti-infiammatorio. Nel prossimo progetto di ricerca vorremmo analizzare la natura e la plasticità della MG ricostituita, valutando la possibilità di indirizzarla verso il fenotipo della MG endogena, senza però perdere la plasticità propria dei macrofagi.

Engineering microglia cells for the delivery of therapeutic molecules in the CNS of EAE mice

INTRODUCTION AND AIMS

Microglia (MG), the immune cells of the central nervous system (CNS), exert both beneficial and detrimental roles in several neurological disorders. Their replacement, upon transplantation (TX), has already been proven as a potential therapeutic strategy in pre-clinical and clinical studies carried out in patients with myelin disorders. We showed that MG can be replaced upon TX of hematopoietic stem cells (HSCT) preceded by a busulfan (BU)-based conditioning regimen, allowing sustained MG replacement. Interestingly, intracerebroventricular (ICV) HSCT induced a faster and widespread MG replacement compared to systemic hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) injection. In this project, we wanted to deliver both immunomodulating and pro-remyelinating therapeutic molecules to the CNS by TX of engineered HSPCs in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of multiple sclerosis (MS). Among anti-inflammatory molecules, we tested interleukin (IL)-4, whose efficacy was previously showed. As pro-remyelinating molecules, we choose Semaphorin-3F, whose CNS overexpression was demonstrated to promote oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination.

RESULTS

The following aims were designed, whose results are here reported.

AIM1: Validation of IL-4 and Semaphorin3f secretion by primary microglia.

We setup and validated the experimental protocol to express transgenes in a regulated manner, using the

Cre/LoxP system. MG were isolated from CX3CR1CreERT2-EYFP mice and transduced with lentiviral vectors (LVs) encoding either IL-4 or Semaphorin-3F genes both under the control of the Cre/loxP system. Upon 4-hydroxy (4-OH) tamoxifen (TAM) treatment, the efficacy of both Cre-mediated recombination and gene expression were confirmed measuring the level of transgenes in culture media. We also confirmed the efficiency of the system in the liquid culture of CX3CR1-CreERT2-EYFP HSPC. Unfortunately, we were not able to detect Semaphorin3F, thus we decided to test an additional remyelinating molecule, namely Activin-A that showed an efficient differentiation of oligodendrocyte precursor in models of demyelination.

AIM2: Engineering hematopoietic stem and progenitor cells in order to express IL-4 and/or Semaphorin 3f in the mouse brain of untreated and EAE mice after transplantation and reconstitution of the endogenous microglia.

ICV TX of modified CX3CR1CreERT2-EYFP HSPC was performed in BU-treated mice. The occurrence of both MG reconstitution in CNS, Cre recombination and IL-4 expression after TAM treatment were confirmed. Sixty days after the ICV TX, we induced the EAE. Unfortunately, 80% of the ICV TX mice, treated or not with TAM, died 12 days after immunization. Thus, we decided to modify the conditioning regimen protocol using Busilvex[®] (the clinical formulation of BU). The mortality was dramatically reduced but still present (even before the immunization), possibly related to a seasonally response of mice to myeloablation and to transplant procedures. Therefore, we could test only the therapeutic approach and not

the preventing treatment. We observed that transplanted mice were more subjected to die after immunization, but TAM administration, leading to IL-4 expression, reverted this phenomenon. Indeed, the cohort of treated mice had lower disease burden than untreated controls and survived mice completely reverted the disease. We confirmed that IL-4 was expressed and functioning as assessed by labelling tissue sections for phosphorylated signal transducers and activators of transcription (STAT) 6, activated after IL-4/IL-4 receptor binding. Moreover, we reported that upon IL-4 expression MG were able to express anti-inflammatory markers as Fizz1. This observation suggested that reconstituted MG may functionally resemble to myeloid/macrophage cells which are rapidly and efficiently activated by IL-4, differently from endogenous MG.

CONCLUSIONS

All together these *in vivo* data led us to hypothesize

that in a pathological situation, as during acute EAE, the reconstituted cells could exert the typical functions of myeloid cells, leading possible detrimental effects to the CNS. By preliminary data we confirmed this hypothesis in mice ICV transplanted with GFP-LV transduced cells and immunized. By clinical and pathological analysis, we observed that ICV transplanted mice had worse outcomes when compared to un-transplanted mice and higher numbers of infiltrates and intense demyelination. Our hypothesis is that reconstituted MG can react to inflammatory cues like macrophages rather than parenchymal MG. On the other hand, they could differ in their ability to respond to IL-4 signal, acquiring an anti-inflammatory phenotype.

Investigating in deep the nature and plasticity of reconstituted MG and the possibility to educate them to become closer to the endogenous, without losing the typical plasticity of macrophages, could be the major aim of our future research project.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Capotondo A, Brambilla E, Martino G. Engineering microglia cells for the delivery of therapeutic molecules in the CNS of EAE mice. XXVI AINI Congress, 16th ESNI Course, Venezia, Giugno 26-30, 2017

Capotondo A, Brambilla E, Martino G. Engineering microglia cells for the delivery of therapeutic molecules in the CNS of EAE mice. Nature Conferences-Regeneration, Milano, Novembre 16-18, 2017

Capotondo A, Brambilla E, Di Tomaso T, Bergamaschi A, Muzio L, Martino G. Engineering microglia cells for the delivery of therapeutic molecules in the CNS of EAE mice. OSR Scientific Retreat, Baveno, Marzo 16-18, 2018

Capotondo A, Brambilla E, Di Tomaso T, Bergamaschi A, Muzio L, Martino G. Engineering microglia cells for the delivery of therapeutic molecules in the CNS of EAE mice. Oral presentation at International NI 2018, 14th International Congress of Neuroimmunology, Agosto 27-31, 2018; Brisbane, Australia

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2016 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2016 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

Egle Solito

WHRI-SMD- Queen Mary University London, UK

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Elisa Maggioli, Rodrigo Azevedo-Loiola

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Veronica De Rosa, IEOS-CNR-Napoli

Ruolo della annessina A1 nella sclerosi multipla: identificazione di un fattore endogeno che controlla la migrazione di cellule T attraverso la barriera ematoencefalica e la tolleranza immunologica

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune che colpisce il cervello e/o il midollo spinale, caratterizzata da una vasta gamma di potenziali sintomi, come problemi alla vista, problemi di movimento delle braccia o delle gambe, alterazioni degli organi di senso o disturbi dell'equilibrio. Nei pazienti con SM il sistema immunitario attacca erroneamente una parte sana del corpo, in questo caso il cervello o il midollo spinale, i loro linfociti oltrepassano la barriera del cervello, la Barriera Emato-Encefalica (BEE), e attaccano lo strato che circonda e protegge i nervi. Ciò determina un rallentamento o un'interruzione dei messaggi che viaggiano lungo i nervi. Non è chiaro cosa generi una risposta immunitaria nei confronti del self. Attualmente non esiste una cura per la SM, ma esistono diversi trattamenti che possono aiutare a controllare la patologia.

Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che una molecola endogena prodotta dal nostro organismo, chiamata Annexin A1 (ANXA1), regola la permeabilità della BEE ed impedisce il passaggio di cellule e molecole dannose nel cervello. Inoltre ANXA1 è anche una molecola anti-infiammatoria in grado di controllare l'infiammazione, che è una delle principali manifestazioni della SM. Sulla base di dati pubblicati da noi, ipotizziamo che la ridotta espressione di ANXA1 sia a livello immunologico che a livello della BEE possa contribuire all'esordio della SM o alla sua progressione. L'uso farmacologico di questa molecola potrebbe ripristinare la funzionalità della BEE riducendo l'infiammazione e consentendo al sistema immunitario di funzionare correttamente. Gli obiettivi principali di questo progetto sono stati:

- 1) Indagare le ragioni della perdita selettiva di ANXA1 nei pazienti con SM;
- 2) Valutare se ANXA1 potrebbe controllare la fun-

zione delle cellule T regolatorie (Treg), quindi la tolleranza immunitaria;

- 3) Esaminare come ANXA1 possa modulare la differenziazione e la capacità migratoria di differenti sottogruppi di cellule T.

RISULTATI

Siamo stati in grado di rispondere a tutti e tre gli obiettivi proposti, anche grazie all'estensione del finanziamento di 6 mesi.

La nostra ricerca ha dimostrato che:

- 1) Nei pazienti con SM recidivante-remittente (SM-RR), naïve al trattamento, i livelli sistemici di ANXA1, sia plasmatici che nel fluido cerebrospinale, diminuiscono con la progressione della malattia.
- 2) I linfociti T "buoni" dei pazienti con SM-RR, le cellule Treg, hanno una minore espressione di ANXA1 che determina una ridotta migrazione nel cervello per ridurre l'infiammazione. Invece, nei linfociti T "cattivi", denominati cellule T helper 17 (Th17), la ridotta espressione di ANXA1 determina una maggiore migrazione nel parenchima cerebrale, favorendo l'attacco, dei linfociti T helper 17 più aggressivi, alla mielina e compromettono la funzionalità neurologica.

CONCLUSIONI

In conclusione, dimostrando che la ridotta espressione di ANXA1 nei pazienti con SM-RR è un fattore che può alterare la funzionalità delle cellule T, individuiamo la possibilità che quest'ultima possa essere considerata come una molecola con attività terapeutica in grado di ristabilire la funzionalità della risposta immunitaria e ripristinare la permeabilità della BEE, controllando la migrazione delle cellule T nel parenchima cerebrale.

Tali dati supportano fortemente un prossimo passo di sperimentazione preclinica e clinica.

Unveiling the role of annexin A1 in Multiple Sclerosis: identification of an endogenous factor decoding T cell breach of the blood brain barrier and immune tolerance

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease that affects the brain and/or spinal cord, characterized by a wide range of potential symptoms, such as problems with vision, arm or leg movement, alteration of sense organs or balance disorders. In patients with MS the immune system mistakenly attacks a healthy part of the body – in this case, the brain or spinal cord, their lymphocytes pass the barrier of the brain, the Blood-Brain Barrier (BBB) and they attack the layer that surrounds and protects the nerves. This means that messages travelling along the nerves become slowed or disrupted.

What trigger this immunological self-damaging response is unclear. There's currently no cure for MS, but a number of treatments can help to control the condition. Our research group has demonstrated that an endogenous molecule produced by our body called Annexin A1 (ANXA1) regulates BBB permeability and controlling the passage of cells and harmful molecules into the brain. Moreover ANXA1 is also an anti-inflammatory molecule which is able to control inflammation which is one of the main manifestation of MS. Based on our published data, we hypothesized that the reduction in ANXA1 expression at both immunological level as well as at the BBB level may contribute to MS trigger or its progression. The pharmacological use of this molecule could restore the BBB functionality lowering inflammation and allowing the immune system to work properly. The main aims of this project were:

- 1) To investigate the reasons of ANXA1 selective loss in MS patients;
- 2) To evaluate whether ANXA1 could control regula-

tory T (Treg) cell function, hence immune tolerance;

- 3) To examine how ANXA1 can modulate specific T cells subset differentiation and their migration.

RESULTS

We have been able to fulfil all the three aims of our proposal thanks also to the extension of 6 months of the sponsorship.

Our research showed that

- 1) In relapsing-remitting MS subjects (RR-MS), naïve to treatment, circulating and cerebrospinal fluid expression levels of ANXA1 decrease with disease progression.
- 2) The “good” T lymphocytes of RR-MS subjects, Treg cells, have less ANXA1 expression this cause a less efficient migration into the brain parenchyma and consequently a less efficient control of inflammation. In contrast, in the the “bad” T lymphocytes, named T helper 17 (Th17) cells, the reduced ANXA1 expression cause a greater migration into the brain parenchyma, favoring their attack on myelin and compromising neurological function.

CONCLUSIONS

In conclusion, by demonstrating that reduced ANXA1 expression in patients with RR-MS naïve to treatments could alter T cells functionality, we pinpoint the possibility that ANXA1 could be considered as therapeutic molecule able to replenish the immune response functionality and BBB permeability by controlling T cells migration into the brain parenchyma. Such data strongly support a next step of preclinical and possibly clinical trial.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

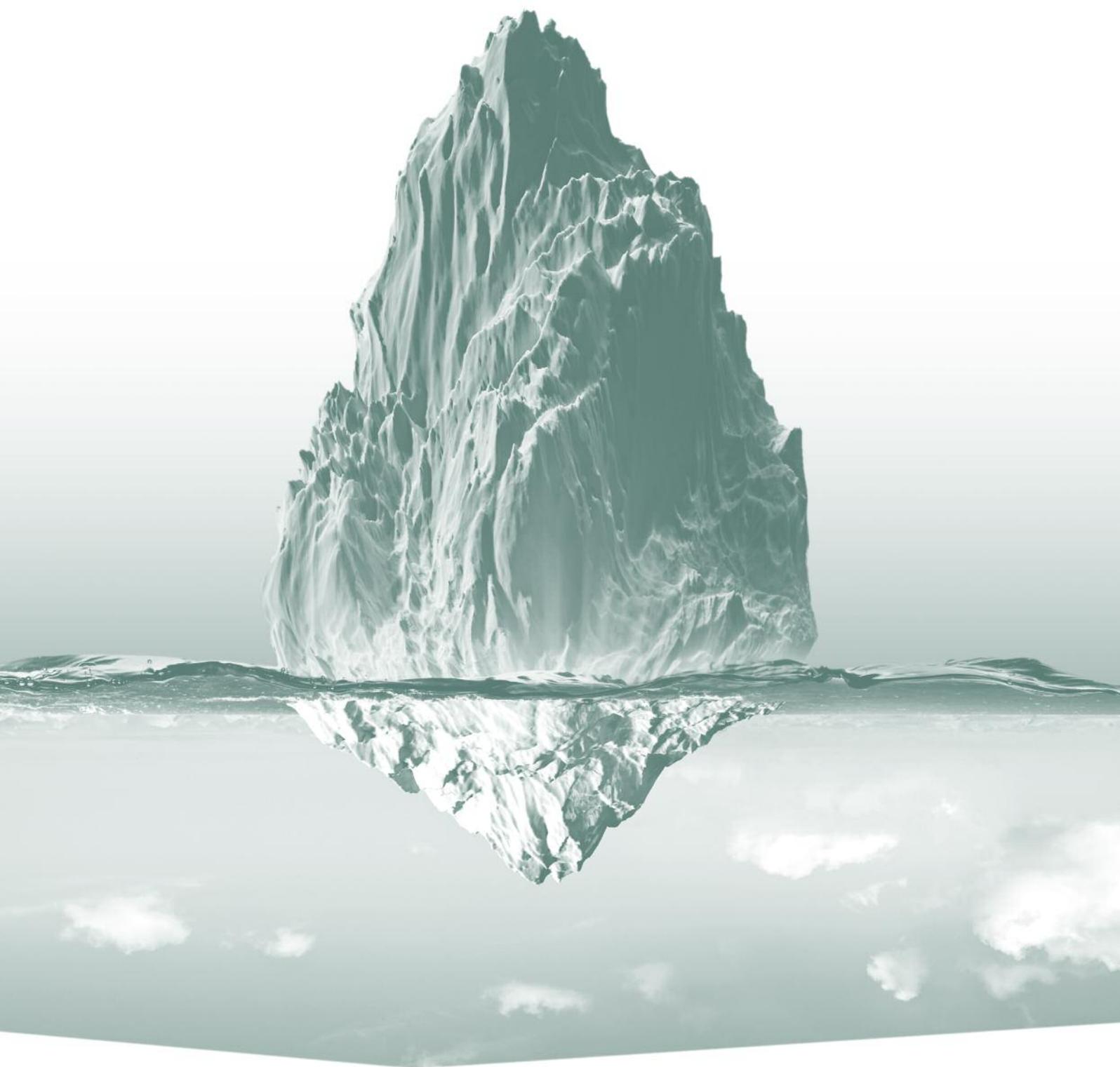
- Pantaleão L, Rocha GHO, Reutelingsperger C, Tiago M, Maria-Engler SS, Solito E, and Farsky SP. Connections of annexin A1 and translocator protein-18 kDa on toll like receptor stimulated BV-2 cells. *Exp Cell Res*. 2018 Jun 15; 367(2):282-290. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.04.008. Epub 2018 Apr 9
- Sheikh MH, Solito E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 31; 19(4). pii: E1045. doi: 10.3390/ijms19041045
- Purvis GSD, Chiazza F, Chen J, Azevedo-Loiola R, Martin L, Kusters DHM, Reutelingsperger C, Fountoulakis N, Gnudi L, Yaqoob MM, Collino M, Thiemermann C, Solito E. Annexin A1 attenuates microvascular complications through restoration of Akt signalling in a murine model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2018 Feb; 61(2):482-495. doi: 10.1007/s00125-017-4469-y. Epub 2017 Oct 30
- Lima KM, Vago JP, Caux TR, Negreiros-Lima GL, Sugimoto MA, Tavares LP, Arribada RG, Carmo AAF, Galvão I, Costa BRC, Soriani FM, Pinho V, Solito E, Perretti M, Teixeira MM, Sousa LP. The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1. *J Biol Chem*. 2017 Aug 18; 292(33):13758-13773. doi: 10.1074/jbc.M117.800391. PMID: 28655761
- Ries M, Loiola R, Shah UN, Gentleman SM, Solito E*, Sastre M. The anti-inflammatory Annexin A1 induces the clearance and degradation of the Amyloid- β peptide, *Journal of Neuroinflammation*. 2016 Sep 2; 13(1):234. doi: 10.1186/s12974-016-0692-6. PMID: 27590054
- McArthur S, Loiola RA, Maggioli E, Errede M, Virgintino D, Solito E. The restorative role of annexin A1 at the blood-brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. 2016 Sep 21; 13(1):17
- Solito E. Protection and Repair at the BBB: role of Annexin A1 invited speaker at the BBB consortium Spring Meeting London, 15th April 2016
- Maggioli, E, McArthur, S., Mauro, C, Kieswich, J., Kusters, D. H., Reutelingsperger, C. P., Yaqoob, M., and Solito, E. (2016) Estrogen protects the blood-brain barrier from inflammation-induced disruption and increased lymphocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 51, 212-222
- Maggioli, E., McArthur, S. and Solito, E. Impact of aging and gender on blood-brain barrier response to inflammation. The 8th Conference on Annexins, 2015 Maastricht (NL)
- Solito, E. Maggioli, E., Colamatteo, A. and DeRosa, V. Annexin A1 role in central immunity: translational potential. The 8th Conference on Annexins, 2015 Maastricht (NL)
- Maggioli, E, Smith, J, Mauro, C, Marelli-Berg, F. and Solito, E. Impact of high dietary fat on blood brain barrier structural and immunological integrity. 11th International Conference on Cerebrovascular Biology, 2015, Paris (France)
- 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
- La Rocca C, Carbone F, De Rosa V, Colamatteo A, Galgani M, Perna F, Lanzillo R, Brescia Morra V, Orefice G, Cerillo I, Florio C, Maniscalco GT, Salvetti M, Centonze D, Uccelli A, Longobardi S, Visconti A, Matarese G. Immunometabolic profiling of T cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis reveals an impairment in glycolysis and mitochondrial respiration. *Metabolism*. 2017 Dec; 77:39-46. doi: 10.1016/j.metabol.2017.08.011
- De Rosa V, La Cava A, Matarese G. Metabolic pressure and the breach of immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2017 Oct 18; 18(11):1190-1196. doi:10.1038/ni.3851
- Lanzillo R, Carbone F, Quarantelli M, Bruzzese D, Carotenuto A, De Rosa V, Colamatteo A, Micillo T, De Luca Picione C, Saccà F, De Rosa A, Moccia M, Brescia Morra V, Matarese G. Immunometabolic profiling of patients with multiple sclerosis identifies new biomarkers to predict disease activity during treatment with interferon beta-1a. *Clin Immunol*. 2017 Oct; 183:249-253. doi: 10.1016/j.clim.2017.08.011
- de Candia P, De Rosa V, Gigantino V, Botti G, Ceriello A, Matarese G. Immunometabolism of human autoimmune diseases: from metabolites to extracellular vesicles. *FEBS Lett*. 2017 Oct; 591(19):3119-3134. doi: 10.1002/1873-3468.12733
- La Rocca C, Carbone F, De Rosa V, Colamatteo A, Galgani M, Perna F, Lanzillo R, Brescia Morra V, Orefice G, Cerillo I, Florio C, Maniscalco GT, Salvetti M, Centonze D, Uccelli A, Longobardi S, Visconti A, Matarese G. Immunometabolic profiling of T cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis reveals an impairment in glycolysis and mitochondrial respiration. *Metabolism*. 2017 Dec; 77:39-46. doi: 10.1016/j.metabol.2017.08.011
- De Rosa V, La Cava A, Matarese G. Metabolic pressure and the breach of immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2017 Oct 18; 18(11):1190-1196. doi:10.1038/ni.3851
- Lanzillo R, Carbone F, Quarantelli M, Bruzzese D, Carotenuto A, De Rosa V, Colamatteo A, Micillo T, De Luca Picione C, Saccà F, De Rosa A, Moccia M, Brescia Morra V, Matarese G. Immunometabolic profiling of patients with multiple sclerosis identifies new biomarkers to predict disease activity during treatment with interferon beta-1a. *Clin Immunol*. 2017 Oct; 183:249-253. doi:10.1016/j.clim.2017.08.011
- de Candia P, De Rosa V, Gigantino V, Botti G, Ceriello A, Matarese G. Immunometabolism of human autoimmune diseases: from metabolites to extracellular vesicles. *FEBS Lett*. 2017 Oct; 591(19):3119-3134. doi: 10.1002/1873-3468.12733
- De Rosa V, Di Rella F, Di Giacomo A, Matarese G. Regulatory T cells as suppressors of anti-tumor immunity: Role of metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017 Jun; 35:15-25. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.04.001
- Melis D, Carbone F, Minopoli G, La Rocca C, Perna F, De Rosa V, Galgani M, Andria G, Parenti G, Matarese G. Cutting Edge: Increased Autoimmunity Risk in Glycogen Storage Disease Type 1b Is Associated with a Reduced Engagement of Glycolysis in T Cells and an Impaired Regulatory T Cell Function. *J Immunol*. 2017 May 15; 198(10):3803-3808. doi: 10.4049/jimmunol.1601946
- Carbone F, La Rocca C, De Candia P, Procaccini C, Colamatteo A, Micillo T, De Rosa V, Matarese G. Metabolic control of immune tolerance in health and autoimmunity. *Semin Immunol*. 2016 Oct; 28(5):491-504. doi: 10.1016/j.smim.2016.09.006. Review
- Galgani M, De Rosa V, La Cava A, Matarese G. Role of Metabolism in the Immunobiology of Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2016 Oct 1; 197(7):2567-75. doi: 10.4049/jimmunol.1600242. Review
- Procaccini C, Santopaolo M, Faicchia D, Colamatteo A, Formisano L, de Candia P, Galgani M, De Rosa V, Matarese G. Role of metabolism in neurodegenerative disorders. *Metabolism*. 2016 Sep; 65(9):1376-90. doi: 10.1016/j.metabol.2016.05.018. Review

De Rosa V, Galgani M, Santopaolo M, Colamatteo A, Laccetti R, Matarese G. Nutritional control of immunity: Balancing the metabolic requirements with an appropriate immune function. *Semin Immunol.* 2015 Sep;27(5):300-9. doi: 10.1016/j.smim.2015.10.001. Review

Procaccini C, Carbone F, Di Silvestre D, Brambilla F, De Rosa V, Galgani M, Faicchia D, Marone G, Tramontano D, Corona M, Alviggi C, Porcellini A, La Cava A, Mauri P, Matarese G. The Proteomic Landscape of Human Ex Vivo Regulatory and Conventional T Cells Reveals Specific Metabolic Requirements. *Immunity.* 2016 Feb 16;44(2):406-21. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.028

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 3 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 250.000 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 3 years (extended by 6 months) and the amount of € 250,000



NETWORK ITALIANO DI NEUROIMAGING (INNI)

THE ITALIAN NEUROIMAGING NETWORK INITIATIVE (INNI)

Massimo Filippi

Neuroimaging Research Unit, University “Vita-Salute” San Raffaele, Milano

LISTA DEI CENTRI PARTECIPANTI COINVOLTI NEL PROGETTO /

LIST OF THE PARTICIPANTS CENTER INVOLVED IN THE PROJECT:

Neuroimaging Research Unit, University “Vita-Salute” San Raffaele Milano

Department of Neurology and Psychiatry, Sapienza University Roma

Department of Medical, Surgical, Neurological, Metabolic and Aging Sciences & MRI Research Center SUN-FISM Napoli

University of Campania “L. Vanvitelli”, Dept. Medicine, Surgery and Neurosciences
University of Siena, Siena

Network Italiano di Neuroimaging (INNI) per l’ottimizzazione dell’utilizzo di tecniche avanzate di Risonanza Magnetica in pazienti con SM

L’iniziativa INNI, che coinvolge centri e ricercatori con competenze riconosciute a livello internazionale, ha l’obiettivo principale di determinare e convalidare nuovi biomarcatori di risonanza magnetica (RM) da utilizzare come predittori e / o risultati in futuri studi sulla SM. Inoltre, INNI mira anche a guidare l’applicazione della risonanza magnetica per la SM a livello nazionale. La definizione di standard di RM e protocolli clinici per la valutazione dei pazienti con SM in Italia, consentirà di integrare i dati ottenuti da diversi centri, per testare specifiche ipotesi di ricerca sulla fisiopatologia della malattia e sugli effetti del trattamento che potrebbero infine promuovere la medicina personalizzata.

Il network INNI è guidato da un Comitato Scientifico i cui membri sono il Principal Investigator dello studio (Massimo Filippi di Milano), i leader degli altri centri coinvolti nell’iniziativa (Patrizia Pantano di Roma, Nicola De Stefano di Siena, Gioacchino Tedeschi di Napoli e Maria Rocca di Milano) e rappresentanti della Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM), proprietaria del database. Il database INNI online è disponibile all’indirizzo: <https://database.inni-ms.org>.

Il contenuto del database è disponibile solo per gli utenti autorizzati, che hanno ricevuto login e password appropriati.

Attualmente, sono presenti nel database i dati di 1710 soggetti di cui 1218 persone con SM e 492 controlli sani. Delle 1218 persone con SM 763 sono pazienti con SM recidivante-remittente (RR), 193 con SM secondariamente progressiva (SP), 69 con SM

benigna, 84 SM primariamente progressiva (PP), 94 con sindrome clinicamente isolata (CIS) e 15 pazienti con sindrome radiologicamente isolata (RIS). Per accedere ai dati, deve essere presentata al comitato scientifico per l’approvazione una proposta di ricerca, che spiega nel dettaglio i principali obiettivi del progetto e il progresso nella conoscenza che ne seguirà. Al momento della registrazione, gli utenti avranno pieno accesso ai set di dati richiesti, e il diritto di utilizzo dei medesimi per scopi non commerciali.

Durante il prossimo triennio, INNI agirà su tre diverse linee strategiche di azione:

- 1) Manutenzione e espansione continua dell’infrastruttura
- 2) Sviluppo di progetti di ricerca ad hoc basati sul contenuto di dati di INNI, finalizzati a convalidare a livello multicentrico le tecniche di risonanza magnetica
- 3) Promozione di un piano per la standardizzazione dell’uso della risonanza magnetica a livello nazionale, proponendo protocolli di acquisizione standardizzati da applicare per lo studio della malattia e aiutando i centri in tutta Italia alla messa a punto di questo protocollo, al fine di rendere omogeneo l’approccio per le persone con SM a livello nazionale.

Per quanto riguarda la seconda linea strategica sullo sviluppo di progetti di ricerca ad hoc sono stati pianificati, dai quattro centri partecipanti, quattro diversi progetti di ricerca.

PROGETTO 1

Quantificazione della misura dell'atrofia: dalla ricerca alla pratica clinica

(Massimo Filippi, Milano)

Ci sono sfide sia tecniche che correlate alla malattia che impediscono le misurazioni dell'atrofia per l'uso nella pratica clinica.

In questo contesto, vi è la necessità di fornire linee guida sia per l'acquisizione che per l'analisi, volte a spostare le misure di atrofia nel contesto clinico.

Inizio: maggio 2018 - Durata: 3 anni

PROGETTO 2

Valutazione multicentrica su larga scala del volume dell'ippocampo nei pazienti con sclerosi multipla

(Nicola De Stefano, Siena)

Lavori recenti hanno mostrato correlazioni significative tra prestazioni insufficienti nei test cognitivi e perdita del volume dell'ippocampo nei pazienti con SM. Pertanto, vi è la necessità di implementare un metodo automatizzato per la stima delle variazioni volumetriche del giro dentato dell'ippocampo e studiare i fattori che influenzano l'espansione del giro dentato dell'ippocampo nella SM.

Inizio: maggio 2018 - Durata: 3 anni

PROGETTO 3

L'impatto dei cambiamenti della connettività funzionale sulla progressione della malattia e l'accumulo di disabilità

(Patrizia Pantano, Roma)

La disabilità clinica e il carico di malattia in singoli pazienti con SM potrebbero non coincidere. Perciò, c'è la necessità di finalizzare e convalidare un modello che combini il danno strutturale, la riorganizzazione funzionale e la disabilità nel tempo.

Inizio: maggio 2018 - Durata: 2 anni

PROGETTO 4

Determinanti RM strutturali e funzionali di disequilibrio cognitivo-radiologico in pazienti con SM

(Gioachino Tedeschi, Napoli)

Un'ampia percentuale di pazienti affetti da sclerosi multipla presenta deficit cognitivi, con un coinvolgimento preminente dell'attenzione, della velocità di elaborazione delle informazioni, delle funzioni esecutive, della memoria e delle abilità visuo-spaziali.

Utilizzando il set di dati 3T-MRI unico e molto ampio (dati disponibili di circa 1200 persone con SM), multicentrico, strutturale e funzionale del progetto INNI, lo studio si propone di esplorare i substrati strutturali e funzionali della discrepanza cognitivo-radiologica osservata nelle persone con SM.

Inizio: maggio 2018 - Durata: 2 anni

The Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI) to optimize the use of advanced MRI techniques in patients with MS

The Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI), which involves centres and investigators with an International recognized expertise, has the major goal to determine and validate novel magnetic resonance imaging (MRI) biomarkers to be utilized as predictors and/or outcomes in future MS studies. In addition, INNI aims also to guide the application of MRI in MS at a national level. The definition of MRI standards and clinical protocols for the evaluation of MS patients in Italy will allow to integrate the data obtained

from different centers to test specific hypotheses of research on the pathophysiology of the disease and on the effects of the treatment which might ultimately promote personalized medicine.

The online INNI database is available at: <https://database.inni-ms.org>. The database content is available for authorized users only, who received appropriate login and password.

To date (December 2017), 1710 subjects have been

uploaded in the INNI database. There are 1218 patients with MS and 492 healthy controls. There are 763 patients with relapsing-remitting (RR) MS, 193 secondary progressive (SP) MS, 69 benign MS, 84 primary progressive (PP) MS, 94 CIS and 15 RIS patients.

During the next three-year period, INNI will be acting on three different aspects:

Maintenance and continuous expansion of the infrastructure;

Development of *ad-hoc* research projects based on INNI content, aimed at a multicenter validation of MRI techniques;

Promotion of a plan for the standardization of the use of MRI at a national level, by proposing standardized acquisition protocols to be applied for the study of the disease and helping peripheral centers in the set-up of this protocol, in order to homogenize the approach to MS patients at a national level.

Regarding action 2 on the development of ad-hoc research projects, four different research projects are planned by the four participating centers.

PROJECT 1

Moving atrophy quantification for research setting to clinical practice

(Massimo Filippi, Milan)

There are both technical and disease-related challenges that prevent atrophy measurements for use in clinical practice.

In this framework, there is the need to provide guidelines both for the acquisition and analysis, aimed at moving atrophy measures in the clinical context.

Beginning: may 2018 - Period: 3 years

PROJECT 2

Large-scale, multi-centre assessment of hippocampal volume in MS patients

(Nicola De Stefano, Siena)

Recent works have shown significant correlations between poor performance in cognitive tests and loss of hippocampal volume in MS patients. Therefore, there is the need to implement an automatic method for estimation of volumetric changes of hippocampal dentate gyrus and investigate the factors influencing hippocampal dentate gyrus expansion in MS.

Beginning: may 2018 - Period: 3 years

PROJECT 3

The impact of functional connectivity changes on disease progression and disability accumulation

(Patrizia Pantano, Rome)

Clinical disability and disease burden in single MS patients may not coincide. Therefore there is the need to finalize and validate a model that combines structural damage, functional reorganization and disability over time.

Beginning: may 2018 - Period: 2 years

PROJECT 4

Structural and functional MRI determinants of cognitive-radiological mismatch in MS patients

(Gioachino Tedeschi, Naples)

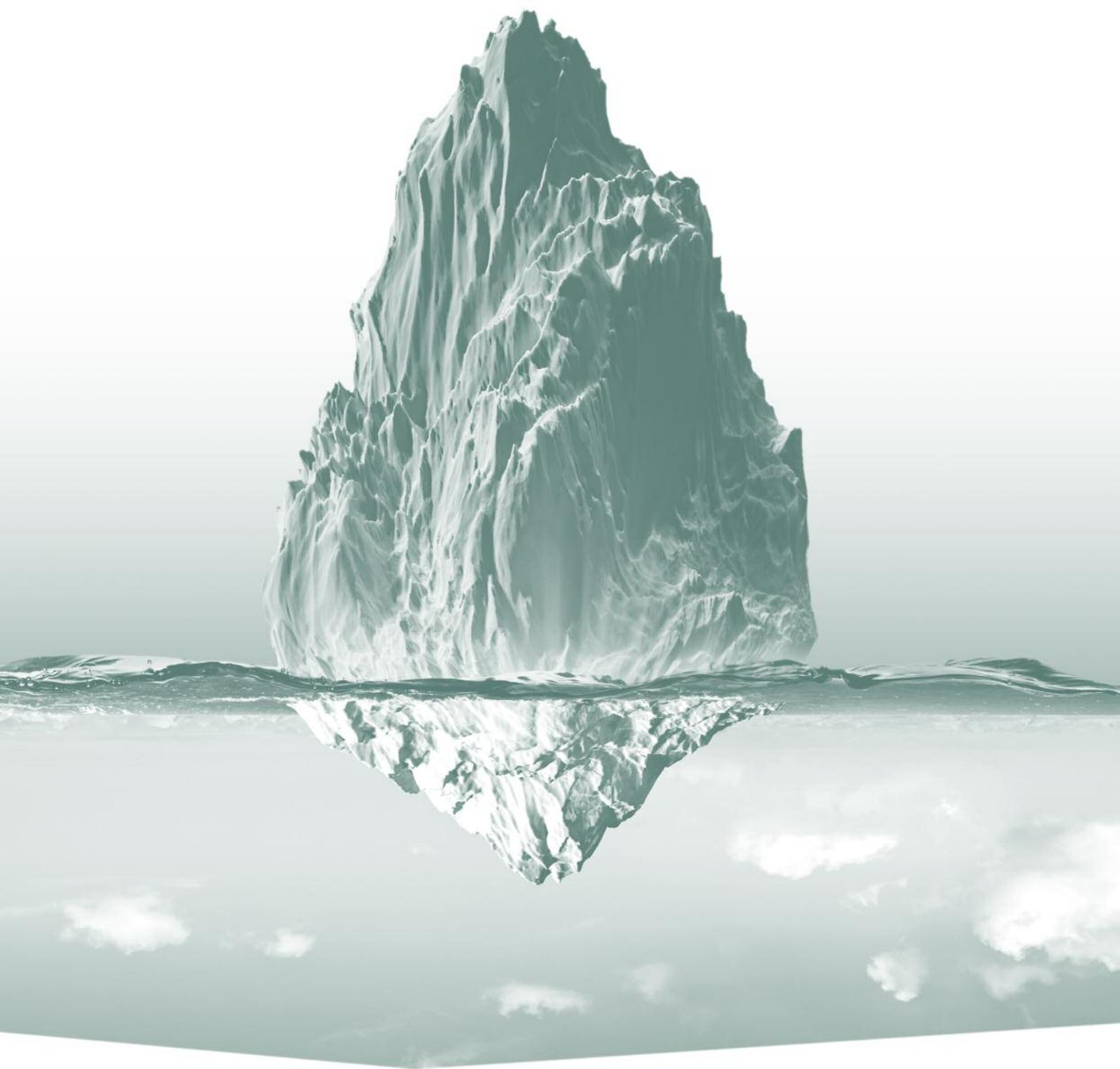
A large proportion of MS patients experience cognitive deficits, with prominent involvement of attention, information processing speed, executive functions, memory and visuo-spatial abilities (Chiavallotti and DeLuca 2008).

Using the unique and very large (data available from ≈ 1200 MS subjects), multicenter, structural and functional 3T-MRI dataset of the INNI project, our aim will be to explore the structural and functional substrates of the cognitive-radiological mismatch observed in MS patients.

Beginning: may 2018 - Period: 2 years

Fondi totali richiesti: 865.790 € per 3 anni (642.640,00 per l'infrastruttura; 223.150, per progetti specifici)

Total fund request: € 865,790 for three years (642.640,00 for infrastructure; 223.150, for specific projects)



REGISTRO ITALIANO SCLEROSI MULTIPLA

ITALIAN MULTIPLE SCLEROSIS REGISTER

Registro Italiano Sclerosi Multipla

Il Registro italiano di Sclerosi Multipla è uno dei Progetti Speciali di punta della ricerca sostenuta da AISM e dalla sua Fondazione che è stato avviato con l'obiettivo di creare una infrastruttura organizzata multicentrica per raccogliere i dati di tutti i pazienti con sclerosi multipla seguiti nei diversi Centri sclerosi multipla (SM) italiani.

Nel 2015 è stata ufficialmente lanciata una Unità di ricerca specifica per il Registro Italiano SM, nata sulla base di un Accordo di Programma firmato nel 2014 tra FISM e l'Università degli Studi di Bari (centro coordinatore del più grande database clinico italiano sulla SM).

Oltre 140 Centri clinici italiani hanno aderito al progetto e ad oggi, il Registro Italiano SM raccoglie i dati demografici e clinici di oltre 50.000 persone seguite dai Centri clinici italiani. È dunque pronto a diventare un vero strumento di ricerca scientifica che può essere utile per lo sviluppo di studi epidemiologici e clinici e di programmazione sanitaria.

I dati del Registro Italiano SM saranno utili per promuovere l'equità di accesso alle cure confrontando le pratiche assistenziali dei diversi centri nonché studiare/valutare politiche assistenziali di carattere nazionale e locale.

Il Comitato Scientifico del Progetto Registro Italiano SM ha individuato due linee di ricerca strategica prioritarie:

1) **PROGETTI IN SANITÀ PUBBLICA**

Necessità di impostare un censimento universale dei pazienti che venga aggiornato in maniera sistematica e continuativa allo scopo di ottenere stime precise di prevalenza e incidenza della malattia a livello regionale e nazionale per il perseguimento di finalità di prevenzione, diagnosi, cura, programmazione sanitaria,

verifica della qualità delle cure e valutazione dell'assistenza sanitaria sul territorio italiano.

2) **PROGETTI DI RICERCA**

Necessità di raccogliere informazioni utili per la pianificazione di studi di ricerca per specifiche progettualità. In particolare studi di farmacovigilanza volti a identificare sicurezza, tollerabilità ed efficacia associata nel breve e lungo termine ai trattamenti immunosoppressivi e immunomodulanti, nonché studi su fattori prognostici e biomarcatori relativi alla progressione di malattia, alla risposta al trattamento e alla mortalità.

La linea strategica dei **Progetti di Ricerca** comprende 3 aree di studio principali

EPIDEMIOLOGIA DESCRITTIVA

Studia la frequenza, la distribuzione e i determinanti della SM nella popolazione.

OTTIMIZZAZIONE DELLA TERAPIA

Studio e analisi delle terapie SM. Comprende tre ambiti di lavoro:

- Analisi sulle terapie
- Progetti specifici
- Fattori prognostici e modelli predittivi di risposta alla terapia

FORME RARE DI SM

Incentrato su diverse forme SM: forme benigne, RIS, CIS, PP, SM a esordio pediatrico, forme aggressive.

Attualmente sono stati attivati 16 Progetti su sulle tre aree principali della linea strategica di ricerca: 3 i progetti di epidemiologia descrittiva, 12 sull'ottimizzazione della terapia e 1 sulle forme rare di SM.

Italian Multiple Sclerosis Register

The Italian Multiple Sclerosis Registry is one of the main research Special Projects supported by AISM and its Foundation, which was launched with the aim of creating a multicentric organized infrastructure to collect the data of all patients with multiple sclerosis (MS) followed in the various multiple sclerosis (MS) centers in Italy. In 2015 a specific Research Unit was launched for the Italian MS Registry, established on the basis of a Program Agreement signed between the Italian MS Foundation (FISM) and the University of Bari (coordinating center of the largest Italian MS clinical database) in 2014. Over 140 Italian clinical Centers have joined the project and to date, the Italian SM Registry collects demographic and clinical data of over 50,000 people followed by Italian clinical Centers.

Data from the Italian MS Registry will be useful to promote the equity of access to care by comparing the welfare practices of the different Centers and to study / evaluate national and local welfare policies.

The Scientific Committee of the Italian MS Register Project has identified two strategic research priorities:

1) PROJECTS IN PUBLIC HEALTH

Need to set up a universal census of patients that is systematic and continuous update, in order to obtain accurate estimates of prevalence and incidence of the disease at regional and national level for the pursuit of prevention, diagnosis, treatment, health planning, verification of the quality of care and assessment of health care in Italy.

2) RESEARCH PROJECTS

Need to gather useful information for the planning of research studies for specific projects. In particular, pharmacovigilance studies aimed at identifying the safety, tolerability and efficacy associated, in the short and long term, with immunosuppressive and immunomodulatory treatments, as well as studies on prognostic factors and biomarkers related to disease progression, response to treatment and mortality.

The strategic research projects priorities includes 3 main areas of study

DESCRIPTIVE EPIDEMIOLOGY

It studies the frequency, the distribution and the determinants of MS in populations.

THERAPY OPTIMIZATION

The study and analysis of MS therapies. Includes three areas of work:

- Analysis of therapies
- Specific projects
- Prognostic factors and predictive models of therapy response

RARE FORMS OF MS

Focus on the different MS forms: benign forms, RIS, CIS, PP, pediatric MS onset, aggressive forms.

Currently 16 Projects have been active on the three main areas of the strategic research line:

3 descriptive epidemiology projects, 12 projects on the optimization of the therapy and 1 project on rare forms of the disease.

Lorena Lorefice

Centro Regionale per la Diagnosi e la Cura della Sclerosi Multipla, Ospedale R. Binaghi, ATS Sardegna, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

Caratterizzazione clinica ed evoluzione della sclerosi multipla ad esordio tardivo: studio multicentrico retrospettivo

La sclerosi multipla ad esordio tardivo (*late onset MS*; LOMS), classicamente definita in base alla comparsa della prima manifestazione clinica dopo i 50 anni, si osserva in meno del 10% dei pazienti. Pochi studi hanno confrontato le caratteristiche cliniche e demografiche di questi pazienti con i casi di SM ad esordio classico, riportando con maggiore frequenza un decorso progressivo primario, notoriamente associato a più severa disabilità. Le informazioni relative agli outcomes clinici di questi pazienti, alla loro capacità di rispondere ai trattamenti e alle conseguenti implicazioni prognostiche risultano comunque ancora parziali.

Il presente progetto, retrospettivo e multicentrico, nasce con l'obiettivo di colmare quest'area di incertezza attraverso la descrizione delle caratteristiche cliniche precoci e tardive dei pazienti LOMS di un'estesa coorte italiana e confrontando tali caratteristiche con quelle dei casi ad esordio in età giovane-adulta.

Lo studio sarà realizzato utilizzando i dati presenti nel registro italiano SM IMed Web. In primis, saranno identificati e valutati i pazienti con diagnosi di SM e con età all'esordio superiore ai 50 anni (LOMS). Successivamente sarà incluso un secondo gruppo di pazienti SM con esordio classico in età giovane-adulta (20-40 anni) (*young-adult onset MS*; YOMS). I pazienti appartenenti ai due gruppi saranno confrontati per sesso e durata di malattia.

Saranno valutate tutte le seguenti informazioni: età

all'esordio della SM, età alla diagnosi, primo sintomo clinico, decorso clinico (recidivante remittente o primariamente progressivo all'esordio), durata di malattia, livello di disabilità (EDSS score) al momento dell'esordio e dell'ultima valutazione clinica, il numero e il tipo di ricadute e l'uso di farmaci disease-modifying (DMDs). Inoltre, per ciascun paziente, sarà definito un "progression index" (EDSS score/anni di malattia). Per quanto riguarda le analisi statistiche, in primis sarà effettuata un'analisi descrittiva in base alla distribuzione dei dati; le caratteristiche demografiche e cliniche dei due gruppi (LOMS vs YOMS) saranno poi confrontate. La curva di sopravvivenza sarà usata per definire il tempo dall'esordio della malattia al raggiungimento del punteggio EDSS a 3 e a 6, sia all'interno di ogni gruppo che tra i due gruppi; saranno quindi determinati i potenziali fattori di rischio associati alla progressione di malattia che contemporaneamente saranno inseriti come covariate in un modello multivariato di Cox.

L'obiettivo primario dello studio è la caratterizzazione clinica dei pazienti LOMS in modo da chiarire in un esteso campione se l'esordio tardivo è associato a outcomes clinici peggiori o se il più importante determinante per la prognosi è il decorso clinico. Lo studio mira a inoltre ad incrementare le conoscenze relative ai fenotipi clinici della LOMS, alla prognosi e all'impatto che l'uso dei farmaci DMDs possono avere sull'evoluzione della malattia.

Clinical characteristics and disease outcomes of late onset multiple sclerosis: a retrospective multicenter study

Late onset of MS (LOMS), classically defined by the occurrence of the first symptoms after age 50, it is relatively infrequent and it occurs in less than 10% of patients. To date, few studies compared this population with young-adult onset MS (YOMS) patients in term of demographic and clinical characteristics, some of which assessed that LOMS more frequently features a primary progressive course, predicting a severe disability, while a recent study showed that older age at MS onset is an independent factor of poor prognosis. However, there is still uncertain information about the clinical outcomes of LOMS, the response to disease modifying treatments (DMDs) and consequently the implication for disease prognosis. The present project is a multicenter retrospective study aimed to describe the early and late clinical characteristics of LOMS in a large cohort of Italian MS patients, using YOMS as a comparator. Data of the Italian IMedWeb MS Registry will be used to perform this retrospective analysis. Firstly, patients diagnosed with MS with an age at onset of > 50 years (LOMS) will be evaluated for study and following a comparison group of YOMS cases, comprising patients with an age at MS onset between 20-40 years, will be included. LOMS and YOMS cases will be matched for sex and for disease duration. Information on age at MS onset, age at MS diagnosis, initial MS presentation, disease course (classified into ei-

ther a primary progressive or relapsing course from onset), disease duration, level of disability (EDSS score) at onset and at least examination, number and type of relapses, and the use of disease modifying drugs (DMDs) will be evaluated. In addition, a progression index (EDSS score/disease duration) for each patient will be also defined. Initially, a descriptive analysis will be conducted, according to data distribution, and the demographic and clinical characteristics of the LOMS and YOMS groups were compared.

A Kaplan-Meier survival analysis will be used to estimate the time from onset to EDSS 3 and EDSS 6 within and between the LOMS and YOMS groups, and the potential risk factors associated with progression will be assessed simultaneously as covariates in a multivariate Cox regression models. The primary objective of this study is the better clinical characterization of LOMS patients in order to clarify in a large sample if late-onset is associated with a worse outcome or if the most important determinant for disease prognosis is the disease course. Furthermore, it aims to increase knowledge about the LOMS clinical phenotype and the impact that the use of DMDs may have on the number of relapses and accumulation of disability, giving new information on prognostic factors of these patients, in order to optimize their care.

Giuseppe Fenu

Centro Sclerosi Multipla, Università degli Studi di Cagliari, Ospedale Binaghi, Cagliari

Variatione delle caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti affetti da SM con diagnosi tra il 1983 e il 2016

È un'osservazione comune emergente dalla pratica clinica quotidiana e dall'osservazione delle popolazioni di pazienti inclusi negli studi, che le caratteristiche cliniche e demografiche delle persone affette da sclerosi multipla (SM) abbiano avuto una sostanziale modifica nel corso delle ultime decadi. Alla base di tale modifica vi sono probabilmente diverse componenti: l'evoluzione dei criteri diagnostici, la maggiore conoscenza e attenzione rivolte alla patologia, la maggiore disponibilità e il progresso tecnico degli strumenti di completamento diagnostico, in primo luogo degli apparecchi di risonanza magnetica nucleare (RMN). Inoltre la disponibilità di trattamenti efficaci e la dimostrazione dell'importanza dell'inizio precoce della terapia spingono ulteriormente ad arrivare alla definizione diagnostica in una fase sempre più precoce della storia di malattia. Tuttavia sono attualmente scarsi gli studi che hanno confrontato le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti che hanno ricevuto la diagnosi di SM nelle diverse decadi. Un recente studio ha osservato in una coorte di pazienti una significativa modifica della prognosi a lungo termine nei pazienti con diagnosi dopo il 2000 rispetto a quelli con diagnosi precedente, attribuendola principalmente ai cambi nei pattern di trattamento. Obiettivo del nostro studio è quello di valutare se

sono presenti differenze relativamente ai principali parametri clinici e demografici nei pazienti che hanno ricevuto la diagnosi di SM nelle diverse decadi. Per ciascun paziente verranno valutati i seguenti parametri: genere, età all'esordio, età alla diagnosi, latenza diagnostica (intervallo temporale tra esordio clinico e diagnosi), tasso di ricadute annualizzato nei primi 2 anni di malattia, tempo tra esordio e prima ricaduta, tempo dall'esordio al raggiungimento dell'EDSS 6, 0, disseminazione spaziale nella prima RMN, sistema funzionale interessato all'esordio, EDSS all'ultimo controllo, Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) all'ultimo controllo.

I pazienti verranno poi classificati sulla base delle decadi di diagnosi:

- 1983-1995: dai criteri di Poser fino alla disponibilità dei primi immunomodulanti
- 1996-2005: dalla disponibilità dei primi immunomodulanti alla comparsa del natalizumab (con sottogruppo 1996-2000 (IFN-Criteri di McDonald) - 2001-2005 (Criteri di McDonald-Prima revisione dei criteri)
- 2005-2016: prima e seconda revisione dei criteri di McDonald (con sottogruppo 2005-2011: prima revisione criteri di McDonald-Seconda Revisione e 2011-2016: seconda revisione dei criteri di McDonald attuale).

Changes of clinical and demographic characteristics in patients with MS diagnosis during the various decades between 1983 and 2016

It is a common observation emerging from daily clinical practice and from analysis of multiple sclerosis (MS) populations included in clinical studies that the clinical and demographic characteristics of people with multiple sclerosis have had a substantial change over the last decades. At the basis of this change, there are probably several components: evolution of diagnostic criteria, greater knowledge and attention to pathology, greater availability and technical progress of diagnostic completion tools primarily for MRI scan. In addition, the availability of effective therapies and the demonstration of the importance of early treatment, it lead to arrive at diagnosis at an increasingly early stage of the history of the disease. However, there are currently few studies that compared the clinical and demographic characteristics of patients who have been diagnosed with MS over the decades. A recent study observed in a cohort of patients a significant change in long-term prognosis in patients with post-2000 diagnosis compared to those with previous diagnosis, primarily attributing it to changes in treatment patterns. The aim of our study is to evaluate whether differences in the main clinical and demographic parameters are present in

patients who have been diagnosed with MS over the decades.

For each patient, the following parameters will be evaluated: gender, age at onset, age at diagnosis, diagnostic latency (time interval between clinical onset and diagnosis), annualized relapse rate in the first 2 years of disease, time from onset to first relapse, time from onset to reach EDSS 6,0, spatial dissemination in the first RMN, system functional involved at onset, EDSS at last control, Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) at last control.

Patients will then be classified on the basis of decades of diagnosis:

- 1983-1995: from the Poser criteria to the availability of the first immunomodulants
- 1996-2005: From the availability of the first immunomodulants to the onset of natalizumab (with subgroup 1996-2000 (McDonald's IFN Criteria) - 2001-205 (McDonald's Criteria - First Criterion Revision)
- 2005-2016: First and Second Revision of McDonald's Criteria (Subgroup 2005-2011: First McDonald-Second Revision Criteria Review and 2011-2016: Second Revision of Current McDonald Criteria).

Jessica Frau

Centro Regionale per la Diagnosi e la Cura della Sclerosi Multipla, Ospedale R. Binaghi, ATS Sardegna, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

Valutazione dei fattori prognostici al basale in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da sclerosi multipla

La ricerca dei fattori prognostici che incidono sullo sviluppo della sclerosi multipla (SM) e sul successivo decorso ha sempre destato un grande interesse ed è ancora attuale. Nel corso del tempo, grazie anche ai miglioramenti delle tecniche diagnostiche, non solo fattori clinici e demografici, ma anche laboratoristici e di risonanza magnetica sono stati presi in considerazione come possibili modificatori della prognosi. L'introduzione dei farmaci disease-modifying (DMDs) nella SM, avendo cambiato la storia naturale della malattia, può influire anche sui vari fattori prognostici sino ad ora trovati. Tale utilizzo precoce è essenzialmente legato a una sostanziale anticipazione nella diagnosi grazie anche all'evoluzione dei criteri diagnostici. Tali differenti approcci potrebbero aver parzialmente modificato l'impatto dei vari fattori prognostici.

Obiettivo del nostro studio è valutare in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da SM che hanno esordito con una ricaduta clinica quali fattori presenti al basale possono predire il successivo decorso della patologia, esaminando in particolare quattro variabili: il tempo tra l'esordio e la seconda ricaduta di malattia, il raggiungimento dei punteggi 3 e 6 nella scala EDSS (Expanded Disability Status Scale), il punteggio alla multiple sclerosis severity score (MSSS) all'ultimo controllo. Le variabili considerate saranno esaminate

in due differenti coorti, la prima rappresentata da pazienti diagnosticati sino al 2000 e la seconda da pazienti con diagnosi dal 2001 al 2015 per evidenziare eventuali differenze tra i 2 gruppi. La scelta di tale anno è stata posta in quanto i primi DMDs sono stati introdotti pochi anni prima del 2000 e nel 2001 sono entrati in vigore nuovi criteri diagnostici. Questo permetterà di capire se l'uso dei DMDs e il differente approccio alla malattia con possibilità di diagnosi più precoce hanno modificato i fattori prognostici basali rispetto a quanto riportato nella letteratura in epoche precedenti. Obiettivo secondario è la valutazione di differenze nei fattori prognostici generali trovati tra la Sardegna e le altre regioni Italiane, considerando la netta prevalenza della malattia nell'isola e le sue peculiari caratteristiche genetiche e ambientali. Anche in questo caso le 2 coorti saranno divise ognuna in 2 gruppi, a seconda dell'anno della diagnosi (sino al 2000, dal 2001 al 2015) Per ciascun paziente verranno valutate le seguenti caratteristiche: genere, età all'esordio, anno di diagnosi, tempo tra l'esordio e la seconda ricaduta clinica, sistemi funzionali coinvolti all'esordio, eventuale età al raggiungimento dei punteggi EDSS 3 e 6, EDSS all'ultimo controllo, MSSS all'ultimo controllo, presenza o assenza di bande oligoclonali (OB) IgG nel liquor, disseminazione spaziale alla prima risonanza magnetica.

Evaluation of baseline prognostic factors in a large Italian cohort of patients with multiple sclerosis

The study of prognostic factors involved in the development and clinical course of multiple sclerosis (MS) has been and is still now of great interest. In the last decades, due to the improvement of diagnostic tools, not only clinical and demographic features, but also laboratory and radiological features have been considered as potential prognosis modifiers. To note, the introduction of DMDs in the early phase of MS, essentially due to the more precocious diagnosis due to the new diagnostic criteria, has been found to considerably impact the natural history of the disease. Thus, they could also have an effect on the historically considered prognostic factors.

The primary aim of the study is to evaluate in a large cohort of Italian MS relapsing patients the baseline prognostic factors, which can impact on the following outcomes: time to second clinical relapse, time to the achievement of the EDSS scores 3 and 6, MSSS score at the last follow-up. The analysis will be performed dividing the cohort in a group with diagnosis until 2000 and the other with diagnosis since 2001 until

2015. This cut-off has been chosen because coincident with application of the new diagnostic criteria and because it comes just few years after the introduction of DMDs. This could permit to understand whether the use of DMSs and the more precocious diagnosis impact on prognostic factors. Secondary outcome is to evaluate possible differences in prognostic factors between Sardinian patients and the other Italian cohort. Indeed, MS has a significant higher prevalence in the island, having a peculiar genetic and environmental background. Also in this case, both the Sardinian patients and the Italian cohort will be divided in 2 groups, in respect to the year of diagnosis (until 2000, and from 2001 until 2015) For each included subject the following features will be analysed: gender, age at onset, year of diagnosis, time from the onset to second relapse, functional systems involved at the onset, age at achievement of EDSS scores 3 and 6, MSSS at last follow-up, presence of oligoclonal bands IgG in cerebrospinal fluid, spatial dissemination in the first MRI.

Maria Pia Amato

Dipartimento NEUROFARBA, Divisione di Riabilitazione Neurologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze

Valutare l'efficacia e la sicurezza dei trattamenti nella sclerosi multipla progressiva

Il trattamento delle forme di sclerosi multipla (SM) progressiva (P) rappresenta un aspetto controverso nella letteratura e poco studiato nei RCTs. Le linee guidaECTRIMS/EAN hanno posto chiare raccomandazioni per quanto riguarda il trattamento con farmaci disease-modifying (DMDs) nelle forme recidivanti remittenti (RR), nella sindrome clinicamente isolata (CIS) e, solo come raccomandazione debole, nelle forme secondariamente e primariamente progressive SMSP, SMPP). Diversamente, le linee guida nord- Americane danno indicazione a considerare la sospensione dei DMDs dopo lo shift alla fase secondariamente progressiva. La mancanza di dati Evidence-Based in questo campo ha molteplici possibili spiegazioni: la rarità delle forme PP; la mancanza di farmaci con meccanismo d'azione che sia efficace contro la patogenesi e la neurodegenerazione delle forme progressive; la mancanza di misure di outcome sensibili e ben validate che identifichino la progressione di malattia; la diagnosi di progressione stessa che rimane clinica e confermata solo retrospettivamente. Allo stesso tempo, sono estremamente limitati anche i dati disponibili riguardo la sicurezza e tollerabilità dei DMDs nelle forme progressive. Questo aspetto assume grande rilievo in considerazione del fatto che i soggetti con SMP appartengono generalmente a fasce di età più avanzate, sono a maggior rischio di comorbidità e molti raggiungono lo stadio di SMSP dopo diversi anni di immunoterapia.

Nella pratica clinica una certa proporzione di pazienti con SMP sono trattati con DMDs di prima e seconda

linea, cosicché è possibile trarre informazioni dagli studi di real life basati sui pazienti inclusi nei Registri SM.

Lo studio si propone di fornire dati di efficacia e sicurezza dei DMDs in pazienti con PMS trattati nella pratica clinica, confrontati con pazienti con PMS non trattati. Obiettivi secondari sono il confronto tra le forme di PMS attiva e non attiva e tra i farmaci di prima e seconda linea.

Questo è uno studio multicentrico, retrospettivo, condotto su dati acquisiti prospetticamente. I pazienti verranno suddivisi in 3 braccia di trattamento a seconda della terapia assunta durante la fase progressiva della malattia (PP o SP): 1) Pazienti in terapia con DMDs di prima linea 2) Pazienti in terapia con DMDs di II linea 3) Pazienti che non assumono DMDs (identificati come gruppo di riferimento o controllo). In ogni gruppo saranno distinti i pazienti con forma attiva e non-attiva (clinicamente e sulla base della risonanza magnetica) secondo i criteri pubblicati da Lublin e Reingold. Per ridurre il rischio di bias derivante dalla mancata randomizzazione i pazienti verranno sottoposti a matching usando il propensity-score sulla base di durata di malattia, sesso, età, punteggio EDSS e terapie precedenti.

Gli endpoint di efficacia comprendono: tasso annualizzato di ricadute, Progression Index, tempo alla progressione dell'EDSS confermato a 3 mesi, tempo alla sospensione della terapia per mancata risposta. Gli endpoint di sicurezza saranno la frequenza e la severità degli eventi avversi e il tempo alla sospensione della terapia per eventi avversi.

Assessing efficacy and safety of treatments in progressive Multiple Sclerosis

Background. The treatment of patients affected by Progressive Multiple Sclerosis (PMS) is controversial and these phenotypes are scarcely represented in RCTs. The European treatment guidelines give indications about the efficacy of Disease Modifying Drugs (DMDs) in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis, in Clinically Isolated Syndrome (CIS) and, as weak recommendation, in primary and secondary progressive multiple sclerosis (PPMS, SPMS). Instead, the North-American guidelines recommend considering discontinuing treatment with DMDs after the shift from the RR to the SP phase of the disease. The paucity of evidence based data on treatment strategies for PMS has many potential explanations: among these, the rarity of the PP course as compared with the RR one, the lack of drug whose mechanism of action is able to tackle the specific pathogenetic mechanisms and neurodegeneration that characterises PMS, the lack of sensitive and well-validated outcome measures assessing progression; inherent difficulties in the diagnosis of progression itself that remains mainly a clinical and retrospective one. At the same time, trial data about tolerability and safety of DMDs in PMS are limited as well. This is an extremely relevant issue: in fact, patients with PMS are usually older than those with RRMS and are at higher risk of age-correlated comorbidities. Moreover, a sizeable proportion of patients shift to the SP course after many years of immune-therapy. In clinical practice, however, a considerable number

of PPMS and SPMS patients are treated with first or second line DMDs, so that some information can be derived from the real-life population of patients included in MS registries.

The objective of the study is to provide real-life data about efficacy and safety of DMDs in PMS, compared with PMS not treated with DMDs. Secondary objectives of the present study are the comparison of results between patients with active PMS and non-active PMS and the comparison of results obtained in PMS using first and second line DMDs.

This is a multicentric, retrospective cohort study based on prospectively acquired data. Patients will be divided into 3 arms according with the treatment exposure during the PMS phase (PP or SP): 1) Patients taking first line DMDs 2) Patients taking second line DMDs 3) Patients taking no DMD (identified as reference or control group). Furthermore, within each group patients will be classified as having active or non-active disease (clinically and/or radiologically) using the Lublin and Reingold classification. To allow for a less biased comparison patients will be propensity score-matched according to disease duration, age, sex, EDSS score and previous therapies.

The primary efficacy endpoints are the annualized relapse rate, progression Index, time to 3- month CDP on the EDSS, time to discontinuation due to non-response. The primary safety end-points are frequency and severity of adverse events and time to discontinuation due to adverse events.

Damiano Paolicelli

Centro Sclerosi Multipla, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Sense, Università degli Studi di Bari, Policlinico di Bari, Bari

Studio di coorte acquisita retrospettivamente sulla valutazione dell'impatto nel lungo termine di differenti strategie terapeutiche su outcomes di disabilità nella Sclerosi Multipla Relapsing. Registro Italiano iMedWeb. Studio RE.LO.DI.MS.

La presente proposta si configura come un ampio studio, multicentrico, osservazionale, di coorte retrospettivo, per valutare l'impatto a lungo termine di diverse strategie di trattamento sugli esiti della disabilità nei pazienti con SM recidivante remittente (SMRR) analizzando i dati del Registro italiano iMedWeb sulla sclerosi multipla (SM). Recenti evidenze mostrano la possibilità che i diversi approcci terapeutici nella SM possano avere effetti simili quando valutati a lungo termine (almeno 4 anni) sulla progressione della disabilità. In particolare, l'impatto a lungo termine di diverse sequenze di trattamento è rilevante in condizioni particolari (ad esempio, per donne che pianificano una gravidanza o per pazienti pediatrici), in cui i clinici possono avere bisogno di rinviare terapie immunosoppressive a favore di farmaci immunomodulatori (come IFN beta-1a SC) con un miglioramento del rapporto rischio/beneficio. Saranno valutati tre gruppi di pazienti affetti da SM, a partire dalla loro prima terapia: i soggetti che hanno iniziato con interferone beta-1a SC 44 mcg e poi passati a Fingolimod (FTY), come prima opzione, e rimasti in trattamento con FTY fino all'ultimo controllo clinico registrato; soggetti in trattamento con FTY, fino all'ultimo follow-up prescritto come trattamento di prima linea (il farmaco orale con il più lungo follow-up) e soggetti che hanno iniziato con IFN beta-1a SC 44 mcg e che hanno proseguito con tale terapia fino all'ultimo follow-up.

Questo è uno studio osservazionale, di coorte. Dati longitudinali verranno estratti dal Registro Italiano iMedWeb sulla SM a partire dal 1 gennaio 2010 (anno di immissione di FTY sul mercato italiano della SM) ad oggi, raccolti in modo retrospettivo. L'intervallo di tempo tra l'interruzione di IFN beta-1a 44 mcg ed il FTY sarà considerato come un periodo di wash-out. I pazienti con un wash-out > o uguale a 3 mesi non saranno inclusi nell'analisi. Per simulare una randomizzazione, gli effetti del trattamento iniziali saranno esplorati facendo corrispondere i gruppi di trattamento (IFN beta-1a 44 mcg SC o FTY) con la tecnica del Propensity Score.

Obiettivo primario dello studio è quello di valutare la percentuale di soggetti con progressione della disabilità confermata (CDP) tra le tre coorti. Verranno esaminate, per paziente, un minimo di 3 visite (inclusa la visita basale) in cui è presente un punteggio EDSS, per poter essere in grado di valutare un evento di progressione della disabilità confermato. Saranno esclusi i punteggi EDSS registrati oltre 30 giorni dopo l'inizio di una ricaduta. Obiettivi secondari: punteggio Roving per l'EDSS in cui viene valutata la variazione di EDSS con tecniche innovative; curve nel tempo dell'EDSS (dal trattamento iniziale all'ultima visita); il tasso annualizzato di ricaduta (ARR); tempo alla prima ricaduta durante il trattamento. Altri obiettivi comprendono la sicurezza a lungo termine.

Retrospective study to evaluate the long-term impact of different treatment strategies on disability outcomes in patients with Relapsing Multiple Sclerosis. Italian IMedWeb MS Registry. RE.LO.DI.MS Study

The present proposal is a large, multicentre, observational, retrospectively acquired cohort study, to evaluate the long-term impact of different treatment strategies on disability outcomes in patients with Relapsing MS (RMS) considering data on Italian IMedWeb MS Registry. Recent findings show the possibility that different treatment approaches may have similar long-term (at least 4 years) effects on disability progression in MS. Notably, the long-term impact of different treatment sequences is particularly relevant in specific conditions (e.g. women pursuing a pregnancy or pediatric patients), in which clinicians may need to postpone immunosuppressive therapies in favor of immunomodulatory drugs (such as IFN beta1a) with an improved risk/benefit ratio. Three groups of MS relapsing (RMS) patients will be evaluated from their first therapy: RMS subjects who started with IFN beta 1a SC 44 mcg switching to FTY, as first option, in treatment with FTY until the last follow-up, compared to RMS patients in treatment with FTY until the last follow-up and prescribed as first-line treatment (the oral drug with the longer follow-up) and patients who started with IFN beta 1a SC 44 mcg in treatment with IFN beta 1a SC 44mcg until the last follow-up.

This is an observational, retrospectively acquired cohort study. Longitudinal data will be extracted from

the Italian iMedWeb MS Registry starting from 1st January 2010 (year of FTY market availability in Italy) to date, collected retrospectively. The time interval between IFN beta 1a 44 mcg cessation and switching to FTY will be considered as an untreated wash-out period. Patients with a wash-out period > or equal at 3 months will be not included in the analysis. To simulate a randomization, initial treatment effects were also explored by matching the treatment groups (IFN beta 1a 44 mcg SC or FTY) with a Propensity Score-based 1:1 matching algorithm.

Primary objective of the study is to evaluate the proportion of subjects with confirmed disability progression (CDP) between the three cohorts. A minimum of 3 visits (incl. baseline) at which an EDSS score has been recorded will be required, by definition, for a patient to be able to evaluate a confirmed disability progression event. EDSS scores recorded within 30 days after the onset of a relapse will be excluded.

Secondary objectives: Roving EDSS score in which the increase or decrease had to be separated from the last EDSS assessment by previous EDSS, the grow curves over time (from the initial treatment to last visit) of the estimated EDSS score, Annualized Relapse Rate (ARR), time to first on-treatment relapse. Additional objectives are on long term safety profile.

Maria Trojano

Centro SM Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso
Università di Bari, Bari

Definire le scelte di trattamento nella SM durante due differenti epoche: un'analisi della real life utilizzando il Registro Italiano SM

Le opzioni terapeutiche per i pazienti con sclerosi multipla (SM) sono progressivamente aumentate durante gli ultimi 20 anni. Gli obiettivi dei DMT (disease modifying treatment) sono la prevenzione delle ricadute e la progressione della disabilità. Nell'Unione Europea sono a disposizione sei farmaci di prima linea e tre farmaci di seconda linea, la decisione terapeutica sia all'esordio della terapia sia in caso di risposta sub-ottimale al trattamento è dunque complessa. L'obiettivo di questo studio è la valutazione del cambiamento dell'approccio terapeutico con l'arrivo dei nuovi farmaci orali di prima linea (teriflunomide e dimetilfumarato).

Lo studio comparerà i criteri di scelta di uno specifico trattamento nei pazienti *naive* e nei pazienti che cambiano terapia in due scenari diversi "l'era dei vecchi iniettabili - Old Era" e "l'era dei primi orali di prima linea - New Era".

Gli obiettivi principali di questa analisi saranno: valutare i fattori determinanti la scelta del primo nelle due ere in un grande campione di pazienti affetti da SM recidivante remittente (SMRR) Italiano; valutare le strategie di modifica del trattamento dopo la sospensione del primo DMT; valutare il profilo di tollerabilità e sicurezza dei nuovi DMTs. Questa analisi retrospettiva sarà divisa in due fasi. Due coorti di pazienti con SMRR saranno valutate separatamente. Per prima verrà valutata una coorte che include tutti

i pazienti che hanno iniziato un primo trattamento o che hanno cambiato il loro DMT durante i 24 mesi che precedono la commercializzazione del primo farmaco orale di prima linea (tefilunomide). Successivamente, si analizzerà una seconda coorte di pazienti che hanno iniziato un primo trattamento o che hanno cambiato dopo il loro DMT durante i 12 mesi successivi la commercializzazione del primo farmaco orale di prima linea, quando tutti i nuovi farmaci sono diventati disponibili (teriflunomide, dimetilfumarato, peg-interferone, alemtuzumab).

L'analisi principale sarà la descrizione della frequenza di distribuzione della prima scelta terapeutica nella popolazione arruolata e delle strategie sequenziali. Le caratteristiche demografiche, cliniche e di risonanza magnetica (RM) basali saranno correlate alle possibilità di scelta. L'eterogeneità tra centri SM e nelle diverse regioni geografiche nell'approccio terapeutico sarà valutata. Il test chi quadro sarà usato per valutare l'eterogeneità tra centri, un modello di regressione logistica sarà utilizzato per determinare l'associazione tra le caratteristiche basali e la scelta del trattamento. L'efficacia del trattamento DMT sarà valutata attraverso il tasso annualizzato di ricadute e dal tempo alla prima relapse dopo l'avvio o il cambio di terapia. La persistenza al trattamento sarà valutata attraverso una analisi di tempo alla sospensione. La sicurezza sarà valutata attraverso il tasso degli eventi avversi.

Profiling treatment choices in MS during two different eras: a real world assessment in the Italian MS Registry

The treatment options for subjects with multiple sclerosis (MS) have expanded dramatically during the past 20 years. The objective of these disease-modifying treatments (DMTs) is the prevention of further relapses and accumulation of disability.

In the European Union neurologists and patients can currently choose from different licensed DMTs, six first-line and three second-line DMTs, making it increasingly difficult for patients and their physicians to choose between treatments at disease onset and in case of non-response to treatment. The aim of this study is evaluate the change in therapeutic approach with the availability of new first line oral drugs (teriflunomide and dimethyl fumarate - DMF). The study will compare the choice criteria to assign a specific DMT in naive and switching patients during the “old injectable era” and during the “first line orals and pegilations era”. The main objectives of this analysis will be: to evaluate the determinants of the first treatment choice at the time of introduction of new therapies in a large Italian relapsing-remitting MS (RRMS) population; to evaluate the switch strategies after the first DMT discontinuation; to evaluate how the treatment choice is changed after the introduction of the new oral first-line drugs; to evaluate the tolerability and safety profile of the new DMTs This retrospective analysis will be divided into two phases and performed as follow: Two cohorts of RRMS patients will

be evaluated separately. First, a retrospective cohort that includes all patients who started treatment as naive or switched their treatment during 24 months prior to the marketing of (i.e. AIFA approval date) the first oral drug first-line (teriflunomide). Second, a retrospective cohort of patients who started treatment as naive or switched treatment posterior to the marketing the first oral drug and covering an initiation or switching period of 12 months when all new drugs are available teriflunomide, DMF, pegylated interferon, alemtuzumab).

The primary analysis will be a description by a frequency distribution of first treatment choice in the enrolled population and of switch strategies. Baseline demographic, clinical and MRI data will be correlated with the DMT choice and timing. Heterogeneity among centres and geographic regions in the therapeutic approach will be evaluated. Chi square test will be used to assess heterogeneity among centres (anonymized) and multivariate logistic regression to evaluate the association of baseline factors with treatment choice.

Efficacy of DMTs will be assessed by the annualized relapse rate (ARR) and by the time to first relapse from treatment start and from treatment switch. Persistence on treatment will be evaluated by the Time to discontinuation. Safety will assess by the evaluation of the rate of the adverse event.

Maria Trojano

Centro SM Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso
Università di Bari, Bari

Big Multiple Sclerosis Data (BMSD) network

Il progetto denominato BMSD network è una collaborazione avviata nel 2014 tra la rete dei centri sclerosi multipla (SM) Italiani, denominata iMedWeb network, successivamente confluita in toto nel Registro SM Italiano, 3 registri SM Europei (i registri Svedese, Danese e Francese) e la rete internazionale MSBase.

Obiettivo principale di questa collaborazione è quello di cercare di risolvere questioni chiave nella ricerca sulla SM e nella gestione del paziente attraverso la condivisione di dati su larga scala. Nella fase iniziale del progetto, avviata nel 2014 e conclusasi nel 2015, è stata verificata la fattibilità tecnica dello stesso.

È stato nominato uno *steering committee* del progetto costituito dai rappresentanti dei 5 registri: Maria Trojano per il Registro Italiano SM; Helmut Butzkueven per MSBase; Michel Clanet per l'OFSEP (Francia); Melinda Magyari per il Registro Danese ed il Jan Hillert (coordinatore dello steering committee) per il registro SM Svedese. È stato inoltre costituito un data

management sub-committee, che avrà la responsabilità di gestire la fase di condivisione dei dati confluenti dai 5 registri e di analizzare i dati. Questo gruppo di lavoro è coordinato da Pietro Iaffaldano (Registro Italiano SM) e costituito dai data manager di ciascun registro: Tim Spelman (MSBase); Nils Koch-Henriksen (Registro Danese); Leszek Stawiarz (Registro Svedese); Roman Casey (OFSEP). Sono stati elaborati 3 progetti di ricerca, utili soprattutto a testare le possibilità del progetto globale.

Gli obiettivi di questi studi sono: valutare l'efficacia a lungo termine del trattamento precoce con farmaci modificanti la malattia (DMT) rispetto a quello tardivo; studiare l'impatto a lungo termine delle DMT sulla progressione della malattia clinica nei pazienti con SMRR trattati rispetto a pazienti con SMRR non trattati e per valutare l'efficacia a lungo termine comparativa delle DMT di prima linea - DMT iniettabili e azatioprina.

Big Multiple Sclerosis Data (BMSD) network

The project called BMSD network is a collaboration started in 2014 between the network of Italian multiple sclerosis (MS) centers, called iMedWeb network, subsequently merged into the Italian SM Register, 3 SM European registers (the Swedish, Danish and French registers) and the international MS-Base network

The main objective of this collaboration is to try to solve key issues in MS research and patient management through large-scale data sharing. In the initial phase of the project, started in 2014 and concluded in the 2015, the technical feasibility of the project was verified.

A steering committee of the project has been appointed consisting of representatives of the 5 registers: Maria Trojano for the Italian SM Registry; Helmut Butzkueven for International MSBase database; Michel Clanet for the OFSEP of France; Melinda Magyari for the Danish MS Registry and Jan

Hillert (steering committee coordinator) for the Swedish MS Registry MS Registry. A data management sub-committee was also set up, which will be responsible for managing the phase of sharing the data from the 5 registers and analyzing the data. This working group is coordinated by Pietro Iaffaldano (Registro Italiano SM) and is made up of the data managers of each registry: Tim Spelman (MSBase); Nils Koch-Henriksen (Danish Registry); Leszek Stawiarz (Swedish Registry); Roman Casey (OFSEP).

Three research projects have been elaborated, useful above all to test the possibilities of the global project. The objectives of the studies are: to evaluate the very long-term efficacy of early versus delayed DMTs treatment; to investigate the very long-term impact of DMTs on clinical disease progression in RRMS patients DMTs treated versus untreated RRMS patients and to evaluate the comparative long-term efficacy of first line DMTs - Injectables DMTs and Azathioprine.

Francesco Patti

Centro Sclerosi Multipla AOU Policlinico Vittorio Emanuele di Catania,
Policlinico G. Rodolico, Catania

Studio pilota retrospettivo sugli effetti a lungo termine di Cladribina in pazienti affetti da sclerosi multipla recidivante remittente o sindrome clinicamente isolata

Questo studio mira a raccogliere dati sul follow-up nella pratica clinica dopo il trattamento con Cladribina, limitato a pazienti reclutati in centri italiani. I dati anonimizzati saranno raccolti in modo retrospettivo tramite iMedWeb. Il periodo di studio sarà il tempo necessario per l'estrazione di tutti i pazienti dal database. La raccolta dei dati, utilizzando il database iMed, dovrebbe durare fino a circa 3 mesi. Le fonti di informazioni saranno i dati raccolti dal database iMed. I dati verranno inseriti nel modulo elettronico di segnalazione, da parte del personale del sito. Sono previsti circa 161 soggetti (studi ORACLE 67 pazienti, CLARITY 66 pazienti, ONWARD 28 pazienti).

Le analisi di questo studio avranno due obiettivi esplorativi: in primo luogo verranno valutati la fattibilità di un grande studio retrospettivo finalizzato alla valutazione dei trattamenti post-trial e del corso di malattia in pazienti con sindrome clinicamente isolata o con sclerosi multipla recidivante e remittente ar-

ruolati in studi randomizzati di efficacia. Questa valutazione sarà basata sulla valutazione complessiva della percentuale di pazienti persi per il follow-up e sulla qualità e completezza dei dati recuperati. In secondo luogo, le informazioni descrittive ottenute da questo studio sui trattamenti post-trial e sul corso della malattia saranno anche critici per la progettazione dello studio osservazionale su larga scala. Per l'endpoint primario, l'analisi del tempo per il trattamento sarà valutata mediante classica curva di sopravvivenza di Kaplan Meier.

Questa valutazione sarà completata da analisi concorrenziale dei rischi, in cui le ragioni di fine trattamento saranno considerate separatamente. Le incidenze cumulative dei motivi concorrenti per il fine trattamento saranno opportunamente calcolate tenendo conto di: inizio di una nuova terapia, nessun ulteriore trattamento (dopo un anno dall'ultimo ciclo di Cladribina, morte, sconosciuto).

Retrospective pilot study on long-term Cladribine effects in patients with relapsing remitting multiple sclerosis or clinically isolated syndrome

The aim of this Italian pilot study is to explore the feasibility of the retrospective approach for evaluating effectiveness in subjects previously treated with Cladribine and then followed as per clinical practice. The study results can inform on feasibility and identify modifications needed in a design of a larger, ensuing hypothesis testing study, where many different European Countries will be involved. The study will be conducted as a retrospective, observational study of patients with clinically isolated syndrome (CIS) or relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) treated with Cladribine as inclusions/exclusions criteria in the pivotal trials. This study aims to collect data on follow-up in clinical practice after Cladribine treatment, limited to patients recruited in Italian Centers. Data will be collected retrospectively through iMedWeb Database, which contains anonymous clinical data. The study period will be the time required for the abstraction of database for all patients. Data collection, using iMed database, is expected to last up to approximately 3 months following Study initiation. The source of information will be data collected from iMed database. Data will be entered into the electronic case report form by site staff. Approximately 161 subjects are planned to be included. The analyses of this study will have

two exploratory objectives: first, the feasibility of a large, retrospective study aimed at evaluating post-trial treatments and disease course in CIS/RRMS patients enrolled in randomized efficacy trials will be assessed. This assessment will be based on the overall evaluation of the proportion of patients lost-to follow-up, and on quality and completeness of retrieved data. Second, the descriptive information obtained from this study on post-trial treatments and disease course will be valuable on its own, but will be also critical for the design of the large-scale observational study. In the analyses of the primary endpoint, Time to treatment change will be analysed by means of a classical Kaplan Meier Survival analysis, with start of a new therapy, treatment stop or death will be considered as events while survival times of patients lost to follow-up before starting a new therapy will be censored at the time of last information. This analysis will be complemented by a competing risk analysis, in which the reasons for treatment stop will be considered separately, using the Nelson-Aalen estimator of the cause-specific cumulative hazards: the cumulative incidences of the following competing reasons for treatment stop will be computed: start of a new therapy, no further treatment (after one year since last Cladribine course, death, unknown).

Emanuele D'Amico

Centro SM, AOU Policlinico Vittorio Emanuele Di Catania, Policlinico G. Rodolico, Catania

Confronto sull'efficacia delle prime linee terapeutiche dei pazienti con sclerosi multipla: risultati da uno studio multicentrico

Evidenze da studi real-life sulla scelta ed efficacia della prima linea terapeutica per il trattamento della sclerosi multipla recidivante-remittente (SMRR) sono poche.

Questo studio si propone di valutare l'efficacia e i profili di interruzione dei farmaci di prima scelta nel trattamento dei pazienti con SMRR di nuova diagnosi. Questo sarà uno studio di coorte retrospettivo con raccolta di dati collezionati in modo prospettico. I centri specializzati nella cura della SM saranno invitati a

partecipare al progetto. I centri per la SM sono attivi in Italia e sono afferenti dal Registro Italiano per la SM. I pazienti con SMRR che hanno ricevuto diagnosi dal 1° gennaio 2010 al 31 dicembre 2015 saranno identificati e saranno considerati per entrare nello studio. I risultati includeranno i dati inerenti il tasso annualizzato di recidive (ARR), le progressioni di disabilità confermata e di attività neuroradiologica; la persistenza al trattamento e l'interruzione della terapia per qualsiasi motivo.

Comparative effectiveness of initial treatment choices for multiple sclerosis: a multicentre study

Real-world studies about effectiveness of initial disease-modifying treatment (DMT) choices for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) are scarce.

This study aims to assess the effectiveness and drug discontinuation rates of new first DMT choices among patients with newly diagnosed RRMS.

This will be a retrospective cohort study used prospectively collected data. Centers specialized in MS care will be invited to join the project. The MS

centers are settled in Italy and they are recognized by the Italian Registry for MS.

Patients with RRMS who received diagnoses from January 1, 2010, to December 31, 2015 will be identified and will be considered to enter the study.

Outcomes will include annualized relapse rate (ARR), proportions relapse free, confirmed progression free, proportions neuroradiological activity free, treatment persistence, discontinuation of therapy due to any reason.

Francesco Patti

Centro Sclerosi Multipla AOU Policlinico Vittorio Emanuele di Catania,
Policlinico G. Rodolico, Catania

Valutazione dell'efficacia di diversi schemi di somministrazione di Natalizumab in real word life: uno studio retrospettivo multicentrico italiano

I medici specialisti che si occupano di gestire il trattamento della sclerosi multipla (SM) cercano costantemente di bilanciare i rischi e benefici dei farmaci specifici per tale patologia, molti dei quali sono dotati di notevole efficacia clinica ma gravati da numerosi effetti collaterali. In particolare, il natalizumab (NTZ) ha dimostrato in diversi studi clinici di essere in grado di ridurre significativamente l'attività clinica e neuro-radiologica di tale malattia, pur essendo associato a una complicanza potenzialmente fatale conseguente alla riattivazione del virus JC latente (JCV), la leuco-encefalopatia multifocale progressiva (PML). Questo studio multicentrico retrospettivo risponde alla domanda su quale effetto clinico può avere una dilazione della frequenza di somministrazione di NTZ sulla gestione della SM. Infatti, l'obiettivo principale di questo studio è quello di valutare l'efficacia e la sicurezza di NTZ quando viene somministrato secondo una frequenza di infusione minore rispetto ai protocolli di somministrazione standard.

Tutti i pazienti con SM recidivante-remittente idonei per lo studio saranno stratificati in quattro gruppi sulla base del programma di trattamento NTZ ricevuto: pazienti con "intervallo standard" di somministrazione che praticano l'infusione ogni 28-34 giorni; "intervallo intermedio" che comprende pazienti che sono stati infusi ogni 35-41 giorni; "intervallo prolungato" che include pazienti che effettuano l'infusione con una

frequenza compresa tra 42 e 48 giorni; "intervallo molto prolungato" che comprende i pazienti che hanno una frequenza di infusione superiore a 48 giorni. I seguenti dati verranno estratti tramite software iMed: caratteristiche demografiche, dati clinici, tempo al raggiungimento dei punteggi EDSS 4.0 e 6.0; sintomi e segni all'esordio e alle visite di controllo; punteggi EDSS all'inizio e alle visite di controllo; comorbidità, numero totale di recidive, numero di recidive nell'anno prima di NTZ e durante NTZ, esposizione a farmaci immunomodulanti e/o immunosoppressori prima di NTZ, dati sul trattamento con NTZ (data di inizio NTZ, numero di dosi somministrate, motivo della sospensione: rischio PML, gravidanza, evento avverso, scelta del paziente o mancanza di efficacia del trattamento), stato JCV all'inizio di trattamento con NTZ e all'ultimo follow-up (con valore index), PML (data di esordio, sintomi all'esordio, tipo di trattamento, numero di dosi di NTZ somministrate prima dell'esordio della PML, esito, dati RM alla diagnosi PML), dati neuroradiologici. Per valutare l'incidenza delle recidive nei 4 gruppi durante il trattamento con NTZ verrà utilizzato un modello di regressione multivariata di Poisson, mentre una regressione multivariata di Cox verrà utilizzata per valutare il tempo alla prima ricaduta e il punteggio EDSS 4 e 6. Tutti i modelli verranno adattati per le seguenti covariate al *baseline*. Verrà quindi eseguita un'analisi con calcolo del propensity score.

Comparative effectiveness of different Natalizumab dosing schedules in real world life: a retrospective Italian multicentre study

Physicians treating patients with multiple sclerosis (MS) are consistently attempting to balance the risks and benefits of all medications available for MS treatment. In particular, natalizumab (NTZ) treatment has exhibited a substantial reduction in both clinical and radiographic evidence of disease activity in several clinical trials even though it is associated with a potentially fatal complication by reactivation of latent JC virus (JCV), progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). This retrospective multicentre study answers the question what clinical effect extended interval dosing (EID) schedules of NTZ has on managing MS. Indeed, the main objective of this study is to evaluate the effectiveness and safety of NTZ when is administered according the extended dosing strategy compared to standard scheduled administration.

All relapsing-remitting MS patients eligible for the study will be stratified into four groups based on NTZ treatment schedule received: standard interval dosing (SID) including patients who received infusions on average every 28-34 days; intermediate late extended dosing (ILED) including patients who have been infused on a schedule every 35 -41 days; late extended dosing (LED) including patients infused on a schedule every 42-48 days; very late extended dosing (VLED) including patients infused on a schedule higher than 48 days. We will collect using iMed soft-

ware the following data: demographic characteristics, clinical data about MS (time to reach EDSS 4.0 and 6.0, symptoms and signs at onset and at follow-up visits, EDSS scores at onset and at last visit, comorbidity, total number of relapses, number of relapses in the year before NTZ and during NTZ, immunomodulant exposure prior to NTZ, immunosuppressive exposure prior to NTZ); NTZ treatment data (start date NTZ, number of doses administered, reason of discontinuation: progressive multifocal leukoencephalopathy concern, pregnancy, adverse event, patient's choice or lack of efficacy of the natalizumab treatment), JCV status at NTZ treatment onset and at last follow-up, PML (date of onset, symptoms at onset, type of treatment, number of NTZ administered before onset of PML, outcome, MRI data at PML diagnosis), MRI data at diagnosis and at follow-up visits. A multivariate Poisson regression model accounting for overdispersion will be used to assess incidence of relapses in the 4 groups during NTZ treatment, whereas multivariate Cox proportional hazards regression was used to model the time to reach the 1st relapse and EDSS score 4 and 6. All the models will be adjusted for the baseline covariates. Furthermore, to allow for an unbiased comparison, these patients will be propensity score-matched on a one-to-one basis.

Matilde Inglese

Centro per lo Studio e la cura della Sclerosi Multipla e Malattie Demyelinizzanti – DiNOGMI, Ospedale Policlinico San Martino, Genova

Il concetto di persistenza nel miglioramento di disabilità: un'applicazione del modello di Markov ai pazienti trattati del Registro Italiano

Il concetto di miglioramento di disabilità sulla scala EDSS in seguito al trattamento ricevuto è stato recentemente introdotto nella sclerosi multipla (SM) per gli studi condotti su pazienti trattati con terapie altamente efficaci. Diversi trattamenti hanno mostrato non solo un effetto nel ridurre il rischio di progressione di EDSS, ma sono risultati efficaci nell'indurre un miglioramento sulla stessa scala. Recentemente, uno studio prospettico, condotto su circa 5000 pazienti con sclerosi multipla recidivante remittente (SMRR), trattati con Natalizumab, ha evidenziato una regressione media di EDSS fino a 5 anni di follow-up e la probabilità di miglioramento di EDSS (27% a 5 anni) è risultata più alta del tasso di progressione (14% a 5 anni). Altri studi osservazionali hanno confrontato, tra gli altri, la probabilità di miglioramento sull'EDSS in pazienti trattati con Natalizumab vs Fingolimod. Entrambi gli studi hanno riportato una differenza significativa tra i due trattamenti in favore di Natalizumab con un tasso più elevato di miglioramento di EDSS sostenuto nel tempo. Un'importante punto non ancora approfondito nell'esaminare la probabilità di miglioramento su scala EDSS è relativo al tempo totale nel quale il paziente mantiene il miglioramento raggiunto quando confrontato con i livelli di EDSS pre-trattamento.

Il principale obiettivo di questo progetto di ricerca è

di sviluppare i metodi statistici opportuni per quantificare e testare l'insorgenza e la persistenza di un miglioramento di EDSS, usando i dati da una coorte di pazienti trattati con Natalizumab estratti dal Registro Italiano. Verrà selezionato un gruppo di controllo di pazienti trattati con Fingolimod per settare un test d'ipotesi che valuti se la persistenza di miglioramento è significativamente differente tra i due gruppi. La scelta di sviluppare questa metodologia sui pazienti trattati con Natalizumab è basata su dati precedenti che hanno mostrato come questo trattamento sia in grado di indurre un miglioramento nei pazienti con SM.

Nella prima fase tutti i pazienti con SMRR di età ≥ 18 anni inclusi nel Registro e trattati con Natalizumab o Fingolimod saranno estratti. Verranno utilizzate tutte le caratteristiche demografiche e cliniche (età, sesso, EDSS, durata di malattia, relapse pre-trattamento, precedente terapia) presenti nel dataset minimo del Registro.

Nella seconda fase, i dati saranno analizzati per mezzo dei modelli di Markov usando Stata e R. Il risultato atteso è lo sviluppo di una statistica per quantificare la prevalenza dei pazienti migliorati nel tempo, la determinazione dei suoi intervalli di confidenza ed un test statistico per confrontare questa prevalenza tra i gruppi a confronto.

The concept of persistence in disability improvement: an application of Markov model to treated patients from the Italian Registry

The concept of EDSS improvement due to a treatment has been recently introduced in multiple sclerosis (MS) studies for patients treated with highly effective therapies. Some drugs showed not only an effect in reducing the risk of EDSS progression, but resulted able to induce an EDSS improvement. Recently, a prospective study conducted on about 5000 RRMS patients treated with Natalizumab, revealed a mean regression of EDSS up to 5 years of follow-up and the probability of EDSS improvement (27% at 5 years) was higher than the progression rate (14% at 5 years). Other real world studies, compared, among other outcomes, the probability of EDSS improvement in patients treated with Natalizumab vs Fingolimod. Both studies reported a significant difference between the two treatments in favour of Natalizumab with a higher sustained rate of EDSS improvement. An important issue not addressed when examining the probability of EDSS improvement is how long the patient maintains the improvement status as compared with pre-treatment EDSS levels. The main aim of this research project is to develop statistical methods to quantify and test the insur-

gence and the persistence of EDSS improvement, using data from a cohort of patients treated with Natalizumab extracted by the Italian Registry. We will select a control group of patients treated with Fingolimod to set up a hypothesis test assessing whether the persistence of improvement is significantly different between two groups.

The choice of developing this methodology on Natalizumab treated patients is based on previous data showing that this treatment is able to induce an improvement in MS patients. In the first phase all RRMS of age >18 years included in the Registry and who are treated with Natalizumab or Fingolimod will be extracted. All demographic and clinical characteristics (Age, EDSS, disease duration, relapse status pre-treatment) present in the minimum dataset of the registry will be used. In the second phase, data will be analysed by mean of Markov models using Stata and R. The expected result is the development of a statistic to quantify the prevalence of improved patients over time, the quantification of its confidence intervals and a statistical test to compare this prevalence curve between groups.

FATTORI PROGNOSTICI E MODELLI PREDITTIVI DI RISPOSTA ALLA TERAPIA /
PROGNOSTIC FACTORS AND PREDICTIVE MODELS OF RESPONSE TO THERAPY

Roberto Bergamaschi

Centro SM, Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino, Pavia

Predire precocemente l'evoluzione sfavorevole dei pazienti con Sindrome Clinicamente Isolata (CIS). Lo studio RECIS (Risk Estimate for CIS)

Questo progetto multicentrico mira a definire modelli prognostici per la previsione di perdere lo stato NEDA (No Evidence of disease activity) nei pazienti con sindrome clinicamente isolata CIS, attraverso l'analisi di un ampio set di variabili cliniche e strumentali (risonanza magnetica, potenziali evocati, liquido cerebrospinale) raccolti in pazienti affetti da CIS. Vogliamo includere nell'analisi i dati di 357 pazienti provenienti da 4 centri SM (Bari 110, Firenze 103, Gallarate 48, Pavia 96) selezionati sulla base dei seguenti criteri: sindrome clinicamente isolata; prima valutazione neurologica entro tre mesi dall'esordio; primo esame RM suggestivo di SM entro un mese dalla prima valutazione neurologica.

Al fine di definire i modelli prognostici per la perdita dello stato NEDA nei pazienti con CIS, caratterizze-

remo tutti i pazienti arruolati sulla base della loro diversa "propensione" per raggiungere l'endpoint sfavorevole, adattando modelli predittivi basati su approcci bayesiani. Abbiamo utilizzato un modello multivariabile multiplo e un approccio teorico informativo per analizzare preliminarmente le registrazioni di 76 pazienti al fine di ottenere un modello prognostico per il rischio di perdere lo stato di NEDA. I pazienti che hanno perso NEDA erano 59 (77%): 31 a 6 mesi, 14 a 12 e 14 a 24 mesi. Stiamo continuando ad analizzare tutti i dati raccolti dai 357 pazienti e sviluppare il miglior modello prognostico, confrontando approcci bayesiani e frequentisti. Inoltre ci proponiamo di creare un punteggio prognostico personalizzato e di validare il modello e il punteggio prognostico individuale su set di dati diversi.

Early prediction of unfavorable evolution of Clinically Isolated Syndrome (CIS) patients. RECIS (Risk Estimate for CIS) study

This multicenter project aims to define prognostic models for the prediction of losing NEDA status in CIS patients, through the analysis of a large set of clinical and instrumental variables (MRI, evoked potentials, cerebrospinal fluid) collected in CIS patients. We include in the analysis the records of 357 patients from 4 MS Center (Bari 110; Firenze 103; Gallarate 48; Pavia 96) selected on the basis of the following criteria: clinically isolated syndrome; first neurological evaluation within three months from onset; first MRI examination suggestive for MS within one months from first neurological evaluation.

In order to define prognostic models for the prediction of losing NEDA status in CIS patients, we will characterize all the patients enrolled on the basis of

their different “propensity” to reach the unfavourable end-point, by fitting predictive models based on frequentist and on Bayesian approaches. We used a multiple multinomial logit model and an information theoretical approach to preliminary analyze the records of 76 patients in order to obtain a prognostic model for the risk of losing NEDA status. Patients losing NEDA were 59 (77%): 31 at 6 months, 14 at 12, and 14 at 24 months. We are in process to analyze all the collected records (357 patients); develop the best prognostic model, comparing Bayesian and frequentist approaches; setting up of a personalized prognostic score and validate of the prognostic model and of the individual prognostic score on different data set.

FATTORI PROGNOSTICI E MODELLI PREDITTIVI DI RISPOSTA ALLA TERAPIA /
PROGNOSTIC FACTORS AND PREDICTIVE MODELS OF RESPONSE TO THERAPY

Maria Trojano

Centro SM, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso
Università di Bari, Bari

Analisi del Registro Italiano di Sclerosi Multipla per studiare il concetto di Progressione Indipendente dalle Ricadute

La sclerosi multipla (SM) è una patologia caratterizzata da ricadute cliniche, tuttavia evidenze scientifiche sottolineano che è presente una progressione della malattia indipendente dalle ricadute, che si può osservare anche in pazienti in trattamento.

Questo studio ha come obiettivo la valutazione in un contesto di pratica clinica reale del tasso di progres-

sione della disabilità e la descrizione dei fattori associati alla progressione della disabilità indipendente dalle ricadute.

Lo studio verrà condotto mediante estrazione ed analisi dei dati presenti nel registro FISM raccolti dalla sua istituzione all'anno 2017.

INSPIRA - Italian analysis of the National multiple sclerosis registry Studying the concept of Progression Independent from Relapse Activity

Multiple Sclerosis (MS) is a disease characterized by clinical relapses, however scientific evidences underline the presence of a disease progression independent from relapses, which could occur also in patients under treatment.

The present study aims at evaluating the rate over

time of disability progression and the factors associated to the disability progression unrelated to relapse in a real world setting.

The study foresees the extraction and analysis of data collected within the FISM Registry from its constitution to 2017.

Maria Trojano

Centro SM, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso
Università di Bari, Bari

Confronto tra due diversi algoritmi di trattamento nella sclerosi multipla recidivante: approccio aggressivo sin dall'esordio in confronto al classico schema sequenziale

Farmaci modificanti il decorso della malattia (DMTs) altamente efficaci per la sclerosi multipla, come natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone o fingolimod, presentano una efficacia superiore ai cosiddetti farmaci di prima linea (es. l'interferone beta) sui parametri di attività di malattia.

Ad oggi, l'algoritmo di trattamento più frequentemente utilizzato è basato sulla strategia di escalation. Si inizia il trattamento con dei farmaci di prima linea (interferon β , glatiramer acetato, teriflunomide or dimetilfumarato) e si passa ad un farmaco a maggiore efficacia nei pazienti che nonostante il trattamento manifestino riacutizzazioni o progressione della disabilità. Ad oggi non è noto se i pazienti che iniziano la terapia con un farmaco ad alta efficacia abbiano dei vantaggi a lungo termine sulla disabilità in confronto ai pazienti che iniziano con un trattamento di prima linea. Dati provenienti da confronti indiretti a partire

dalle fasi di estensione e analisi per sottogruppi dei trial clinici suggeriscono che le terapie ad alta efficacia siano associate ad un miglior controllo dell'attività clinica (effetto sulle riacutizzazioni) quando iniziate precocemente rispetto all'esordio della malattia. Tuttavia, il rapporto tra il corretto timing della terapia e la sua efficacia rispetto agli outcome di disabilità non è ancora stato chiarito.

Utilizzando la coorte globale del Registro Italiano Sclerosi Multipla, noi valuteremo l'efficacia comparativa rispetto al tasso di ricadute e ad outcome di disabilità in pazienti che sono stati trattati con uno dei 4 farmaci ad alta efficacia (natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone, fingolimod) come primo farmaco ed in pazienti che hanno iniziato la loro storia terapeutica con un farmaco di prima linea (interferon β , glatiramer acetato, teriflunomide or dimetilfumarato).

Early-aggressive treatment algorithm versus classical escalation therapy in relapsing multiple sclerosis

Higher-efficacy disease modifying therapies (DMTs) for multiple sclerosis (MS), such as natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone or fingolimod, have a consistently superior effect on disease activity than firstline MS therapies, such as interferon β .

To date, the most applied treatment algorithm is based on the escalation strategy, initiating treatment with one of the registered first-line DMTs (interferon β , glatiramer acetate, teriflunomide or dimethylfumarate) and escalating to a higher-efficacy agent in patients who experience on-treatment relapses or progression of disability.

Whether patients initiating higher-efficacy DMTs as their first therapy derive a greater benefit from treatment than those who start with the first-line agents, remains a matter of debate. Indirect comparisons

from extension arms and subgroup analyses of randomized trials suggest that higherefficacy therapies are associated with improved control of relapse activity when initiated earlier after MS onset.

However, the effect of timing on the effectiveness of therapies on disability outcomes is still to be clarified. Using the global Italian Multiple Sclerosis Registry cohort, we will evaluate the comparative efficacy on relapse and disability outcomes in patients who commenced one of four higher-efficacy DMTs (natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone, fingolimod) as their first treatment and in patients who started their treatment history with the first-line agents (interferon β , glatiramer acetate, teriflunomide or dimethylfumarate).

Marzia Romeo

Centro Sclerosi Multipla, Ospedale San Raffaele, Milano

Fattori predittivi di progressione di disabilità in un'ampia coorte italiana di pazienti affetti da sclerosi multipla

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica demielinizzante del sistema nervoso centrale ed è la causa più comune, non traumatica, di disabilità nei giovani adulti. La maggior parte dei pazienti presenta, nella fase iniziale della malattia, un andamento caratterizzato da episodi acuti di peggioramento clinico, definiti ricadute o esacerbazioni, seguiti da una fase di remissione della malattia. La fase secondariamente progressiva di malattia (SP), segue la fase a ricadute e remissioni dopo un tempo variabile dall'esordio di malattia ed è caratterizzata da progressivo accumulo della disabilità senza remissione. Una percentuale minore di pazienti (10-15%) presenta, invece, un decorso progressivo sin dall'esordio della malattia in assenza di episodi clinici acuti. Questa forma di malattia è definita sclerosi multipla primariamente progressiva (SM-PP).

Nella pratica clinica quotidiana l'identificazione del cambio di decorso di malattia avviene spesso in ritardo. Il ritardo nella diagnosi è anche imputabile all'assenza di marcatori di laboratorio o test specifici per la diagnosi di SM-SP e all'assenza di chiari predittori clinici di progressione di disabilità. La dia-

gnosi precoce permetterebbe di introdurre nella breve finestra di opportunità d'intervento (la fase di transizione verso un decorso progressivo) farmaci con potenziale effetto neuro-protettivo. L'ocrelizumab e il siponimod (BAF312) sono i primi farmaci a essersi dimostrati efficaci nelle forme progressive di malattia.

Recentemente dalla collaborazione tra la FISM e l'Università di Bari è nato il Registro Italiano sulla SM che raccoglie gran parte dei pazienti provenienti dai vari centri SM italiani. Lo studio di quest'ampia popolazione di pazienti permetterebbe di individuare le variabili demografiche, cliniche e neuroradiologiche che identificano precocemente l'evoluzione progressiva della malattia in modo da poter intervenire precocemente, anche in questi pazienti, con terapie efficaci sul decorso progressivo di malattia. Il trattamento precoce nei pazienti con variabili predittive sfavorevoli di andamento progressivo di malattia permetterebbe di rallentare il processo degenerativo con conseguente riduzione del danno irreversibile e della spesa sanitaria associata all'elevata disabilità nella SM.

Predictive factors of disability progression in a large cohort of italian multiple sclerosis patients

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common cause of neurological disability in young adults globally. It is a chronic degenerative illness and therefore carries a high economic and quality of life burden associated with it. One of the principal objectives in the care of people with MS is, therefore, to reduce the irreversible accumulation of neurological disability. The diagnosis of progressive MS is clinical and retrospective because based on the patient's history and the neurological exam. In everyday clinical practice, the identification of the change in disease course is often late and there are no applicable predictors of disability progression. Therefore, the objective of the present study is to identify the predictive factors of disability progression in patients with progressive course of MS included in the datasets of the Italian MS Registry. The population of the Italian MS Registry is

representative of MS population of our Country and includes a large number of patients. This is a retrospective longitudinal study enrolling patients with secondary progressive MS (SP-MS), primary progressive MS (PP-MS) and relapsing-remitting MS (RR-MS) with Expanded Disability Status Scale (EDSS) > 4.0 and without disease activity (clinical and MRI) in the previous 6 months. A 2-year follow-up is required. The outcome of the three groups of patients, defined as disability progression sustained for at least 6 months and confirmed at the end of the 2 years' follow-up, will be compared in order to identify demographic, clinical and brain MRI variables predictive of disability progression. The early identification of patients with unfavorable predictive variables will allow treating patients with the new coming soon therapies for MS (ocrelizumab and siponimod).

Maria Pia Amato

Dipartimento NEUROFARBA, Divisione di Riabilitazione Neurologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, IRCCS Fondazione Don Carlo Gnocchi, Firenze

E-MUSIC: Early Multiple Sclerosis Italian Cohort

Questo studio multicentrico si propone di identificare un'ampia corte di pazienti Italiani, rappresentativi della popolazione generale dei pazienti con sclerosi multipla (SM), seguiti prospetticamente nel tempo a partire dal primo episodio clinico suggestivo di SM, in modo standardizzato. Tale corte, una volta identificata, potrà arricchirsi di nuovi pazienti e rappresentare il riferimento per proposte di studi osservazionali su larga scala i cui obiettivi saranno di volta in volta proposti dai ricercatori dei Centri SM Italiani. Scopo di questo primo progetto è valutare, in questa corte di pazienti, se ed in che misura varino gli indicatori prognostici di malattia all'esordio (compresa l'esposizione a farmaci modificanti il decorso) in tre sottogruppi di pazienti suddivisi in base all'età di esordio dei sintomi: Pediatric Onset Multiple Sclerosis (POMS, età d'esordio = 18 anni), Adult Onset Multiple Sclerosis (AOMS, età d'esordio "classica" tra 18 e 49 anni compiuti) e Late Onset Multiple Sclerosis (LOMS, età d'esordio = 50anni). Gli outcome clinici che verranno presi in considerazione sono: a) il tempo alla conversione da sindrome clinicamente isolata (CIS) a SM clinicamente definita (SMCD) o l'intervallo di tempo tra il I e il II episodio di SM (se il paziente soddisfa già al primo episodio i criteri diagnostici per SM) b) il tempo al primo peggioramento della disabilità confermato a 3 mesi. I singoli indicatori prognostici

stici saranno distinti in predittori a basso, medio ed alto impatto prognostico sulla base dei risultati dell'analisi statistica. Sarà anche analizzata la risposta e tollerabilità ai Disease Modifying Drugs (DMDs) nei tre sottogruppi.

Questo studio di corte retrospettivo, eseguito su dati acquisiti prospetticamente, multicentrico (studio di tipo 1) su pazienti seguiti fin dal primo episodio clinico suggestivo di SM a partire dal 1° gennaio 2008 (inclusi nel registro da non oltre 10 anni). Verranno analizzati come possibili predittori prognostici all'esordio il sesso, l'età all'esordio categorizzata in 3 gruppi (POMS, AOMS e LOMS), il tipo di decorso (primariamente progressivo o recidivante remittente), la familiarità per SM (parente di I o II grado), le comorbidity, il numero e il tipo di sistema funzionale coinvolto, la topografia del I episodio clinico (Neurite Ottica isolata, sindrome spinale isolata, sindrome sopratentoriale isolata - incluso un esordio ADEM-like - sindrome isolata del troncoencefalo; multifocale se l'esordio coinvolge più di due di queste sindromi topografiche), il carico lesionale alla Risonanza Magnetica, la presenza di sintesi intratecale di IgG all'esame del liquor, l'esposizione ed il tipo di terapie modificanti il decorso di malattia (DMDs di I o II linea), la latenza tra l'esordio clinico della malattia e l'introduzione di una prima DMD.

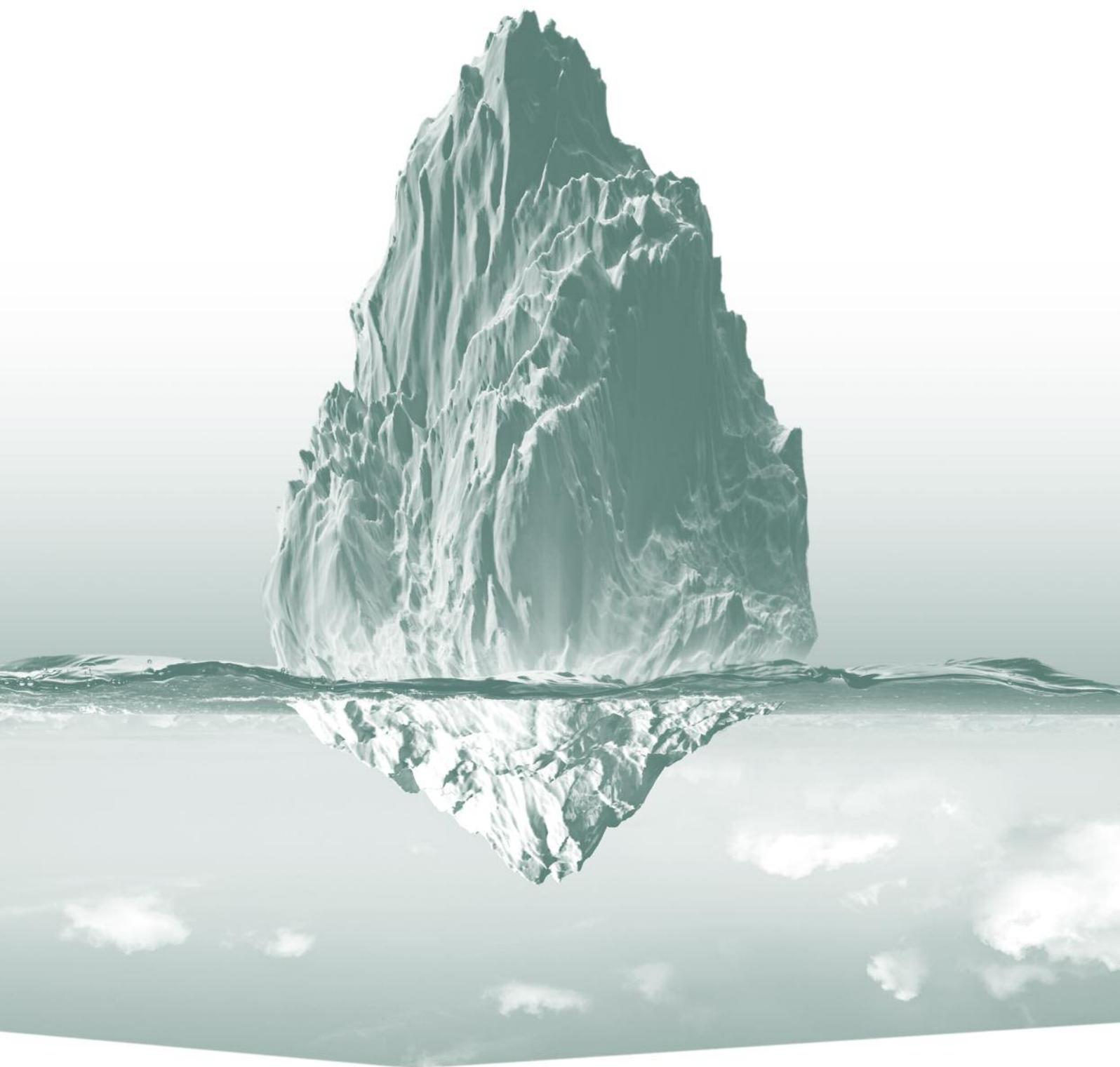
E-MUSIC: Early Multiple Sclerosis Italian Cohort

This multicentric project aims to identify a cohort of Italian MS patients presenting with a first clinical episode suggestive for MS and prospectively follow them in a standardized manner. This cohort will constitute a meeting point for all the MS Italian centres for study proposals, especially large observational studies with various objectives.

The aim of this first project is to evaluate if and how the prognostic indicators vary in 3 subgroups of patients with different age at onset: Pediatric Onset Multiple Sclerosis (POMS, age at onset = 18 years), Adult Onset Multiple Sclerosis (AOMS, age at onset from 18 and 49 years) and Late Onset Multiple Sclerosis (LOMS, age at onset = 50 years). The outcomes of the study will be: a) time to conversion from clinically isolated syndrome (CIS) to clinically defined MS (CDMS) or from the I to the II clinical episode (for those who fulfil the McDonald's 2010 criteria from the first episode); b) time to a first confirmed EDSS worsening at 3 months. The single prognostic indicators will be distinguished in high, medium and low risk predictors on the basis of the data obtained from the statistical analysis.

Methods. This is a multicentric, retrospective study based on prospectively acquired data (type 1 study) on patients followed from their first clinical episode from January 1st, 2008.

Possible predictors that will be analysed are: age at onset (POMS, AOMS, LOMS), sex, disease course (primary progressive or relapsing remitting), familiarity for MS (first or second degree relatives), comorbidities, number/type of functional system involved, topography of first clinical episode (monofocal if the clinical presentation is with an Isolated Optic Neuritis, Isolated Spinal Syndrome, Isolated Supratentorial Syndrome -ADEM-like onset included- or Isolated brainstem Syndrome; will be termed multifocal if two or more of the abovementioned systems are involved), number of lesions at MRI scan, presence of intrathecal Oligoclonal Bands (OB) at the Cerebrospinal Fluid (CSF), the exposition and type of Disease Modifying Drugs (first - or second - line DMDs) and time to a first DMD. Furthermore, the tolerability, safeness and response to the first DMD in term of safeness and efficacy will be analysed.



PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM 2018

FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2018

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM 2018 FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2018

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Marco Caimmi

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR),
Istituto di Sistemi e tecnologie Industriali Intelligenti
per il Manifatturiero Avanzato (STIIMA), Milano

**Studio pilota multicentrico singolo cieco
per valutare l'attività e l'efficacia dell'ASSISTarmMS
(esoscheletro) sulle ADL correlate all'arto superiore
in pazienti con SM**

*A multicenter single-blind pilot study for evaluating
the activity and the efficacy of ASSISTarmMS,
an exoskeleton, on upper-limb related ADL
in MS patient*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 29.925 - 1 anno / year

Raffaele d'Isa

Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Milano

**Può la neurostimolazione non-invasiva promuovere
la rimielinizzazione? Uno studio pilota preclinico**

*Can non-invasive neuromodulation promote
remyelination? A pilot preclinical study*

Borsa di Ricerca / Research Fellowship
€ 26.700 - 1 anno / year

Letizia Leocani

Università e IRCCS Ospedale San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale - INSPE
Dipartimento di neurologia, neurofisiologia clinica e
neuroriabilitazione, Milano

**La stimolazione magnetica transcranica ripetitiva
col coil-H come trattamento della depressione nella
sclerosi multipla progressiva: studio pilota
randomizzato in doppio cieco**

*rTMS with H-coil as a treatment for depression in
progressive multiple sclerosis: a pilot randomized double
blind study*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Andrea Manca

Università degli Studi di Sassari,
Dipartimento di Scienze Biomediche, Sassari

**Effetti dell'allenamento eccentrico sulla spasticità
e debolezza muscolare degli arti in persone
con sclerosi multipla: uno studio pilota**

*The effects of eccentric strength training on limb
spasticity and muscle weakness in people with
multiple sclerosis: a pilot study*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Sofia Straudi

Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara,
Unità Operativa di Medicina Riabilitativa, Ferrara

**Il ruolo del "gaming" nel miglioramento
dell'equilibrio e delle funzioni cognitive in pazienti
con sclerosi multipla e disabilità lieve o moderata.
Uno studio randomizzato controllato**

*The role of video games therapy on balance and
cognitive functions in mild to moderate impaired
multiple sclerosis patients. A randomized control trial*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 40.000 - 2 anni / years

DIAGNOSI E MONITORAGGIO
DELLA MALATTIA / DIAGNOSIS
AND MONITORING OF THE DISEASE

Francesca De Vito

Istituto Neurologico Mediterraneo (INM) Neuromed - IRCCS, Unità di Neurologia e Unità di Neuroriabilitazione, Pozzilli (IS)

I microRNA circolanti nel liquido cerebrospinale come potenziali biomarkers della progressione della malattia mediata dalla sinaptopatia nella sclerosi multipla

MicroRNAs in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for synaptopathy-driven disease progression in multiple sclerosis

Borsa di Ricerca / Research Fellowship
€ 52.000 - 2 anni / years

Benedetta Bodini

ICM, Sorbonne Universités, Paris VI, Institut du cerveau et de la moelle épinière (ICM), Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France

Disregolazione energetica e neurodegenerazione nella sclerosi multipla: studio biennale con *imaging* ad altissimo campo del sodio, spettroscopia del fosforo e spettroscopia pesata in diffusione

Exploring in vivo the energetic origin of neurodegeneration in multiple sclerosis: a 2-year ultra-high field sodium imaging, phosphorus spectroscopy and diffusion-weighted spectroscopy study

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 150.000 - 2 anni / years

Linda Chaabane

Fondazione Centro San Raffaele, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe), Milano

Sviluppo di un metodo di visualizzazione delle cellule staminali neuronali tramite risonanza magnetica del 19F: ottimizzazione della marcatura, limiti di rilevazione e saggi di biocompatibilità

Set-up of Neural Stem cells Imaging by 19F-MRI: labeling optimization, detection limits and biocompatibility tests

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Massimo Filippi

Fondazione Centro San Raffaele, Neuroimaging Research Unit, INSPE Divisione di Neuroscienze, Milano

Il ruolo della connettività cerebrale e di tecniche di *machine learning* per la predizione del peggioramento clinico e della compromissione cognitiva in pazienti con sclerosi multipla

The role of brain network connectivity and machine learning for predicting disease worsening and cognitive impairment in patients with multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 250.000 - 2 anni / years

Su-Chun Huang

Fondazione Centro San Raffaele, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Milano

Combinando morfometria basata sui voxel della tomografia a coerenza ottica e potenziale evocato visivamente multifocale per studiare demielinizzazione e neurodegenerazione della sclerosi multipla

Combining voxel-based morphometry of optical coherence tomography and multifocal visual-evoked potential to study the relationship between demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 68.800 - 2 anni / years

Maria Assunta Rocca

Fondazione San Raffaele, Unità di Neuroimaging della Sostanza Bianca del Sistema Nervoso Centrale, Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Milano

Valutazione dell'atrofia della sostanza bianca nella sclerosi multipla: assottigliamento dei fasci di fibre e perdita assonale

Assessment of white matter atrophy in multiple sclerosis: fibre bundle shrinkage and microstructural axonal loss

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 100.000 - 2 anni / years

**PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO /
PATHOGENESIS AND RISK FACTORS**

Marco Patrone

*Fondazione Centro San Raffaele,
Dipartimento di Immunologia Trapianti e Malattie Infettive,
Unità di Biocristallografia, Milano*

**Basi molecolari dell'associazione tra la SM e
l'antigene nucleare 2 del virus di Epstein-Barr**

*Dissecting the molecular link between MS
and Epstein-Barr nuclear antigen 2*

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 105.000 - 3 anni / years

Francesca Santoni de Sio

*Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto Telethon per la terapia genica,
Unità meccanismi di tolleranza periferica, Milano*

**Studio del ruolo dei nodi epigenetici aberranti nella
deregolazione immunologica delle cellule T CD4+
nella sclerosi multipla**

*Unraveling the role of aberrant epigenetic hubs
in the pathogenic dysregulation of CD4+ T cells
in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 190.000 - 2 anni / years

Stefano Pluchino

*University of Cambridge,
Department of Clinical Neurosciences, Cambridge, UK*

**Caratterizzazione e manipolazione delle vie
metaboliche responsabili di neuroinfiammazione
cronica**

*Characterisation and manipulation of the metabolic
pathways driving chronic neuroinflammation*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 175.000 - 3 anni / years

Veronica De Rosa

*Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR),
Istituto per l'Endocrinologia e l'Oncologia Sperimentale,
(IEOS), Napoli*

**Ruolo delle vescicole extracellulari nella regolazione
dell'espressione del Foxp3 e della funzione
soppressoria in cellule T regolatorie nella
sclerosi multipla**

*Elucidating the extracellular vesicle-associated
determinants modulating Foxp3 expression and
suppressive function of T regulatory cells
in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 270.000 - 3 anni / years

Francesca Gilli

*Dartmouth-Hitchcock Clinic,
DHMC Neurology,
Lebanon, New Hampshire, USA*

**Effetti del sesso biologico sull'attività immunitaria
umorale intratecale e la progressione di malattia
nella sclerosi multipla**

*Sex effects on intrathecal humoral inflammation
and disease progression in multiple sclerosis*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 140.000 - 2 anni / years

Linda Ottoboni

*Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe),
Unità di Neuroimmunologia, Milano*

**Analisi dei trascritti contenuti nelle singole
microvescicole rilasciate dalla microglia ottenuta
da cellule pluripotenti umane indotte**

*Single extra-micro-cellular vesicle sequencing
analysis from human induced pluripotent stem cell
derived microglia*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Mariarosaria Santillo

*Università degli Studi di Napoli "Federico II",
Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Napoli*

**Anticorpi patogenetici diretti contro le cellule che
formano mielina in pazienti affetti da sclerosi multipla**

*Multiple sclerosis pathogenic antibodies targeting
myelin forming cells*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

VERSO NUOVI TRATTAMENTI /
TOWARDS NEW TREATMENTS

Claudia Verderio

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR),
Istituto di Neuroscienze,
Dipartimento di Scienze Biomediche, Milano

Vescicole extracellulari di origine mieloide nel sangue: una finestra sulla disfunzioni sinaptiche e un possibile bersaglio per una nuova terapia epigenetica nella SM

Circulating extracellular vesicles derived by myeloid cells: a window on synaptic dysfunction and a target for novel epigenetic intervention in MS

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 144.000 - 2 anni / years

Francesca Cignarella

Washington University in St. Louis,
Neurology, St. Louis, MO, USA

Impatto di digiuno a giorni alterni in un modello murino di sclerosi multipla

Impact of intermittent fasting on a mouse model of multiple sclerosis

Borsa di Ricerca / Research Fellowship
€ 85.000 - 2 anni / years

Alice Laroni

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

Effetto dei cambiamenti metabolici, indotti da un'associazione di probiotici e prebiotici e mediati dal microbiota, sulla modulazione delle risposte immuni nella sclerosi multipla

Impact of prebiotic/probiotic-mediated changes in microbe-derived metabolites on dysfunctional innate immune responses in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Gianvito Martino

Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe),
Unità di Neuroimmunologia, Milano

Strategia di trapianto di cellule staminali neurali ingegnerizzate per promuovere la remielinizzazione e la neuroprotezione nella sclerosi multipla

Multi fold transplant strategy of engineered neural stem cells to promote remyelination and neuroprotection in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 100.000 - 1 anno / year

Fabrizio Michetti

Università Cattolica del Sacro Cuore,
Istituto di Anatomia Umana e Biologia Cellulare, Roma

La proteina S100B: un potenziale bersaglio terapeutico nella sclerosi multipla. Studio *in vivo*

The S100B protein as a potential therapeutic target in multiple sclerosis. An in vivo study

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Luca Muzio

Fondazione Centro San Raffaele,
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSpe), Milano

Sviluppo di proteine REcTO per modulare la neuroinfiammazione

Targeting neuroinflammation by REcTO proteins

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Ildiko Szabo

Università degli Studi di Padova,
Dipartimento di Biologia, Padova

Verso l'eliminazione farmacologica specifica di linfociti T patogenici implicati nella sclerosi multipla

Towards specific elimination of autoreactive pathogenic T lymphocytes implicated in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 158.000 - 2 anni / years

Maria Letizia Trincavelli

Università di Pisa, Dipartimento di Farmacia, Pisa

Struttura cristallografica e caratterizzazione funzionale del recettore GPR17: un bersaglio innovativo per terapie di rimielinizzazione nella sclerosi multipla

Crystal structure and functional characterization of the GPR17 receptor, a novel pharmacological target for remyelination therapy in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 235.000 - 2 anni / years

PROGETTI SPECIALI 2018 - 2019 SPECIAL PROJECTS 2018 - 2019

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Diego Centonze

*Unità di Neurologia e Neuroriabilitazione,
Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed-IRCCS,
Pozzilli (IS)*

La sinaptopatia infiammatoria come bersaglio dell'esercizio terapeutico nella lotta alla sclerosi multipla

*The inflammatory synaptopathy as a target of exercise
therapy in the fight against multiple sclerosis*

Progetto Speciale / Special Project
€ 84.215,5 - 2 anni / years

CONDIVISIONE DI DATI / DATA SHARING

Antonio Bertolotto

*AOU San Luigi, Neurologia 2 - CRESM (Centro
Riferimento Regionale Sclerosi Multipla), Orbassano (TO)*

Una banca biologica ed un laboratorio dedicati alla raccolta ed alla distribuzione di campioni biologici di SMPP, la replicazione e la condivisione di dati e la validazione di metodi biologici

*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*

Progetto Speciale / Special Project
€ 100.000 - 1 anno / year

Massimo Filippi

*Neuroimaging Research Unit, Università Vita-Salute
San Raffaele, Milano*

Network Italiano di Neuroimaging (INNI) per l'ottimizzazione dell'utilizzo di tecniche avanzate di risonanza magnetica in pazienti con SM

*The Italian Neuroimaging Network Initiative (INNI)
to optimize the use of advanced MRI techniques
in patients with MS*

Progetto Speciale / Special Project
€ 865.790 - 3 anni / years

VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

Francesco Cucca

*Dipartimento di Biomedicina, Istituto di Ricerca Genetica
e Biomedica, CNR, Monserrato (CA)*

Un toolbox genetico nella scoperta di nuovi farmaci per la SM: lo sviluppo di brevetti di geni candidati

*A genetic toolbox in MS drug discovery:
patent development of candidate genes*

Progetto Speciale / Special Project
€ 1.050.000 - 3 anni / years

Federica Eva Esposito

*Dipartimento di Neurologia, INSPE,
Fondazione Centro San Raffaele, Milano*

Validazione e studio funzionale di varianti genetiche implicate nella risposta alla terapia con fingolimod

*Validation and functional assessment of genetic
variants implicated in the response to fingolimod
treatment*

Progetto Speciale / Special Project
€ 84.000 (fondi per il primo anno) - 2 anni /
years (funds for the first year)

Giuseppe Matarese

*Istituto di Endocrinologia e Oncologia Sperimentale,
Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli*

**Restrizione calorica come nuovo approccio terapeutico
per manipolare l'immunità e per migliorare
il potenziale terapeutico di farmaci di prima linea
nella SM recidivante-remittente**

*Calorie restriction as a novel therapeutic tool
to manipulate immunity and improve therapeutic
potential of first line drug treatments during relapsing
remitting MS*

Progetto Speciale / Special Project
€ 466.200 - 2 anni / years

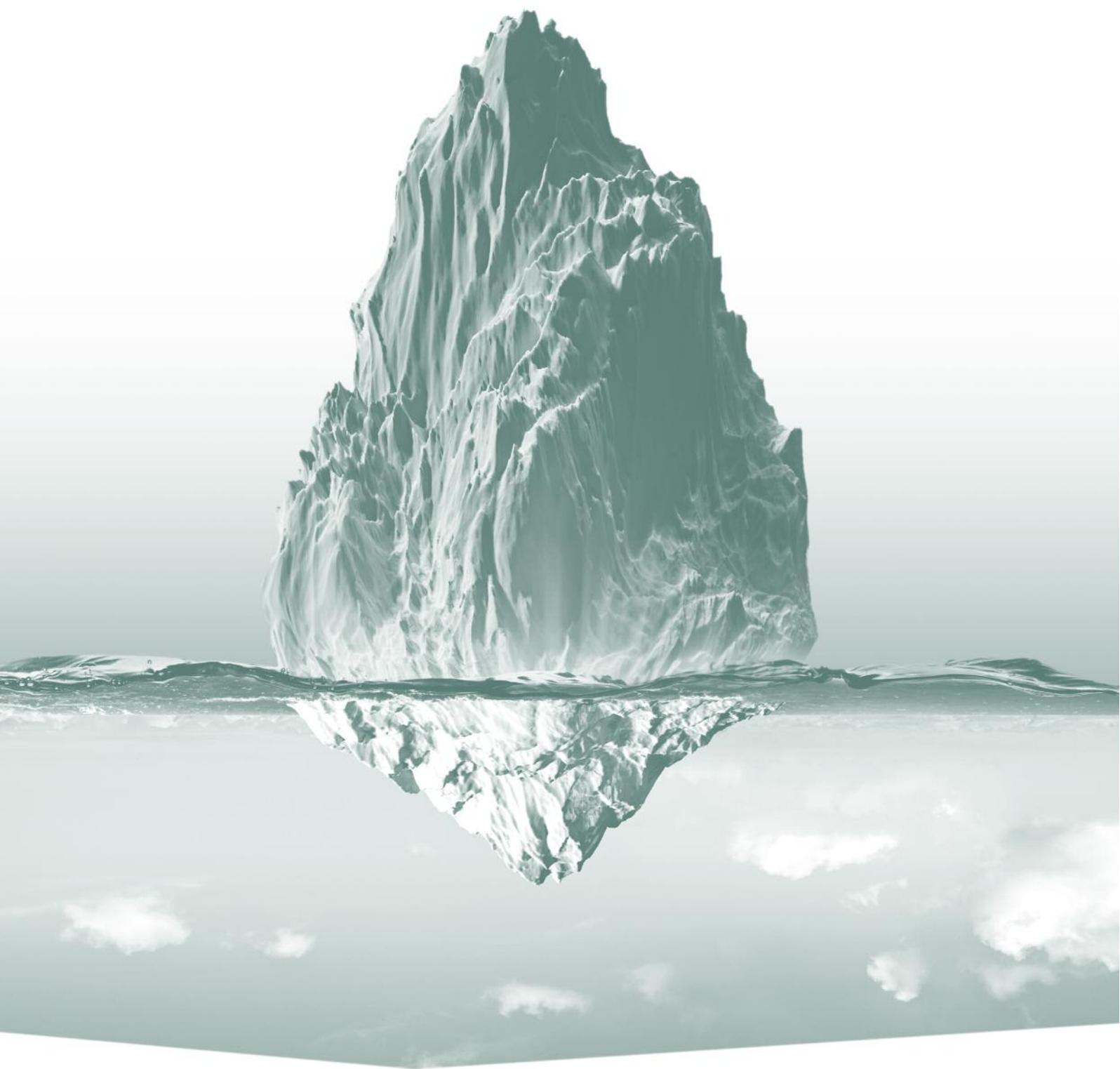
Monica Ulivelli

*Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze,
Università degli Studi di Siena, UOC di Neurologia e
Neurofisiologia Clinica, UOS Diagnosi e Terapia delle
Malattie Demyelinizzanti, Siena*

**Stato di immunizzazione verso le principali malattie
trasmissibili - prevenibili con vaccino -, e sicurezza
dei vaccini, in una coorte di pazienti con SM.
Studio multicentrico italiano**

*Immunisation status against major communicable
diseases preventable with vaccines, and safety
of vaccines, in a cohort of MS patients.
An Italian multicenter study*

Progetto Speciale / Special Project
€ 80.570,50 - 3 anni / years



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, INSpe,
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 in persone con sclerosi
multipla**

Costs of comorbidity 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
€ 54.000 - 2 anni / years

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
€ 200.000 - 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 β nella modulazione della risposta patogena delle cellule Th17 umane nella sclerosi multipla

Role of IL-1 β 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*

**Microvescicole 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
€ 222.000 - 3 anni / years

VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

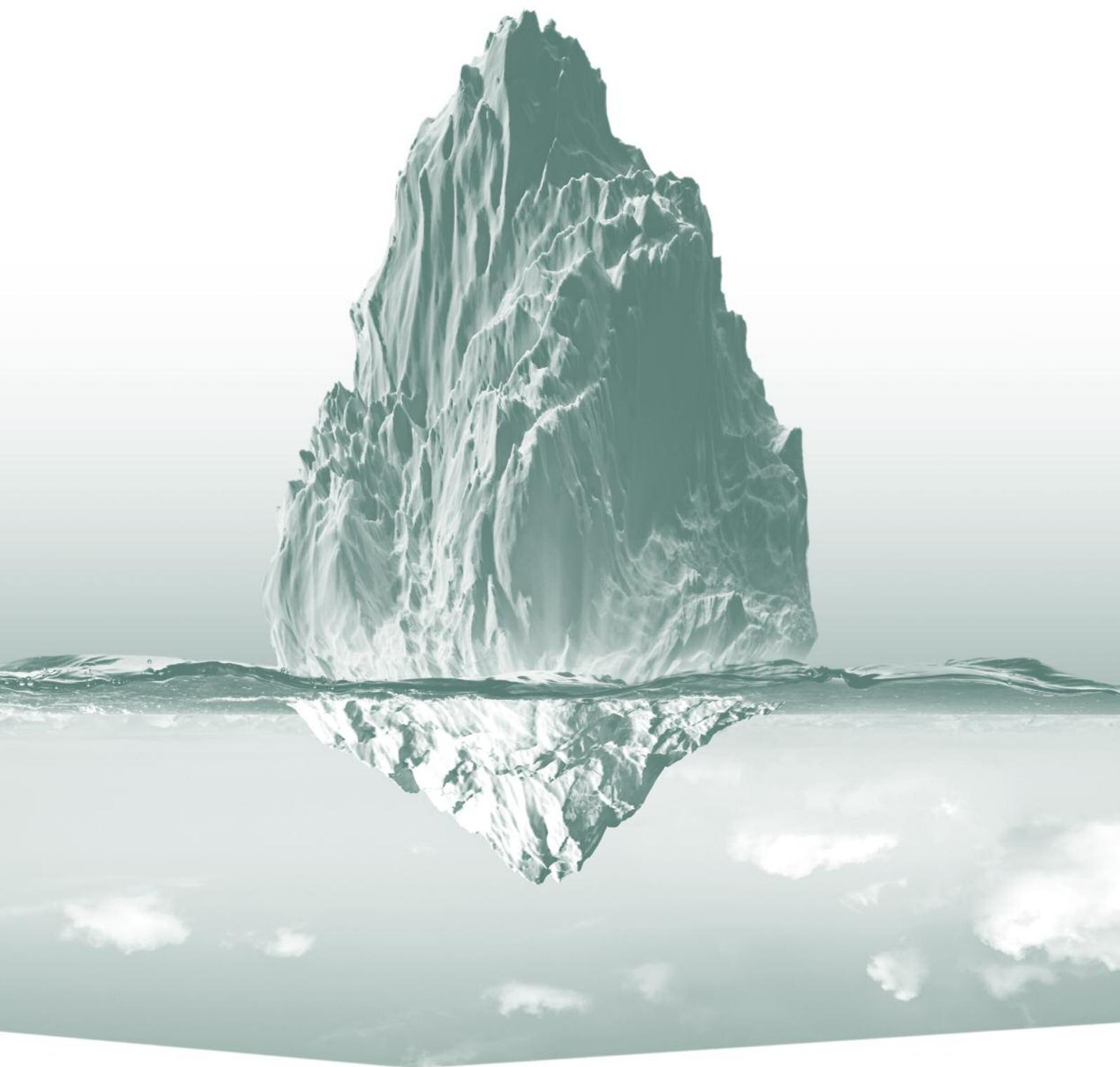
Gianvito Martino

*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



COMITATO SCIENTIFICO FISM 2018/2017

FISM SCIENTIFIC COMMITTEE 2018/2017

BIOMEDICAL RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Roberta Brambilla

University of Miami, The Miami Project To Cure Paralysis, Miller School of Medicine, MIAMI US

Gabriela Constantin

Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università degli Studi di Verona, VERONA

Francesco Cucca

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, SASSARI

Massimiliano Di Filippo

Centro Malattie Demielinizzanti e Laboratori di Neurologia Sperimentale, Clinica Neurologica, Università degli Studi di Perugia, PERUGIA

Raju Kapoor

University College London Hospitals NHS, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, LONDON, UK

Matilde Inglese

DINOEMI, Università degli Studi di Genova, GENOVA
Mount Sinai School of Medicine – NEW YORK, USA

Catherine Lubetzki

Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département des Maladies du Système Nerveux, PARIS, France

Giuseppe Matarese

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", NAPOLI

Miriam Mattoscio

Imperial College London, LONDON, UK

Stefano Previtali

Ospedale San Raffaele, MILANO

Antonio Scalfari

Imperial College London, LONDON, UK

Claudia Verderio

CNR Istituto di Neuroscienze, Dipartimento di Scienze Biomediche, MILANO

**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

Monica Falautano

Dipartimento di Neurologia, Servizio di Psicologia, Ospedale San Raffaele, MILANO

Letizia Leocani

Unità di Neurofisiologia Sperimentale e MAGICS Center, INSPE, Ospedale San Raffaele, MILANO

Luca Prosperini

Dipartimento Neuroscienze, U.O.C. Neurologia e Neurofisiopatologia, Azienda Ospedaliera S. Camillo Forlanini, ROMA

Maria Assunta Rocca

Fondazione San Raffaele, MILANO

Anders Guldhammer Skjerbæk

Development Manager Msc, Physiotherapist, MS Hospitals in Denmark

Alessandro Verri

DIBRIS, Università degli Studi di Genova, GENOVA

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

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