

SCLE^{ONLUS}
ROSI
MULT
iPLA
associazione
italiana

un mondo
libero dalla SM



**LA RICERCA SULLA
SCLEROSI MULTIPLA**

Finanziata dalla
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

2014

2014

LA RICERCA SULLA SCLEROSI MULTIPLA

Finanziata dalla
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

A cura di

Roberta Guglielmino

Area Ricerca scientifica AISM-FISM

Coordinamento editoriale

Silvia Zino

Area Comunicazione e Ufficio Stampa AISM

Progetto grafico

Francesca Massa

Copyright 2014

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - Onlus

Via Operai 40 - 16149 Genova

Tel. 010 27 13 226

Fax 010 27 13 205

fism@aism.it

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

Pubblicato e distribuito da

Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Onlus

Via Operai, 40 - 16149 Genova

ISBN 9788871480886

INTRODUZIONE / INTRODUCTION

Mario A. Battaglia 7

**Dalla parte della persona con sclerosi multipla /
Stand on the side of the person with MS**

Paola Zaratin 9

**PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO /
PATHOGENESIS AND RISK FACTORS**

Disanto Giulio 14

Caratterizzazione funzionale delle varianti dei geni KIF coinvolti nella patogenesi della sclerosi multipla
Functional characterization of KIF genetic variants involved in multiple sclerosis pathogenesis

Marongiu Mara 17

Studio del meccanismo funzionale alla base dell'associazione di CBLB con la sclerosi multipla
Study of the functional mechanisms underlying the association of CBLB with multiple sclerosis

Perga Simona 20

Analisi delle variazioni di singoli nucleotidi polimorfi in TNFAIP3 associati alla sclerosi multipla
Analysis of single-nucleotide polymorphisms in TNFAIP3 associated with multiple sclerosis

Caiafa Paola 23

Riprogrammazione epigenetica nella sclerosi multipla
Epigenetic reprogramming in multiple sclerosis patients

Baldari Cosima 26

La proteina adattatrice Rai in differenziamento, attività e chemiotassi dei linfociti Th17 e nella patogenesi della sclerosi multipla
The Rai adaptor protein in Th17 cell differentiation, effector function and chemotaxis and in the pathogenesis of multiple sclerosis

Gran Bruno 30

Modulazione dell'equilibrio tra cellule T regolatrici e T helper 17 da parte di recettori Toll-like: implicazioni per la sclerosi multipla
Toll-like receptors modulate the balance between regulatory (Treg) and T helper 17 (Th17) cells: implications for multiple sclerosis

Novelli Francesco 33

Regolazione interferone-dipendente dei linfociti Th17 e Th22 nella sclerosi multipla
Interferon-dependent regulation of Th17 and Th22 lymphocytes in multiple sclerosis

Bononi Angela 36

Ruolo di proteine mitocondriali nella patogenesi della sclerosi multipla
Involvement of mitochondrial proteins in the pathogenesis of multiple sclerosis

Morara Stefano 39

Ruolo protettivo di Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) nella patogenesi dell'EAE
Protective role of Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in EAE pathogenesis

Piccio Laura 42

Ruolo di TREM-2 nella sclerosi multipla e nel suo modello animale
Role of TREM2 in multiple sclerosis and its animal model

Ria Francesco 46

Meccanismi molecolari del trasferimento delle informazioni ambientali alle cellule T nella patogenesi della EAE: ruolo del TLR2
Molecular mechanism transmitting information from environment to encephalitogenic T cells in the pathogenesis of EAE: role of TLR2

Aloisi Francesca 49

Analisi dell'infezione con virus di Epstein-Barr e della risposta immunitaria nel fluido cerebrospinale e nel sangue di pazienti con sclerosi multipla mediante tecniche altamente sensibili di PCR
Analysis of Epstein-Barr virus infection and immune response in the cerebrospinal fluid and blood of patients with multiple sclerosis using highly sensitive PCR techniques

Chiappetta Giuseppe 52

Ricerca di interazioni patogeneticamente rilevanti tra EBV e il retrovirus endogeno della famiglia W MSR/V nel cervello con sclerosi multipla
Searching for pathogenetically relevant interactions between EBV and MSR/V/human endogenous retrovirus-W in the multiple sclerosis brain

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA / DISEASE CLASSIFICATION AND DIAGNOSIS

Dolei Antonina 56

Studio del retrovirus associato alla sclerosi multipla (MSRV)/HERV-W come marcatore prognostico di progressione e del suo contributo alla patogenesi

Study of multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV)/HERV-W as disease progression marker, and of its contribution to pathogenesis

Barnaba Vincenzo 60

Immuno-attivazione cronica nella sclerosi multipla
Chronic immune activation in multiple sclerosis

Cossarizza Andrea 62

Polifunzionalità delle cellule iNKT periferiche come marker immunologico delle diverse forme della sclerosi multipla

Polyfunctionality of peripheral blood iNKT cells as an immunological marker of different forms of multiple sclerosis

De Stefano Nicola 65

Modifiche nell'arco di 10 anni della sostanza bianca e grigia cerebrale in pazienti con sclerosi multipla in rapporto alla loro disabilità fisica

Ten-year changes in the cerebral white and grey matter of patients with multiple sclerosis and their relevance to physical disability

Deriu Franca 68

Studio neurofisiologico, neuroradiologico e clinico del tronco encefalico in pazienti con sclerosi multipla

Neurophysiologic, neuroimaging and clinical study of brainstem in patients with multiple sclerosis

VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

Battistini Luca 72

Ruolo delle cellule MAIT nella sclerosi multipla: come la flora intestinale influenza le risposte autoimmuni

Role of MAIT cells in multiple sclerosis: how can the gut flora influence autoimmune responses

Riccio Paolo 75

Le basi molecolari per un intervento nutrizionale nella sclerosi multipla

The molecular basis of nutritional intervention in multiple sclerosis

Casazza Simona 79

Le cellule mesenchimali staminali influenzano l'ambiente microgliale? Implicazioni per il trattamento della sclerosi multipla

Do mesenchymal stem cells impact microglia behavior? Implications for the treatment of multiple sclerosis

Saccardi Riccardo 82

Valutazione immunologica del midollo osseo in pazienti affetti da sclerosi multipla severa sottoposti ad autotrapianto di cellule staminali ematopoietiche

Immunological evaluation of bone marrow in severe multiple sclerosis patients undergoing autologous haematopoietic stem cell transplantation

Abbracchio Maria Pia 85

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

Palmisano Marilena 89

Ruolo delle MAP chinasi p38 nella mielinizzazione
Role of p38 MAP kinases in myelination

Annunziata Pasquale 92

Studio degli effetti immunomodulatori di un nuovo cannabinoide agonista selettivo per il recettore CB2 su cellule immunocompetenti nella sclerosi multipla

Study of immunomodulatory effects of a new cannabinoid CB2-selective agonist on immunocompetent cells from multiple sclerosis patients

Maccarrone Mauro 94

Ruolo del sistema endocannabinoide nel processo neurodegenerativo della sclerosi multipla sperimentale

Role of the endocannabinoid system in the neurodegenerative process of experimental multiple sclerosis

Pedotti Rosetta 98

Il sistema delle prokineticine nelle malattie demielinizzanti autoimmuni del sistema nervoso centrale: meccanismi patogenetici e possibili nuovi bersagli di terapia per la sclerosi multipla

The prokineticin system in autoimmune demyelinating disease of the central nervous system: pathogenetic mechanisms and possible novel target of therapy for human multiple sclerosis

Avolio Carlo 102

Recettore purinergico P2X7 su monociti di pazienti con sclerosi multipla ed effetti degli attuali trattamenti immunomodulanti per la malattia

P2X7 purinergic receptor on monocytes of patients with multiple sclerosis and effects of current immune treatments of the disease

Tirassa Paola 105

Il nerve growth factor somministrato in forma di collirio in un modello animale di sclerosi multipla: uno studio prospettico sul trattamento durante le fasi precoci della malattia

Nerve growth factor given as eye drops in the animal model of multiple sclerosis: a prospective study of treatment in early stage of disease

**NEURORIABILITAZIONE E NEUROPLASTICITÀ /
NEUROREHABILITATION AND
NEUROPLASTICITY**

Marzola Pasquina 109

Imaging funzionale nello studio della plasticità neuronale in un modello sperimentale di sclerosi multipla su ratto

Functional MRI to study brain plasticity in an experimental model of MS in rats

Calabresi Paolo 111

Uno studio elettrofisiologico dei meccanismi di alterata plasticità sinaptica in modelli sperimentali di sclerosi multipla

An electrophysiological study of the mechanisms of synaptic plasticity impairment in experimental multiple sclerosis

Tecchio Franca 116

Alleviare la fatica nella sclerosi multipla: un intervento con stimolazione transcranica in corrente continua (studi FaMuSNe e FaReMuS DiCDiT)

Fatigue relief in multiple sclerosis by neuromodulation: a transcranial direct current stimulation intervention [FaMuSNe & FaReMuS DiCDiT]

Tomassini Valentina 120

Valutazione dell'immaginazione motoria e degli effetti della pratica mentale di un compito motorio in pazienti con sclerosi multipla

Assessing motor imagery and the effects of mental practice of a motor task in patients with multiple sclerosis

Basaglia Nino 123

Gli effetti della rieducazione robot-assistita sulla funzionalità deambulatoria e sull'attivazione delle unità motorie in persone con sclerosi multipla. Uno studio randomizzato controllato

The effects of robot-assisted gait training on locomotor function and motor unit firing in multiple sclerosis subjects. A randomized control trial

QUALITÀ DELLA VITA / QUALITY OF LIFE

Bassi Marta 127

Il sistema della cura: promozione del benessere tra persone con sclerosi multipla, caregiver ed operatori sanitari. Uno studio pilota

The care system: well-being promotion among people with multiple sclerosis, caregivers and health professionals. A pilot study

Filippini Graziella 131

Integrare le esperienze e le preferenze dei pazienti con sclerosi multipla con i risultati della ricerca scientifica per sviluppare informazioni sulla salute utili per decisioni informate e condivise

IN-DEEP-integrating and deriving evidence, experiences, preferences: developing research-based health information applicable to decision making and self-management by people with multiple sclerosis

Solari Alessandra 135

Preferenze di ruolo, conoscenza del rischio e decision-making nelle persone con sclerosi multipla (AutoMS)

Autonomy preferences, risk knowledge and decision-making performance in multiple sclerosis patients (AutoMS)

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

FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS
2013, 2012, 2011 **140**

**COMITATO SCIENTIFICO FISM /
FISM SCIENTIFIC COMMITTEE**

2013, 2012, 2011 **151**

**LISTA DEGLI AUTORI /
LIST OF THE AUTHORS**

158

Introduzione

Questo è stato un lungo anno per la ricerca scientifica, che si è trovata a lungo sotto le luci della pubblica attenzione. A volte, come ha ricordato Umberto Veronesi, è sembrato che «da una parte ci fosse una comunità scientifica chiusa nei suoi dogmi e sorda al dolore dei pazienti, dall'altra uno Stato che si occupa dei problemi dei malati solo quando appaiono sui media».

La ricerca scientifica che AISM indirizza, sostiene e promuove attraverso la propria Fondazione FISM, e che questo Compendio documenta con esattezza, è la testimonianza che esiste una ricerca rigorosa che non cerca scorciatoie ma trova la via, passo dopo passo, progetto dopo progetto. Senza propinare illusioni, costruisce risposte. Non è distante ma vicina alle domande e ai desideri di vita autentica di tante persone. Perché è una ricerca fatta da persone per altre persone.

Lo testimonia, del resto, il fatto che da oltre 25 anni l'Associazione stia formando una vera e propria «scuola» di ricercatori che, iniziando da giovani e restando fedeli negli anni all'appassionante sfida di individuare finalmente le cause e le cure di questa malattia, partono rigorosamente dai bisogni delle persone con SM.

AISM, infatti, è da sempre convinta che il primo bisogno, il primo diritto delle persone con SM sia quello di sapere che c'è un vasto mondo di ricercatori eccellenti che continuano ad essere coinvolti nella lotta alla SM. Anche per questo, prima in Italia, FISM adotta dal 1986 la peer review come bussola nella scelta degli studi da sostenere.

L'abbondanza dei progetti qui presentati e, soprattutto, la loro alta qualità di risultati è testimoniata dal fatto che nel 2013 ben 140 studi dei ricercatori finanziati dall'Associazione hanno pubblicato i propri studi su autorevoli riviste scientifiche (+39% rispetto al 2012), con un Impact Factor complessivo del 5,9 %.

Tutto ciò rende l'Associazione orgogliosa dei «propri» ricercatori, pur nella consapevolezza che tutti insieme si possa e si debba sempre fare meglio, da ogni punto di vista.

Non è un caso se il Bando FISM 2013 ha raccolto progetti per un totale finanziabile di oltre 10 milioni di euro, mentre a disposizione ve n'erano solo 3.

I 27 progetti di ricerca e le 8 borse di studio selezionate e finanziate con il Bando 2013 coinvolgono 39 laboratori in 11 Regioni italiane e 3 all'estero, a testimonianza di un diffuso radicamento nazionale e internazionale della comunità dei ricercatori che si impegnano nel campo della sclerosi multipla. Significativo il trend dei finanziamenti erogati.

Il 28,6% dei progetti finanziati è collocabile nella ricerca di base su fattori di rischio, cause e progressione della malattia, in coerenza con la storia e la missione della Fondazione di AISM, che a quest'area aveva dedicato il 61% dei finanziamenti ancora nel 2011.

Ma è in crescita decisa anche il finanziamento per lo sviluppo e validazione di trattamenti neuro-riabilitativi e, in generale, ai progetti di ricerca traslazionale (22,9%) e clinica (28,6%, rispetto all'11,7% del 2012) che indirizzano con vigore all'individuazione di nuovi trattamenti in grado di incidere sull'andamento di malattia e sulla qualità di vita.

Come ha scritto la Senatrice Elena Cattaneo «la scienza è un catalizzatore di cambiamenti, un modo di comportarsi nel mondo».

Perché questo accada, l'impegno della ricerca non finisce quando produce risultati importanti e attendibili: a quel punto è necessario che i decisori politici prendano le proprie decisioni sulle politiche socio-sanitarie da perseguire proprio a partire da questi risultati ottenuti con rigore e metodo.

Precisamente questo è lo scopo della ricerca che FISM indirizza, promuove e finanzia: cambiare l'oggi e il domani, raccogliere e vincere con rigore e tenacia le sfide non ancora affrontate; diventare uno strumento del diritto all'informazione, alla salute, alla vita delle persone con SM; essere protagonista di un'autentica strategia di «advocacy» e, in ultima analisi, contribuire con decisione alla costruzione di un mondo finalmente libero dalla sclerosi multipla.

Mario A. Battaglia
Presidente FISM

Introduction

This has been a long year for scientific research, which has been subjected to public scrutiny for long. At times, as Umberto Veronesi reminds us, it seemed that «on the one hand there was the scientific community hide-bound within its dogmas and deaf towards the pain of the patients, while on the other hand the State would look into the problems of the sick only when the same were taken up by the media».

The scientific research that Italian Multiple Sclerosis Society, AISM, directs, supports and promotes through its Foundation FISM, and is documented precisely by this Compendium, is proof that there exists rigorous research that doesn't look for short-cuts but finds the way, one step after another, one project after another. Without creating illusions, provides answers. It is not removed from, but is close to the questions and the authentic desire of life of many people, because it is research done by people for other people.

This is also proven by the fact that since more than 25 years the Society has been forming a «school» of researchers, who commence at a young age and stay faithful over the years to the passionate challenge of finally identifying the causes and the cures for this disease while they start out strictly based on the needs of people with MS.

In fact, AISM, has always been of the firm conviction that the primary need, the primary right of the people with MS is to know that there is a vast number of excellent researchers who remain engaged in the struggle against MS. Also for this reason, FISM is the first in Italy to have adopted since 1986 peer review as a guide for the selection of research studies to support.

The large number of projects presented here, and especially the high quality of their results is proven by the fact that in 2013, 140 researchers funded by the Society have published their papers in peer scientific journals (39% more than in 2012), with an overall Impact Factor of 5.9 %.

All this is a source of pride for the Society in its «very own» researchers, while at the same time acknowledging that all together can and must always do better under every aspect.

As a matter of fact, in response to the FISM Call for Applications 2013 the total of the requested funding was more than 10 million Euros, while only 3 million Euros were available.

The 27 research projects and the 8 fellowships selected and funded with the Call for Applications 2013 involve 39 laboratories in 11 Italian Regions and 3 laboratories abroad, providing proof of a large scale national and international presence of the research community that is committed in the field of multiple sclerosis. The trend of the released funding is significant.

28.6% of the funded projects can be collocated in basic research on risk factors, causes and the disease progression, in keeping with the history and the mission of the Foundation, which dedicated to this area 61% of the funding even in 2011.

However, the funding for the development and validation of neurorehabilitation treatments is in sustained growth and, generally, to the translational (22.9%) and clinical (28.6%, compared to 11.7% in 2012) research projects, which vigorously directs towards identifying new treatments that are capable of having an impact on the disease progression and on the quality of life.

As the Senator Elena Cattaneo has written «science is a catalyst of change, a way to conduct oneself in the world».

For this to happen, the commitment of research does not end when important and reliable results are obtained: at that point it is necessary that the political decision-makers make their decisions regarding the social and health policies to be followed by taking as a starting point these results that were obtained with rigour and method.

This is precisely the scope of the research that the FISM directs, promotes and funds: change today and tomorrow, take up and win with rigour and tenacity the challenges that have not been confronted as yet; become the means of the right to information, health and life for people with MS; be the protagonist of a real «advocacy» strategy and, in the final count, contribute decisively to creating a world that is finally free of multiple sclerosis.

Mario A. Battaglia

Chairman of Italian MS Foundation

Dalla parte della persona con sclerosi multipla

La definizione che il vocabolario inglese dà della parola «advocacy» potrebbe essere anche un'efficace definizione della «ricerca» che AISM promuove e finanzia attraverso la sua Fondazione: una ricerca rigorosa, eccellente nel suo individuare evidenze che incidono sulla vita e, per questo «schierata» dalla parte delle persone nella loro lotta alla sclerosi multipla.

Quello che AISM promuove è una scienza che sia reale supporto, risposta efficace alle urgenze di chi ha diritto di accesso a una ricerca che dia, finalmente, risposte «personalizzate».

Una ricerca, insomma, che diventa il primo strumento di advocacy, il più efficace supporto attivo ad una causa, alla vittoria delle persone sulla malattia, al trionfo della vita sulla sclerosi multipla.

Poiché la ricerca che cambia la vita inizia proprio dall'ascolto delle persone per cui tenacemente lavora, in questo 2013, non a caso, l'Associazione ha interpellato nuovamente le persone con SM sui bisogni cui chiedono risposte per oggi e per domani.

Le stesse persone con sclerosi multipla sono state coinvolte attivamente, per citare un esempio emblematico, in un'importante ricerca socio-sanitaria sui costi sociali finanziata dal Ministero per la Salute e presentata all'ultimo Congresso della Società Italiana di Neurologia («Approccio integrato tra i servizi nella rete di riferimento e condivisione di azione interdisciplinare tra operatori di eccellenza in linea con raccomandazioni europee e linee guida nazionali per la sclerosi multipla come modello di disabilità fisica»).

Così come sono state le stesse persone con SM e i loro familiari il «motore» del Progetto IN-DEEP (Integrating and Deriving Evidence, Experiences and Preferences) che, integrando le esperienze e le preferenze dei pazienti con i risultati della ricerca scientifica, ha messo a punto un modello informativo via internet per garantire l'accesso a informazioni chiare, sicure, basate sull'evidenza, utili per decisioni informate e condivise.

Di cosa hanno dunque bisogno le persone con sclerosi multipla? Cosa domandano alla ricerca?

Chiedono sicuramente che vengano identificate con precisione quali sono le varianti genetiche e i fattori di rischio che agiscono nella **patogenesi della malattia**. Sono ben 13 i progetti conclusi che, in questo Compendio, documentano l'impegno continuativo di FISM nel promuovere questo ambito della ricerca di base. Anche il 60% dei nuovi progetti finanziati con il Bando FISM 2013 è legato alla conoscenza dei fattori di rischio, delle cause della malattia e della sua progressione.

Le persone con SM, con urgenza maggiore, chiedono alla ricerca una **classificazione** sempre più precisa della malattia e una **diagnosi** puntuale, efficace, precoce. Vogliono avere una «fotografia» della singola situazione individuale, dell'evoluzione delle lesioni mieliniche, dello stato della struttura e della funzionalità del sistema nervoso, della possibilità di intervenire per prevenire o ritardare la neuro degenerazione e la progressione della disabilità fisica.

La sfida cui le persone con SM chiamano la ricerca, in altri termini, è quella di arrivare a un vero trattamento personalizzato, che li accompagni fin dai primi momenti lungo tutto il «viaggio» che dovranno compiere insieme alla malattia. In questo ambito si collocano 5 Progetti del Compendio FISM 2014.

Ma alle persone non basta neppure questo, né basta alla ricerca che FISM vuole sostenere: occorre che ogni conoscenza in più sia fortemente indirizzata alla messa a punto di **nuovi trattamenti** per combattere la malattia.

È proprio nella ricerca di nuovi trattamenti che si collocano diversi dei progetti di punta finanziati da FISM.

Sono qui presentati 11 progetti; anzitutto quelli sulle cellule staminali e quelli di valutazione su pazienti sottoposti ad autotrapianto di staminali ematopoietiche, campi nei quali i ricercatori italiani sostenuti dall'Associazione sono pionieri da oltre dieci anni.

Altrettanto decisivi potranno risultare i progetti che stanno sviluppando strategie volte a riparare la mielina: sarebbe un salto di qualità nel trattamento della malattia e nella prevenzione della neuro degenerazione.

Ugualmente importanti, per migliorare i trattamenti e la qualità della vita con cui si affronta quotidianamente la malattia e le sue conseguenze, potranno rivelarsi gli studi indirizzati all'individuazione di nuovi trattamenti

sintomatici o sulla conoscenza delle basi molecolari della nutrizione e sul ruolo della flora intestinale nel processo infiammatorio alla base della malattia. Sulla malattia incidono anche le ricerche su **neuroplasticità e neuroriabilitazione** che stanno diventando una delle nuove frontiere, delle caratteristiche distintive della ricerca sulla sclerosi multipla, in particolare di quelle finanziate e promosse in tutto il mondo dalle Associazioni SM. Un campo nel quale AISM attraverso la sua Fondazione è impegnata in prima persona insieme ai ricercatori di eccellenza italiani. I 5 studi qui presentati sui meccanismi di plasticità sinaptica e quelli che potrebbero essere presto applicabili sull'immaginazione motoria, sulla rieducazione robot-assistita della funzionalità deambulatoria, come anche quelli di stimolazione transcranica per alleviare la fatica sono esemplificativi ma non esaustivi dell'importanza che deve assumere questo ambito di ricerca.

Tre progetti qui presentati sono dedicati alla **qualità di vita**, indirizzati alla valutazione della capacità del «sistema di cura» di promuovere benessere, al ruolo che i pazienti vogliono assumere nella «presa di decisione» su come curarsi, agli strumenti informativi che devono avere per essere in grado di decidere liberamente come curarsi nel migliore dei modi.

Oltre ai Progetti finanziati con Bando, qui presentati, FISM ha dedicato altri 3 milioni circa a «**Progetti speciali**» che promettono di incidere molto sul futuro della conoscenza e del trattamento della SM.

Può essere importante una breve ricognizione tra i temi e i titoli dei «Progetti Speciali».

Dal 2009 la Fondazione finanzia il progetto ImmunoChip che studia i fattori genetici e di suscettibilità della sclerosi multipla e che nel 2013 ha portato alla scoperta di 48 nuove varianti genetiche che influenzano il rischio di sviluppare la SM.

Dal 2011 FISM sta finanziando due progetti di ricerca triennali: un progetto speciale di «laboratorio delle interazioni Axo-gliali» e un progetto in neuroriabilitazione per la messa a punto di «trattamenti attraverso la neurostimolazione centrale e periferica».

Dal 2007 continua il nostro impegno per trasformare la ricerca sulle cellule staminali in terapia e nel 2012 FISM ha deciso di sostenere il Progetto MESEMS per una «terapia con cellule staminali mesenchimali». Inoltre, sempre nel 2012, ha promosso due importanti progetti riabilitativi sulla «messa a punto di outcome per misurare l'efficacia della riabilitazione» e sui «disturbi dell'equilibrio», il Progetto PenSAMI per lo sviluppo di un nuovo modello di cure palliative nella SM, e un progetto di «analisi stakeholder» su come «famiglie e persone con SM affrontano la disabilità».

Anche nel 2013 FISM ha aperto ulteriori frontiere: un primo «Progetto speciale» mira alla costituzione di un «Network Italiano di Neuroimaging (INNI) per l'ottimizzazione dell'utilizzo di tecniche avanzate di Risonanza Magnetica in pazienti con SM»; un secondo studio intende sviluppare «nuovi modulatori di GPR17, recettore chiave nei processi di rimielinizzazione». Una terza ricerca, infine, si propone di migliorare gli strumenti di classificazione della SM attraverso l'individuazione di «biomarcatori di diagnosi e prognosi».

Emerge un panorama vasto, complesso, sfidante, di ricerche concluse e ancora in corso d'opera.

Senza dimenticare il Bando sulle forme progressive di SM, citato nelle pagine precedenti, per il quale l'Associazione ha giocato un ruolo determinante. La piattaforma di eccellenza della Progressive MS Alliance vuole essere il catalizzatore di questa eccellenza per vincere la sfida di sviluppare una terapia per le forme progressive. Il valore chiave per un «salto di qualità» nella cura della SM, infatti, è quello dell'«alleanza» tra i diversi attori in gioco, perché come intitolava un editoriale di Todd Sherer pubblicato su *Nature Medicine* nel 2013 «money without collaboration won't bring cure».

È questo il momento opportuno per accelerare insieme, Associazioni SM, comunità dei ricercatori, pazienti, ma anche organizzazioni finanziatrici, industria, agenzie regolatorie, responsabili politici ai diversi livelli. Ognuno può, e probabilmente deve, mettere a disposizione la propria eccellenza per trovare finalmente la via verso l'accesso ad un trattamento personalizzato per raggiungere un mondo libero dalla sclerosi multipla.

Paola Zaratini

Direttore Ricerca Scientifica

Stand on the side of the person with MS

The definition that the English dictionary gives for the word «advocacy» may be an effective definition of the «research» that Italian Multiple Sclerosis Society promotes and funds through its Foundation: a rigorous research, excellent in identifying evidence that makes an impact on life and stand on the side of the people struggle against multiple sclerosis.

The science that AISM promotes is a science that it is true support and effective response to the imperatives of those that have the right of access to a research that provides, finally, «personalized» answers.

On the whole, research that becomes the 'advocacy tool', the most effective active support to a cause, to the people victory over the disease, to the triumph of life over multiple sclerosis.

The research, that changes life, starts by listening to the need of people for whom one works diligently. In 2013, the Society has once again called upon people with MS to express the needs for which they seek answers for today and for tomorrow.

To cite a significant example, people with multiple sclerosis have been involved actively in an important research on social costs funded by the Ministry of Health and presented at the last Congress of the Italian Society of Neurology in 2013.

Just like it was the people with MS and their family members who were the «engine» of the project IN-DEEP (Integrating and Deriving Evidence, Experiences and Preferences) that, by integrating the experiences and the preferences of the patients with the results of scientific research, has fine-tuned an information model via internet in order to guarantee access to clear, safe, evidence-based, shared information useful for making informed decisions.

Thus, what people with multiple sclerosis need? What do they demand to research?

Surely they ask that genetic variations and risk-factors, that have an impact on the **pathogenesis of the disease, are identified with precision**. There are 13 completed projects that are presented in this Compendium, that document the continuous commitment of FISM in promoting this field of basic research. Also 60% of new projects funded via FISM 2013 Call for Applications is linked to the knowledge of the risk-factors, the causes of the disease and its progression.

The people with MS, with great urgency, ask to research for a **classification** of the disease that is more precise and will allow a punctual, effective and early **diagnosis**. They want to have a «picture» of their individual situation, of the development of the lesions, of the state of the structure and the functionality of the nervous system, of the possibility to intervene in order to avoid or delay the neurodegeneration and the progression of physical disability.

In other words, people with MS call research for action, to arrive at truly personalized treatments, that stand on their side from the beginning along the whole «journey» that they will have to make with the disease. In this field 5 Projects of FISM 2014 Compendium are collocated.

But this is not enough for the research that FISM wants to promote: it is needed that every additional knowledge be strongly directed towards the fine-tuning of **new treatments** in order to fight against the disease.

It is precisely in the research for new treatments that various frontline projects funded by FISM are collocated.

11 projects are presented here; first of all those on stem cells and those that evaluate patients who have undergone autologous transplants of hematopoietic cells, fields in which Italian researchers supported by the Society are pioneers since more than ten years.

The projects that are developing remyelinating strategies might also result to be decisive in the same measure: it would be the next level in quality in treating the disease and in the prevention of neurodegeneration.

The studies, that are aimed at identifying new symptomatic treatments or on the knowledge of the molecular basis of nutrition and on the role of the intestinal flora in the inflammatory process might also result to be equally important in order to improve treatments and quality of life.

Disease life is also impacted by research on **neuroplasticity and neurorehabilitation** that are becoming one of the newer frontiers, of the distinctive characteristics of research on multiple sclerosis, particularly those that are funded and promoted in the whole world by MS Societies. A field in which AISM is directly committed through its Foundation together with high-quality Italian researchers. The 5 studies on the mechanism of synaptic plasticity presented here and those that may soon be applicable on motor imagery, on robot-assisted rehabilitation of the ambulatory function, as also those of transcranial stimulation for relieving fatigue are non-exhaustive examples of the importance that this field of research must achieve.

Three projects presented here are dedicated to the **quality of life**. These projects aimed at evaluating the capacity of the «caring systems» to promote wellbeing, the role that patients want to assume in «taking a decision» about how to get treated and the information that they need to have in order to freely decide about how to get treated in the best manner.

In addition to the Projects funded by the Call for applications and presented here, in 2013 FISM provides 3 million to «**Special Projects**» that promise to greatly affect the future of knowledge and treatment of MS.

A brief overview of the themes and titles of the «Special Projects» it is also important.

Since 2009, the Foundation has been funding the Immunochip project that is studying the genetic and susceptibility factors of multiple sclerosis. In 2013 this project led to the discovery of 48 new genetic variants that influence the risk of developing MS.

Since 2011 FISM has been funding two three-year long research projects: a special project of «laboratory of Axo-glia interactions» and a project in neurorehabilitation for the fine tuning of «symptomatic treatment through central and peripheral neurostimulation».

Since 2007 we have been committed to transform research on stem cells into therapy. In 2012 FISM has decided to promote Project MESEMS for a «therapy with mesenchymal stem cells». Other than that, always in 2012 it promoted two important rehabilitation projects on «fine-tuning the outcome for measuring the effectiveness of rehabilitation» and on «balance disorders», the Project PenSAMI for the development of a new model of palliative care in MS and the project of «stakeholder analysis» on how «families and people with MS confront the disability».

In 2013 FISM has opened other frontiers: a first «Special Project» aims at the establishment of an «Italian Network of Neuroimaging (INNI) for optimizing the use of advanced techniques of magnetic resonance imaging in patients with MS»; a second study intends to develop «new modulators of GPR17, a key receptor in the process of remyelination». In the end, a third research, proposes to improve the instruments for classification of MS through the identification of «biomarkers of diagnosis and prognosis». A vast, complex scenario of research finding emerges, some concluded and some still in progress.

Without forgetting the Call for Applications on the progressive forms of MS, mentioned in the previous pages, for which the Society played a decisive role. The Progressive MS Alliance excellence platform aims to be the catalyst of this high quality in order to win the challenge of developing a therapy for progressive forms. The key to achieving the «next level in quality» in curing MS, is in fact an «alliance» between the various parties involved, because as in the title of an editorial of Todd Sherer published in Nature Medicine in 2013 «money without collaboration won't bring cure».

This is the right moment to speed up together, MS Societies, the research community, patients, but also funding organisations, industry, regulatory agencies, and political decision makers, each for their part, at different levels. Everyone can, and probably must, make available their own excellence to have finally access to a personalized treatment to achieve freedom from MS.

Paola Zaratini
Director of Scientific Research



PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

Giulio, Disanto

Department of Neurology, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, UK

MENTORE: George Ebers and Sreeram Ramagopalan

Caratterizzazione funzionale delle varianti dei geni KIF coinvolti nella patogenesi della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Il decorso clinico della sclerosi multipla (SM) può variare da una condizione quasi impercettibile (SM benigna) a casi in cui la malattia progredisce molto velocemente (SM maligna). C'è ragione di ritenere che la genetica svolga un ruolo non solo nel determinare il rischio di SM ma anche il suo decorso clinico. L'obiettivo originale di questo studio è stato quello di identificare il potenziale ruolo svolto da una famiglia di geni chiamati KIF (importanti per il trasporto di mitocondri e vescicole sinaptiche nei neuroni) nell'influenzare il decorso clinico della SM. È ormai stabilito che sia i geni che l'ambiente determinano l'insorgenza della SM. Per esempio, è stato visto che più di 100 varianti genetiche, come anche la deficienza di vitamina D (VD) e l'infezione da virus di Epstein-Barr (EBV) aumentano il rischio di SM. Per questo, abbiamo anche deciso di studiare il ruolo svolto da fattori genetici e ambientali nel causare la SM.

RISULTATI

Abbiamo sequenziato 4 geni KIF (KIF1B, KIF5A, KIF21B e KIFAP3) in un elevato numero di pazienti con SM benigna, SM maligna e controlli senza SM. Abbiamo trovato la presenza di varianti genetiche con potenziali effetti negativi sulle proteine KIF nei pazienti con SM maligna ma non in quelli con SM benigna e controlli. Abbiamo tentato di replicare questi risultati in un gruppo separato di pazienti con SM, ma purtroppo non è stato possibile raccogliere nuovi campioni e abbiamo dovuto momentaneamente interrompere questo progetto.

Ci siamo quindi concentrati sul ruolo di geni e ambiente nel determinare l'insorgenza della SM. Abbiamo raccolto tutti gli studi sulla frequenza d'infezione da EBV in pazienti SM e controlli sani e abbiamo visto che la frequenza di quest'infezione aumenta con la latitudine. Questo è importante per-

ché più si vive lontano dall'equatore e più è elevata la probabilità di avere bassi livelli di VD. Studi recenti hanno suggerito che la VD può influenzare il controllo di infezioni virali. Abbiamo quindi deciso di studiare il rapporto tra VD e EBV e osservato che il trattamento con elevate dosi di VD diminuisce significativamente i livelli di anticorpi contro EBV nei pazienti con SM.

Abbiamo poi studiato la relazione tra varianti genetiche che influenzano il rischio di SM (varianti SM) e lo stato della cromatina in più di 100 tipi di cellule. La cromatina può essere definita come la combinazione di DNA e proteine nel nucleo cellulare e la sua conformazione determina quali regioni di DNA sono attive e quali inattive in ciascun tipo di cellula. Abbiamo integrato i dati sulle varianti SM e lo stato della cromatina e abbiamo visto che le varianti SM sono localizzate in regioni di DNA attive nelle cellule del sistema immunitario ed in particolare linfociti T CD4⁺, T CD8⁺ e B.

La deficienza di VD rappresenta un fattore di rischio per la SM, ma i meccanismi responsabili per questa associazione non sono chiari. Abbiamo studiato la relazione tra il recettore della VD (VDR) e gli stati della cromatina in cellule del sistema immunitario e osservato che il VDR si lega in regioni attive di DNA e che questo accade anche in prossimità delle varianti SM.

CONCLUSIONI

Varianti genetiche nei geni KIF sembrano avere un ruolo nel determinare il decorso clinico della SM. Questo suggerisce che la suscettibilità dei neuroni alla perdita di mielina che caratterizza la SM potrebbe influenzare la severità della malattia. Questi risultati sono però ancora preliminari e devono essere confermati in un gruppo separato di pazienti con SM. Abbiamo visto come la frequenza dell'infezione da EBV aumenti con l'aumentare della latitudine e co-

me il trattamento con VD sia in grado di influenzare la risposta immunitaria contro questo virus. Questi risultati suggeriscono la possibile presenza di un legame causale tra VD e EBV nella insorgenza della SM. Abbiamo poi usato dati di cromatina presi da più di 100 tipi di cellule per scoprire quali di questi sono alla base della SM. I risultati ottenuti dimostrano la natura immunitaria della SM e l'importanza di particolari popolazioni cellulari come linfociti T CD4⁺, T CD8⁺ e B. Infine, abbiamo visto come il VDR si lega in regioni di DNA attive in cellule del sistema immunitario e vicino alle varianti SM. Questo

suggerisce che i ruoli svolti dalla VD e dalle varianti SM convergono nell'influencare l'attività dei geni coinvolti nell'anomala risposta immunitaria che caratterizza la SM.

Non è chiaro come questi risultati influenzeranno la vita delle persone con SM. Ma l'identificazione dei tipi cellulari alla base dell'insorgenza della SM è importante per lo sviluppo di terapie sempre più mirate ed efficaci. Inoltre, lo studio dei meccanismi attraverso cui i fattori ambientali agiscono sul sistema immunitario è necessario per organizzare strategie di prevenzione della malattia.

Functional characterization of KIF genetic variants involved in multiple sclerosis pathogenesis

INTRODUCTION AND AIMS

The clinical outcome of multiple sclerosis (MS) varies from a barely perceptible lifelong disease to mortality within a year of disease onset. These two phenotypic extremes are thought to be benign and malignant forms of MS. There is reason to believe that genes may not only play a role in MS susceptibility, but also in clinical outcome. The original aim of this project was to characterize the potential role of KIF genes (a family of genes involved in axonal transport of mitochondria and synaptic vesicles) in influencing the clinical outcome of MS.

It is now established that both genes and environment underlie MS aetiology. For example, studies have shown that more than 100 genetic variants as well as vitamin D (VD) deficiency and past Epstein-Barr virus (EBV) infection increase the risk of developing MS. Therefore, in addition to the role played by KIF genes in clinical outcome, we aimed to elucidate the role of genetic and environmental factors influencing susceptibility to MS.

RESULTS

We sequenced kinesin family genes (KIF1B, KIF5A, KIF21B and KIFAP3) in a large number of benign MS, malignant MS and healthy individuals. At least one genetic variant with a likely functional effect was observed in the malignant samples but not in benign patients or controls. We aimed to replicate these results in a new separate cohort of MS patients and controls. Unfortunately, it has not been

possible to obtain new DNA samples and we had to temporarily suspend this part of the project.

We therefore focused on the role played by genetics and environment in determining the onset of MS. We performed a meta-analysis of studies investigating the frequency of EBV infection in MS patients and controls and found that the frequency of EBV infection increases with increasing latitude. This is important because living at northern latitudes is a major determinant of vitamin D (VD) deficiency, which also increases MS risk later in life. Recent data suggests that VD may influence the control of persistent infections. Therefore, we investigated whether high dose VD supplementation had any effect on the humoral response against EBV in MS patients. VD supplementation considerably decreased antibody levels against EBV.

We then studied the relation between genetic variants influencing the risk of MS (MS variants) and chromatin states across more than 100 different cell types. Chromatin can be defined as the combination of protein and DNA within the nucleus of a cell and its conformation determines whether a specific region of DNA is active or inactive in a particular cell type. By integrating MS variants and cell specific chromatin profiles, we found that MS variants were located within regions of the genome specifically active in immune cell types and in particular CD4⁺ T, CD8⁺ T and B cells.

As mentioned above, VD deficiency represents a risk factor for MS, but the molecular mechanisms

behind this association remain elusive. We investigated the relationship between vitamin D receptor (VDR) binding and chromatin states in immune cell types. We found that the VDR binds to active chromatin states in immune cell types and that this happens near MS variants more than expected by chance.

CONCLUSIONS

Genetic variation within KIF genes appears to influence the clinical outcome of MS. This suggests that neuronal susceptibility to demyelination may be an important factor determining how severe the disease will be. However, these results are still preliminary and require confirmation in a separate group of MS patients.

We observed that the frequency of EBV infection is positively associated with latitude and we demonstrated that vitamin D supplementation results in a decreased production of antibodies against this virus. These results support the presence of a cas-

cade linking these two environmental agents in the causal model of MS. We used chromatin data across more than 100 cell types to define which ones drive the onset of MS. We found a prominent role played by immune cell types and in particular CD4⁺ T, CD8⁺ T and B cells. Finally, we observed that a very large proportion of VDR binding in immune cells localizes to active DNA and that this is particularly evident near genetic variants influencing MS risk. These findings indicate how the roles played by VD and by MS associated genetic variants converge into the regulation of the same genes that likely drive the abnormal immune response in MS.

It is still unclear how these results will influence the life of MS patients. However, the identification of the cell types driving MS aetiology will be relevant for the development of strategies of targeted treatment. Furthermore, elucidating how environmental agents such as VD and EBV infection act in MS will provide the rationale behind the development of strategies of disease prevention.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Disanto G, Sandve GK, Ricigliano VA, Pakpoor J, Berlanga-Taylor AJ, et al. DNase hypersensitive sites and association with multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2014 Feb 15;23(4):942-8. doi: 10.1093/hmg/ddt489.

Disanto G, Pakpoor J, Morahan JM, Hall C, Meier UC, et al. Epstein-Barr virus, latitude and multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013;19: 362-365.

Disanto G, Handel AE, Damoiseaux J, Hupperts R, Giovannoni G, et al. Vitamin D supplementation and antibodies against the Epstein-Barr virus in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2013 Oct;19(12):1679-80. doi: 10.1177/1352458513494494.

Disanto G, Watson CT, Meier UC, Ebers GC, Giovannoni G, Ramagopalan SV Month of birth and thymic output. *JAMA Neurology* 2013; 70: 527-528

Disanto G, Hall C, Lucas R, et al. Assessing interactions between HLA-DRB1*15 and infectious mononucleosis on the risk of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013 Sep;19(10):1355-8. doi: 10.1177/1352458513477231

Disanto G, Ramagopalan SV (2013) On the sex ratio of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013 Jan;19(1):3-4. doi: 10.1177/1352458512447594.

Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2012; 78: 823-832.

Disanto G, Sandve GK, Berlanga-Taylor AJ, Morahan JM, Dobson R, et al. Genomic regions associated with multiple sclerosis are active in B cells. *PLoS One* 2012; 7: e32281.

Disanto G, Sandve GK, Berlanga-Taylor AJ, Ragnedda G, Morahan JM, et al. Vitamin D receptor binding, chromatin states and association with multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3575-3586.

Ragnedda G, Disanto G, Giovannoni G, Ebers GC, Sotgiu S, et al. Protein-protein interaction analysis highlights additional loci of interest for multiple sclerosis. *PLoS One* 2012; 7: e46730.

Disanto G, Ramagopalan SV Multiple sclerosis and co-morbid autoimmune disease: the final nail in the coffin? *Mult Scler* 2012; 18: 1370-1371

Disanto G, Morahan JM, Ramagopalan SV (2012) Multiple sclerosis: risk factors and their interactions. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 2012;11: 545-555

Borsa di studio finanziata con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 20.700 €

Mara Marongiu

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

COLLABORATORI:

Angela Loi, Loredana Porcu, Francesca Crobu, Isadora Asunis, Laura Crisponi, Francesco Cucca

Studio del meccanismo funzionale alla base dell'associazione di CBLB con la sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una grave patologia multifattoriale che interessa il sistema nervoso centrale (SNC). È caratterizzata da perdita di mielina, infiammazione cronica e disfunzione neurologica progressiva. Nelle popolazioni Europee, la SM è una causa comune di disabilità neurologica nei giovani adulti. Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha effettuato uno studio di associazione genetica su tutto il genoma (GWAS) nella popolazione sarda (studio caso/controllo) e ha identificato un'associazione tra la SM e diversi SNPs (polimorfismi a singolo nucleotide) posizionati nel gene CBLB. L'associazione più forte identificata è quella con lo SNP rs9657904 ($p=1.60 \times 10^{-10}$), posizionato nel primo introne del gene. Un secondo SNP, ovvero rs7649466, ha mostrato un grado di associazione simile a quello del rs9657904, e si trova nella regione non tradotta al 5' del gene, (Sanna *et al.*, 2010).

CBLB, che codifica per una proteina della famiglia RING delle ubiquitin ligasi E3, agisce come regolatore negativo di molti recettori tirosin chinasi e più in generale dell'attivazione delle cellule T. Il funzionamento alterato del CBLB è implicato nell'autoimmunità.

Il razionale della ricerca è quello di analizzare il ruolo degli SNPs rs9657904 e rs7649466 trovati associati con SM, attraverso la caratterizzazione funzionale della regione genomica che li comprende entrambi, valutando, inoltre, gli aplotipi protettivo (Hap1) e predisponente (Hap2).

RISULTATI

Questo progetto è stato finanziato come studio pilota. Abbiamo analizzato *in vitro* una regione genomica di 1.9kb, contenente gli SNPs rs9657904 e rs7649466, considerando gli aplotipi protettivo

(Hap1) e predisponente (Hap2). Per caratterizzare il ruolo funzionale di questi SNPs, la regione di 1.9kb e diversi frammenti di delezione derivati da essa sono stati inseriti in plasmidi necessari per eseguire saggi reporter basati sulla luciferasi, effettuati in cellule Saos-2 e Jurkat che esprimono endogenamente il CBLB. Questi saggi hanno rivelato che la regione di 1.9 kb ha diverse attività regolatorie dipendenti dall'aplotipo. In particolare i risultati supportano l'ipotesi che le regioni che comprendono rs7649466 e rs9657904 abbiano rispettivamente attività promotrice e silenziatrice.

La nostra ipotesi di partenza era che l'aplotipo di predisposizione Hap2 fosse associato con una diminuzione dell'espressione di CBLB, quindi con una riduzione del controllo negativo sull'infiammazione. Malgrado studi di espressione in cellule T primarie selezionate in base ai diversi aplotipi Hap1 e Hap2 (effettuati dal nostro gruppo nell'ambito di un altro progetto assegnato dalla FISM al prof. Francesco Cucca) supportino questa ipotesi, i nostri risultati *in vitro* sono discordanti, con Hap2 associato ad un aumento dell'espressione del gene reporter, che corrisponderebbe all'aumento dell'espressione del gene CBLB in cellule primarie con medesimo aplotipo.

Questa discordanza rimane ancora da chiarire. Le possibili spiegazioni che proponiamo riguardano i limiti degli studi *in vitro*, della grandezza della regione genomica considerata e/o il tipo di linee cellulari utilizzate. Per superare questi limiti ripeteremo gli esperimenti di luciferasi in cellule T primarie, e raffineremo l'associazione genetica alla ricerca di eventuali nuove varianti associate.

Attraverso studi *in silico* abbiamo individuato potenziali siti di legame per la vitamina D nella regione promotrice. Abbiamo quindi eseguito esperimenti di

induzione con la vitamina D *in vitro*, su cellule transfettate con vettori contenenti la regione interessata, posizionata a monte del gene reporter per la luciferasi. Questi studi suggeriscono che l'espressione del CBLB possa essere indotta con la vitamina D, ma sono necessari ulteriori studi per identificare esattamente i siti di legame.

Gli obiettivi principali dello studio pilota sono stati raggiunti malgrado l'analisi per chiarire la funzione delle regioni regolatrici identificate, e il loro ruolo nella SM rimanga da completare. I nostri risultati supportano il proseguimento della ricerca, che potrà portare ad una migliore comprensione del ruolo di CBLB nella SM.

CONCLUSIONI

Il CBLB è un regolatore negativo dell'infiammazione,

e il suo ruolo è considerato importante sia nelle patologie autoimmuni che nella protezione dai tumori. L'associazione genetica del CBLB con la SM, è supportata dal suo ruolo ben noto nel controllo delle risposte immuni. Malgrado le varianti associate con la SM siano localizzate nelle regioni di controllo putative del CBLB, il meccanismo esatto che sottende la loro funzione non è stato ancora chiarito. Dimostrare le associazioni causative con la malattia non è semplice, perché le associazioni derivanti da studi GWAS solitamente sono caratterizzate da effetti funzionali deboli. Sono tuttavia necessarie evidenze funzionali che chiariscano i meccanismi molecolari alla base dell'associazione genetica e della patofisiologia della SM, al fine di rendere possibile lo sviluppo dei trattamenti farmacologici, che rappresentano il nostro obiettivo finale.

Study of the functional mechanisms underlying the association of CBLB with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a common and severe multifactorial disorder affecting central nervous system (CNS) and it is characterized by myelin loss, chronic inflammation and progressive neurological dysfunction. In Europeans MS is a common cause of neurological disability in young adults.

Recently our research group carried out a Genome Wide Association Study (GWAS) in the Sardinian population (case/control study) and found genetic associations between MS and several SNPs (single nucleotide polymorphisms) located within the CBLB gene. The strongest association was with rs9657904 ($p=1.60 \times 10^{-10}$), located within the intron 1 of the CBLB gene. A second SNP rs7649466, located in the 5'UTR region, showed a degree of association similar to that of rs9657904 (*Sanna et al., 2010*).

CBLB encodes a protein that belongs to the RING-family E3 ubiquitin ligases acting as negative regulator of many receptor tyrosine kinases. CBLB has been recently highlighted as a negative regulator of T-cell activation and its dysfunction usually results in autoimmunity.

The rationale of this study is to analyze the functional role of the SNPs rs9657904 and rs7649466

found associated to MS, by the characterization of the putative regulatory role of the genomic region harboring both SNPs, and of their relationship with MS considering the protecting (Hap 1) and predisposing (Hap 2) haplotypes.

RESULTS

This project was supported as a pilot study. We analyzed *in vitro* a 1.9 kb genomic region containing SNPs rs9657904 and rs7649466, taking into account the protecting (Hap 1) and the predisposing (Hap 2) haplotypes. To characterize the functional role of these SNPs, the 1.9 kb region as well as several derived deletion fragments were inserted into plasmids necessary to perform luciferase reporter assays in Saos-2 and Jurkat cell lines, that express endogenously CBLB. These assays revealed that the 1.9 kb region shows differential transcriptional regulatory activity, haplotype-dependent. In particular the results suggest that the regions encompassing rs7649466 and rs9657904 have respectively promoter and silencer activity.

Our starting hypothesis was that the predisposing haplotype (Hap 2) would have been associated to a decrease in CBLB expression, thus to a reduction of its negative control of inflammation. Although

CBLB expression studies on Hap1 and Hap2 primary T cells (performed by our group in the context of another project assigned by FISM to prof. Francesco Cucca), support this hypothesis, our *in vitro* results are apparently discordant, with Hap 2 associated with an increased expression of the reporter gene, so suggesting an increased expression of CBLB.

This discordance has to be addressed. At the moment, possible explanations proposed could be related to the limit of *in vitro* analysis, to the size of the genomic region considered, and/or to the cell line used. To overcome these limits we are planning to repeat luciferase experiments by transfection of primary T cells and to refine the genetic association to eventually find new variant(s) associated.

In silico prediction analysis for transcription factor binding sites revealed a potential binding motif for vitamin D in the promoter region. *In vitro* luciferase assays with or without vitamin D induction suggested that CBLB expression would actually be under its control, although more studies are requested to identify the exact binding site(s).

Main aims of the pilot study have been achieved although further work is needed to clarify the function

of the regulatory regions identified, and their role in MS. Our results support the continuation of the research, which would result in a better comprehension of the role of CBLB in MS.

CONCLUSIONS

CBLB is a negative regulator of inflammation, and its role is considered important both in autoimmune diseases and in tumor protection. The genetic association of CBLB found with MS, is clearly supported by its already well known role in the control of the immune responses. Although the MS associated variants are located in putative regulatory regions for CBLB, the exact mechanism underlying their function have not yet been clarified. Furthermore our group is still working on the refinement of the genetic association.

Testing causative associations with the disease is not straightforward, because genetic association derived from GWAS usually are characterized by weak functional effects. However functional evidences are necessary to understand the molecular mechanisms underlying pathophysiology of MS, required for the subsequent development of pharmacological treatments, which represent our very final aim.

Simona Perga

Laboratorio di Neurobiologia Clinica, Centro di Riferimento Regionale per la Sclerosi Multipla (CReSM) AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano TO

COLLABORATORI:

Antonio Bertolotto, Francesca Montarolo, Serena Martire, Michela Spadaro, Nicole Navone, Marco Capobianco, Francesca Sperli, Simona Malucchi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

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

Sandra D'Alfonso, Dipartimento di Scienze Mediche Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università del Piemonte Orientale, Novara

Analisi delle variazioni di singoli nucleotidi polimorfi in TNFAIP3 associati alla sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'enzima A20 (codificato dal gene TNFAIP3) svolge un ruolo chiave nella regolazione negativa dell'infiammazione e dell'immunità, limitando numerosi segnali pro-infiammatori, tra cui quelli mediati da NFκB. Ridotti livelli di espressione di A20 predispongono a patologie croniche infiammatorie tra cui la sclerosi multipla (SM). Recentemente abbiamo dimostrato una significativa diminuzione dei livelli trascrizionali di A20 nel sangue di pazienti con SM, con un ritorno a livelli normali durante la gravidanza.

Dal momento che A20 potrebbe rappresentare un bersaglio farmacologico interessante, abbiamo cercato di capire il ruolo dell'enzima nella patologia della SM e le cause della sua deregolazione nei pazienti, considerando possibili meccanismi genetici e fattori ormonali collegati alla gravidanza.

A tale scopo abbiamo valutato se specifiche varianti alleliche di A20 potessero causare nei pazienti con SM un ridotto livello di espressione dell'enzima, con conseguente riduzione dell'attività anti-infiammatoria, e se vi fosse un aumento del rischio di sviluppare la malattia nei soggetti che presentino tali varianti. In particolare, ci siamo focalizzati sulla correlazione tra l'espressione genica di A20 e la genotipizzazione di specifici polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nella regione regolatoria e codificante del gene TNFAIP3.

In parallelo abbiamo ipotizzato che alcuni ormoni

importanti durante la gravidanza potessero influenzare i livelli di espressione di A20: abbiamo quindi valutato l'effetto di beta-estradiolo, progesterone, idrocortisone e prolattina sui livelli di A20 nel sangue intero ottenuto da pazienti con SM e controlli sani (CS) in presenza o meno di lipopolisaccaride (LPS) e fitoemoagglutinina (PHA), aggiunti per simulare un ambiente infiammatorio.

RISULTATI

Sfruttando l'approccio "haplotype tagging SNPs" (tagSNPs) abbiamo genotipizzato un pannello di SNP selezionati nella regione regolatoria e codificante del gene TNFAIP3 in un gruppo di pazienti con SM e CS per valutare se specifici polimorfismi o uno o più assetti aploipici fossero in grado di influenzare i livelli di espressione di A20. Con questa strategia abbiamo identificato un pannello di 17 tagSNPs nel promotore (considerando 100 kb a monte del gene), 9 tagSNPs nella regione codificate e altri 3 SNP non sinonimi, in grado di cambiare l'aminoacido codificato.

Per effettuare una correlazione genotipo-espressione di A20 abbiamo selezionato una popolazione di 58 pazienti con SM a recidive e remissioni, *naïve* al trattamento farmacologico specifico, e 54 controlli sani associati per sesso ed età. Dall'analisi di questi gruppi abbiamo nuovamente confermato che l'espressione di A20 è significativamente ridotta nei pazienti con SM ($p=0,010$). L'analisi di correlazione

tra il genotipo e l'espressione del RNA messaggero (mRNA) ha rivelato l'associazione tra bassi livelli del mRNA di A20 e gli SNP rs719149 nella regione codificante e rs694764 nel promotore ($p=0,055$), oltre agli SNP rs2230926 non-sinonimo nel gene e rs670369 nella regione regolatoria, i quali mostrano una tendenza alla significatività statistica ($p=0,059$ e $p=0,099$ rispettivamente). Inoltre, abbiamo dimostrato che due specifici assetti aplo-tipici nel promotore (comprendenti gli SNP rs657597, rs694764, rs799419, rs670369, rs2027276, rs11970361, rs11970411, rs730503, rs600144, rs12527457) influenzano significativamente l'espressione di A20 nella popolazione studiata.

Per testare l'ipotesi che gli ormoni che rivestono un ruolo chiave durante la gravidanza siano in grado di influenzare l'espressione di A20, abbiamo valutato l'effetto di beta-estradiolo, progesterone, idrocortisone e prolattina sui livelli di A20 nel sangue intero ottenuto da dieci pazienti con SM *naïve* al trattamento e 20 controlli sani (CS), associati per sesso ed età, in presenza o meno di LPS e PHA. Abbiamo osservato che tutti gli ormoni sono in grado di influenzare

l'espressione di A20, ma in modo diverso nei pazienti rispetto ai CS. Mentre nei CS il livello di A20 sembra aumentare in seguito al trattamento con estradiolo e progesterone, nei pazienti diminuisce. La modulazione è neutralizzata dall'aggiunta di LPS/PHA, sebbene in maniera minore rispetto ai CS. L'idrocortisone, invece, mostra effetti simili in CS e pazienti, ma in questi ultimi con entità minore. Infine, la prolattina è in grado di aumentare l'espressione di A20 in condizioni basali, mentre in combinazione con la stimolo infiammatorio è incapace di incrementarla ulteriormente nei pazienti come accade invece per i CS.

CONCLUSIONI

I dati suggeriscono che gli SNP nel gene TNFAIP3 ed in particolare nel suo promotore hanno un ruolo nella regolazione dell'espressione di A20, sebbene sia probabile il coinvolgimento di ulteriori meccanismi. Infatti, i livelli di A20 sembrano influenzati da fattori solubili come gli ormoni sessuali, sia nei CS che nei pazienti, anche se in modi differenti. Questi risultati spiegano in parte la bassa espressione di A20 osservata nei pazienti con SM.

Analysis of single-nucleotide polymorphisms in TNFAIP3 associated with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The ubiquitin-ending enzyme A20 (codified by TNFAIP3 gene) is a key player in the negative regulation of inflammation and immunity, by restricting and terminating a number of pro-inflammatory signals, including NFκB pathway. A reduced level of A20 expression predisposes to chronic inflammation-sensitive pathologies, including multiple sclerosis (MS). Recently, we demonstrated a significant decrease of A20 transcriptional level in peripheral blood obtained by MS patients, with a reversion to a normal level during pregnancy.

Since A20 enzyme could be potentially amenable to pharmacological intervention, we aimed at deepen the knowledge of the role of A20 in the immunopathology of MS. In particular, we wanted to investigate the causes underlying A20 gene expression deregulation in MS patients, evaluating possible genetic mechanisms and pregnancy-related hormonal factors. At this purpose, we tested whether specific A20 allelic vari-

ants may cause a reduced level in MS patients with decreased anti-inflammatory activity, influencing the development of the disease in individual bearing these variants. Particularly, we focused on the correlation between A20 gene expression and the presence of specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regulatory and in the coding genomic regions.

In parallel, we hypothesized that pregnancy-related hormones could influence A20 gene expression. Therefore, we evaluated the effects of beta-estradiol, progesterone, hydrocortisone and prolactin on A20 level on whole blood obtained by MS patients and matched healthy controls (HC), followed by the addition or not of the lipopolysaccharide (LPS) and the phytohaemagglutinin (PHA) to simulate an inflammatory environment.

RESULTS

We genotyped selected "haplotype tagging SNPs" (tagSNPs) in TNFAIP3 gene and regulatory regions in

MS patients and HC group to assess whether specific polymorphisms or one or more haplotype settings were able to influence A20 gene expression. The “tagging SNPs” approach allows to capture the information of the haplotype blocks present in each gene by genotyping a minimum number of SNPs, paying particular attention to those already associated with other autoimmune inflammatory diseases. With this strategy we identified a panel of 17 tagSNPs in the regulatory region which includes 100 kb upstream the TNFAIP3 gene, 9 tagSNPs in the coding region and other 3 interesting non-synonymous SNPs.

To perform a correlation between A20 genotype and gene expression level, we selected a population comprehending 58 treatment-naïve relapsing-remitting MS patients and 54 sex- and age-matched HC. In particular MS patients blood samples were obtained at the diagnosis before starting any pharmacological treatment, to avoid any influence on gene expression. In this new groups we confirmed that A20 expression was significantly lower in MS patients compared to healthy controls ($p=0.010$). Moreover, genotype-messenger RNA (mRNA) expression correlation analysis revealed that SNP rs719149 in the coding region and SNP rs694764 in the promoter were associated with decreased A20 mRNA levels in the whole population ($p=0,055$), while the non-synonymous rs2230926 in the gene and the rs670369 in the regulatory region showed a trend ($p=0,059$ and $p=0,099$ respectively). In addition, two specific haplotype combinations of SNPs located in the TNFAIP3 promoter (including SNPs rs657597, rs694764, rs799419, rs670369, rs2027276, rs11970361, rs11970411, rs730503,

rs600144, rs12527457) resulted significantly associated to gene expression.

At the same time, we hypothesized that pregnancy-related hormones could influence A20 gene expression. Therefore, we evaluated the effects of beta-estradiol, progesterone, hydrocortisone and prolactin on A20 level on whole blood obtained by ten treatment-naïve MS patients and 20 matched HC followed by the addition or not of LPS and PHA. We demonstrated that all the hormones were able to modulated A20 expression both in MS patients and HC. However, while in HC they increased A20 level, in MS patients estradiol and progesterone decreased it. This was rescued by the addition of LPS/PHA but at lower levels compared to HC. Furthermore, hydrocortisone showed similar effects on both MS patients and HC, although the magnitude of the phenomenon was lower in patients than in HC. Finally, prolactin was able to increase A20 gene expression in basal condition but in combination with the inflammatory LPS/PHA stimulation in MS patients was unable to further increase its level, as occurred in HC, as a cell protective mechanism.

CONCLUSIONS

These data suggest that SNPs in TNFAIP3 genomic region and particularly in the promoter seem to have a role in the A20 gene expression regulation, even if others mechanism are probably involved. In fact, A20 transcripts appear influenced by soluble factors such as sex-hormones both in MS patients and HC, although in a different way. These results could partially explain the decreased level of A20 observed in MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Perga S, Martire S, Montarolo F, Spadaro M, Navone ND, Berchiolla P, Bertolotto A. Role of single nucleotide polymorphisms and haplotype variants in TNFAIP3 expression modulation in multiple sclerosis patients. *Manuscript in preparation*.

Perga S, Martire S, Montarolo F, Spadaro M, Navone ND, Berchiolla P, Bertolotto A. Investigating the causes of A20 down-regulation in multiple sclerosis: genetic mechanisms and hormonal modulations. 15th International Congress of Immunology – ICI 2013, Milan, August 22-27, 2013

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per un periodo di 2 anni per l'ammontare di 40.000 €

Paola Caiafa

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

COLLABORATORI:

Michele Zampieri, Fabio Ciccarone, Roberta Calabrese, Elisabetta Valentini, Tiziana Guastafierro, Maria Giulia Bacalini, Vito G.A. Ricigliano

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Marco Salvetti, Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso, Sapienza Università di Roma, Roma

Riprogrammazione epigenetica nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

I cambiamenti epigenetici che avvengono nel sistema immunitario e nel cervello sono alla base dei meccanismi patogenetici della sclerosi multipla (SM). La deregolazione del quadro di metilazione del DNA può portare ad instabilità genomica ed ad alterazione dell'espressione genica. I pazienti affetti da SM presentano una diminuzione di 2/3 dei livelli di 5metilcitosina (5mC) rispetto ai controlli. L'evento di demetilazione può determinare instabilità genomica, ma soprattutto l'attivazione di geni che devono essere silenti nel cervello. Quest'ultimo evento è stato descritto per l'enzima peptidil-arginina deiminasi 2 (PAD2), che è significativamente più espresso nel cervello e nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) di pazienti affetti da SM a causa della demetilazione del suo promotore. L'induzione di PAD2 sembra essere coinvolta nella destabilizzazione della mielina e nell'esacerbare la risposta autoimmune nel cervello. Il nostro obiettivo è stato quello di fornire una serie di informazioni sui cambiamenti epigenetici in PBMCs di pazienti con SM rispetto a donatori sani (H) e di individuare un metodo diagnostico non invasivo per questa patologia. Abbiamo ipotizzato che è possibile trovare una corrispondenza tra sangue e cervello nell'espressione di geni coinvolti nella regolazione epigenetica. Dati di letteratura mostrano, infatti, che le PBMC rappresentano un surrogato del cervello nell'identificazione di biomarcatori delle malattie neurologiche, supportando l'uso di tali cellule nei nostri esperimenti. Per caratterizzare ulteriormente il quadro epigenetico nella SM, abbiamo concentrato la nostra attenzione su geni che codificano proteine coinvolte in eventi epigenetici come: metilazione/demetilazio-

ne del DNA; poli-ADP-ribosilazione e degradazione del polimero di ADP-ribosio e di altri geni potenzialmente coinvolti nell'eziopatogenesi della SM.

RISULTATI

Il nostro studio è stato incentrato sull'espressione e l'attività enzimatica della famiglia delle DNA metiltransferasi (DNMTs) e delle proteine TET coinvolte rispettivamente nell'aggiunta di 5mC sul genoma e nella formazione dell'intermedio di demetilazione del DNA 5-idrossimetilcitosina (5hmC). I nostri risultati hanno dimostrato che l'espressione di TET2 e DNMT1 è diminuita nei PBMC di pazienti con SM, sia a livello di mRNA che di proteina. Questa diminuzione si accompagna con differenze nella metilazione del loro promotore. I diminuiti livelli di TET2 corrispondono a una bassa quantità di 5hmC sul genoma di pazienti SM mentre il livello di 5mC è leggermente aumentato.

Per quanto riguarda la poli-ADP-ribosilazione la nostra analisi è stata estesa agli enzimi della poli-ADP-ribosilazione, coinvolti nella regolazione della metilazione del DNA attraverso la modulazione dell'attività della DNMT1. Abbiamo riscontrato una ridotta espressione di PARG, enzima che degrada i polimeri di ADP-ribosio. In parallelo abbiamo condotto esperimenti al fine di studiare il livello basale ed inducibile dell'attività PARP. I risultati hanno mostrato che, sebbene i livelli basali di attività PARP erano simili tra i campioni H e SM, era presente una inferiore attivazione di PARP in campioni SM in presenza di DNA tagliato.

Abbiamo concentrato la nostra attenzione anche su CTCF poiché questo fattore di trascrizione è coinvolto nel *cross-talk* tra poli ADP-ribosilazione e metila-

zione del DNA. CTCF controlla sia l'espressione di geni coinvolti nella sclerosi multipla sia il passaggio dalla fase latente a litica del virus Epstein-Barr, che è noto essere coinvolto nella patogenesi della SM. I nostri dati evidenziano che CTCF è espresso sia in MS che in donatori H e che il suo livello di espressione non cambia nella patologia. La nostra ricerca si è focalizzata anche sul rapporto tra le due isoforme di CTCF, la proteina di 130 kDa e la forma poli ADP-ribosilata di 180 kDa. E quest'ultima rappresenta la forma predominante nei PBMC dei pazienti SM.

Abbiamo analizzato anche geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi della SM, come la famiglia NOTCH. Dati di letteratura indicano che il segnale di NOTCH può rappresentare un nuovo interessante bersaglio terapeutico nella SM. I nostri risultati mostrano che i livelli di NOTCH1 sono significativamente aumentati nei pazienti con SM, mentre NOTCH3 non è espresso nei PBMCs. Per

quanto riguarda gli studi sui gemelli monozigoti avevamo disponibilità solo del DNA. Abbiamo analizzato i cambiamenti dello stato di metilazione del DNA dei geni deregolati nei PBMC di pazienti SM. Tra le 5 coppie di gemelli esaminati, di cui uno affetto dalla patologia, abbiamo scoperto che solo in una coppia, l'individuo affetto mostrava ipermetilazione del promotore di tutti i geni ad eccezione di PAD2.

CONCLUSIONI

I nostri dati forniscono nuove informazioni sui cambiamenti epigenetici che avvengono nelle cellule mononucleate del sangue di pazienti affetti da SM e rafforzano l'idea che l'epigenetica possa avere ruoli rilevanti nella patogenesi della SM. Questa ricerca è anche di grande interesse al fine di individuare un metodo non invasivo da utilizzare nella diagnosi e/o nel trattamento della SM.

Epigenetic reprogramming in multiple sclerosis patients

INTRODUCTION AND AIMS

Epigenetic changes occurring in the immune system and in the brain may support multiple sclerosis (MS) pathogenesis. Aberrant DNA methylation can lead to genome destabilization and to deregulated gene expression. Multiple sclerosis (MS) patients show a decrease in 5-methylcytosine (5mC) level by 2/3 in white matter. This demethylation is dangerous: it is responsible for genomic instability but even more for reactivation of genes that must be silenced in brain. The latter was demonstrated for peptidyl arginina deiminase 2 (PAD2), which is significantly up-regulated in brain and PBMCs of MS patients because its promoter is demethylated. PAD2 over-expression seems to be responsible for myelin deregulation and for reinforcing autoimmune response in MS brain. Aim of this study has been to provide a range of information on epigenetic changes in PBMCs from MS patients and to identify a non-invasive diagnostic method for this pathology. We hypothesized that it was possible to find a correspondence between blood and brain in expression of genes involved in epigenetic regulation. In fact, data showing that PBMCs represent a good substitute for brain to identify biomarkers for neurological diseases support the use of PBMCs in our experiments. To further characterize

the epigenetic landscape in MS, we focused our attention on genes encoding proteins involved in epigenetic events as: DNA methylation/demethylation machinery; poly(ADP-ribosyl)ation/(ADP-ribose)polymer degradation; other potential genes involved in the etiopathogenesis of MS.

RESULTS

Our study has been focused on the expression of the enzymes involved in DNA methylation/demethylation machinery. Attention was focused on the expression and enzymatic activity of DNA methyltransferases (DNMTs) and Ten-eleven-translocation (TET) family proteins involved in the addition of 5mC on the genome and in the formation of the intermediate of DNA demethylation 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), respectively. Our results showed that the expression of TET2 and DNMT1, is down-regulated both at mRNA and protein levels in PBMCs of MS patients vs healthy donors. This down-regulation could be associated with slight but reproducible differences in the methylation of specific CpGs present in their promoters. The decrease of TET2 level corresponds to low amount of 5hmC on the genome of MS patients while the level of 5mC is slightly increased.

Concerning poly(ADP-ribose)ation machinery our analysis was extended to enzymes responsible for ADP-ribose polymer synthesis and degradation as they are involved in the regulation of DNA methylation patterns through the modulation of DNMT1 activity. We found reduced expression of PARG enzyme. Parallel experiments were carried out to study the basal and inducible level of PARP activity. Results showed that although basal levels of PARP activity were similar in H and MS samples, interestingly, lower PARP activation was evidenced in MS samples in the presence of nicked DNA.

We focused our attention also on CTCF since this transcriptional factor is involved in the cross-talk between poly(ADP-ribose)ation and DNA methylation. CTCF controls both the expression of genes involved in multiple sclerosis and the passage from the latent to lytic phase of Epstein-Barr virus, which is known to be involved in MS pathogenesis. Our data evidenced that CTCF is expressed in both MS and H donors and the expression level does not change in the pathology. This research was also focused on the ratio between the two forms of CTCF which were previously identified: a 130-kDa protein (CTCF-130) and the poly(ADP-ribose)ation-modified 180-kDa isoform (CTCF-180). Interestingly, Western-blot analysis showed that the 180 kDa form

of CTCF, corresponding to the PARylated protein represents the predominant form present in PBMCs of MS patients. We focused our attention also on genes potentially involved in MS pathogenesis as NOTCH family; several findings indicate that NOTCH signaling may represent a novel interesting therapeutic target in MS. Our results show that NOTCH1 levels are significantly up-regulated in MS patients while no expression was observed for NOTCH3. As concerns the study on monozygotic twins, we have only had the availability of DNAs. We analyzed changes in DNA methylation profiling of the genes that we found to be up/down regulated in PBMCs of MS patients. Out of the five sets of twins examined, we found that in only one set, were promoters hypermethylated in MS subject apart from PAD2.

CONCLUSIONS

Our data provide new information on epigenetic changes in peripheral blood mononuclear cells of MS patients showing new pathogenic mechanisms and reinforce the idea that epigenetics may have relevant roles in MS pathogenesis. This research is also of interest to provide new information to generate a set of data useful for non-invasive diagnosis and/or treatment of MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Calabrese R., Valentini E., Ciccarone F., Guastafierro T., Bacalini M.G., Ricigliano V.A.G., Zampieri M., Annibali V., Mechelli R., Franceschi C., Salvetti M and Caiafa P. TET2 gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis peripheral blood cells. *BBA Molecular Basis of Disease*, *in press*

Calabrese, R., Valentini E., Ciccarone, F., Guastafierro, T., Bacalini, M.G., Zampieri, M., Ricigliano, V.A.G., Annibali, V., Mechelli, R., Salvetti, M., Caiafa P., Epigenetic reprogramming in peripheral mononuclear cells from multiple sclerosis patients. XXV Italian Meeting "ADP-RIBOSYLATION REACTIONS" IGM -CNR Pavia, 31 May-01 June 2013.

Calabrese, R., Valentini E., Ciccarone, F., Guastafierro, T., Bacalini, M.G., Zampieri, M., Ricigliano, V.A.G., Annibali, V., Mechelli, R., Salvetti, M., Caiafa P., Epigenetic reprogramming in peripheral mononuclear cells from multiple sclerosis patients. Congresso Scientifico Annuale FISM - 29-30 May 2013.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 40.000 €

Cosima Baldari

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

COLLABORATORI: **Cristina Ulivieri, Maria Teresa Savino, Emanuela Fanigliulo, Giulia Masi, Patrucci Laura**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

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

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

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

La proteina adattatrice Rai in differenziamento, attività e chemiotassi dei linfociti Th17 e nella patogenesi della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia cronica demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata da infiammazione e neurodegenerazione, la cui eziologia non è ancora ben conosciuta. Tuttavia dati ottenuti su lesioni SM, suscettibilità genetica e studi su modelli animali, così come l'efficacia delle immunoterapie, forniscono forti elementi a favore del fatto che la SM sia una malattia mediata dal sistema immunitario in cui l'infiammazione locale nel SNC e il risultante danno tissutale sono principalmente mediati da linfociti T CD4⁺ autoreattivi per la mielina. È stato proposto che i linfociti T autoreattivi attivati in periferia passano nel SNC dove vengono riattivati da macrofagi e cellule della microglia che presentano antigeni della mielina. Tra le cellule CD4⁺ i linfociti Th17 sono stati identificati come il principale tipo cellulare implicato nella patogenesi della SM, come indicato dalla aumentata frequenza di linfociti Th17 e dalle elevate concentrazioni di IL-17 documentate nelle lesioni del SNC, nel liquido cerebro-spinale e nel sangue di pazienti SM. L'inibizione delle risposte mediate da IL-17/Th17 appare pertanto al momento l'opzione terapeutica più promettente nella SM. Identificare regolatori negativi del differenziamento della funzione delle cellule Th17 potrebbe quindi promuovere lo sviluppo di terapie mirate sicure ed efficaci. Il principale obiettivo di questo progetto è stato quello di capire se Rai, un membro della famiglia degli adattatori Shc che abbiamo recentemente dimostrato controllare negativamente lo sviluppo di

una malattia autoimmune simile al lupus sistemico eritematoso (LSE) attenuando le risposte T e B, fosse in grado di modulare non solo l'attivazione dei linfociti CD4⁺ ma anche il loro differenziamento a linfociti effettori noti essere associati con l'autoimmunità, traslando i risultati alla patogenesi della SM.

RISULTATI

Nella fase iniziale del progetto abbiamo studiato il ruolo di Rai nello sviluppo di linfociti Th1 e Th17, che sono implicati nella patogenesi di diverse patologie autoimmuni tra cui il LSE e la SM. Il ruolo di Rai nel differenziamento di linfociti Th1, Th2 e Th17 è stato studiato utilizzando linfociti T isolati da topi Rai^{-/-} e di controllo e valutando l'espressione di citochine e fattori di trascrizione caratteristici per ogni sottopopolazione. I risultati ottenuti hanno mostrato che l'assenza di Rai promuove il differenziamento spontaneo dei linfociti verso linfociti Th1 e Th17 mentre reprime il differenziamento dei Th2, a supporto di un ruolo di Rai non solo quale regolatore negativo dell'attivazione dei linfociti T ma anche dello sviluppo di linfociti Th1 e Th17 *in vivo*. Questi risultati sono stati confermati *in vitro* in esperimenti su linfociti T CD4⁺ sia naïve che effettori/memoria, che hanno dimostrato che l'assenza di Rai favorisce selettivamente sia il differenziamento che l'espansione dei linfociti Th17.

Al fine di esplorare il legame tra lo sbilanciamento verso Th1/Th17 osservato in topi Rai^{-/-} e la loro suscettibilità a sviluppare spontaneamente una patologia di

tipo LSE, abbiamo caratterizzato l'infiltrato T nel rene, il principale organo bersaglio della risposta autoimmune in questa malattia. Infiltrati Th1 e Th17 sono stati identificati nei reni di topi Rai^{-/-}, a dimostrazione che l'assenza di Rai contribuisce allo sviluppo della nefrite autoimmune non solo aumentando l'attivazione linfocitaria ma anche favorendo lo sviluppo e l'espansione dei linfociti T effettori proinfiammatori. È da notare che abbiamo riscontrato un difetto nell'espressione di Rai nei linfociti isolati da pazienti affetti da LSE, a conferma che Rai svolge un ruolo importante nella patogenesi di questa malattia.

Questi risultati suggeriscono che, alterando l'equilibrio tra le sottopopolazioni di linfociti T helper verso Th1/Th17, la deficienza di Rai potrebbe contribuire allo sviluppo di altre patologie autoimmuni oltre il LSE, inclusa la SM. Per valutare questa ipotesi abbiamo studiato l'impatto dell'assenza di Rai sullo sviluppo dell'ESA, il modello murino della SM umana. Topi wild-type e Rai^{-/-} sono stati immunizzati con il peptide della mielina MOG₃₅₋₅₅ e monitorati per segni clinici. Sorprendentemente, in contrasto con la nostra ipotesi, abbiamo osservato che i topi Rai^{-/-} sviluppavano una malattia meno grave se paragonata ai topi di controllo. In accordo con i dati clinici, analisi istologiche su sezioni seriali di midollo spinale hanno evidenziato una ridotta demielinizzazione in topi Rai^{-/-} rispetto ai controlli accompagnata da minore attivazione sia della microglia che degli astrociti.

Una possibile spiegazione della ridotta severità della malattia in topi Rai^{-/-} può essere che l'assenza di Rai compromette la risposta immunitaria indotta dall'antigene MOG₃₅₋₅₅ e/o l'infiltrazione dei linfociti T nel SNC. Per valutare questa possibilità abbiamo analizzato *in vitro* la proliferazione in risposta a MOG₃₅₋₅₅ di splenociti da topi wild-type o Rai^{-/-} ESA 10 giorni post-immunizzazione. Abbiamo inoltre caratterizzato gli infiltrati cellulari nel midollo spinale di topi wild-type o Rai^{-/-} ESA al picco della malattia. I risultati hanno mostrato che la ridotta gravità della malattia e la ridotta demielinizzazione nei topi Rai^{-/-} non è causata né da risposte immunitarie anomale al peptide MOG, che induce il caratteristico sbilanciamento Th1/Th17 precedentemente osservato in questi topi, né da una ridotta infiltrazione dei linfociti T nel midollo spinale. Inoltre esperimenti di trasferimento di malattia in topi immunodeficienti che esprimono Rai hanno dimostrato che i linfociti T Rai^{-/-} MOG specifici inducono una malattia più grave se paragonati a linfociti T MOG specifici di controllo, in ac-

cordo con l'elevata proporzione di linfociti Th1/Th17, suggerendo che l'assenza di Rai nel SNC potrebbe proteggere i topi dall'ESA.

Gli astrociti sono il tipo cellulare più abbondante del SNC e sono importanti regolatori del processo infiammatorio e neurodegenerativo tipico dell'ESA. È stato dimostrato che gli astrociti alterano la permeabilità della barriera ematoencefalica, attraggono cellule del sistema immunitario nel SNC e contribuiscono al danno neuronale mediante la produzione di citochine ed ossido nitrico. Abbiamo quindi deciso di studiare l'espressione e la funzione di Rai in astrociti primari di topo. Abbiamo dimostrato per la prima volta che Rai è espresso in queste cellule. Inoltre, per studiare la funzione di Rai negli astrociti nel contesto dell'ESA abbiamo sviluppato un modello *in vitro* in cui gli astrociti Rai^{-/-} o di controllo sono stati esposti a terreno di coltura condizionato da linfociti T *wild-type* o Rai^{-/-} specifici per MOG e misurato la produzione della citochina proinfiammatoria IL-6. I risultati ottenuti mostrano che gli astrociti Rai^{-/-} producono livelli più bassi di IL-6 rispetto ai controlli indicando che Rai regola positivamente la produzione di IL-6 da parte degli astrociti.

CONCLUSIONI

Le cellule Th17 svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi della SM, e l'identificazione di molecole capaci di modulare il differenziamento e le funzioni effettrici di questa popolazione potrebbe quindi rappresentare un importante punto di partenza per lo sviluppo di terapie innovative. In questo studio abbiamo identificato la proteina Rai come nuovo regolatore negativo del differenziamento e dell'espansione delle cellule Th17 *in vitro* e *in vivo* e fornito evidenze del suo ruolo nella patogenesi di malattie autoimmuni mediate dai linfociti Th17. Il risultato inatteso che, a dispetto di questa funzione, l'insorgenza e la progressione dell'ESA sono ritardati e il decorso della malattia è meno grave nei topi Rai^{-/-}, si può spiegare alla luce della nuova funzione di Rai emersa da questo studio quale regolatore positivo della produzione di citochine proinfiammatorie da parte degli astrociti. Complessivamente questi dati suggeriscono quindi che l'inibizione di Rai nel SNC potrebbe creare un ambiente protettivo mediante la soppressione della reazione infiammatoria mediata dagli astrociti, anche in presenza di cellule Th17 iperattive. Pertanto, strategie volte a bloccare la funzione di Rai negli astrociti potrebbero contribuire allo sviluppo di una nuova terapia neuroprotettiva per la SM.

The Rai adaptor protein in Th17 cell differentiation, effector function and chemotaxis and in the pathogenesis of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system characterized by inflammation and axonal degeneration, the aetiology of which is as yet not fully understood. However, data from MS lesions, genetic susceptibility and studies on animal models, taken together with the efficacy of immunotherapies, strongly support the notion that MS is an immune-mediated disease where local inflammation in the central nervous system (CNS) and the resulting tissue damage are primarily mediated by self-reactive myelin-specific CD4⁺ T cells. It has been proposed that the autoreactive T cells activated in periphery gain access to the CNS where they are reactivated by macrophages and microglial cells presenting myelin antigens. Among CD4⁺ T cells, IL-17-producing Th17 cells have been identified as the main immune cell type implicated in the pathogenesis of MS, as indicated by the increased frequency of Th17 cells and elevated concentrations of IL-17 found in CNS lesions, cerebrospinal fluid and blood-derived mononuclear cells from MS patients. Based on these findings, strategies to inhibit IL-17/Th17 responses appear at present as the most promising therapeutic option for MS. Identifying novel negative regulators of Th17 differentiation and function are expected bring us closer to develop safe and effective targeted therapies.

The principal aim of this proposal was to understand whether Rai, a Shc family adaptor protein which we have recently demonstrated to be implicated in the negative control of lupus-like autoimmunity by acting as an attenuator of T and B cell responses, could regulate not only the activation of CD4⁺ T cells, but also their differentiation to Th effectors associated with autoimmunity, translating the results to the pathogenesis of MS.

RESULTS

In the initial phase of the project we evaluated the potential role of Rai in the development of the Th1 and Th17 subsets, which are centrally implicated in the pathogenesis of several autoimmune disorders, including SLE and MS. The role of Rai in the development of the Th1, Th2 and Th17 subsets was assessed on T cells isolated from wild-type and Rai^{-/-}

mice which were analyzed for the expression of cytokines and transcription factors diagnostic for each subset. Rai was found to promote the spontaneous polarization of Th1 and Th17 cells while repressing Th2 polarization, indicating a role of Rai as negative regulator not only of T cell activation, as previously reported, but also of Th1 and Th17 cell development *in vivo*. These results were confirmed in *in vitro* experiments on purified naïve and effector/memory CD4⁺ T cells, which demonstrated that Rai deficiency selectively favours the differentiation of Th17 cells as well as their expansion.

To further explore the link between the Th1/Th17 bias observed in Rai^{-/-} mice and their susceptibility to spontaneously develop lupus-like autoimmunity, we characterized the T cell infiltrate in the kidney, the main target organ of autoimmune response in SLE. Th1 and Th17 cell infiltrates were found in the kidneys of Rai^{-/-} mice, providing evidence that Rai deficiency contributes to the development of lupus nephritis not only by enhancing lymphocyte activation but also by promoting the development and expansion of proinflammatory effector T cells. Interestingly, T cells from SLE patients were found to have a defect in Rai expression, supporting a role for Rai in the pathogenesis of this autoimmune disease.

These findings suggest that, by altering the balance among helper T cell subsets towards Th1/Th17, Rai deficiency may contribute to the development of other autoimmune diseases beside SLE, including MS. To address this hypothesis, the impact of Rai deficiency on the development of EAE, a mouse model of human MS, was assessed. Wild type and Rai^{-/-} mice were immunized with the myelin peptide MOG₃₅₋₅₅ and monitored for clinical signs. Surprisingly, in contrast with our hypothesis, we found that Rai^{-/-} mice developed a milder disease when compared to control mice. In agreement with this finding, histological analysis on consecutive spinal cord sections showed a reduced demyelination in Rai^{-/-} mice compared with controls paralleled by a reduction in both microglia and astrocyte activation.

One possible explanation for the milder disease severity in Rai^{-/-} mice may be that Rai deficiency impairs the primary immune response to MOG₃₅₋₅₅ peptide and/or T lymphocyte infiltration into the CNS. To

address these possibilities we analyzed the *in vitro* proliferation rates in response to MOG₃₅₋₅₅ peptide of splenocytes from wild-type and Rai^{-/-} EAE mice 10 days post-immunization. Moreover we characterized the cell infiltrates in the spinal cord of wild-type or Rai^{-/-} EAE mice at the peak of disease. The results showed that the reduced disease severity and spinal cord demyelination in Rai^{-/-} EAE mice did not result either from abnormal primary immune responses to MOG peptide, which elicits the characteristic Th1/Th17 bias previously observed in these mice, or from a reduced T cell infiltration in the spinal cord. Moreover, adoptive transfer experiments into immunodeficient mice expressing Rai showed that MOG specific Rai^{-/-} T cells induce a more severe disease than their wild-type counterparts, consistent with the higher proportion of Th1/Th17 cells, and suggested that Rai deficiency in the CNS might protect mice from EAE.

Astrocytes are the most abundant cell population within the CNS and are important regulators of neuroinflammation and neurodegeneration. It has been shown that astrocytes alter blood-brain barrier permeability, attract immune cells into the CNS and contribute to neuronal damage via nitric oxide production through the cytokines they produce. Hence, the expression and function of Rai in primary mouse astrocytes were analyzed. We provided the first demonstration that Rai is expressed in astrocytes. Moreover, to study the function of Rai in astrocytes in the context of EAE we set up an *in vitro* model in

which wild-type or Rai^{-/-} astrocytes were exposed to conditioned media from wild-type or Rai^{-/-} MOG specific T cells and the production of the proinflammatory cytokine IL-6 was measured. Interestingly, Rai^{-/-} astrocytes produced lower levels of IL-6 mRNA compared to controls, indicating that Rai plays a positive role in IL-6 production by astrocytes.

CONCLUSIONS

Th17 cells play a crucial role in the pathogenesis of MS and the identification of molecules capable to modulate differentiation and effector functions of this subset are expected to provide important progress in the development of novel MS therapies. Here we identified Rai as a negative regulator of Th17 cell differentiation and expansion *in vitro* and *in vivo* and provided evidence of its role in the pathogenesis of Th17-mediated disease. The unexpected finding that, notwithstanding this function, the onset and progression of EAE are delayed and the disease course milder in Rai^{-/-} mice can be accounted for by the novel function of Rai emerged from this study as a positive regulator of proinflammatory cytokine production by astrocytes. Taken together, the data suggest that Rai inhibition in the CNS might establish a protective environment by impairing the astrocyte-mediated inflammatory reaction even in the presence of hyperactive MOG-specific Th17 cells. Thus it may be speculated that blockade of Rai in astrocytes could lead to the development of a novel neuroprotective therapy for MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Savino MT, Olivieri C, Emmi G, Prisco D, De Falco G, Ortensi B, Beccastrini E, Emmi L, Pelicci G, D'Elia MM, Baldari CT. The Shc family protein adaptor, Rai, acts as a negative regulator of Th17 and Th1 cell development *J Leukoc Biol* 2013; 93: 549-559.

Olivieri C, Baldari CT. T-cell-based immunotherapy of autoimmune diseases. *Expert Rev Vaccines* 2013;12: 297-310.

Olivieri C, Baldari CT. Statins: from cholesterol-lowering drugs to immunomodulators. *Pharmacol Res* 2014. *March 20*. [Epub ahead of print]

Olivieri C, Savino MT, Aldinucci A, Fanigliulo E, Bonechi E, Della Bella C, Pelicci G, Ballerini C, D'Elia MM, Baldari CT. Astrocyte Rai drives IL-6 and NO production during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Manuscript in preparation*.

Olivieri C, Savino MT, Fanigliulo E, Aldinucci A, Bonechi E, Della Bella C, Pelicci G, Ballerini C, D'Elia MM, Baldari CT. The Rai adaptor protein in Th17 cell differentiation, effector function and chemotaxis and in the pathogenesis of multiple sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 29-30 Maggio 2013

Olivieri C, Savino MT, Ortensi B, Pelicci G, Emmi L, D'Elia MM, Baldari CT. The Shc family protein adaptor Rai, acts as a negative regulator of Th17 cell development. European Congress of Immunology, Glasgow, Scotland, 5-8 September 2012

Olivieri C, Savino MT, Aldinucci A, Luccarini I, Della Bella C, Pelicci G, Ballerini C, D'Elia MM, Baldari CT. The Rai adaptor protein in Th17 cell differentiation, effector function and chemotaxis and in the pathogenesis of multiple sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 30-31 Maggio 2012

Savino MT, Olivieri C, Aldinucci A, De Falco G, Pelicci G, Ballerini C, D'Elia MM, Baldari CT. The Rai adaptor protein in Th17 cell differentiation, effector function and chemotaxis and in the pathogenesis of multiple sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 25-26 Maggio 2011

Savino MT, Olivieri C, Aldinucci A, De Falco G, Ballerini C, D'Elia MM, Pelicci G, Baldari CT. Altered balance of helper T cells in Rai^{-/-} mice. XXI AINI Congress, Pollenzo Bra (CN), 22-25 September 2011.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) per l'ammontare di 100.000 €

Bruno Gran

Division of Clinical Neuroscience (Clinical Neurology Research Group),
University of Nottingham School of Medicine, United Kingdom

COLLABORATORI:

Mukanthu Nyirenda, Cris Constantinescu, Uwe Vinkemeier, Tim Constantin-Teodosiu

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Guang-Xian Zhang, Abdolmohamad Rostami, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA
Amit Bar-Or, McGill University, Montreal, Canada

Modulazione dell'equilibrio tra cellule T regolatrici e T helper 17 da parte di recettori Toll-like: implicazioni per la sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cellule T regolatrici (Treg) sono importanti per il mantenimento della tolleranza alle proprie proteine ('antigeni'), comprese quelle espresse dalla mielina che vengono colpite da reazioni autoimmuni nella sclerosi multipla (SM). Le Treg inibiscono le funzioni infiammatorie di cellule 'effettrici' del danno tissutale, come le cellule T-helper 17 (Th17). Un aspetto importante dei meccanismi immunologici della SM è che la funzione delle Treg è ridotta nei pazienti, ma non conosciamo i meccanismi di questa riduzione. In studi precedenti condotti in soggetti non affetti da SM, avevamo dimostrato che i recettori 'toll-like receptor' (TLR), che sono coinvolti nelle funzioni del sistema immunitario 'innato' (rapido, poco specifico, e senza 'memoria immunologica'), sono espressi anche su cellule del sistema immunitario 'adattativo' (più lento, molto specifico, e caratterizzato da memoria immunologica), in particolare sulle cellule Treg. Come riportato da altri ricercatori nei modelli sperimentali, avevamo dimostrato che nelle Treg umane, la stimolazione di TLR2 (uno dei TLR espressi sulla membrana cellulare) portava alla riduzione della funzione soppressiva di queste cellule, 'liberando' le cellule Th17 proinfiammatorie dai normali meccanismi di controllo. Inoltre le Tregs venivano stimolate a trasformarsi in cellule Th17, aumentando ulteriormente la tendenza all'infiammazione. In questo progetto pilota, l'obiettivo è stato di studiare gli effetti della stimolazione di TLR2 nelle persone con SM e confrontarli con soggetti di controllo. Riteniamo questi studi molto importanti per caratterizzare i meccanismi con i quali le infezioni urinarie e respiratorie,

che sono frequenti nella SM, possono indurre ricadute cliniche.

RISULTATI

I nostri risultati dimostrano che le persone con SM sono più suscettibili agli effetti della stimolazione di TLR2 rispetto ai soggetti di controllo. Tali differenze comprendono un più alto livello di espressione del recettore TLR2 sulle cellule Treg ed una loro più forte suscettibilità alla perdita di funzione regolatrice e all'acquisizione di un fenotipo infiammatorio (Th17) quando stimolate tramite TLR2. Inoltre, gli effetti molecolari dell'attivazione di TLR2 erano più potenti nelle persone con SM, in particolare nella produzione dell'interleuchina-6 (IL-6) e l'attivazione dei meccanismi infiammatori che essa controlla.

CONCLUSIONI

In questo studio pilota, abbiamo dimostrato che i meccanismi immunitari indotti dall'attivazione di TLR2 nelle cellule Treg, che avevamo precedentemente caratterizzato in soggetti di controllo, sono presenti ed ancora più potenti nelle persone con SM. Questo potrebbe rappresentare un nuovo meccanismo di 'patogenesi' attraverso il quale infezioni sistemiche (come quelle degli apparati urinario e respiratorio) possono indurre ricadute di malattia riducendo la funzione soppressiva delle cellule Treg ed inducendole a diventare proinfiammatorie (Th17). Inoltre, pensiamo che i nostri dati possano contribuire a spiegare perché i pazienti con SM hanno una ridotta funzione Treg. Sarà importante stabilire se oltre alla nota capacità di facilitare le ricadute di SM, le in-

fezioni che attivano i TLR possono anche accelerare la progressione di malattia.
Per quanto riguarda le implicazioni per la cura della

SM, riteniamo che i nostri dati identifichino TLR2 ed IL-6 come potenziali bersagli terapeutici.

Toll-like receptors modulate the balance between regulatory (Treg) and T helper 17 (Th17) cells: implications for multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Regulatory T cells (Tregs) are important to maintain immune tolerance to self-antigens as they inhibit proinflammatory T cells (such as T-helper 17, Th17 cells). Their function is thought to be defective in multiple sclerosis (MS), possibly contributing to disease pathogenesis. However, the mechanisms of such reduced function are not known. We demonstrated that Toll-like receptors (TLR), which are involved in the function of the innate immune system, are also expressed on human Tregs. Since studies in the mouse showed that the activation of TLR2 reduces the regulatory (anti-inflammatory) function of Tregs, we studied these mechanisms in human cells. We found that activation of human TLR2 on Tregs made these cells less suppressive of inflammatory cells, and even transformed such Tregs into pro-inflammatory Th17 cells. Therefore, there are two mechanisms by which stimulation of these receptors could activate inflammation in MS (reduced suppression of inflammatory T cells and transformation of anti-inflammatory into inflammatory T cells). In this pilot project, we wanted to compare such effects of TLR2 activation in people with and without MS. This is important as many types of infections can activate TLR2, and we know that urinary and respiratory infections are frequent in MS and they can induce disease relapses.

RESULTS

We found that people with MS were more susceptible to the effects of TLR2 activation that we had

previously described in people without MS. Such differences included a higher expression of TLR2 by Tregs in MS and a stronger tendency of Tregs to become less suppressive and more inflammatory (Th17) when stimulated through TLR2. In addition, the effects of TLR2 activation, including the production of the proinflammatory cytokine, interleukin-6 (IL-6) and the activation of its signalling pathways, were more potent in people with MS.

CONCLUSIONS

In this pilot study, we established that immune mechanisms induced by the activation of TLR2 on Tregs, which we had previously identified in control subjects, are even more potent in people with MS. This may be a novel pathogenic mechanism by which systemic infections (such as those affecting the urinary or respiratory tract, quite common in MS) could induce disease exacerbations by reducing the suppressive activity of Tregs and inducing them to become pro-inflammatory. This could also be a new mechanism to explain why people with MS have a weaker Treg function, an observation that has been reported by many groups in the last 10 years, but for which we didn't yet have an explanation. It will be important to determine whether in addition to the known effect of facilitating disease relapses, infections that activate TLRs may also accelerate disease progression.

In terms of proximity to cure, we believe that our data identify TLR2 and IL-6 as new therapeutic targets in MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Podda G, Nyirenda M, Crooks J, Gran B. Innate immune responses in the CNS: Role of Toll-like receptors, mechanisms, and therapeutic opportunities in multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013; 8:791-806.

Nyirenda M, Crooks J, Gran B. The Role of Toll-Like Receptors in multiple sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. In: *Multiple sclerosis immunology – a foundation for current and future treatments*. T. Yamamura and B. Gran, Eds. Springer, New York, 2013 (www.springer.com/biomed/immunology/book/978-1-4614-7952-9); Chapter 8, pp. 149-176.

Nyirenda M, Vinkemeier U, Constantin-Teodosiu D, Drinkwater S, King L, Morandi E, Podda, G, Zhang GX, Ghaemmaghami A, Bar-Or A, Constantinescu CS, and Gran B. TLR2 stimulation regulates the balance between Treg and Th17 function in multiple sclerosis: a new novel mechanism of reduced Treg function in autoimmune disease. *Manuscript in preparation*

Nyirenda M, Constantinescu C, Bar-Or A, Zhang GX, Gran B. Toll-like receptor 2 (TLR2) regulates the balance between Th17 and Treg function in multiple sclerosis: a key role for IL-6/STAT3 signalling. 6th World Immune Regulation Meeting (WIRM), Davos, Switzerland, March 2012 (Late-Breaking Abstract - Winner of WIRM Travel Grant)

Nyirenda M, Constantin-Teodosiu T, Crooks J, Podda G, Bar-Or A, Zhang GX, Constantinescu CS, Gran B. Innate immune sensing by human regulatory T cells - Role of TLR2 and relevance to autoimmunity in multiple sclerosis. 3rd European Congress of Immunology (ECI), Glasgow, UK, September 2012.

Nyirenda M, Constantinescu C, Bar-Or A, Zhang GX, Gran B. Toll-like receptor 2 (TLR2) regulates the balance between Th17 and Treg function in multiple sclerosis: a key role for IL-6/STAT3 signalling. 11th International Society of Neuroimmunology (ISNI) Congress, Boston, USA, November 2012.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 28.000 €

Francesco Novelli

Università di Torino, Centro Ricerche Medicina Sperimentale (CeRMS),
Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino

COLLABORATORI:

Simona Rolla, Valentina Bardina

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Luca Durelli, Marinella Clerico, Divisione di Neurologia, Università di Torino,
Facoltà San Luigi Gonzaga, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

Regolazione interferone-dipendente dei linfociti Th17 e Th22 nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune in cui i linfociti T autoreattivi giocano un ruolo critico nel danneggiare il sistema nervoso centrale. Studi condotti nel nostro laboratorio, avvalorati da dati ottenuti in modelli murini, hanno evidenziato che nel sangue periferico (SP) dei pazienti con SM in fase attiva vi è un aumento dei linfociti CD4 T helper (Th) produttori la citochina IL17 (Th17) rispetto ai soggetti sani, e che l'interferone (IFN) β , che è correntemente utilizzato nella terapia della SM, induce proprio la selettiva apoptosi dei linfociti Th17. Recentemente abbiamo però dimostrato il coinvolgimento di una nuova popolazione di linfociti CD4 Th in grado di produrre selettivamente la citochina IL22 e per questo definiti Th22. Inoltre, abbiamo osservato che l'espressione di una delle catene del recettore per l'IFN γ (IFN γ R2), potrebbe essere un indicatore di malattia e di suscettibilità alla terapia con IFN β . L'IFN γ , una citochina in grado di inibire i Th17, non può essere somministrato ai pazienti per i suoi effetti tossici, ma i suoi effetti inibitori possono essere regolati tramite, ad esempio, il ferro.

Lo scopo del progetto è stato quello di: caratterizzare in dettaglio i linfociti Th22 che si espandono durante la fase attiva della SM; studiare gli effetti degli interferoni sui linfociti Th17 e Th22; analizzare se la modulazione del ferro potesse influire sui segnali che determinano la sopravvivenza dei linfociti Th17 e di conseguenza sull'insorgenza della SM studiando un modello murino basato sul deficit genetico di hemopexina (Hx), una molecola in grado di regolare la disponibilità cellulare del ferro nei linfociti T.

RISULTATI

Il primo obiettivo del nostro programma di ricerca era quello di definire il ruolo dei linfociti Th22 nella SM. Per questo abbiamo analizzato le cellule del sangue periferico di 62 pazienti con SM recidivante-remittente (SMRR) e 30 soggetti sani dello stesso *range* di età. Abbiamo osservato che il numero di linfociti Th22 era aumentato nel SP dei pazienti con SMRR specialmente durante le fasi attive della malattia, aumentava anche nel liquido cefalorachidiano e che queste cellule erano specifiche per l'antigene self della proteina basica della mielina (MBP). Seguendo alcuni pazienti per un anno, abbiamo visto che, mentre i linfociti Th17 aumentavano solo durante le fasi attive della SM, i linfociti Th22 aumentavano significativamente già alcuni mesi prima delle recidive.

Per caratterizzare meglio queste cellule, abbiamo valutato l'espressione di diversi recettori per chemochine (CCR) e citochine (IL-R) e fattori trascrizionali. I linfociti Th22 auto-reattivi esprimono ad alti livelli di CCR6, ma non di CCR4 e CCR10, recettore in grado di promuovere l'attraversamento della barriera ematoencefalica e quindi il raggiungimento del sistema nervoso centrale. I linfociti Th22 sono un sottopopolazione cellulare CD4⁺ distinta che condivide solo alcune caratteristiche con i Th17: l'espressione di CD161 e di RoR γ T caratterizzano i linfociti Th17 ma non i Th22; entrambi esprimono i fattori importanti per la differenziazione e la stabilizzazione IL-23R, IL-7R, AhR. Nei pazienti con SM, ma non nei soggetti sani, Th17 e Th22 esprimono elevati livelli di T β et, un fattore trascrizionale riconosciuto come indice di elevata patogenicità.

Nella seconda parte della nostra ricerca, abbiamo condotto studi per definire gli effetti dell'IFN β sull'espansione dei linfociti Th17 e Th22 nella SM. Mentre avevamo già descritto che i linfociti Th17 fossero un bersaglio selettivo della terapia con IFN β , qui abbiamo osservato che i Th22 esprimevano livelli più bassi del recettore IFNAR1 ed erano meno sensibili al trattamento *in vitro* con l'IFN β rispetto ai Th17.

Infine, per valutare il ruolo dell'Hx nella SM, abbiamo indotto l'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), il modello murino di SM, in topi *wild type* (WT) e deficienti per il gene dell'Hx (Hx $^{-/-}$). I risultati ottenuti indicano che durante l'ESA aumentano i livelli di Hx nel siero; i topi Hx $^{-/-}$ sviluppano una precoce e più severa patologia, hanno più elevati livelli di linfociti Th17 che circolano in periferia e infiltrano il sistema nervoso centrale rispetto ai topi WT.

CONCLUSIONI

I nostri dati indicano che i linfociti Th22 costituiscono un nuovo sottotipo cellulare patogenetico nella SM e il loro aumento potrebbe essere un marcatore nel SP che potrebbe predire una recidiva. Inoltre, i dati riguardanti la differente risposta all'IFN β da parte dei linfociti Th17 e Th22 suggeriscono che livelli più alti o bassi di linfociti Th22 resistenti all'IFN β possano contribuire alla refrattarietà alla terapia.

Infine, i nostri studi che indicano come l'Hx sia in grado di influenzare la generazione dei linfociti Th17 durante la ESA, suggeriscono un ruolo anti-infiammatorio di questa molecola, per cui la somministrazione di Hx potrebbe essere un nuovo approccio terapeutico nelle malattie autoimmuni indotte dai linfociti T come la SM.

Interferon-dependent regulation of Th17 and Th22 lymphocytes in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

An uncontrolled self-reactive effector T-cell response plays an important role in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). Previously studies performed in our lab, in agreement with data in murine models, showed that CD4 T helper lymphocytes producing IL17 cytokine (Th17) increased in the peripheral blood (PB) of MS patients in the active phase of the disease compared to Healthy Subject (HS); of interest, we showed that Interferon (IFN) β , a common therapy for MS disease, affected and reduced Th17 cells. Recently, we observed an increase of a new Th cells able to selectively produce IL22 and termed Th22 and that the expression of a IFN γ receptor chain (IFN γ R2) could be considered a disease marker and predict resistance or sensitivity of SM patients for IFN β administration. IFN γ , a cytokine that regulates Th17 cells, cannot be administered to MS patients due to its toxic effects, but its inhibitory properties can be regulated by other molecules such iron. Our research program aimed to: clarify and characterize the involvement of Th22 cells in the pathogenesis of MS; the modulation of Th17 and Th22 in response to IFNs; analyze the role of iron in modulating Th17 cells and its impact on the pathogenesis of MS by studying a

mouse model deficient for the Hemopexin (Hx), a molecules able to regulate iron availability in T cells.

RESULTS

The first aim of this research program was to ascertain the role of Th22 cell in MS. We collected and analyzed peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 62 patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and 30 age- and gender-matched healthy volunteer (HS) subjects. We found a significant increased number of Th22 cells in the PBMC of RRMS patients with respect to healthy subject. Th22 cells expanded mostly during the relapses, were specific for the auto-antigen myelin basic protein (MBP) and enlarged in the cerebrospinal fluid. Longitudinal analysis showed that whereas Th17 cell increased always greater during the relapses and were lower or undetectable in the inactive phases, Th22 cells significantly enlarged already in the month prior the relapses.

To further characterize this subset in RRMS, the expression of several chemokine (CCR) and cytokine (IL-R) receptors and transcriptional factors were analyzed on Th22 cells in comparison with Th17 cells. Higher expression of CCR6, but not CCR4 and CCR10, delineated self-reactive Th22 cells in active

RRMS patients and could promote Th22 invasion of the central nervous system by binding the specific receptors expressed on brain blood barrier epithelial cells. Th22 cells in MS represent a distinct pathogenic subset of CD4⁺ Th cells that share only some features with Th17 cells: CD161, together with RoR γ T, are molecular signatures of Th17 cells but not of Th22; both subsets express similar high expression of IL-23R, IL-7R and the transcription factor AhR that are important for their differentiation and stabilization. Of interest, both subsets express high level of T β et in patients with MS compared to HS indicating a more pathogenic phenotype of these subsets in the disease. In the second task of our research, we performed experiments planned to study the effect of IFN β in the regulation of Th17 and Th22 expansion in MS. Whereas Th17 cells were already described by our group to be a selective target of the conventional therapy with IFN- β , we observed that Th22 cells expressed lower level of IFNAR1 and were less sensitive to in vitro IFN- β treatment compared to Th17 cells. Finally, to evaluate the role of Hx in MS, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), the animal model of MS, was induced in Wild Type (WT) and Hx

knock-out (Hx^{-/-}) mice. We observed that sera Hx level increased during EAE; Hx^{-/-} mice developed a clinically earlier and more severe and pathologically exacerbated expression of EAE and higher amount of Th17 cells infiltrating the CNS and circulating in the periphery compared to WT controls.

CONCLUSIONS

Our data suggest that Th22 cells may constitute a new relevant pathogenic subset in multiple sclerosis and could be a PB marker that could predict the clinical or MRI signs of MS disease activity. Moreover, the data that account for a differential response to IFN β of Th22 cells compared to Th17 cells suggest that the high or low proportion of IFN β resistant Th22 cell might contribute to refractoriness to the therapy.

Finally, our observations that indicate that Hx could influence the generation of Th17 response during EAE, suggest an anti-inflammatory role of Hx in autoimmune disease. Thus, Hx administration may be beneficial in clinical settings in autoimmune diseases such MS, characterized by dysregulation of T cell differentiation.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Rolla S, Bardina V, De Mercanti S, Quaglino P, De Palma R, Gned D, Durelli L, Novelli F and Clerico M. Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN β . *J Leuk Biol.* (*Under revision*)

Rolla S, Ingoglia G, Bardina V, Silengo L, Altruda F, Novelli F and Tolosano E. Acute-phase protein hemopexin is a negative regulator of Th17 response and experimental autoimmune encephalomyelitis development. *J Immunol.* 2013, 191(11):5451-9

Rolla S, Clerico M, Bardina V, Quaglino P, Durelli L and Novelli F. Phenotypical and functional characterization of t helper 22 cells in multiple sclerosis patients. *Keystone Symposia: Th17 Cells in Health and Disease*, Keystone, Colorado, February 5 - 10, 2012

Rolla S, Ingoglia G, Bardina V, Silengo L, Altruda F, Novelli F and Tolosano E. The acute-phase protein hemopexin regulates th17 cells and experimental allergic encephalomyelitis development. *European congress of Immunology 2012*, Glasow, UK, September 5-8, 2012

Rolla S, Bardina V, Clerico M, Durelli L and Novelli F. Multiparametric analysis of Th17 and Th22 cells discloses their pathogenicity in human multiple sclerosis. *11th International Society of Neuroimmunology Congress*, Boston, MA, November 4-8, 2012.

Ingoglia G, Rolla S, Bardina V, Silengo L, Altruda F, Novelli F and Tolosano E. Hemopexin deficiency in mice resulted in enhanced th17 differentiation and exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis. *fifth meeting of the international bioiron society*, London UK, April 14 - 18, 2013

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di 40.000 €

Angela Bononi

Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Sezione di Patologia Generale
Università di Ferrara, Ferrara

MENTORE: **Paolo Pinton**

Ruolo di proteine mitocondriali nella patogenesi della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurologica che colpisce il sistema nervoso centrale (SNC), caratterizzata da demielinizzazione e neurodegenerazione. Nonostante eziologia e patogenesi della SM non siano ancora state comprese completamente, diversi studi suggeriscono che il danno infiammatorio alla mielina e agli oligodendrociti (le cellule che generano la mielina nel SNC) siano alla base di sviluppo e progressione della patologia. Inoltre, in diverse patologie demielinizzanti si sono riscontrate anomalie nella funzionalità dei mitocondri, e recenti evidenze hanno messo in luce come i mitocondri siano coinvolti nella SM. Il corretto espletamento delle funzioni mitocondriali è necessario per il corretto differenziamento degli oligodendrociti e la mielinizzazione.

I mitocondri sono organelli cellulari spesso descritti come le “centrali energetiche” della cellula. A livello mitocondriale avviene l’integrazione sia di segnali di sopravvivenza che di morte, e ciò è controllato principalmente sulla base della quantità di ioni Ca^{2+} che i mitocondri accumulano.

Questo progetto di ricerca si è avvalso di differenti approcci sperimentali volti ad una migliore comprensione della complessa relazione tra omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale e il differenziamento di oligodendrociti precursori (OPCs), rivolgendo l’attenzione in particolare alle alterazioni causate dalle condizioni infiammatorie che si osservano in pazienti con SM. Capire come tali eventi partecipano alla patogenesi della SM potrà aprire la strada a nuovi approcci terapeutici.

RISULTATI

Inizialmente è stato ottimizzato un protocollo per isolare e mantenere *in vitro* colture cellulari di precursori oligodendrocitari, e il loro differenziamento in oligodendrociti adulti. In seguito abbiamo indaga-

to se il differenziamento degli oligodendrociti è inficiato durante gli eventi infiammatori che caratterizzano la SM. Il Fattore di Necrosi Tumorale- α (TNF- α) è una delle principali citochine coinvolte nella patogenesi della SM. Abbiamo dimostrato che il TNF- α compromette il differenziamento degli oligodendrociti.

L’evento finale nel differenziamento degli oligodendrociti è la produzione di mielina e l’avvolgimento dell’assone. Abbiamo misurato l’entità della mielinizzazione degli assoni in colture miste di cellule gliali e OPCs, dimostrando in tal modo che gli OPCs esposti al TNF- α hanno una ridotta capacità di formare mielina.

Per determinare il meccanismo alla base della selettiva riduzione di differenziamento e mielinizzazione negli OPCs, abbiamo analizzato la fisiologia mitocondriale in OPCs esposti al TNF- α . L’analisi dell’omeostasi intracellulare del Ca^{2+} ci ha permesso di dimostrare che il TNF- α altera in modo specifico l’accumulo mitocondriale di Ca^{2+} negli OPCs. Questa osservazione è stata ulteriormente confermata in colture miste di cellule gliali e OPCs.

Al fine di capire meglio come il TNF- α danneggia i mitocondri, abbiamo analizzato anche altri parametri mitocondriali. È stato interessante osservare come tale trattamento non altera la morfologia o il numero dei mitocondri, ma bensì causa una marcata riduzione del potenziale di membrana mitocondriale (MMP), a suggerire una ridotta attività della catena respiratoria.

È stato dimostrato che una compromissione della catena respiratoria può alterare la produzione di specie reattive dell’ossigeno (ROS), ed è stato provato che il TNF- α ha il medesimo effetto. Nei nostri esperimenti abbiamo osservato un aumento dei livelli di ROS in OPCs trattati con TNF- α , insieme ad una forte riduzione dell’attività del complesso I della catena respiratoria. Abbiamo usato FCCP (carbo-

nylcyanide-p trifluoromethoxyphenylhydrazone), un disaccoppiante mitocondriale, per riprodurre il calo di MMP generato dal TNF- α . FCCP è stato in grado di riprodurre la diminuzione di MMP osservata in cellule trattate con TNF- α , ed è stato inoltre in grado di ridurre il differenziamento degli OPCs in modo analogo al TNF- α .

Questi risultati suggeriscono che il TNF- α riduce il differenziamento degli oligodendrociti attraverso la compromissione dell'attività del complesso I della catena respiratoria negli OPCs, che si riflette in un'aumentata produzione di superossido, con conseguenti riduzioni del MMP e dell'accumulo mitocondriale di Ca²⁺.

Sulla base di questi risultati, abbiamo ipotizzato una compromissione del metabolismo nelle cellule esposte al TNF- α . Un alterato metabolismo mitocondriale causa elevati livelli di AMP e l'attivazione

del sensore metabolico AMPK (AMP-activated protein kinase). Abbiamo dimostrato che i livelli di AMPK aumentano durante l'esposizione al TNF- α , ed, inoltre, l'attivazione farmacologica di AMPK con metformina ha un effetto sinergico con il TNF- α nell'inibire il differenziamento degli OPCs.

CONCLUSIONI

I dati da noi raccolti indicano che il TNF- α causa alterazioni metaboliche inducendo un danno ai mitocondri e attivando AMPK, con conseguente blocco del differenziamento degli OPCs.

Questi risultati ci permettono di comprendere in modo più approfondito i meccanismi che portano alla formazione delle lesioni e alla loro mancata rimielinizzazione nella SM, e suggeriscono possibili strategie terapeutiche basate su farmaci in grado di modulare le funzioni mitocondriali.

Involvement of mitochondrial proteins in the pathogenesis of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a neurological disorder of the central nervous system (CNS) characterized by demyelination and neurodegeneration. Although the pathogenesis of MS is not completely understood, various studies suggest that inflammatory damage to myelin and oligodendrocytes (the myelin-forming cells of the CNS) is associated with the development and progression of MS. Also mitochondrial dysfunction is frequently associated with demyelinating disease, and recent evidences pointed out the involvement of mitochondria in MS. Mitochondrial functions are required for proper oligodendrocytes differentiation and myelination.

Mitochondria are cellular organelles often described as the "powerhouses" of the cell. Integration of survival and death stimuli occurs on mitochondria, and it is mainly controlled by the accumulation of calcium ions (Ca²⁺) inside these organelles.

The project utilized a variety of experimental approaches to shed light on the complex relationship between mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and the process of differentiation in oligodendrocyte precursors (OPCs), with special focus on alterations caused by the inflammatory processes occurring in

MS. Further understanding of how these events participate in the pathogenesis of MS and can provide rationale for novel therapeutic approaches.

RESULTS

We first established a protocol for isolation and in vitro culture of oligodendrocytes progenitors as well as their differentiation into mature oligodendrocyte. Then we investigated if oligodendrocyte differentiation may be affected during the inflammatory events that characterize MS. Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- α) is one of the most relevant cytokines involved in the pathogenesis of MS. We found that TNF- α impairs oligodendrocyte differentiation. The final event in oligodendrocyte differentiation is the production of myelin and the ensheathment of axons. We measured the extent of axonal myelination in mixed glia and OPCs co-culture, and found that OPCs exposed to TNF- α have impaired myelin formation activity.

To determine the mechanism for the selective impairment of OPCs differentiation and myelinating capacity, we examined mitochondrial physiology in OPCs exposed to TNF- α . We analysed intracellular Ca²⁺ homeostasis and found that TNF- α selectively

impairs mitochondrial Ca^{2+} uptake in OPCs. We further confirmed this observation in the mixed glial co-culture system.

To better understand how TNF- α promotes mitochondrial impairment, we analyzed other mitochondrial parameters. Interestingly, while mitochondria in treated cells did not significantly change in neither size nor number, they displayed a strong reduction of mitochondrial membrane potential (MMP), suggesting a decrease in their respiratory chain activity. It has been reported that an impairment of the respiratory chain can alter reactive oxygen species (ROS) production, and TNF- α has been shown to have the same effect. We found increased ROS levels in TNF- α -treated OPCs and a strong reduction in respiratory complex I activity. We used carbonyl-cyanide-p trifluoromethoxyphenylhydrazone (FC-CP), a mitochondrial uncoupler, to mimic the MMP impairment generated by TNF- α . FCCP was able to reproduce the lowered MMP observed in cells treated with TNF- α , and was also able to reduce OPCs differentiation in a similar way to TNF- α . These results suggest that TNF- α damages oligodendrocyte

differentiation by impairing respiratory complex I in OPCs, with subsequent increased superoxide levels, lowered MMP and consequently reduced mitochondrial Ca^{2+} uptake.

Based on these results, the cells exposed to TNF- α were expected to display metabolic impairment. The impairment of mitochondrial metabolism might increase the levels of AMP and the activation of the metabolism sensor AMP-activated protein kinase (AMPK). We demonstrated that AMPK levels are increased during TNF- α exposure, and AMPK pharmacological activation with metformin exerts a synergistic effect with TNF- α to inhibit OPCs differentiation.

CONCLUSIONS

Overall our data indicates that TNF- α is able to induce a metabolic alteration driven by mitochondrial impairment and AMPK activation, resulting in a differentiation blockade of OPCs. These results provide new insights the understanding of lesion formation and remyelination failure in MS and suggest possible therapeutic strategies based on drugs that modulate mitochondrial functions.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Bonora M, De Marchi E, Patergnani S, Suski JM, Celsi F, Bononi A, Giorgi C, Marchi S, Rimessi A, Duszyński J, Pozzan T, Wieckowski MR, Pinton P (2014) Tumor necrosis factor- α impairs oligodendroglial differentiation through a mitochondria-dependent process. *Cell Death Differ In press*

Bononi A, Bonora M, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Giorgi C, Pandolfi PP, Pinton P (2013) Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca^{2+} signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner. *Cell Death Differ* 20:1631-43

Bonora M, Giorgi C, Bononi A, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Rizzuto R, Pinton P (2013) Subcellular calcium measurements in mammalian cells using jellyfish photoprotein aequorin-based probes. *Nat Protoc* 8(11):2105-18

De Marchi E, Baldassari F, Bononi A, Wieckowski MR, Pinton P (2013) Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxid Med Cell Longev* 2013:564961

Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wojtala A, Wieckowski MR, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P (2013) Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle* 12(4):1-10

Giorgi C, Baldassari F, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wieckowski MR, Pinton P (2012) Mitochondrial Ca^{2+} and apoptosis. *Cell Calcium* 52:36-43

Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, De Marchi E, Suski JM, Bononi A, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Wieckowski MR, Pinton P (2012) ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling* 8:343-357

Marchi S, Marinello M, Bononi A, Bonora M, Giorgi C, Rimessi A, Pinton P (2012) Selective modulation of subtype III IP3R by Akt regulates ER Ca^{2+} release and apoptosis. *Cell Death Dis* 3:e304

Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Suski JM, Wieckowski MR, Pinton P (2012) Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion* 12:77-85

Marchi S, Giorgi C, Suski J, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Duszyński J, Wieckowski MR, Pinton P (2012) Mitochondria-ROS crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct* 2012:329635

Bononi A, Missiroli S, Poletti F, Suski JM, Agnoletto C, Bonora M, De Marchi E, Giorgi C, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Wieckowski MR, Pinton P (2012) Mitochondria-associated membranes (MAMs) as hotspot Ca^{2+} signalling units. *Adv Exp Med Biol* 740:411-38

De Stefani D, Bononi A, Romagnoli A, Messina A, De Pinto V, Pinton P, Rizzuto R (2012) VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca^{2+} signals to mitochondria. *Cell Death Differ* 19:267-273

Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, Giorgi C, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Pinton P (2011) Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res* 2011:329098

Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Duszyński J, Wieckowski MR, Pinton P (2011) Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal* 9(1):19

Borsa di ricerca finanziata con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 50.000 €

Stefano Morara

Istituto di Neuroscienze, CNR, Milano

COLLABORATORI:

Claudia Sardi, Marco Righi, Laura Zambusi, Alessia De Simone

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Luciano Provini, Istituto di Fisiologia Generale e Chimica Biologica, Università di Milano, Milano

Roberto Furlan, Annamaria Finardi, Francesca Ruffini, Divisione di Neuroscienze, Unità INSPE, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Fabio Grohovaz, Daniele Zacchetti, Divisione di Neuroscienze, Neurofisiologia Cellulare, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Ian M Dickerson, Department of Neurobiology and Anatomy, University of Rochester, NY, USA

Adviye A Tolun, Department of Biochemistry & Molecular Biology, University of Miami, USA

Ruolo protettivo di Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) nella patogenesi dell'EAE

PREMESSE E OBIETTIVI

Il ruolo dei neuropeptidi nella sclerosi multipla sta assumendo una rilevanza crescente. Nostri risultati preliminari hanno mostrato che il 'Calcitonin Gene-Related Peptide' (CGRP) inibisce il rilascio di citochine infiammatorie e ossido nitrico dalla microglia attivata *in vitro*. Questa azione e la diffusa espressione del peptide e del suo recettore nel sistema nervoso centrale (CNS) ci hanno fatto ipotizzare un suo ruolo nei processi neuroinfiammatori che caratterizzano la SM. Questo studio analizza il coinvolgimento del CGRP e di un componente citoplasmatico del recettore, 'CGRP-Receptor Component Protein (RCP)', nella encefalite autoimmune sperimentale (EAE) mediante l'analisi di i) effetti dell'induzione di EAE in topi knockout per il gene alfa-CGRP (ceppo 129S6), ii) effetti della somministrazione lombare cronica nel liquor durante l'EAE, iii) effetti dell'induzione di EAE nell'espressione di RCP.

RISULTATI

L'immunizzazione con MOG35-55 in topi 129S6 *wild type* ha prodotto la forma leggera di EAE cronica descritta in questo ceppo, mentre in topi knockout ha prodotto una forma più severa. Il punteggio clinico seguiva la scala topi knockout > eterozigoti > *wild type*. Il progetto verteva sull'uso di questi topi, ma il programma è stato bloccato da una contaminazione

della colonia che l'ha resa inservibile. Per ottenere dati funzionali, abbiamo adottato una nuova tecnica, la somministrazione cronica di CGRP nel liquor lombare di topi mediante minipompe osmotiche.

La somministrazione di CGRP durante le prime due settimane post-immunizzazione ha ridotto il punteggio clinico. Un'analisi morfologica quantitativa della microglia ha mostrato che il CGRP inibisce parzialmente l'attivazione della microglia stessa, mentre non ha effetti sull'espressione di GFAP negli astrociti, la densità cellulare e l'infiltrazione linfocitaria. In periferia, i linfociti non hanno mostrato alterazioni di produzione di interferon-gamma, TNF-alpha, IL-17, IL-2 e IL-4, suggerendo che l'azione del CGRP fosse confinata al CNS.

Il coinvolgimento del recettore è stato analizzato in un terzo modello sperimentale, l'EAE riacutizzante-remittente, indotta da PLP139-151, in topi SJL. Nella sostanza bianca, in condizioni fisiologiche RCP è espresso in microglia, astrociti, oligodendrociti e cellule endoteliali, mentre durante l'EAE è espresso anche nei linfociti infiltranti. Nei topi EAE l'espressione di RCP era aumentata in fase di riacutizzazione (nei siti di lesione), sebbene senza correlazione con la densità cellulare. Nessuna differenza durante la remissione. La localizzazione nucleare di RCP nella microglia era aumentata sia dall'EAE che dalla somministrazione intraliquorale di CGRP. L'EAE in-

duceva, invece, una sua diminuzione negli astrociti, e non induceva cambiamenti nella localizzazione nucleare di CLR (componente di membrana del recettore) nella microglia. Infine, l'espressione di CGRP era aumentata nei motoneuroni.

In studi *in vitro*, è stata confermata l'azione anti-infiammatoria di CGRP sulla microglia attivata sia con LPS, sia con altri stimoli pro-infiammatori, quali, ad es., beta-amiloide fibrillare: CGRP inibiva il rilascio di IL-6, l'induzione di iNOS e la produzione di NO (Consonni *et al.*, in preparazione). Una analisi trascrittomica di colture gliali in condizioni di controllo e stimolazione ha confermato che il peptide inibisce il processo di attivazione indotto dagli stimoli pro-infiammatori, rivertendo lo stato gliale ad uno stato di base, invece di dirigerlo verso uno stato di attivazione alternativa (ad es., tipo M2).

Un'analisi bioinformatica ha mostrato che il CGRP inibisce l'attivazione indotta da LPS con un meccanismo che coinvolge, ma non è limitato a, l'attivazione mediante cAMP. Gli inibitori della via della

MAPK (PD98059 per MEK e SB203580 per p38) non sono stati in grado di inibire l'effetto del peptide sulla microglia.

CONCLUSIONI

In conclusione, il CGRP inibisce l'attivazione microgliale *in vivo*, ed il peptide ed il suo recettore possono rappresentare nuovi fattori endogeni coinvolti nella patogenesi dell'EAE, almeno durante la sua fase di sviluppo. Il ruolo protettivo del CGRP potrebbe essere mediato dalla traslocazione intracellulare differenziale (che viene modulata dall'EAE) in specifici tipi cellulari del CNS, contribuendo all'aumento della segnalazione attraverso il recettore. L'utilizzo della somministrazione lombare intraliquorale del peptide, potrebbe permettere di verificare il coinvolgimento di una attivazione cronica della microglia (e, più in generale, della glia) nella fase cronico-progressiva della sclerosi multipla, permettendo quindi di identificare nuovi meccanismi patogenetici e, di conseguenza, nuovi bersagli terapeutici.

Protective role of Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in EAE pathogenesis

INTRODUCTION AND AIMS

The role of neuropeptides in multiple sclerosis pathogenesis is emerging. Previous results of ours showed that Calcitonin gene-related peptide (CGRP) potently inhibits the release of inflammatory cytokines and nitric oxide from activated microglia *in vitro*. This anti-inflammatory action and the widespread distribution of both the peptide and its receptor in several areas of the central nervous system (CNS) led us to hypothesize a role in neuroinflammatory processes. In the current study we addressed the involvement of CGRP and a cytoplasmic component of its receptor, CGRP-Receptor Component Protein (RCP), in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by analyzing i) the effects of EAE induction in alpha-CGRP null mutant mice (strain 129S6), ii) the effects of lumbar CSF chronic delivery of CGRP during EAE, iii) the effects of EAE induction in RCP expression.

RESULTS

Immunization with MOG35-55 in wild type 129S6 mice induced the mild form of chronic EAE de-

scribed for this strain whereas in alpha-CGRP null mice induced a more severe form of EAE. The scores followed the scale alpha-CGRP null > heterozygote > wild type.

The experimental backbone of the project was built on the usage of alpha-CGRP null mice, but the subsequent unavailability of the colony (due to a major health outbreak) blocked this plan. Thus, we introduced a novel experimental approach capable to provide functional data: CGRP administration into spinal CSF by osmotic minipumps. CGRP delivery into lumbar cerebrospinal fluid (CSF) reduced chronic EAE clinical score when administered during the first two weeks after immunization. A quantitative morphological analysis of microglia shape revealed that CGRP partially inhibited microglia activation. GFAP expression in astrocytes, cell density and lymphocyte infiltration were not affected. In addition, peripheral lymphocytes did not alter the production of interferon-gamma, TNF-alpha, IL-17, IL-2 and IL-4, suggesting that the action of CGRP was exerted from within the CNS.

The involvement of the receptor in CGRP effects was addressed by RCP analysis in a third model, PLP139-151-induced relapsing-remitting EAE (in SJL mice). Under physiological conditions, RCP was expressed in microglia, astrocytes, oligodendrocytes, vascular endothelial cells, and also in infiltrating lymphocytes of EAE mice, in spinal cord white matter. In relapsing-remitting EAE RCP was significantly increased in lesion areas during relapse, whereas no significant difference was detected during remission. No correlation with cell density was found. A nuclear localization of RCP (stimulated by CGRP, *in vitro*) increased in microglia cells in EAE mice or after CGRP CSF application. EAE, instead, decreased it in astrocytes, whereas did not change the nuclear localization of CRL (a membrane receptor component). Finally, CGRP was increased in motoneurons during EAE.

In *in vitro* studies, CGRP exerted an anti-inflammatory effects also on other pro-inflammatory stimuli, such as amyloid-beta, by inhibiting the increase of interleukin-6 secretion, iNOS induction and NO production (Consonni et al, in preparation). A transcriptomic analysis of glial cultures confirmed that the neuropeptide acts by inhibiting the process of activation induced by pro-inflammatory factors, reverting the glial cells to the resting state, rather than

diverting them towards alternative (e.g. M2-like) phenotypes.

A bioinformatics data analysis showed that CGRP inhibits the LPS-induced activation with a mechanism that implies, but is not limited to the activation of the cAMP pathway. Inhibitors of the MAPK pathways (PD98059 for MEK and SB203580 for p38) were not able to revert the neuropeptide effects on microglia.

CONCLUSIONS

In conclusion, CGRP is able to inhibit microglia activation *in vivo*, and the peptide and its receptor may represent novel endogenous protective factors in EAE pathogenesis, at least during the developing phase of the disease. The protective effect of CGRP could be mediated by the differential intracellular translocation of RCP (dynamic during EAE) in specific cell types of CNS, resulting in enhanced signaling from the CGRP receptor. The use of the chronic lumbar CSF delivery of the peptide might allow to address the question of the involvement of chronic microglia (and glia in general) activation during the chronic-progressive phase of the disease, thus possibly leading to more precise definition of the pathogenetic mechanisms thus paving the way to new therapeutic approaches.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Sardi C, Zambusi L, Finardi A, Ruffini F, Tolun AA, Dickerson IM, Righi M, Zacchetti D, Grohovaz F, Provini L, Furlan R, Morara S. Involvement of Calcitonin Gene-Related Peptide and Receptor Component Protein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, DOI information: 10.1016/j.jneuroim.2014.03.008.

Morara S, Zambusi L, Finardi A, Ruffini F, Tolun AA, Dickerson IM, Righi M, Zacchetti D, Grohovaz F, Provini L, Furlan R, Sardi C. Involvement of Calcitonin Gene-Related Peptide and Receptor Component Protein in experimental autoimmune encephalomyelitis. 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, July 5th-9th 2014.

Sardi L, Zambusi C, Bergami A, Ruffini F, Tolun AA, Dickerson IM, Righi M, Zacchetti D, Grohovaz F, Provini L, Furlan R, Morara S. Protective role of Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in EAE pathogenesis. FISM Annual Scientific Congress, Rome, May 29th-30th 2013.

Sardi L, Zambusi C, Bergami A, Ruffini F, Dickerson IM, Zacchetti D, Grohovaz F, Provini L, Furlan R, Morara S. Involvement of Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Adrenomedullin And Receptor Component Protein (RCP) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). FISM Annual Scientific Congress, Rome, May 30th-31st 2012.

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

Laura Piccio

Department of Neurology, Washington University in St Louis, St Louis, USA

COLLABORATORI:

Anne H. Cross, Claudia Cantoni, Mike Ramsbottom, Robert Mikesell

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Marco Colonna, Marina Cella, Washington University in St Louis, St Louis, USA

Ruolo di TREM2 nella sclerosi multipla e nel suo modello animale

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune (in cui il sistema immunitario reagisce contro il *self*) causata da un attacco verso componenti del sistema nervoso centrale (SNC). La patologia della SM è caratterizzata da infiammazione cronica, demielinizzazione e neurodegenerazione nel SNC. *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2* (TREM2) è un recettore immunitario espresso da microglia, macrofagi e cellule dendritiche, tutte cellule che modulano le risposte immunitarie e sono implicate nella SM. Sappiamo che TREM2 ha una importante funzione protettiva nel SNC perché una mutazione del suo gene nell'uomo causa neurodegenerazione con perdita di mielina e assoni. Recentemente è stato dimostrato che delle varianti genetiche di TREM2 sono associate a un maggiore rischio di sviluppare la malattia di Alzheimer e altre malattie neurodegenerative. Nel modello animale della SM, l'encefalomielite sperimentale allergica (ESA), abbiamo dimostrato che bloccando TREM2 si osserva un peggioramento clinico delle malattia. Nelle persone con SM, TREM2 è espresso ad alti livelli dalla microglia/macrofagi nelle lesioni nel SNC e abbiamo identificato una forma solubile di TREM2 i cui livelli sono aumentati nel fluido cerebrospinale di pazienti con SM. D'altra parte poco si conosce sulla funzione di TREM2 e sul suo ligando/i. Lo scopo di questo progetto è stato quello di caratterizzare il ruolo regolatorio di TREM2 e della sua forma solubile nei modelli animali della SM (Scopo1 del progetto). Abbiamo anche studiato la funzione del recettore TREM2 e della sua forma solubile nel modulare le attività di macrofagi e cellule dendritiche in persone sane e con SM (Scopo 2).

RISULTATI

Come proposto nello Scopo 1 di questo progetto abbiamo condotto diversi studi nel modello animale, l'ESA. In particolare abbiamo studiato il decorso clinico della malattia in topi geneticamente deficienti per il recettore TREM2, topi TREM2 *knock-out* (TREM2 KO), rispetto a topi *wild-type* (WT) o controllo. Complessivamente questi studi non hanno evidenziato delle differenze nei due gruppi nel decorso clinico dell'ESA dopo immunizzazione con diversi componenti della mielina. Anche l'analisi istologica nel SNC non ha identificato delle differenze tra i due gruppi. Abbiamo quindi testato una nuova ipotesi e cioè che TREM2 potrebbe svolgere una funzione immunomodulatoria solo in particolari condizioni. A questo riguardo è noto che il trattamento con lipopolisaccaride (LPS-un componente batterico) prima dell'immunizzazione riduce la severità della malattia attraverso meccanismi solo in parte conosciuti. Abbiamo ipotizzato che TREM2 possa essere implicato in questa protezione da LPS. Topi WT e TREM2 KO sono stati trattati con LPS prima delle induzione di ESA. Come atteso il trattamento con LPS nei topi WT ha portato ad una malattia meno severa, mentre questo effetto è stato meno pronunciato nei TREM2 KO. Questo supporta l'ipotesi che TREM2 possa mediare alcuni effetti immunomodulatori dell'LPS. In differenti esperimenti di ESA abbiamo dimostrato che il trattamento con la forma solubile di TREM2 migliora il decorso clinico. Successivamente, abbiamo testato il possibile ruolo di TREM2 in un modello di demielinizzazione-remielinizzazione nel SNC indotto con cuprazone. In questo modello non c'è attivazione di una risposta autoimmune e la microglia gioca un ruolo chia-

ve. Abbiamo osservato nei topi TREM2 KO maggiore danno alla mielina, agli assoni e accumulo di detriti mielinici. Abbiamo inoltre riscontrato un numero minore di microglia nei topi TREM2 KO nelle aree interessate dalla patologia. Questo può riflettere un difetto di proliferazione o di reclutamento delle cellule microgliali nei topi TREM2 KO, così come un difetto delle funzioni fagocitarie durante acuta demielinizzazione.

Recentemente la comunità scientifica internazionale ha evidenziato il ruolo critico svolto da TREM2 in malattie neurodegenerative nell'uomo, incluse la malattia di Alzheimer e di Parkinson. Queste evidenze supportano gli studi nell'uomo proposti nella Scopo 2 della nostra ricerca. Abbiamo studiato *in vitro* gli effetti di un anticorpo diretto contro TREM2 e della forma solubile di TREM2 sulle funzioni fagocitarie e la produzione di citochine di macrofagi e cellule dendritiche umane senza ottenere alcun risultato significativo. Abbiamo quindi intrapreso un'altra direzione per studiare la funzione di TREM2 nell'uomo. In particolare, abbiamo ottenuto dei campioni di sangue da due fratelli affetti da malattia di Nasu-Hakola (le cui cellule non esprimono

TREM2 a causa di una mutazione) e da persone sane. Abbiamo caratterizzato la mutazione genetica in questa famiglia ed eseguito degli studi di microscopia elettronica e di espressione genica (attraverso *microarrays*) utilizzando macrofagi derivati dalle cellule del sangue di questi soggetti o di persone sane. Non abbiamo osservato differenze da un punto di vista morfologico nei macrofagi derivati dai pazienti rispetto alle persone sane, ma abbiamo riscontrato invece differenze di espressione genica.

CONCLUSIONI

In questo progetto abbiamo utilizzato diversi modelli animali della SM per capire il ruolo di TREM2 nella malattia. Abbiamo dimostrato che la mancanza di TREM2 non ha un impatto importante sul decorso clinico e la patologia della ESA. Al contrario, nel modello di demielinizzazione indotto con il cuprazone la mancanza di TREM2 si associa a maggiore danno tissutale, molto probabilmente legato a un difetto di funzione microgliale. Lo scopo di questa ricerca è stato quello di capire il ruolo di TREM2 nella SM e di identificare delle nuove possibili strategie terapeutiche.

Role of TREM2 in multiple sclerosis and its animal model

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is believed to be mediated by an autoimmune response directed against central nervous system (CNS) components. MS pathology is characterized by chronic inflammation, demyelination, and neurodegeneration within the CNS. Triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) is an immune receptor expressed in microglia, macrophages (Macs) and dendritic cells (DCs), all cells that can modulate immune responses and are implicated in MS pathogenesis. TREM2 has important protective functions in the CNS, as its genetic deficiency in humans causes neurodegeneration with myelin and axon loss. Recently it was also shown that TREM2 genetic variants are associated with increased risk to develop Alzheimer's disease (AD) and other neurodegenerative diseases. In the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal model of MS, we showed that blockade of TREM2 worsened the dis-

ease. In MS patients, we demonstrated that TREM2 is highly expressed by Macs/microglia in active MS lesions, and we identified a novel soluble form of TREM2 which was elevated in the cerebrospinal fluid of MS subjects. However, TREM2 biology is not fully understood; its function is still elusive and its natural ligand is unknown. The goal of this application was to further characterize the regulatory role of TREM2 receptor and its soluble counterpart in MS animal models (Aim 1). We also evaluated the function of TREM2 receptor and soluble TREM2 in modulating the activities of human Macs and DCs in healthy people compared to MS subjects (Aim 2).

RESULTS

As proposed in Aim 1 of our application, we have performed several studies in the EAE model. We have compared EAE clinical course in TREM2 knock-out (TREM2 KO) and wild-type (WT) mice. Overall these studies did not show any consistent

difference in EAE clinical course in the two groups when they were immunized with different myelin antigens. Analyses of the pathology in the spinal cord also did not detect significant differences in the two groups. Therefore, we tested a novel hypothesis considering that TREM2 might exert an immunomodulatory function only in particular conditions. It is known that treatment with lipopolysaccharide (LPS—a bacterial component) before EAE induction reduces disease severity through partially understood mechanisms. We postulated that TREM2 might be implicated in this protection by LPS. We performed experiments in which WT and TREM2 KO mice were treated with LPS before EAE induction. As expected in WT mice treated with LPS, EAE was less severe compared to the control group treated with PBS. In TREM2 KO mice the protection given by LPS treatment was less pronounced compared to WT mice. This supports the hypothesis that TREM2 mediates, at least in part, some of the immunomodulatory effects of LPS in EAE. In separate experiments we have demonstrated that treatment with soluble TREM2 was able to ameliorate EAE clinical course. Next, we decided to test a possible role for TREM2 in a less complicated animal model (not mediated by an autoimmune response) of demyelination-remyelination, the cuprizone-toxicity model, where microglia play a key role. In TREM2 KO mice, we observed more pronounced myelin damage and more axonal beading with greater accumulation of myelin debris compared to WT. Fewer microglia were observed in the TREM2 KO mice at sites of pathology. This may reflect a defect of proliferation or recruitment of microglia in TREM2 KO mice, as well defective phagocytic function during acute demyelination. During the period of funding several lines of evidence

suggested a critical role of TREM2 in neurodegenerative diseases, including AD and Parkinson's disease. This lend further support for the human studies proposed in Aim 2 of the original proposal. We have tested the effects of an antibody against TREM2 and soluble TREM2 on human Mac and DC cytokine production and phagocytic function *in vitro*. We did not detect any effect that could justify further pursuing these studies. Therefore we have undertaken another direction to evaluate TREM2 functions in humans. Specifically, we have obtained blood samples from two Italian siblings affected by Nasu-Hakola disease (NHD), a rare genetic disease characterized my mutations in the TREM2 gene. We have characterized the genetic mutation in the two affected siblings. *In vitro* derived macrophages from these subjects were used for different studies including electron microscopy and gene expression analyses by microarrays. We did not observe differences by electron microscopy in NHD cells compared with healthy subjects, but there was differential gene expression noted.

CONCLUSIONS

This project has used different MS animal models and human specimens to understand the possible role of TREM2 in MS. TREM2 genetic deficiency did not have a robust impact on EAE disease clinical course and pathology. In contrast, in the cuprizone-induced model of demyelination, TREM2 deficiency was associated with more tissue damage very likely due to defective microglial functions. The goal of these studies was to expand our understanding on the role of TREM2 in MS, and potentially to identify novel therapeutic strategies that target TREM2 pathways.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Alvarez E, Piccio L, Mikesell RJ, Klawiter EC, Parks BJ, Naismith RT, Cross AH. CXCL13 is a Biomarker of Inflammation in multiple sclerosis, Neuromyelitis Optica, and Other Neurological Conditions. *MS Journal*. 2013; 19(9):1204-8.

Piccio L, Cantoni C, Henderson JG, Hawiger D, Ramsbottom M, Mikesell R, Ryu J, Hsieh CS, Cremasco V, Haynes W, Dong LQ, Chan L, Galimberti D, Cross AH. Lack of adiponectin leads to increased lymphocyte activation and increased disease severity in a mouse model of multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2013; 43(8):2089-2100.

Isobe N, Gourraud PA, Harbo HF, Caillier SJ, Santaniello A, Khankhanian P, Maiers M, Spellman S, Cereb N, Pando MJ, Piccio L, Cross AH, De Jager PL, Cree BAC, Hauser SL, and Oksenberg JR. Genetic risk variants in African Americans with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013; 81(3): 219-227.

Fenoglio C, Ridolfi E, Cantoni C, De Riz M, Bonsi R, Serpente M, Villa C, Pietroboni AM, Naismith RT, Alvarez E, Parks BJ, Bresolin N, Cross AH, Piccio LM, Galimberti D, Scarpini E. Decreased circulating miRNA levels in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013;19(14):1938-42.

Angiari S, Rossi B, Piccio L, Zinselmeyer BH, Budui S, Zenaro E, Della Bianca V, Bach SD, Scarpini E, Bolomini-Vittori M, Piacentino G, Dusi S, Laudanna C, Cross AH, Miller MJ, Constantin G. Regulatory T cells suppress the late phase of the immune response in lymph nodes through P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Immunol*. 2013;191(11):5489-500.

Bock V, Botturi A, Gaviani P, Lamperti E, Maccagnano C, Piccio L, Silvani A, Salmaggi A. Polycystic Lipomembranous Osteodysplasia with Sclerosing Leukoencephalopathy (PLOS): a new report of an Italian woman and review of the literature. *J Neurol Sci*. 2013; 326(1-2):115-9.

Rossi B, Zenaro E, Angiari S, Ottoboni L, Bach S, Piccio L, Pietronigro EC, Scarpini E, Fusco M, Leon A, Constantin G. Inverse agonism of cannabinoid CB1 receptor blocks the adhesion of encephalitogenic T cells in inflamed brain venules by a protein kinase A-dependent mechanism. *J Neuroimmunol*. 2011;233(1-2):97-105.

International multiple sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 2010; 19:953-962.

Zuvich RL, McCauley JL, Oksenberg JR, Sawcer SJ, De Jager PL; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Aubin C, Cross AH, Piccio L, Aggarwal NT, Evans D, Hafler DA, Compston A, Hauser SL, Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetic variation in the IL7RA/IL7 pathway increases multiple sclerosis susceptibility. *Hum Genet* 2010; 127(5):525-535.

Naismith RT, Piccio L, Lyons JA, Lauber J, Tutlam NT, Parks BJ, Trinkaus K, Song SK, Cross AH. Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: a 52-week phase II trial. *Neurology* 2010; 74(23):1860-1867.

Piccio L, Naismith RT, Trinkaus K, Klein RS, Parks BJ, Lyons JA, Cross AH. Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2010; 67(6):707-714.

Graham DB, Akilesh HM, Gmyrek GB, Piccio L, Gilfillan S, Sim J, Belizaire R, Carrero JA, Wang Y, Blaufuss GS, Sandoval G, Fujikawa K, Cross AH, Russell JH, Cella M, Swat W. ITAM signaling in dendritic cells controls T helper cell priming by regulating MHC class II recycling. *Blood*. 2010 Oct 28;116(17):3208-18.

Klawiter EC, Piccio L, Lyons JA, Mikesell R, O'Connor KC, Cross AH. Intrathecal Anti-MOG Antibody Production is Elevated in Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. 2010; 67(9):1102-8.

Piccio L, Cantoni C, Bollman B, Mikesell R, Ramsbottom M, Cross AH. Title: Key role of TREM-2 on microglia in cuprizone-induced demyelination model. Tykeson Conference. November 2013. Denver, USA.

Piccio L, Cantoni C, Mikesell R, Ramsbottom M, Cross AH. Title: Role of TREM-2 in MS and its animal model. Tykeson Conference. November 2011. Dallas, USA.

Piccio L. Invited Speaker. Lecture's title: Immunomodulatory role of adiponectin in the animal model of multiple sclerosis. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, International Brain Research Organization. July 14-18, 2011. Florence, Italy.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2009 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 120.000 €

Francesco Ria

Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica del S. Cuore, Roma

COLLABORATORI:

Chiara Nicolò, Gabriele Di Sante, Giuseppe Migliara, Alessia Piermattei, Mariagrazia Valentini, Monica Becattini

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Gabriela Constantin, Università di Verona, Verona
Maria Foti, Università Milano "Bicocca", Milano

Meccanismi molecolari del trasferimento delle informazioni ambientali alle cellule T nella patogenesi dell'EAE: ruolo del TLR2

PREMESSE E OBIETTIVI

L'ambiente condivide con la genetica la responsabilità dello sviluppo della sclerosi multipla (SM), probabilmente almeno in parte grazie alla capacità di agenti infettivi di modulare il sistema immune. Un ruolo importante nel determinare l'esito delle infezioni è giocato da recettori degli organismi superiori, specifici per i patogeni infettivi, tra i quali la famiglia meglio studiata ed essenziale allo sviluppo della EAE (il modello sperimentale della SM) è quella dei TLR. Noi abbiamo dimostrato in precedenza che prodotti derivati dal micobatterio della tubercolosi sono in grado di modulare la mobilità delle cellule T coinvolte nella patogenesi della EAE, e avevamo dati preliminari che indicavano che varianti spontanee in ceppi di topi di uno dei TLR (TLR2) regolano sia la mobilità delle cellule T e modulano l'andamento clinico della EAE. Gli obiettivi di questo progetto erano definire la localizzazione cellulare di TLR2 rilevante per la mobilitazione delle cellule T e per la modulazione dell'EAE, di definire i meccanismi molecolari attraverso cui TLR2 influenza la mobilità e l'EAE e definire il ruolo di TLR2 nel nostro modello di EAE post-infettiva.

RISULTATI

Nel corso del progetto abbiamo raccolto una grande quantità di informazioni sul ruolo di TLR2 come modulatore della EAE. Per prima cosa abbiamo dimostrato che TLR2 regola la mobilità delle cellule T direttamente sulle stesse cellule T specifiche per il sistema nervoso centrale (CNS). Mentre l'analisi delle cellule T mediante *microarray* di mRNA non ha fornito alcuna informazione sui meccanismi molecolari che

sottendono a questo ruolo di TLR2, abbiamo trovato che le varianti di TLR2 regolano finemente i livelli di espressione di una molecola (denominata CD44) coinvolta sia nella mobilità delle cellule attraverso i tessuti, sia nella patogenesi della EAE. Anche questa azione di TLR2 è mediata dal TLR2 espresso direttamente sulle cellule T stesse. Successivamente abbiamo confermato ed approfondito il ruolo delle varianti di TLR2 nell'andamento clinico della EAE. Infatti, abbiamo dimostrato che le varianti di TLR2 influenzano differenti aspetti della malattia attraverso meccanismi indipendenti. La severità di malattia sembra legata alla capacità di TLR2 di modulare l'attività delle cellule presentanti l'antigene (cellule B e cellule dendritiche nei linfonodi, microglia nel SNC) che a loro volta promuovono o ostacolano la capacità delle cellule T di sostenere l'infiammazione che in ultima analisi danneggia il SNC. Dall'altra parte, l'abilità della malattia di andare incontro ad una spontanea e transitoria remissione dei sintomi è anch'essa influenzata da varianti di TLR2, ma sembra piuttosto legata alla capacità di TLR2 espresso direttamente sulle cellule T di modularne lo sviluppo verso il fenotipo regolatorio. Un'altra osservazione interessante è che le varianti di TLR2 influenzano anche la frequenza con cui vengono trovate lesioni di tipo infiltrativo nel cervello. Sebbene sia intrigante l'idea che lo stesso meccanismo influenzi la mobilità delle cellule T ed la distribuzione degli infiltrati nel SNC, non abbiamo per ora evidenze in questa direzione. Infine, abbiamo osservato che le varianti di TLR2 non modulano il nostro modello di EAE post-infettiva, che dipende principalmente dalle cellule T CD8+ autoreattive, rispetto ai

modelli classici di EAE che dipendono prevalentemente dalle cellule T CD4+.

CONCLUSIONI

Il ruolo dell'ambiente nello sviluppo della SM è stato ampiamente dimostrato. È anche noto che esiste una ampia variabilità individuale del decorso della malattia. Il lavoro compiuto nel corso del presente progetto evidenzia un nuovo meccanismo attraverso

il quale agenti infettivi (indipendentemente dalla loro capacità intrinseca di causare malattie) possono modulare l'andamento clinico della SM. Questo meccanismo patogenetico può divenire un bersaglio per interventi terapeutici che abbiano l'obiettivo di influenzare la velocità di progressione della malattia, attraverso la modificazione dell'ambiente microbico o farmaci in grado di interferire con i vari componenti del meccanismo stesso.

Molecular mechanism transmitting information from environment to encephalitogenic T cells in the pathogenesis of EAE: role of TLR2

INTRODUCTION AND AIMS

Environment shares the responsibility in the determination of multiple sclerosis (MS) with genetic, possibly in part because of the ability of infectious agents to modulate the immune system. A major role in determining the outcome of infections is played by host's receptors specific for pathogens, among which Toll like Receptors (TLRs) is the best studied family and essential to development of EAE, the experimental model for MS. We had previously shown that motives derived from Mycobacterium tuberculosis regulate the trafficking of T cells involved in the determination of EAE, and had preliminary information that variants of one of this TLRs (TLR2) naturally occurring in mice regulated T cell mobility and modulated clinic of EAE. The aims of this project were to define the cellular localization of TLR2 relevant for mobilization T cells and EAE, to define the molecular mechanisms by which it affects trafficking and EAE, and to address the role of TLR2 in our model post-infectious EAE.

RESULTS

During this project, we collected a wealth of information about the role of TLR2 as a modulator of EAE. First, we demonstrated that TLR2 regulates mobility of T cell directly on CNS-specific T cells. While microarray analysis of T cells did not provide any hint on the molecular mechanisms of this ability of TLR2, we found that TLR2 variants finely regulate the levels of expression of a molecule (named CD44) involved in T cell mobility through tissues and in the pathogenesis of EAE. Also this action is mediated by TLR2 expressed on the very same T cells. Next,

we confirmed and extended our preliminary observation about clinic of EAE. In fact we showed that the variants of TLR2 dictate several aspects of the disease, apparently through independent mechanisms. The severity of the disease appears linked to the ability of TLR2 variants to modulate the activity of cells called APC (DC and B cells in the lymph nodes and mainly microglia in the CNS) that in turn enhance or hinder the pro-inflammatory attitude of T cells that ultimately damages the CNS. On the other hand, the ability of disease to achieve a spontaneous and transient remission of symptoms is also dictated by TLR2 variants, but appears rather linked to the ability of TLR2 (expressed directly by T cells) to modulate their development towards a down-regulatory phenotype. Intriguingly, we find that variants of TLR2 influence also the frequency of lesions within the brain. Although it is suggestive to hypothesize that the same mechanism influences T cell mobility and distribution of the infiltrates in the CNS, we have no evidences in this direction. Finally, we found that TLR2 variants do not modulate clinic of our model post infectious EAE, a model EAE that relies mainly on CD8+ CNS specific T cells, instead of CD4+ cells as most EAE models.

Thus, we can conclude that TLR2 behaves as a relevant modulator of clinic of EAE through multiple mechanisms.

CONCLUSIONS

The role of environment in the development of MS has been largely demonstrated. It is also well known that a large variability exist in course of the disease at the individual level. The work performed in this

project highlights a newly identified pathway that can allow infectious agents (independently from their intrinsic pathogenic ability) to modulate clinic of MS. This mechanism of pathogenesis can also

become a target for a therapeutic intervention aiming at influencing the pace of progression of the disease, by modifying the microbial environment or by blocking this pathway itself.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Di Sante G, Migliara G, Valentini M, Delogu G, Ria F. Regulation of and regulation by CD44: a paradigm complex regulatory network. *International Trends in Immunity*. 2013 1 (4) 33-42.

Nicolò C, Di Sante G, Procoli A, Migliara G, Piermattei A, Valentini M, Delogu G, Cittadini AM, Constantin G and Ria F. M tuberculosis in the adjuvant modulates time of appearance of CNS specific effector T cells in the spleen through a polymorphic site of TLR2. *Plos One* 8: e558192013.

Borrello S, Nicolò C, Delogu G, Pandolfi F, Ria F. TLR2: a crossroads between infections and autoimmunity. *Int. J. Imm. Pharm.* Vol. 24; 3: 549-556, 2011

Nicolò C, Di Sante G, Migliara G, Valentini M, Piermattei A, Delogu G, Ria F. Intracellular Bacteria can cause EAE in SJL mice or modify cell-specific T cell repertoire. *Journal of Neurological Sciences* Dec 15; 311 (1-2):103-106, 2011

Pandolfi F, Cianci R, Casciano F, Pagliari D, De Pasquale T, Landolfi R, Di Sante G, Kurnick JT, Ria F. Skewed T cell receptor repertoire (more than a marker of malignancy. A tool to dissect the immunopathology of inflammatory diseases). *Journal of Biological regulators and homeostatic agents*, Apr-Jun; 25 (2) 153-61, 2011

Di Sante G, Rolla S, Patanella AK, Paolini L, Valentini M, Nicolò C, Migliara G, Piermattei A, Novelli F, Mirabella M, Ria F. MBP85-99-specific TCR repertoire in DRB1*15 patients affected by multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*, ISSN 1664-3224, doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.01025 - 15th ICI, Milan, Italy, 22 Aug - 27 Aug, 2013

Migliara G, Di Sante G, Piermattei A, Nicolò C, Valentini M, Procoli A, Concetta Geloso M, Corbi M, Sgambato A, Ria F. A single non-synonymous polymorphism of TLR2 is sufficient to recapitulate the variability of Experimental Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, ISSN: 1664-3224, doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00963 - 15th ICI, Milan, Italy, 22 Aug - 27 Aug, 2013 (Selected for Oral Presentation)

Di Sante G, De Paolis E, Piermattei A, Valentini M, Migliara G, Tulusso B, Constantin G, Nicolò C, Delogu G, Ria F. Impact of infectious agents on trafficking of effector T cells is mediated by a polymorphic site of TLR2 and CD44 isoforms expression. *Frontiers in Immunology*, ISSN: 1664-3224, doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00725. - 15th ICI, Milan, Italy, 22 Aug - 27 Aug, 2013 (Selected for Oral Presentation)

Nicolò C, Di Sante G, Migliara G, Piermattei A, Valentini M, Procoli A, Delogu G, Constantin G, Ria F. A single non-synonymous polymorphism of TLR2 is responsible for the variability of Experimental Multiple Sclerosis in SJL and B6 mice. *Abstract Book I joint meeting SIPMET/ASIP, Udine (UD)*, 12-15/09/12 (Selected for Oral Presentation)

Nicolò C, Di Sante G, Procoli A, Migliara G, Piermattei A, Valentini M, Delogu G, Pani G, Fusco S, Borrello S, Cittadini AM, Constantin G and Ria F. Mycobacterium Tuberculosis in the adjuvant modulates trafficking of effector T cells through a polymorphic site of TLR2. *Abstract book I joint meeting SIPMET/ASIP, Udine (UD)*, 12-15/09/12

Piermattei A, Nicolò C, Di Sante G, Migliara G, Valentini M, Geloso MC, Constantin G, Ria F. TLR2 haplotype regulates severity and course of EAE by modulating the proinflammatory attitude of CNS-specific T-cells. *Abstract Book. XXII AINI congress Catania (CT) 26 - 29/09/2012* (Selected for Oral Presentation)

Di Sante G, Nicolò C, Migliara G, Piermattei A, Valentini M, Procoli A, Delogu G., Constantin G, Ria F. Impact of infectious agents on trafficking of effector T cells is mediated by a polymorphic site of TLR2. *Abstract Book. XXII AINI congress Catania (CT) 26 - 29/09/2012* (Selected for Oral Presentation)

Nicolò C, Di Sante G, Migliara G, Piermattei A, Valentini M, Geloso MC, Constantin G, Ria F. TLR2 haplotype and M. Tuberculosis in the adjuvant co-modulate trafficking of CNS-specific effector cells. *8th National Conference SIICA Riccione (RN) 28 Sept - 01 Oct 2011*

Nicolò C, Di Sante G, Migliara G, Piermattei A, Valentini M, Geloso MC, Constantin G, Ria F. TLR2 haplotype modulates CD44 on activated T cells and severity of EAE. *8th National Conference SIICA Riccione (RN) 28 Sept - 01 Oct 2011*

Migliara G, Nicolò C, Piermattei A, Di Sante G, Valentini M, Santucci MB, Greco E, Fraziano M, Ria F. Analysis of T cells repertoire and clinical course of EAE after pretreatment with CNS antigens with asymmetric liposomes. *Abstracts Book XXI AINI congress Cuneo (CN) 22 - 24/09/2011*

Nicolò C, Di Sante G, Migliara G, Piermattei A, Valentini M, Geloso MC, Constantin G, Ria F. TLR2 haplotype modulates CD44 on activated T cells and severity of EAE. *Abstract Book. XXI AINI congress Cuneo (CN) 22 - 24/09/2011*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 120.000 €

Francesca Aloisi

Dipartimento di Biologia Cellulare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI:

Caterina Veroni, Maria Puopolo

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Fabiana Marnetto, Antonio Bertolotto, Letizia Granieri, Federica Brescia, Claudia Carcione, Francesca Sperli, Maria Malentacchi, Manuela Matta, Centro di Riferimento Regionale per la Sclerosi Multipla (CRESM), Istituto di Neuroscienze Cavalieri Ottolenghi (NICO), Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano
Clara Ballerini, Alessandra Aldinucci, Annamaria Repice, Luca Massacesi, NEUROFARBA, Università di Firenze, Firenze
Eleonora Cocco, Giuseppe Fenu, Giancarlo Coghe, Gianna Costa, Cristina Melis, Lucia Schirru, Maria Antonietta Secci, Marta Melis, Centro di Sclerosi Multipla, Dipartimento di Salute Pubblica e Medicina Clinica e Molecolare, Cagliari

Analisi dell'infezione con virus di Epstein-Barr e della risposta immunitaria nel fluido cerebrospinale e nel sangue di pazienti con sclerosi multipla mediante tecniche altamente sensibili di PCR

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia complessa causata dall'interazione tra molteplici fattori genetici e ambientali. Tra questi ultimi, il virus di Epstein-Barr (EBV) è l'agente infettivo che in studi epidemiologici e immunologici mostra l'associazione più forte con la malattia. EBV è un virus erpetico molto diffuso nella popolazione, responsabile di una infezione persistente e asintomatica generalmente tenuta sotto stretto controllo dal sistema immunitario. Sebbene i meccanismi che legano l'infezione con EBV al processo infiammatorio cerebrale della SM siano ancora sconosciuti, una ipotesi oggetto di studio è che questo virus stabilisca una infezione persistente nel sistema nervoso centrale stimolando una risposta immunitaria inappropriata e dannosa per la mielina e le cellule gliali e neuronali.

Al fine di comprendere se e in che modo l'infezione con EBV contribuisce alla patologia della SM abbiamo valutato l'esistenza di possibili correlazioni tra stato dell'infezione, attivazione immunitaria e parametri clinici, di laboratorio e strumentali attraverso lo studio dell'espressione di geni virali e geni cellulari implicati nella risposta immunitaria nel *liquor* e

nel sangue di una popolazione di pazienti con SM recidivante remittente non sottoposti a terapia.

RISULTATI

I 35 pazienti che hanno partecipato a questo studio (età media 30 anni, valore medio EDSS=1,6, durata media di malattia 32 mesi) sono stati arruolati e vengono seguiti nei tre Centri Regionali per la SM afferenti al progetto; l'indagine molecolare è stata effettuata nei laboratori dell'Istituto Superiore di Sanità e dell'Ospedale S. Luigi Gonzaga. A seguito di controlli di qualità, cellule del *liquor* e del sangue periferico prelevate da 31 pazienti (13, dei quali 10 in ricaduta clinica, presentavano lesioni attive captanti gadolinio alla risonanza magnetica) sono state analizzate con una metodica altamente sensibile e specifica (denominata real-time RT-PCR con pre-amplificazione di specifici geni bersaglio) che ha permesso di studiare il livello di espressione di sette geni virali e 41 geni cellulari in entrambi i compartimenti. In cinque dei 31 pazienti studiati (16%), di cui tre con risonanza attiva e in ricaduta clinica e 2 in fase inattiva di malattia, è stata rilevata l'espressione di geni virali nelle cellule del *liquor*, del sangue o di en-

trambi i compartimenti (due pazienti). In quattro dei pazienti EBV-positivi, è stata rilevata una infezione di tipo latente mentre geni espressi nel corso della riattivazione virale sono stati riscontrati in un solo paziente in fase attiva, sia nel *liquor* che nel sangue. Solo nei pazienti EBV+ in fase attiva di malattia, in particolare in corso di riattivazione virale, sono stati riscontrati livelli marcatamente più elevati rispetto alla popolazione studiata, di alcuni geni indicatori di attivazione immunitaria, in particolare della risposta mediata da linfociti T citotossici e macrofagi. Quattro pazienti, tutti EBV-negativi, con risonanza inattiva e in remissione clinica, si distinguevano dal resto della popolazione studiata per una maggiore espressione coordinata, sia nel *liquor* che nel sangue, di geni che regolano e mediano l'azione degli interferoni di tipo 1, essenziali per il controllo delle infezioni virali, e di geni implicati nella funzione di linfociti T e macrofagi attivati. Ulteriori differenze nei livelli di espressione genica cellulare e correlazioni tra geni legati alla maturazione delle cellule B e alla risposta pro-infiammatoria nei pazienti in fase attiva e inattiva di malattia emergono dall'analisi statistica e dall'elaborazione dei dati ancora in corso al momento della stesura di questo testo.

CONCLUSIONI

Nonostante la durata relativamente breve dello studio, la sinergia dei quattro centri coinvolti in questo progetto ha permesso di evidenziare la fattibilità e il potenziale di una metodica di analisi dell'espressione genica avanzata, al fine di ottenere un quadro complessivo dello stato di infezione con EBV e dell'attivazione di specifiche componenti del sistema immunitario nel *liquor* e nel sangue periferico di pazienti con SM. Ad oggi, il numero limitato di pazienti analizzati e la bassa percentuale di campioni contenenti segnali rilevabili dell'infezione con EBV non permettono di stabilire un nesso tra latenza o riattivazione virale, qualità o forza della risposta immunitaria e attività o inattività di malattia. Uno studio multicentrico condotto in una coorte più ampia di pazienti, comprendente anche pazienti con forme clinicamente isolate e forme primariamente progressive di SM, verrà proposto al fine di verificare l'esistenza di tale nesso e identificare potenziali marcatori di diversi decorsi di malattia e con valore predittivo.

Analysis of Epstein-Barr virus infection and immune response in the cerebrospinal fluid and blood of patients with multiple sclerosis using highly sensitive PCR techniques

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a complex disease caused by the interaction between multiple genetic and environmental factors. Among the latter, Epstein-Barr virus (EBV) is the infectious agent that in epidemiological and immunological studies shows the strongest association with the disease. EBV is a human herpesvirus very common in the population and is responsible of a persistent and asymptomatic infection that is generally kept in check by immune surveillance. Although the mechanisms linking EBV infection to the immune-mediated inflammatory process targeting the central nervous system in MS are still unknown, one of the hypotheses under scrutiny is that this virus establishes a persistent infection in the central nervous system and stimulates an inappropriate immune response that is detrimental for myelin, glial cells and neurons.

Aiming at understanding whether and how EBV infection contributes to MS pathology we have searched for possible correlations among EBV infectious status, immune activation and clinical and radiological parameters by studying and quantifying expression of viral genes and cellular genes involved in the immune response in the cerebrospinal fluid (CSF) and peripheral blood of therapy free patients with relapsing remitting MS.

RESULTS

Thirty five patients were enrolled for this study (mean age 30 years, mean EDSS score = 1,6, mean disease duration 32 months) in the three Regional MS Centres participating to this project; the molecular analysis was performed in the laboratories of Istituto Superiore di Sanità and S. Luigi Gonzaga Hospital. Following quality controls, CSF cells and

peripheral blood mononuclear cells from 31 patients [13, of which 10 in clinical relapse, had gadolinium-enhanced lesions on magnetic resonance imaging (MRI)] were analyzed with a highly sensitive and specific method (quantitative real-time RT-PCR with pre-amplification of target genes) that allowed to measure the level of expression of seven EBV genes and 41 cellular genes in both compartments. In five patients (16% of the cohort), of which three had an active MRI and were in clinical relapse and two in the inactive phase of disease, we found a detectable expression of EBV genes in CSF, blood or both compartments (two patients). In four EBV positive patients EBV infection was latent while a productive infection was detected in one relapsing patient with active MRI, both in CSF and blood. Only in EBV positive patients in the active phase of disease, particularly during viral reactivation, we detected markedly higher levels of some genes involved in immune activation, particularly in the response mediated by cytotoxic T cells and macrophages. Four patients, all lacking a detectable EBV signal, with an inactive MRI and in clinical remission, showed a higher, coordinated expression, both in CSF and blood, of genes that regulate and mediate the action of type-1 interferons, which are essential to control viral infections, and of genes supporting or mediating T-lymphocyte and

macrophage functions. Significant differences in gene expression levels and gene signatures indicative of B-cell maturation and a pro-inflammatory response between patients in the active and inactive phases of disease are emerging from statistical analysis and further elaboration of data which is still ongoing while writing this report.

CONCLUSIONS

Despite the relatively short duration of the study, the synergy of the four centers contributing to this project has allowed to show the feasibility and potential of an advanced method of gene expression analysis to obtain a comprehensive picture of the EBV infection status and activation of specific components of the immune system in the CSF and peripheral blood of patients with MS. To date, the limited number of samples analyzed and the low prevalence of EBV signals in such samples do not allow to establish a link between EBV latency/reactivation, quality or strength of immune activation and disease activity or inactivity. A study performed in a larger cohort of patients, including also clinically isolated syndromes and primary progressive forms of MS, will be proposed with the aim to verify further the existence of such a link and identify biomarkers associated with different MS courses and/or with predictive value.

Giuseppe Chiappetta

Istituto Superiore di Sanità, Roma

MENTORE: **Barbara Serafini**

Ricerca di interazioni patogeneticamente rilevanti tra EBV e il retrovirus endogeno della famiglia W MSR/V nel cervello con sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia cronica del sistema nervoso centrale (SNC) dovuta ad una progressiva perdita della mielina che riveste gli assoni e alla disregolazione del sistema immunitario che si manifesta con l'entrata e il persistente accumulo di cellule infiammatorie nel cervello e nel midollo spinale. La conseguenza è una continua e graduale degenerazione delle cellule nervose.

Per quanto riguarda le cellule infiammatorie, fino a qualche anno fa, solo il ruolo dei linfociti T era stato ritenuto importante, mentre negli ultimi anni diverse evidenze hanno determinato un ruolo fondamentale anche per i linfociti B. Infatti, la loro presenza è stata osservata all'interno del SNC intorno ai vasi cerebrali sia nella sostanza bianca che in quella grigia e nello spazio subaracnoideo delle meningi di pazienti con SM. È stato visto, proprio nelle meningi di persone con SM, che i linfociti B che penetrano nel SNC sono capaci di aggregarsi e formare strutture simili a follicoli linfonodali, chiamate follicoli ectopici meningei, dove avviene la loro proliferazione ed attivazione.

È risaputo che la sclerosi multipla è una malattia multifattoriale che deriva dall'interazione di fattori genetici ed ambientali. Uno dei fattori ambientali più studiati è l'infezione da Epstein-Barr virus (EBV), associato alla malattia da diverse evidenze scientifiche. Molto interessante è stata l'osservazione della presenza di questo virus all'interno delle cellule B infiltranti il cervello di persone con SM secondaria progressiva (SMSP). Questo fa ipotizzare che EBV, grazie alle sue capacità possa garantire la sopravvivenza, la proliferazione e l'attivazione di questi linfociti B, aumentandone le potenzialità infiammatorie proprio nel cervello di pazienti con SM. Un altro virus legato alla malattia da diverse osservazioni scientifiche, è il retrovirus associato alla SM (MSRV) che appartiene ai retrovirus endogeni umani (HERV). Co-

me la maggior parte degli HERV, MSR/V è integrato nel genoma umano ma normalmente non è attivo, quindi non esprime nessun antigene e non è infettivo. Tuttavia è stata osservata l'espressione di antigeni proinfiammatori di MSR/V e la presenza di particelle retrovirali infettive nel cervello, nel fluido cerebrospinale e nel sangue di pazienti con SM. Questo significa che MSR/V è fisiologicamente silente, ma in alcune condizioni patologiche, probabilmente interagendo con altri cofattori, potrebbe riattivarsi ed esprimere la sua patogenicità.

Poiché alcuni autori hanno osservato che EBV, tramite alcune sue proteine, può riattivare alcuni HERV, è stato ipotizzato che tra i meccanismi di azione di EBV possa esserci anche quello di attivare MSR/V nei linfociti B infiltranti il SNC dei pazienti con SM, scatenando in questo modo, una catena di eventi infiammatori capaci di aggravare il danno del tessuto nervoso, contribuendo alla persistenza della malattia e all'aumento della sua severità. Partendo da questa ipotesi lo scopo del nostro lavoro è stato quello di dimostrare attraverso tecniche istologiche e, in minor misura, molecolari, la co-presenza di EBV e MSR/V nei linfociti B all'interno del SNC di persone con SM.

RISULTATI

Lo studio è stato condotto mediante tecniche di immunistochemica ed immunofluorescenza su otto pazienti con SM secondariamente progressiva (SMSP) e due pazienti di controllo. Solo nei pazienti con SM è stata osservata la co-presenza di due antigeni di MSR/V e due di EBV nei linfociti B, presenti sia nei vasi all'interno di lesioni della sostanza bianca, sia nei follicoli ectopici meningei e, più in generale, nelle meningi fortemente infiammate.

Lo studio molecolare è stato condotto su 16 pazienti con SMSP e sette di controllo. Abbiamo osservato che solo nei pazienti con SM e soprattutto

in quelli con una maggiore presenza di infiammazione da linfociti B nel cervello, ci fosse una maggiore frequenza di espressione di un antigene retrovirale di MSR.V.

CONCLUSIONI

Questi dati confermano un effetto patologico di MSR.V nella SM e contribuiscono a suggerire che il virus di Epstein Barr possa agire nella SM anche con un altro meccanismo patologico. MSR.V, attraverso l'azione attivatrice di EB.V, non solo diventerebbe capace di esprimere antigeni proinfiammatori

sulla membrana delle cellule ospiti, in questo caso i linfociti B, ma riattivandosi per azione dell'herpes virus, potrebbe anche assumere la forma di particella extracellulare infettiva e scatenare così una risposta infiammatoria ancora più potente e difficile da controllare da parte del sistema immunitario all'interno del SNC. Da qui il danno tissutale che si osserva nei pazienti con SM. Con questi dati si potrebbero contribuire ad aprire nuove frontiere terapeutiche, come lo sviluppo di farmaci antivirali che possano interferire con lo stabilirsi dell'infezione virale da EB.V nel cervello di pazienti con SM.

Searching for pathogenically relevant interactions between EB.V and MSR.V/human endogenous retrovirus-W in the multiple sclerosis brain

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic disease of the central nervous system (CNS) caused by a progressive loss of myelin surrounding the axons and by the immune system dysregulation that occurs with the entrance and the persistent accumulation of inflammatory cells in the brain and spinal cord. The result is a continuous and gradual degeneration of the nerve cells.

There is wide consensus in defining multiple sclerosis a multifactorial disease resulting from the interaction of genetic and environmental factors. Among the latter, Epstein-Barr virus (EB.V), an ubiquitous γ -herpesvirus, has been strongly associated with MS through epidemiological, serological and immunological data. Furthermore, together with the new relevance tribute to B cell inflammation in the MS brain, we and others have found a high frequency of EB.V infected B cells in the MS brain. This suggests that EB.V, by its capacities could ensure the survival, proliferation and activation of infected B cells, increasing their inflammatory potential in the brains of patients with MS.

Among other viruses for which a pathogenic role in MS has been hypothesized, consistent data support the involvement of a viral element belonging to the human endogenous retroviruses (HERVs) named MS-associated retrovirus (MSR.V). As most of HERVs, MSR.V is integrated in the human genome but it's not physiologically active, so doesn't express any antigen and is not infective. Nevertheless, significantly higher

levels of MSR.V antigens, RNA and DNA are present in serum, blood cells, brain tissue and cerebrospinal fluid of patients with MS compared to controls and a correlation between MSR.V load and disease progression and prognosis has been described. It has also been shown that the envelope antigen (env) of MSR.V is able to induce a pro-inflammatory response. This means that MSR.V is physiologically silent, but in particular pathological conditions, probably by interacting with other cofactors, could be reactivated and express its pathogenicity.

About pathological interactions, there are several evidences supporting a possible relationship between EB.V, MSR.V and MS. Interestingly, some Authors have shown that EB.V through its latent membrane proteins (LMPs), is able to activate some human endogenous retroviruses, inducing the release of new retroviral particles from infected cells. The aim of this study has been to investigate by histological and molecular studies the possible interaction between MSR.V and EB.V in the inflamed brain of persons with MS, assuming that, among the EB.V pathological mechanisms, the MSR.V activation could play a role in sustaining and aggravating intracerebral inflammation. To this purpose, we analysed expression of the MSR.V antigens env and gag in the brain of patients with secondary progressive (SP) MS and asked if MSR.V antigens and EB.V latency proteins are co-expressed in B cells infiltrating the brain of MS patients, focusing our attention on B cell-enriched immune infiltrates, like intra-

meningeal B cell follicles and perivascular inflammatory infiltrates in active lesions, where EBV infection was described in previous studies.

RESULTS

The immunohistochemistry and immunofluorescence study was performed on eight patients with SPMS and two control patients. We observed the co-presence of two MSR/V and two EBV antigens in B cells infiltrating the brain of patients with MS, and not in control patients. The MSR/V/EBV double positive B cells were found in the perivascular inflammatory infiltrates within white matter lesions, in ectopic meningeal follicles and generally, in highly inflamed meninges.

Molecular study was performed on 16 patients with SPMS and seven control patients. A difference in the expression of one MSR/V antigen (*env*) was observed between MS and control patients and

among the patients with MS there was an increased MSR/V antigens expression in those with a higher degree of B cell inflammation.

CONCLUSIONS

The showed results confirm a pathological effect of MSR/V in MS and contribute to suggest another EBV neuropathologic mechanism in patients with MS. In fact the MSR/V activation by EBV would make the retrovirus able to express proinflammatory antigens on the B lymphocytes plasmamembrane and to be released as an infective extracellular particle triggering an even more powerful inflammatory response hard to be controlled by the immune system, within the CNS.

These data may pave the way for new therapeutic advances, such as the development of antiviral drugs that may interfere with the establishment of EBV viral infection in the brain of patients with MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Chiappetta G, Rosicarelli B, Veroni C, Magliozzi R, Rizzo F, Coccia E, Reynolds R, Perron H, Aloisi F, Serafini B. Searching for pathogenically relevant interactions between EBV and MSR/V/human endogenous retrovirus-W in the multiple sclerosis brain. Congresso Scientifico Annuale FISM, 29 – 30 Maggio 2013, Roma

Chiappetta G, Rosicarelli B, Sotgiu S, Reynolds R, Perron H, Aloisi F, Serafini B. High frequency of cells expressing multiple sclerosis(MS)-associated retrovirus (MSR/V) antigens and co-expression of MSR/V*env* and Epstein Barr virus latent protein LMP1 in inflammatory infiltrates of MS brains. Presentazione orale al XXII Congresso AINI, 26 – 29 Settembre 2012, Catania

Borsa di studio finanziata con il bando 2011 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 22.000 €



CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

Antonina Dolei

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Sassari

COLLABORATORI:

Caterina Serra, Giuseppe Mameli (trasferito altrove), **Alessandra Mei** (trasferita altrove), **Luciana Poddighe, Elena Uleri, Giuseppe Delogu, Edmondo Manca, Roberto Manetti**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Mario Rassu, Martina Stevan, Dipartimento di Patologia Clinica, Unità di Microbiologia e Virologia, Ospedale S. Bortolo - ULSS 6 Vicenza

Franca Bortolon, Responsabile del Centro Sclerosi Multipla, Dipartimento di Neurologia, Ospedale S. Bortolo - ULSS 6 Vicenza

Studio del retrovirus associato alla sclerosi multipla (MSRV)/HERV-W come marcatore prognostico di progressione e del suo contributo alla patogenesi

PREMESSE E OBIETTIVI

È un problema dire alla singola persona con SM come sarà il suo decorso clinico, la progressione del danno e l'efficacia terapeutica, dato che per ora si può solo rilevare il danno già verificato.

L'eziologia della SM è complessa. Tra i cofattori ipotizzati ci sono i retrovirus endogeni umani HERV-W ed il virus di Epstein Barr (EBV). Anche il batterio *C.pneumoniae* è stato proposto. Svariati studi dell'Unità Operativa (UO) Dolei hanno evidenziato un parallelismo nei pazienti tra espressione di MSRV/HERV-W e andamento della SM. L'UO Rassu ha trovato un'elevata presenza di *C.pneumoniae* nel cervello dei pazienti con SM. L'obiettivo di questo studio è stato quello di definire applicazioni pratiche di MSRV/HERV-W come marcatori e il suo ruolo come cofattore nella SM.

-FILONE 1: HERV-W/MSRV come marcatore prognostico, per monitorare in tempo reale la progressione e la risposta terapeutica della singola persona con SM, prevenendo un'ulteriore disabilità e riducendo i costi di assistenza, tramite la sua rilevazione, in parallelo con altri parametri.

- FILONE 2: chiarire se HERV-W/MSRV sia un cofattore della SM, dato il suo potenziale neuro-immuno-patogeno e la sua attivazione dipendente da stimoli SM-correlati.

Il piano sperimentale ha previsto *in vivo* di monitorare nel tempo pazienti con SM sotto terapia, e *in vitro* coltivare ed analizzare cellule del sangue (PBMC) da pazienti e controlli e di astrociti, trattati con diversi stimoli SM-correlati.

RISULTATI

FILONE 1: Analisi dell'espressione di HERV-W in pazienti con SM nel corso di un anno di trattamento con natalizumab. Nessuna persona ha avuto ricadute e la proteina HERV-Wenv è risultata espressa da cellule B, NK e monociti, ma non dai linfociti T. L'espressione di HERV-W era ridotta dal sesto mese di trattamento in poi ($p=0.0001$). Questi risultati indicano che l'espressione di HERV-W si riduce anche con la terapia con natalizumab (*Arru et al. Mult. Scler. 2013, Jul 22, Epub ahead of print*).

C'è stato un forte ritardo nell'arruolamento di pazienti al S. Bortolo, per l'attesa dell'approvazione del Comitato Etico locale. Per questo, lo studio non è ancora concluso. Sono stati arruolati 28 pazienti per lo studio prospettico nell'UO Rassu: 7 con sindrome clinicamente isolate (CIS -Clinically Isolated Syndrome) e 19 con sclerosi multipla recidivante remittente (SMRR); una paziente è ora incinta. Sono stati raccolti almeno tre campioni post-terapia con glatiramero acetato (Copaxone®), interferon 1a (Rebif22®, Avonex®), interferon 1b (Betaferon®), fingolimod (Gilenya®). I dati non definitivi indicano che MSRV è presente in tutti i pazienti. Due pazienti hanno avuto una ricaduta sotto terapia, con aumentata espressione di MSRV.

In un altro studio, la presenza di proteina HERV-Wenv è risultata fortemente aumentata in pazienti non trattati, e fortemente ridotta sotto terapia, indicando di nuovo che la misurazione di HERV-W è un indicatore dell'andamento clinico (*Mameli et al. PLoS One. 2012; 7:e44991*).

FILONE 2: Dato che EBV è stato correlato alla SM, astrociti e PBMC sono stati infettati *in vitro* con EBV, o esposti alla proteina EBVgp350. Si è osservata un'aumentata espressione di MSRVenV e sincitina1, con coinvolgimento di NF-κB, in astrociti, cellule B e monociti, ma non in cellule T ed NK. (Mameli et al, PLoS One 2012, 7:e44991)*.

I legami EBV-SM certi sono risultati indiretti (storia di mononucleosi infettiva, MI, e alti livelli di anticorpi anti-EBNA prima dell'esordio della SM). Pertanto abbiamo deciso di studiare HERV-W anche in pazienti con MI e controlli sani EBV(-) o con EBV latente, con alto/basso titolo di anticorpi anti-EBNA-1. I dati indicano che tutti e due i legami certi EBV-SM sono affiancati dall'attivazione di HERV-W/MSRV potenzialmente neuropatogena. Ciò fa pensare che l'attivazione di HERV-W/MSRV possa essere l'anello mancante tra EBV e SM e questo può aprire nuovi spazi di intervento (Mameli et al. PLoS One. 2013 2013; 8:e78474)*.

CONCLUSIONI

FILONE 1: nei nostri studi le terapie anti-SM (natalizumab, interferon β1a, azatioprina, glatiramero acetato) abbattano l'espressione di HERV-W, in parallelo con il successo clinico; il carico virale è parallelo alle ricadute e alla progressione di SM. Vicinanza alla cura: il complesso dei dati rafforza la nostra ipotesi che MSR/V possa essere usato in tempo reale come marcatore prognostico di efficacia terapeutica.

FILONE 2: si hanno interazioni tra HERV-W e EBV *in vitro* e *in vivo*, in cellule del sangue e del cervello. Per cui è concreta la possibilità di attivazione del potenziale neuropatogeno di HERV-W da cellule EBV superinfettante, sia nel sangue che nel cervello.

Vicinanza a trovare nuovi meccanismi patogenetici: l'ipotesi a due virus': ipotizziamo un contributo sia di EBV (innesco di futura SM) e di HERV-W (effettore diretto di patogenicità). La nostra ipotesi è stata ribattezzata "l'ipotesi a due virus" da altri autori, o "partita doppia genomica", discussa nel web (*), e citata nelle rassegne sull'argomento SM-EBV.

(*):

<http://multiple-sclerosis-research.blogspot.it/2012/10/ebv-and-herv-dual-viral-hypothesis.html>

<http://www.consultantlive.com/nervous-system-diseases/epstein-barr-virus-and-multiple-sclerosis-missing-link-found>

http://www.msdiscovery.org/news/new_findings/8948-genomic-double-play#comment-43

Study of multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV)/HERV-W as disease progression marker, and of its contribution to pathogenesis

INTRODUCTION AND AIMS

It is hard to predict to the patient HER/HIS clinical course, progression, and therapy outcomes, as so far we only can detect already established damage. MS etiology is complex. Among the proposed cofactors are human endogenous retroviruses (HERVs) of the W family and EBV (Epstein Barr virus). Also C. pneumoniae has been proposed. Several studies of the OU Dolei in MS patients have found a direct parallel between MSR/V/HERV-W expression and MS behavior. The OU Rassu found a high presence of C.pneumoniae in MS brains.

AIM: To investigate MSR/V/HERV-W practical applications and cofactor role in MS.

-ARM 1: HERV-W as prognostic BIOMARKER, to monitor in real times the patient for progression & response to therapy, preventing further disability and reducing the costs for care, through the evalu-

ation of HERV-W/MSRV/syncytin expression, in parallel with other parameters.

-ARM 2: whether HERV-W might be a COFACTOR in MS, due to its potentially neuro-immuno-pathogenic properties and to its activation by MS-related triggers.

Design *in vivo*: follow up of patients along therapy; *in vitro*: cultures of PBMC from patients & controls, and of astrocytes, +/- MS-related stimuli.

RESULTS

ARM 1: HERV-W expression in MS patients under natalizumab along 12 months. None of the patients relapsed. B cells, NK and monocytes but not by T cells express the HERV-Wenv protein. The HERV-W expression is reduced from month 6 onward (p=0.0001). Conclusion: efficacious natalizumab therapy down-regulates MSR/V/syncytin-1/HERV-W expression (Ar-

ru et al. *Mult. Scler.* 2013, Jul 22, *Epub ahead of print*). The enrollment of patients was delayed, as the S. Bortolo ethics committee took >ten months.

Thus the study still must be concluded. 28 patients were enrolled for the prospective study in the OU Rassa, 7 with CIS (Clinically Isolated Syndrome) and 19 with RRMS, one patient became pregnant. The patients had at least three samples after therapy with glatiramer acetate (Copaxone®), Interferon 1 α (Rebif22®, Avonex®), Interferon 1 β (Betaferon®) or fingolimod (Gilenya®). Preliminary results confirm MSR/V presence in all patients. Two patients relapsed after therapy with increase of MSR/V expression.

In another study, the positivity for HERV-Wenv protein is strongly increased in naïve patients, and dramatically reduced during therapy, indicating once again that the evaluation of HERV-W expression is an indicator of clinical trend (*Mameli et al. PLoS One.* 2012; 7:e44991).

ARM 2: Since EBV has been related to MS, astrocytes and PBMC *in vitro* were either infected by EBV, or exposed to its major envelope protein, EBVgp350. This protein increases the expression of MSR/Venv and syncytin-1, in both cells; the effect requires the NF- κ B pathway, and occurs in B cells and monocytes, but not in T cells, nor in the highly expressing NK cells. The latter cells, but not the T cells, are activated by proinflammatory cytokines. (*Mameli et al, PLoS One* 2012, 7:e44991)*.

Since confirmed EBV-MS links are indirect (history of infectious mononucleosis, IM, and high anti-EBNA IgG titers before MS onset), we decided to study HERV-W in hospitalized IM patients and

healthy donors either EBV(-) or latently EBV-infected with/without high titers of anti-EBNA-1 IgG. The data indicate that both two main EBV-MS links are paralleled by activation of the potentially neuropathogenic HERV-W/MSR/V. These novel findings suggest HERV-W/MSR/V activation as the missing link between EBV and MS, and may open new avenues of intervention. (*Mameli et al. PLoS One.* 2013 2013; 8:e78474)*.

CONCLUSIONS

ARM 1 conclusion: in our hands, efficacious anti-MS therapies (natalizumab, interferon 1 α , azathioprine, glatiramer acetate) strongly reduce HERV-W expression, paralleling the clinical benefit, and its load is directly related to relapses and MS progression. Proximity to cure: overall data strengthen our hypothesis that MSR/V could be used in real times as prognostic biomarker marker of treatment efficacy. ARM 2 conclusions: interactions among HERV-W and EBV occur *in vitro* and *in vivo*, in cells from blood and from brain. Thus the possibility of the activation of the neuropathogenic potential of HERV-W by superinfecting EBV is concrete, both in blood and in brain.

Proximity to find new pathogenic mechanisms: “the dual virus hypothesis”: We hypothesize a contribute of both EBV and HERV-W to MS, with a direct role of MSR/V as effector of pathogenicity, and EBV as an initial trigger of future MS. Our hypothesis was named as “the dual virus hypothesis” from other Authors, or “genomic double play”, discussed in the web(*), and quoted in Reviews on the MS-EBV topic.

(*):

<http://multiple-sclerosis-research.blogspot.it/2012/10/ebv-and-herv-dual-viral-hypothesis.html>
<http://www.consultantlive.com/nervous-system-diseases/epstein-barr-virus-and-multiple-sclerosis-missing-link-found>
http://www.msdiscovery.org/news/new_findings/8948-genomic-double-play#comment-43

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Dolei A, Garson JA, Arru G, Clerici M, Germa R, Marche PN, Perron H. Multiple sclerosis-associated retrovirus and related human endogenous retrovirus-W in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2014; 266:87-88.

Mameli G, Madeddu G, Mei A, Uleri E, Poddighe L, Delogu LG, Maida I, Babudieri S, Serra C, Manetti R, Mura MS, Dolei A. Activation of MSR-V-Type Endogenous Retroviruses during Infectious Mononucleosis and Epstein-Barr Virus Latency: The Missing Link with Multiple Sclerosis? *PLoS One*. 2013; 8:e78474.

Arru G, Leoni S, Pugliatti M, Mei A, Serra C, Delogu LG, Manetti R, Dolei A, Sotgiu S, Mameli G. Natalizumab inhibits the expression of human endogenous retroviruses of the W family in multiple sclerosis patients: a longitudinal cohort study. *Mult Scler* 2014; 20:174-182.

Di Pietro M, Filardo S, Cazzavillan S, Segala C, Bevilacqua P, Bonoldi E, D'Amore ES, Rassa M, Sessa R. Could past Chlamydia vascular infection promote the dissemination of Chlamydia pneumoniae to the brain? *J Biol Regul Homeost Agents*. 2013; 27:155-164.

Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Sotgiu S, Serra C, Manetti R, Dolei A. Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. *PLoS One*. 2012; 7: e44991.

Poddighe L, Mameli G, Mei A, Uleri E, Serra C, Manetti R, Dolei A. Expression and activation of human endogenous retroviruses of the W family in blood cells and astrocytes: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Retrovirology* 2011, 8(Suppl2): P20

Mei A, Mameli G, Poddighe L, Uleri E, Serra C, Manetti R, Dolei A. Basal Expression and Regulation by Pro-Inflammatory Cytokines of Human Endogenous Retroviruses of the W Family in Blood Cell Subpopulations and in Astrocytes. 9th Joint Meeting of ICS-ISICR, Florence October 9 -12, 2011, p103

Mei A, Poddighe L, Mameli G, Serra C, Uleri E, Manetti R, Dolei A. The Epstein Barr virus (EBV) activates MSR-V-env and syncytin-1 in PBMC and astrocytes: possible implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. 10th Natl Congress of the Italian Society of Virology. Orvieto, Sept. 12-14, 2011, p.32

Poddighe L, Mei A, Mameli G, Serra C, Uleri E, Manetti R, Dolei A. B cells, NK and monocytes from patients with multiple sclerosis exhibit increased surface expression of HERV-Wenv than healthy donors and MS patients under therapy. 10th Natl Congress of the Italian Society of Virology. Orvieto, Sept. 12-14, 2011, p.33

Mameli G, Mei A, Madeddu G, Poddighe L, Fiori ML, Cattari G, Mura MS, Serra C, Manetti R, Dolei A. Modulazione dei retrovirus endogeni della famiglia HERV-W in cellule circolanti di pazienti con mononucleosi infettiva e in cellule trattate in vitro con citochine pro infiammatorie. X Congresso Nazionale SIMIT, 5 /8 Ottobre 2011, p.43

Serra C, Poddighe L, Mameli G, Mei A, Uleri E, Ortu S, Manetti R, Dolei A. Il virus di Epstein Barr attiva i retrovirus endogeni della famiglia HERV-W in astrociti e cellule circolanti: implicazioni patogenetiche per la sclerosi multipla. X Congresso Nazionale SIMIT, 5 /8 Ottobre 2011, p.76.

Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Serra C, Manetti R, Dolei A. Uneven expression and response to stimuli of multiple sclerosis- (MS)-associated retrovirus (MSRV)env and syncytin-1 by cell subpopulations in vivo and in vitro: inference for multiple sclerosis. 11th Intl Symposium on NeuroVirology- *J Neurovirol* 2012; 18:S132-S133.

Mameli G, Mei A, Madeddu G, Fiori ML, Cattari G, Serra C, Poddighe L, Uleri E, Mura MS, Dolei A. Modulazione dei retrovirus endogeni della famiglia HERV-W in pazienti con mononucleosi infettiva e controlli EBV negativi e positivi. 11° Congr.Naz. SIMIT 2012, 17-20 ottobre 2012, Abs 129.

Mameli G, Mei A, Madeddu G, Fiori ML, Cattari G, Serra C, Poddighe L, Uleri E, Mura MS, Dolei A. Upregulation of MSR/V/ HERV-W in patients affected by infectious mononucleosis. 11th Natl Congress of the Italian Society of Virology, Sept. 17-19, 2012, p50.

Arru G, Mei A, Leoni S, Manetti R, Serra C, Uleri E, Sotgiu S, Pugliatti M, Dolei A, Mameli G. Inhibition of Human endogenous retrovirus type W in blood during Natalizumab therapy. 11th Natl Congress of the Italian Society of Virology, Sept. 17-19, 2012, p50-51.

Uleri E, Serra C, Sariyer IK, Khalili K, Dolei A. Human Endogenous Retroviruses HERV-W/MSRV and Syncytin-1 are up-regulated by JC virus in primary human glial cells and U87MG glioblastoma cell line. 5th Intl Conf. on Polyomaviruses and Human Diseases: Basic and Clinical Perspectives, Stresa, May 9th-11th, 2013.

Dolei A, Mameli G, Madeddu G, Mei A, Uleri E, Poddighe L, Maida I, Babudieri S, Serra C, Mura MS. Activation of the potentially neuropathogenic HERV-W/MSRV-type endogenous retroviruses during severe infectious mononucleosis and past Epstein-Barr virus infection: the missing link with multiple sclerosis? 5th European Congress of Virology, Lyon, Virologie, 2013, 17(S2): S46

Dolei A, Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Serra C, Manetti R. Expression and activation by EBV and EBVgp350 of HERV-W human endogenous retroviruses in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. 5th European Congress of Virology, Lyon, Virologie, 2013, 17(S2): S278.

Serra C, Arru G, Mameli G, Leoni S, Mei A, Serra C, Manetti R, Pugliatti M, Sotgiu S, Dolei A. The treatment of multiple sclerosis patients with natalizumab inhibits the expression of human endogenous retroviruses of the HERV-W family, in a longitudinal cohort study. 5th European Congress of Virology, Lyon, Virologie, 2013, 17(S2): S278.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 110.000 €

Vincenzo Barnaba

Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Sapienza, Università di Roma, Roma

COLLABORATORI:

Helene Martini, Alessandra Citro, Carmela Martire, Silvia Piconese, Ylenia Pacella, Chiara Focaccetti

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Francesco Lolli, Università degli Studi di Firenze, Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi, Firenze

Immuno-attivazione cronica nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'apoptosi delle cellule T attivate genera antigeni self che possono essere cross-presentati dalle cellule dendritiche ad un ampio repertorio di linfociti T CD8⁺ autoreattivi.

Abbiamo dimostrato che nelle infezioni croniche, come l'HIV o l'epatite C (HCV), la frequenza di tali cellule CD8⁺ autoreattive correla rispettivamente con la percentuale di linfociti T CD4⁺ apoptotici circolanti nel sangue periferico e con la cronicizzazione della malattia. Studi precedenti suggeriscono che queste risposte contro gli antigeni self apoptotici contribuiscono a mantenere e ad amplificare l'immunopatologia mediante la loro capacità di produrre alti livelli di citochine pro-infiammatorie.

Gli obiettivi di questo studio sono: determinare se i linfociti T CD8⁺ specifici per gli epitopi apoptotici hanno un ruolo nella patogenesi della sclerosi multipla; caratterizzarne il fenotipo al fine di valutare se qualcuno si associa più degli altri alla gravità di malattia; caratterizzare i meccanismi attraverso i quali queste risposte sono indotte e mantenute; verificare se possano essere considerati marcatori di predizione della risposta al trattamento con l'analogo della sfingosina 1-fosfato (Fingolimod) o l'anticorpo monoclonale anti-integrina $\alpha 4\beta 1$ (Natalizumab) nei pazienti con sclerosi multipla.

RISULTATI

Abbiamo visto che la frequenza delle cellule T CD8⁺ specifiche per gli epitopi apoptotici è significativamente più alta nei pazienti con sclerosi multipla rispetto ai donatori sani. Tali cellule autoreattive hanno un forte potenziale di produrre IFN- γ o IL-17 in risposta alla stimolazione con specifici peptidi apoptotici.

Esse si accumulano significativamente nel liquido cerebrospinale degli stessi pazienti e correlano con il grado di disabilità della malattia (EDSS). Mediante saggi di cross-presentazione abbiamo inoltre dimostrato che i linfociti T CD8⁺ specifici per gli epitopi apoptotici sono attivati *ex-vivo* dai frammenti derivanti dal taglio caspatico delle proteine cellulari. Dati preliminari in pazienti con sclerosi multipla in terapia con Fingolimod o Natalizumab indicano che, dopo 4 settimane di terapia, la frequenza delle cellule autoreattive aumenta soltanto nei pazienti che non rispondono al trattamento.

CONCLUSIONI

Abbiamo dimostrato che i linfociti T CD8⁺ specifici per gli epitopi apoptotici sono reclutati nel fluido cerebrospinale dei pazienti con sclerosi multipla e correlano con il grado di disabilità della malattia. Questo suggerisce che tali cellule, con un forte potenziale infiammatorio, si espandono nel sito di infiammazione e mediante la produzione di citochine contribuiscono alla immunopatologia. Il fatto che il processamento e la cross-presentazione delle proteine cellulari sia indispensabile per l'attivazione dei linfociti CD8⁺ autoreattivi indica che questi ultimi partecipano al danno cerebrale attraverso la produzione di citochine pro-infiammatorie (IFN- γ e IL-17) in seguito alla cross-presentazione dell'enorme numero di cellule apoptotiche presenti nel tessuto infiammato. I nostri risultati preliminari in pazienti in terapia con Fingolimod o Natalizumab suggeriscono inoltre che i linfociti T CD8⁺ specifici per gli epitopi apoptotici essendo più alti dopo un mese di terapia solo nei pazienti che non rispondono, potrebbero essere considerati un marcatore precoce di risposta al trattamento.

Chronic immune activation in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

In previous studies, we demonstrated that the proteome of apoptotic T cells include prominent caspase-cleaved cellular proteins. A high proportion of distinct epitopes in these fragments (apoptotic epitopes) can be cross-presented by DCs via the classical major histocompatibility complex (MHC) class I pathway to a wide repertoire of autoreactive CD8⁺ T cells. In chronic HIV and acute hepatitis C virus (HCV) infections, the frequency of resulting autoreactive CD8⁺ T cells correlates with the proportion of circulating apoptotic CD4⁺ T cells *in vivo* and with the disease progression respectively. These studies have suggested that the emergence and the maintenance of these responses contribute to amplification of the immunopathology through their capacity to produce high levels of inflammatory cytokines.

The aims of the present study are: to determine whether CD8⁺ T cells specific for apoptotic self-epitopes are prominent in MS patients; to verify whether they have a distinct effector phenotype; to distinguish which of them is associated with the disease severity, and to ascertain the mechanisms whereby these responses are induced and maintained; to verify if they are predictive markers of favourable response to second line treatment with the structural analogue of sphingosine 1-phosphate (Fingolimod) or the anti- α 4 integrin monoclonal antibody (Natalizumab) in multiple sclerosis (MS) patients.

RESULTS

We found that polyfunctional (IFN- γ and/or IL-17 producing) autoreactive CD8⁺ T cells specific for apoptotic epitopes were represented in MS patients at frequencies significantly higher than in healthy donors (HD). These autoreactive CD8⁺ T cells with a strong potential to produce IFN- γ or IL-17 in response to the relevant apoptotic epitopes were significantly accu-

mulated in the cerebrospinal fluid (CSF) from the same patients. In addition, the frequencies of these autoreactive CD8⁺ T cells correlated with the disease disability (EDSS). Cross-presentation assay revealed that caspase-cleaved cellular proteins are required to activate apoptotic epitope-specific CD8⁺ T cells *ex vivo*.

Preliminary data in MS patients in therapy with fingolimod or natalizumab show that apoptotic epitope-specific CD8⁺ T cells were significantly higher in patients than in HD. Notably, they increased after only four weeks of therapy, being significantly higher in non-responder (NR) patients than in responders (R).

CONCLUSIONS

The demonstration that mixed polyfunctional (type-1 and -17) CD8⁺ TEM cells specific for apoptotic T cell associated self-epitopes are recruited in the CSF of MS patients and are associated with the clinical score of disease disability, suggests that apoptotic self-antigen-specific T cells with strong inflammatory potential largely expand at the level of the inflammatory site, and may contribute, through the production of high levels of inflammatory cytokines, to MS immunopathology. Crosspresentation of caspase-cleavage of apoptotic antigens is required to activate these autoreactive CD8⁺ TEM cells *ex vivo*, suggesting that the latter may participate to the CNS damage through the production of pro-inflammatory IFN- γ and IL-17 cytokines upon cross-presentation of the huge number of apoptotic cells present in the inflamed tissue.

Our preliminary results in MS patients in treatment with Fingolimod or Natalizumab suggest that AE-specific CD8⁺ T cells may be considered as an early marker of response to therapy, being their frequencies significantly higher in NR compared to R since the 4th week of therapy.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

F. Lolli, H. Martini, A. Citro, D. Franceschini, E. Portaccio, M. P. Amato, R. Mechelli, V. Annibaldi, J. Sidney, A. Sette, M. Salvetti and V. Barnaba Increased CD8⁺ T cell responses to apoptotic T cell-associated antigens in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation* 2013; 10:94

F. Lolli, H. Martini, A. Citro, D. Franceschini, E. Portaccio, M. P. Amato, R. Mechelli, V. Annibaldi, J. Sidney, A. Sette, M. Salvetti and V. Barnaba. Chronic Immune Activation in Multiple Sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 29-30 Maggio 2013

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 100.000 €

Andrea Cossarizza

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

COLLABORATORI:

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

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

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

Andrea De Maria, Università di Genova, Genova

Polifunzionalità delle cellule iNKT periferiche come marker immunologico delle diverse forme della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Alcuni studi hanno analizzato il ruolo e la funzionalità delle cellule NKT e iNKT (cellule NKT invariante, che regolano fenomeni autoimmuni) durante la SM. Le cellule iNKT sono una rara (<1%) popolazione di linfociti T che esprimono recettori NK insieme a un recettore di tipo Va24-Ja18, producono IL-4 e/o IFN-gamma, e sono attivate da lipidi come l'alfa-galattosilceramide (a-GalCer) presentato dalla molecola CD1d. Ci sono dati contrastanti su possibili difetti delle iNKT nella SM, per lo più dovuti alla eterogeneità dei pazienti esaminati, al loro numero o anche a problemi tecnici causati dalla difficoltà di analizzare queste rare cellule, o all'uso di diversi marcatori di superficie. L'espressione della molecola CD161 non è mai stata analizzata sulle cellule iNKT. Il CD161 è un recettore natural killer lectin-simile, espresso in circa il 15% dei linfociti T, nonché su alcuni linfociti iNKT. Per chiarire meglio il ruolo delle cellule iNKT nella SM, è necessaria una migliore caratterizzazione fenotipica delle loro sottopopolazioni, in particolare durante la ricaduta e nelle fasi di remissione della malattia. Esistono pochi dati anche sulla funzionalità di queste cellule nella SM, che per lo più riguardano la produzione di singole citochine. Pertanto, l'obiettivo principale del nostro progetto pilota è stato quello di ottimizzare e standardizzare una nuova metodologia per studiare le cellule iNKT nel sangue periferico nei pa-

zienti con SM, al fine di identificare eventuali variazioni del loro fenotipo e della funzione. A questo scopo, abbiamo sviluppato metodiche basate sulla citometria a flusso policromatica.

RISULTATI

Abbiamo ottimizzato una nuova metodologia per lo studio delle cellule iNKT usando un citofluorimetro a focalizzazione acustica (Attune, Life Technologies), che utilizza ultrasuoni per allineare le cellule durante il loro flusso, e permette di identificare fino a 20.000 cellule/secondo. Questo permette di analizzare e meglio caratterizzare cellule rare e di studiarne le funzioni. Dopo la iniziale messa a punto della metodologia, il progetto pilota (dove abbiamo potuto analizzare solo un numero limitato di pazienti) è proseguito, e, a gennaio 2014, abbiamo studiato un totale di 106 pazienti seguiti dal Centro per la SM (presso il NOCSAE, Modena): 74 con forma recidivante-remittente [RR, 14 trattati con interferone 1-beta (IFN1-b), 15 con Natalizumab (Nat), 13 con Glatiramer Acetato (Gla), 32 non trattati]. Di questi 74, 14 pazienti di nuova diagnosi (RRN) sono stati seguiti per un anno. Altri 32 hanno una forma progressiva di MS (PR): 17 Primaria Progressiva (PP), 15 Secondaria Progressiva (SP). Come controlli (CTR) sono stati studiati 32 soggetti sani confrontabili per sesso e per età. È stata eseguita un'analisi dettagliata del fenotipo delle cellule iNKT: la stati-

stica, eseguita tramite l'analisi delle componenti principali (PCA), ha rivelato che alcuni parametri immunologici potrebbero essere utilizzati per raggruppare i pazienti e identificare la forma di SM. Infatti, i pazienti RR e PR hanno meno cellule T CD8⁺ e più cellule CD8⁺CD161⁺⁺ rispetto ai CTR; tali cellule sono più rappresentate nei pazienti RR. La percentuale e il livello di cellule iNKT non variano tra i diversi gruppi, ma i pazienti RR e PP presentano percentuali più elevate di cellule iNKT che esprimono CD4, e di cellule iNKT che sono CD161⁻. I pazienti PR hanno minori livelli di iNKT CD4⁻,CD8⁻ (definiti doppio negativi, DN) e di iNKT che esprimono CD8⁺,CD161⁺⁺ rispetto ai CTR. I pazienti RR trattati con Nat hanno livelli maggiori di cellule T CD3⁺ e CD8⁺ rispetto a quelli che assumono IFN, e, rispetto a tutti gli altri trattamenti, anche maggiori livelli di iNKT che esprimono CD4⁺,CD8⁺. I pazienti RRN mostrano meno cellule iNKT e CD8⁺CD161⁺ dopo 6 mesi di trattamento e una diminuzione di DN iNKT.

CONCLUSIONI

Abbiamo osservato che è possibile raggruppare i pazienti con SM sulla base di parametri immunologici legati alle cellule CD8⁺ e alle diverse sottopopolazioni di cellule iNKT. Se il ruolo delle cellule T CD4⁺ nel corso della SM è ben studiato, è poco conosciuto quello delle cellule T CD8⁺ e delle iNKT, così come l'importanza della loro polifunzionalità. L'utilizzo della PCA suggerisce però che tali cellule abbiano un ruolo patogenetico che merita ulteriori studi. Al fine di trovare nuovo meccanismo patogenetico, l'integrazione del fenotipo cellulare e della funzionalità delle iNKT nelle diverse forme di SM potrebbe condurre all'identificazione di profili immunologici caratteristici di una fase della malattia. Lo studio potrebbe essere utile per meglio caratterizzare e comprendere le diverse forme di malattia, per selezionare il tipo d'intervento terapeutico, per ridurre errori di selezione dei pazienti negli studi clinici e per identificare possibili bersagli immunoterapia selettiva.

Polyfunctionality of peripheral blood iNKT cells as an immunological marker of different forms of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

In the last years few studies have analyzed the role and functionality of NKT and iNKT cells during MS. NKT cells are a population of T lymphocytes that bear NK receptors and link innate and adaptive immunity. A subgroup named "invariant NKT-cells" (iNKT, expressing a Va24-Ja18 T-cell receptor) can regulate autoimmunity. iNKT-cells are very rare in peripheral blood (typically, <1% of T cells), produce IL-4 and/or IFN-gamma, are activated by lipids such as alpha-galactosylceramide (α-GalCer) presented by CD1d, and were mainly studied in patients with RR-MS or assuming IFN-β therapy. Contrasting data exist on iNKT cell defects in MS, probably due to the different phases of disease analyzed, number of patients, or to technical problems due to the paucity of such cells (that requires the cytometric analysis of a huge number of cells) and to the use of different surface markers. Almost no studies have investigated the expression of CD161 molecule, the killer cell lectin-like receptor subfamily B-member 1, which is expressed on about 15% of human T cells as well as on iNKT lymphocytes. A detailed phenotypic

characterization of iNKT cell subsets is needed to better clarify their role in MS, particularly during the relapse and remission phases of disease. Few data also exist on the functionality of these cells in MS, that regard the production of single cytokines. Thus, the main aim of our pilot project was to set up and standardize a new methodology to study peripheral blood iNKT cells in MS patients, and to show the presence of eventual changes in their phenotype and function. For this purpose, we had to develop novel assays based upon polychromatic flow cytometry.

RESULTS

We set up a new methodology for investigating the rare iNKT cells by using an acoustic focusing flow cytometer (Attune, Life Technologies), which uses ultrasonic waves (over 2 MHz), rather than hydrodynamic forces, to position cells into a single, focused line along the central axis of a capillary and can reach a very high speed of acquisition (up to 20,000 cells per second). This allowed us to analyze and better characterize rare cells, such as iNKT

cells, and to study their functions, by considering >5 million cells per blood sample.

After the initial set up of the methodology, the pilot project (where we could analyze only a limited number of patients) was continued, and, as of January 2014, we have studied a total of 106 patients, followed by the MS Center (NOCSAE, Modena, Italy): 74 with a Relapsing Remitting [RR; 14 treated with Interferon 1- β (IFN), 15 with Natalizumab (Nat), 13 with Glatiramer Acetate (Gla), 32 without treatment]. Among these 74 RR patients, 14 newly-diagnosed RR patients (RRN) were followed up to one year; 32 had a Progressive (PR) MS: 17 Primary Progressive (PP), 15 Secondary Progressive (SP). 32 age- and sex-matched subjects were used as healthy controls (CTR). A detailed analysis of iNKT cells was performed along with lymphocyte phenotype, and the principal component analysis (PCA) revealed that some immunological parameters could be used to cluster patients, and identify their MS form. Indeed, RR and PR MS patients displayed less CD8⁺ T cells and more CD8⁺,CD161⁺⁺ T cells if compared to CTR; such cells were more represented in RR patients. The percentage and level of iNKT cells did not vary among different groups, but RR and PP patients had higher percentages of iNKT expressing CD4 and of iNKT,CD161⁻. Levels of CD4⁺,CD8⁻ (double negative, DN) iNKT and iNKT expressing

CD8⁺,CD161⁺⁺ were decreased in PR patients when compared to CTR. CD3⁺ and CD8⁺ T cells in RR patients treated with Nat increased if compared to those assuming IFN, while levels of CD4⁺,CD8⁺ iNKT were increased if compared to all other treatments. RRN patients displayed a decrease of iNKT cells and CD8⁺,CD161^{dim} cells after 6 months of treatments and a decrease of DN iNKT.

CONCLUSIONS

We found that is possible to cluster MS patients based upon immunological parameters related to CD8⁺ and iNKT cell subsets. If the role of CD4⁺ T cells during MS is quite established, much less is known about CD8⁺ T or iNKT cells, and their poly-functionality in MS. The use of PCA strongly suggest that such cells have a pathogenetic role, that deserves further studies. As far as the proximity to find new pathogenic mechanism, integrate analysis of iNKT cell phenotype and functionality in different MS forms may lead to the identification of distinct immunological profiles. Our investigation could be useful for better characterize the disease, for a better comprehension of the pathogenesis of the different disease forms, for the selection of the type of therapeutic intervention, for reducing selection bias when enrolling patients in clinical trials and for identifying possible targets for selective immunotherapy.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Ferraro D, De Biasi S, Vitetta F, Simone AM, Federzoni L, Borghi V, Cossarizza A, Nichelli PF, Sola P. Recurrent Varicella following Steroids and Fingolimod in a multiple sclerosis Patient. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(5):1059-1061, 2013.

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

De Biasi S, Nasi M, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Gibellini L, Pinti M, Del Giovane C, Sola P, Cossarizza A. Complex changes in invariant Natural Killer T (iNKT) cells in patients with different clinical forms and treatments of Multiple Sclerosis. *XV International Congress of Immunology*, Milan (Italy), 22-27 August 2013.

De Biasi S, Nasi M., Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Gibellini L., Pinti M, Del Giovane C, Sola P, Cossarizza A. Complex changes in invariant Natural Killer T (iNKT) cells in patients with different clinical forms and treatments of Multiple Sclerosis. *Conference of the International Society for Advancement in Cytometry "Cyto 2013"*, San Diego (CA, USA), 19-22 May 2013.

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

Nicola De Stefano

Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze, Università di Siena, Siena

COLLABORATORI:

Antonio Giorgio, Maria Laura Stromillo, Francesca Rossi, Marco Battaglini, Alessandro De Leucio, Antonio Federico, Irina Efimenko, Giacomo Demurtas

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Maria Letizia Bartolozzi, Leonello Guidi, Patrizia Maritato, Unità di Neurologia, Ospedale di Empoli, Empoli

Emilio Portaccio, Maria Pia Amato, Dipartimento di Neurologia, Università di Firenze, Firenze

Modifiche nell'arco di 10 anni della sostanza bianca e grigia cerebrale in pazienti con sclerosi multipla in rapporto alla loro disabilità fisica

PREMESSE E OBIETTIVI

L'imaging di risonanza magnetica (MRI) ha contribuito in maniera significativa alla comprensione della patogenesi della sclerosi multipla (SM). Purtroppo, il danno focale (cioè, le lesioni) nella sostanza bianca (SB) non spiega pienamente i processi patologici che portano alla progressione della disabilità. Nei pazienti con SM, il danno della sostanza grigia (SG) è presente fin dalle prime fasi di malattia ed è clinicamente rilevante. Tuttavia, è ancora poco chiaro come il danno della SB e della SG siano correlati con lo stato clinico dei pazienti con SM e come progrediscono nel lungo termine. Abbiamo quindi utilizzato misure di MRI per valutare in un ampio gruppo di pazienti con SM seguiti per 10 anni: i) l'evoluzione a lungo termine della riduzione di volume (atrofia) della SB e della SG e ii) il loro rapporto con la disabilità fisica.

RISULTATI

Da una popolazione iniziale di 163 pazienti affetti da SM, reclutati tra gennaio 2000 e marzo 2002, 106 pazienti con SM hanno eseguito, dopo 10 anni, una valutazione clinica e di MRI, acquisita utilizzando lo stesso scanner e protocollo. 57 pazienti sono stati persi al follow-up per diverse ragioni (non disposti a partecipare [n=21], trasferiti in altra sede [n=14], non contattabili [n=10], grave disabilità [n=9], morte [n=3]). Nel primo studio, pubblicato sul *Multiple Sclerosis Journal*, i dati MRI di 58 pazienti con SM a ricadute e remissioni (RR) sono stati acquisiti al basale e dopo 10 anni, e correlati con le modifiche della disabilità mi-

surata con l'Expanded Disability Status Scale (EDSS). La crescita annua del volume lesionale (VL) nell'arco di 10 anni è stata $+6.7 \pm 8.7\%$ per le lesioni in T2 e $+11.5 \pm 12.3\%$ per le lesioni ipointense in T1. Nell'analisi di regressione multipla, il peggioramento dell'EDSS a 10 anni era significativamente associato sia con il numero di lesioni in T1 al basale sia con l'aumento del VL delle lesioni in T1 nell'arco dei 10 anni.

Nel secondo studio, nell'arco dei 10 anni l'atrofia cerebrale globale annualizzata è stata maggiore nei pazienti con SM rispetto ai controlli normali (CN) ($-0.5 \pm 0.2\%$ vs $-0.3 \pm 0.1\%$, $p=0.009$), soprattutto in quei pazienti con un più alto numero di ricadute. Inoltre, i pazienti con SM avevano anche una maggiore atrofia della SG rispetto ai CN ($-1.10 \pm 0.52\%$ vs $-0.73 \pm 0.19\%$, $p=0.008$). Nell'arco dei 10 anni, la correlazione tra atrofia cerebrale globale e modifiche dell'EDSS era più alta nei pazienti con maggiore disabilità ed era spiegata dall'atrofia della SG.

CONCLUSIONI

Nei pazienti con SMRR, l'accumulo del carico lesionale a lungo termine risulta essere associato ad un peggioramento della disabilità clinica, in particolare in presenza di lesioni distruttive e ipointense alla MRI. Nell'arco di 10 anni, l'atrofia cerebrale nei pazienti con SM è significativamente correlata con le modifiche dell'EDSS, suggerendo così che l'atrofia cerebrale può fornire nel lungo termine un valido marcatore di disabilità e progressione di malattia.

Ten-year changes in the cerebral white and grey matter of patients with multiple sclerosis and their relevance to physical disability

INTRODUCTION AND AIMS

Magnetic resonance imaging (MRI) has greatly contributed to understanding the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). Unfortunately, focal damage (i.e., lesions) in the white matter (WM) does not fully explain the pathologic processes leading to disability progression. Cortical grey matter (GM) pathology is present from the earliest stages and is clinically relevant to MS patients. However, there is limited knowledge on how WM and GM pathology affects the clinical status of MS patients and how it progresses in the long term. Against this background, we used MRI metrics to assess in a large group of MS patients followed up for 10 years: i) the long-term evolution of WM and GM pathology and ii) its relationship with physical disability.

RESULTS

From an original population of 163 MS patients, recruited between January 2000 and March 2002, 106 MS patients had, after 10 years, clinical assessment and brain MRI, acquired using the same scanner and protocol. Indeed, 57 patients were lost to follow-up for different reasons (unwilling to participate [$n=21$], moved [$n=14$], not contactable [$n=10$], unable to participate due to severe disability [$n=9$], died [$n=3$]).

In the first study, published on the Multiple Sclerosis Journal, MRI data of 58 RRMS patients were ac-

quired at baseline and after 10 years, and correlated with disability changes as measured by the Expanded Disability Status Scale (EDSS). The annualized 10-year lesion volume (LV) growth was $+6.7\pm 8.7\%$ for T2-weighted (T2-W) lesions and $+11.5\pm 12.3\%$ for T1-weighted (T1-W) hypointense lesions. In the multiple regression analysis, EDSS worsening over 10 years was best correlated with the combination of baseline T1-W lesion count and increasing T1-W LV. In the second study, submitted, we found that annualized global brain atrophy was higher in MS patients than in normal control (NC) ($-0.5\pm 0.2\%$ vs. $-0.3\pm 0.1\%$, $p=0.009$), especially in those patients with higher number of relapses. Moreover, MS patients had also higher annualized GM atrophy than NC ($-1.10\pm 0.52\%$ vs. $-0.73\pm 0.19\%$, $p=0.008$). Over 10 years, correlation of global brain atrophy with EDSS change was closer in patients with worsening disability and driven by change in GM volume.

CONCLUSIONS

In RRMS patients, long-term brain lesion accrual turned out to be associated with worsening in clinical disability, particularly in presence of hypointense, destructive lesions. Over 10 years, brain atrophy in MS patients significantly correlated with EDSS change, thus suggesting that long-term brain volume change may provide a valuable outcome of longstanding disability and progression.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Giorgio A, Stromillo ML., Bartolozzi ML., Rossi F, Battaglini M, De Leucio A, Guidi L, Maritato P, Portaccio E, Sormani MP, Amato MP, De Stefano N. "Relevance of hypointense brain MRI lesions for long-term worsening of clinical disability in relapsing multiple sclerosis". *Mult Scler.* 2014 Feb;20(2):214-9

Giorgio A, Stromillo ML., Bartolozzi ML., Rossi F, Battaglini M, De Leucio A, Guidi L,, Baldini M, Federico A, Portaccio E., Amato MP, De Stefano N. "Ten-year global and tissue-type brain atrophy rate and relevance to disability progression in patients with multiple sclerosis". *Article submitted*

Giorgio A, Stromillo ML., Bartolozzi ML., Rossi F, Battaglini M, Guidi L., Maritato P., Portaccio E, Amato MP, Federico A, De Stefano N. "Ten-Year brain atrophy and disability changes in patients with multiple sclerosis". *Neurology* April 22, 2012 78:P03.065, Annual Meeting of the American Academy of Neurology (AAN), May 2012, New Orleans, USA

Giorgio A, Stromillo ML., Bartolozzi ML., Rossi F, Battaglini M, Blandino A, Guidi L, Maritato P, Federico A, De Stefano N. "Progression of brain atrophy over 10 years and its relationship to disability change in patients with multiple sclerosis" Poster at 21st Meeting of the European Neurological Society (ENS), 28-31 May 2011, Lisbon, Portugal

Giorgio A, Stromillo ML., Bartolozzi ML., Rossi F, Battaglini M, Blandino A, Guidi L, Maritato P, Federico A, De Stefano N. "Ten-year brain atrophy rate and its relevance to disability in multiple sclerosis" Oral communication at International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) 2011, 7-13 May 2011, Montreal, Canada

A. Giorgio, ML. Stromillo, ML. Bartolozzi, F. Rossi, M. Battaglini, A. Blandino, L. Guidi, M. Patrizia, A. Federico, N. De Stefano. "Ten-year brain atrophy rate and its relevance to disability progression in patients with Multiple Sclerosis". Oral communication at XLI Congresso della Società Italiana di Neurologia (SIN), 23-27 October 2010, Catania, Italy

Giorgio A, Stromillo ML., Bartolozzi ML., Rossi F, Battaglini M, Blandino A, Guidi L, Maritato P, Federico A, De Stefano N. "Ten-year brain atrophy rate and its relevance to disability progression in patients with Multiple Sclerosis". Poster at the Congress of the European Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), 13-16 October 2010, Goteborg, Sweden

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 100.000 €

Franca Deriu

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Sassari

COLLABORATORI:

Immacolata Magnano, Giovanni Mario Pes, Giovanna Pilurzi, Maria Paola Cabboi, Francesca Ginatempo, Elena Giaconi, Edoardo Rosario de Natale, Maurizio Conti, Antonio Achene, Andrea Salis, Giulio Rosati, Eusebio Tolu, John C. Rothwell

Studio neurofisiologico, neuroradiologico e clinico del tronco encefalico in pazienti con sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Le funzioni del tronco encefalico (TE) vengono studiate comunemente mediante i potenziali evocati multimodali (PE: BAEP, SEP del nervo mediano e tibiale), la risonanza magnetica convenzionale (RM) e l'esame clinico (CLIN). Nella Sclerosi Multipla (SM) crescenti evidenze dimostrano un coinvolgimento del TE che spesso non è documentato dalle metodiche standard. Recentemente i riflessi del TE (RTE), hanno ricevuto grande attenzione come strumento per valutare il TE nei pazienti con SM, in particolare il riflesso vestibolocollico (VCR). Al contrario, i riflessi vestibolomasseterino (VMR), acusticomasseterino (AMR) e trigeminocollico (TCR) non sono mai stati studiati sistematicamente nella SM. Il presente progetto si proponeva i seguenti obiettivi: 1) studiare se la sensibilità diagnostica di CLIN, EP e RM può essere migliorata aggiungendo la valutazione del VMR, AMR, VCR e TCR, sia come singoli riflessi che in batteria; 2) documentare variazioni delle disfunzioni del TE nel tempo, attraverso una valutazione di RTE, EP, RM e CLIN prima e dopo un periodo medio di osservazione di un anno.

RISULTATI

La batteria dei quattro RTE è stata registrata in 60 pazienti con SM (età $33,3 \pm 8,3$ anni; durata malattia $8,2 \pm 6,4$ anni). La distribuzione delle anomalie dei RTE e dei PE era la seguente: VMR 62,1%, AMR 55,1%, TCR 58,6%, VCR 25,9%; BAEPs 37,3%, SEP del mediano 60,3% e SEP del tibiale 58,6%. Nel complesso, disfunzioni del TE sono state rilevate come segue: RTE 86,9%, PE 82,7%, RM 71,7%, CLIN 37,7%. Mentre la performance dei RTE e dei PE, presi separatamente, non era significativamente migliore della combinazione di RM/CLIN (70%), l'as-

sociazione dei RTE/EP raggiungeva una sensibilità del 93,3%, significativamente maggiore in un sottogruppo di pazienti con una durata di malattia $\leq 6,4$ anni.

Dopo $15,1 \pm 4,2$ mesi dalla valutazione iniziale, sono stati ritestati 45/60 pazienti, di cui nessuno aveva presentato ricadute, in linea con la stabilità della frequenza di alterazioni alla RM e all'esame CLIN. I RTE ed i PE, invece, hanno mostrato un peggioramento delle funzioni del TE. In particolare, sebbene le percentuali di alterazioni della batteria dei RTE non fosse cambiata, è stato osservato un significativo peggioramento dei punteggi di gravità (*score*) per VMR, AMR e TCR. Per quanto riguarda la batteria dei PE, la frequenza di alterazioni riscontrate era significativamente aumentata al follow up, così come pure lo *score* di gravità, in particolare per l'onda P14 del SEP del mediano.

CONCLUSIONI

Questo studio dimostra che la valutazione del VMR, AMR, TCR e del VCR è una procedura affidabile e informativa nello studio della funzione del TE nei pazienti con SM. La loro valutazione combinata, come batteria, offre una prestazione complessiva paragonabile a quella dei PE ed è capace di rilevare disfunzioni del tronco encefalico, altrimenti non evidenziate dall'esame clinico e dalla RM. È di rilievo il fatto che l'associazione dello studio della batteria dei quattro RTE con i PE standard, ha mostrato un'accuratezza significativamente più elevata nel rivelare un eventuale coinvolgimento del TE, specie nei casi clinicamente e radiologicamente silenti. Sotto questo aspetto, la registrazione dei RTE potrebbe essere d'aiuto nella valutazione funzionale delle sindromi clinicamente silenti, in cui il rilievo di lesioni

del TE subcliniche, può avere un ruolo chiave nella stima del rischio di sviluppare disabilità futura.

Le valutazioni di follow up non hanno mostrato alcuna variazione sostanziale del quadro clinico e neuroradiologico, in accordo con l'assenza di ricadute durante il periodo di osservazione. Ciononostante, la rivalutazione sia dei PE che dei RTE ha evidenziato un deterioramento complessivo dei circuiti del TE, confermando la capacità dei test neurofisiologici di svelare alterazioni funzionali spesso

non rilevate né clinicamente né con la RM. Appare di interesse il fatto che i risultati dei due test neurofisiologici, tendano a variare nel tempo in maniera univoca come suggerito dalle correlazioni positive osservate sia alla valutazione basale che al follow up, nonostante il breve lasso di tempo intercorso. Ciò suggerisce che la registrazione combinata dei RTE/PE potrebbe fornire indicazioni aggiuntive sull'evoluzione temporale della malattia, anche nel breve termine.

Neurophysiologic, neuroimaging and clinical study of brainstem in patients with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Brainstem (BS) functions are conventionally studied by multimodal evoked potential (EP: BAEPs, median and tibial SEPs) recordings, conventional MRI and clinical examination (CLIN). In multiple sclerosis (MS), increasing evidence accounts for a BS involvement, often undetected by standard testing. Recently, BS reflexes (BSRs) have drawn attention in evaluating BS dysfunction in MS especially the vestibulocollic (VCR) reflex. In contrast, the vestibulomasseteric (VMR), acousticmasseteric (AMR) and trigeminocollic (TCR) reflexes have never been studied systematically in MS. This project proposed the following objectives: 1) to investigate whether the diagnostic sensitivity of CLIN, EPs and MRI can be improved adding the assessment of VMR, AMR, TCR and VCR either as single reflexes or in a four-BSR battery; 2) to document BS changes over time through the assessment of BSRs, EPs, MRI and CLIN before and after at least one year of follow up.

RESULTS

The four-BSR battery was recorded in 60 patients (aged 33.3 ± 8.3 years) with MS (illness duration 8.2 ± 6.4 years). Distribution of BSR and EP abnormalities was: VMR 62.1%, AMR 55.1%, TCR 58.6%, VCR 25.9%; BAEPs 37.3%, median SEPs 60.3% and tibial SEPs 58.6%. Overall, BS dysfunction was detected as follows: BSRs 86.9%, EPs 82.7%, MRI 71.7%, CLIN 37.7%. While the performance of BSRs and EPs, taken separately, was not significantly better than that of combined MRI/CLIN testing (70%), the paired use of BSRs/EPs had a sensitivity of

93.3%, which was significantly superior in a subset of patients with a disease duration ≤ 6.4 yrs.

Forty-five out of 60 patients underwent BSRs, EPs, MRI and CLIN reassessment after 15.1 ± 4.2 months from initial evaluation. No relapses had been reported by any patient, in line with the stability of CLIN and MRI abnormality rates at the follow up. Despite this, BSRs and EPs revealed a worsening of BS function. In particular, although the proportion of altered BSRs did not change, a significant worsening of scores was observed for VMR, AMR and TCR. Similarly to BSRs, the prevalence rate of EP abnormalities did not increase significantly, but the analysis of cumulative score showed a significant worsening for the whole EP set with special regard to the P14 wave of the mSEP.

CONCLUSIONS

This study shows that the assessment of VMR, AMR, TCR and VCR is a reliable and informative tool for the investigation of BS function in patients with MS. Their combined recording of a four-reflex battery has an overall performance comparable to that of multimodal EPs and is able to spot BS dysfunction, otherwise undetected by CLIN and MRI examinations. Interestingly, the addition of the four-BSR assessment to the standard EP testing proved to be associated to a significantly higher accuracy in revealing early BS involvement, especially in those cases with clinically and radiologically silent lesions. In this perspective, BSR recording might be valuable in the functional assessment of clinically isolated syndromes, where spotting a silent involve-

ment of the BS may have a key value in the estimation of the risk for developing future disability. The assessments after the follow-up did not show any substantial modification of both CLIN and MRI data according to the lack of relapses in any patient within the observation period. In spite of this, both mEP and BSR reassessments suggested an overall functional deterioration of BS circuits. This finding confirms the ability of neurophysiological tests to spot functional alterations of BS relays, which are often un-

derestimated by CLIN and MRI. Interestingly, the two composite neurophysiological scores showed the tendency to deteriorate jointly over time, as suggested by the positive correlation between mEP and BSR abnormalities observed both at baseline and follow-up, despite the short lag time between the two evaluations. This indicates that the association of BSR and mEP recordings might provide additional insight in the temporal evolution of the disease even in a truly short period of observation.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Magnano I, Pes GM, Pilurzi G, Cabboi MP, Ginatempo F, Giaconi E, Tolu E, Achene A, Salis A, Rothwell JC, Conti M and Deriu F. Exploring brainstem function in multiple sclerosis by combining brainstem reflexes, evoked potentials, clinical and MRI investigations. *Clinical Neurophysiology*, 2014 in press

Deriu F, Pilurzi G, Magnano I, Ginatempo F, Cabboi MP, Pes GM, Conti M. Brain stem reflex abnormalities in patients with multiple sclerosis. 5th International Conference on Non-Invasive Brain Stimulation. 19-21 March 2013, Leipzig (Germany). *Clinical Neurophysiology* 124 (2013) e39–e187

Magnano I, Cabboi MP, Pilurzi G, Conti M, Achene A, Salis A, Pes G, Ginatempo F, Deriu F. Exploring brainstem functions in MS patients by combining neurophysiological and neuroradiological approaches. 57th Meeting of the Italian Society of Clinical Neurophysiology (SINC). Mantova 16th-19th May 2012

Giaconi E, Pilurzi G, Coiana J, Magnano I, Cabboi MP, Achene A, Salis A, Conti M, Pes G, Tolu E, Deriu F. Exploration of brainstem function through vestibular and trigeminal reflexes in healthy people and in patients with multiple sclerosis. 62nd National Congress of Italian Physiological Society; Sorrento 25-27th September 2011. *Acta Physiologica* 203 (suppl. 688): p. 103, 2011

Deriu F, Giaconi E, Rothwell JC, Tolu E. Reflex responses of masseter muscles to sound. *Clin Neurophysiol.* 2010 Oct;121(10):1690-9.

Magnano I, Cabboi MP, Cossu P, Conti M, Achene A, Salis A, Sau GF, Deriu F, Aiello I. L'onda P14 nello studio del tronco dell'encefalo (TE) in pazienti affetti da Sclerosi Multipla Recidivante-Remittente (SMRR). Abstract Book Congresso Nazionale della Società Italiana di Neurofisiologia Clinica (SINC) Siena, 13-15 mag 2010 pag.294

Magnano I, Cabboi MP, Pilurzi G, Conti M, Achene A, Salis A, Giaconi E, Ortu E, Cossu P, Sau GF, Pes GM, Aiello I, Tolu E, Deriu F. (2009). Alterazioni tronco-encefaliche nella Sclerosi Multipla (SM): risultati di uno studio Neurofisiologico e Neuroradiologico. Abstract Book, Congresso Nazionale SINC, Salerno 28-30 maggio 2009, pag 248.

Pilurzi G, Magnano I, Giaconi E, Ortu E, Cossu P, Ruiu E, Pes GM, Tolu E, Deriu F. Vestibulo masseteric reflex and jaw acoustic reflex: a new tool to assist exploration of brainstem function in multiple sclerosis? Abstract book of International Workshop and Conference on Human Reflexes – Wiring and Firing of Motoneurons 11-15 May 2009, Izmir (Turkey), pag 71-72.

Pilurzi G, Giaconi E, Ortu E, Deriu S, Ruiu E, Magnano I, Cossu P, Achene A, Salis A, Conti M, Pes G, Tolu E, Deriu F. The acoustic masseteric reflex (AMR) and the vestibulo masseteric reflex (VMR): a new tool to explore brainstem (BS) function in man. *Acta Physiologica* 2009, 197(Supplement 672):96.

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



**VERSO NUOVI
TRATTAMENTI**

Luca Battistini

Unità di Neuroimmunologia, Fondazione Santa Lucia, Roma

COLLABORATORI:

Giovanna Borsellino, Daniela F Angelini, Eleonora Piras, Gabriella Ruocco, Marco De Bardi

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Marco Salvetti, Sapienza Università di Roma, Roma
Barbara Serafini, Istituto Superiore di Sanità, ISS, Roma

Ruolo delle cellule MAIT nella sclerosi multipla: come la flora intestinale influenza le risposte autoimmuni

PREMESSE E OBIETTIVI

Il miglioramento delle condizioni igieniche, l'uso massiccio di antibiotici, e un'alimentazione ricca in grassi e carboidrati hanno portato, nei paesi occidentali, a un brusco aumento nell'incidenza di malattie autoimmuni. Un'ipotesi per spiegare questa correlazione suggerisce che la ridotta esposizione ai microbi comporti un cambiamento nella composizione della flora batterica intestinale, che ha un ruolo fondamentale nell'istruire e dare forma al sistema immunitario. Per alcune malattie autoimmuni, come il morbo di Crohn, l'associazione tra flora batterica intestinale e insorgenza di patologie infiammatorie e autoimmuni è intuitiva; tuttavia è meno chiaro come i microbi dell'intestino possano influenzare patologie autoimmuni in organi distanti. Alcuni recenti lavori hanno però dimostrato che questa influenza è possibile: alcuni ceppi batterici, inoculati nell'intestino di animali da laboratorio, sono in grado di indurre l'espansione selettiva di linfociti produttori di IL-17, che quindi possono poi sostenere l'infiammazione anche fuori dall'intestino; altri ceppi, al contrario, attivano ed espandono linfociti T regolatori, generando quindi una risposta immunitaria anti-infiammatoria.

Un indizio che suggerisce che anche nella sclerosi multipla (SM) la risposta autoimmune possa essere sostenuta da situazioni non immediatamente correlate con il sistema nervoso centrale è il dato, ottenuto nel nostro laboratorio di una netta e significativa espansione, nei pazienti con SM, di una popolazione cellulare particolare coinvolta nelle risposte antibatteriche a livello della mucosa inte-

stinale, i linfociti MAIT (mucosal associated invariant T cells).

In questo progetto abbiamo studiato il possibile legame tra flora intestinale e SM attraverso lo studio delle cellule MAIT per valutare il loro ruolo nel processo infiammatorio alla base della malattia: questi risultati potrebbero fornire indicazioni su approcci terapeutici mirati a ristabilire una flora batterica che non sostenga l'infiammazione e l'autoimmunità.

RISULTATI

In questo studio è stato inizialmente confermato che i linfociti T CD8+CD161^{high} sono presenti nel sangue periferico dei pazienti con SM con maggiore frequenza rispetto ai controlli sani, e che queste cellule corrispondono ai linfociti MAIT V α 7.2+. Queste cellule esprimono, i marker IL18R e CCR6 coerentemente con il loro target tissutale, la mucosa intestinale; tra l'altro, l'espressione del CCR6 permette anche a queste cellule di penetrare nel sistema nervoso centrale.

Abbiamo studiato pazienti SM con la forma recidivante-remittente della malattia. Durante la fase stabile della malattia la frequenza delle cellule MAIT nel sangue periferico è significativamente maggiore rispetto a quella misurata nei pazienti nella fase acuta della malattia e nei soggetti sani. Inoltre, la frazione di linfociti MAIT aumenta con l'aumentare dell'indice di progressione della malattia, un valore dato dal rapporto tra la disabilità (EDSS) e la durata di malattia.

Questi dati sono stati confermati anche nelle coppie di gemelli omozigoti discordanti per malattia: i ge-

melli affetti presentano frequenze maggiori di cellule MAIT nel sangue periferico rispetto ai gemelli sani. È stato poi studiato lo stato di attivazione e il potenziale citotossico e pro-infiammatorio delle cellule MAIT. Queste cellule analizzate *ex vivo* hanno un fenotipo attivato, e dopo stimolazione massimale producono IFN- γ e IL-17, una citochina proinfiammatoria che sembra avere un ruolo nella SM; inoltre producono GM-CSF e TNF- α . Gli studi funzionali hanno dimostrato che la frazione di cellule MAIT che produce queste citochine è maggiore nei pazienti rispetto ai sani.

Infine, abbiamo esaminato gli infiltrati cellulari nei tessuti cerebrali dei pazienti SM che mostravano lesioni attive nella sostanza bianca, e i dati hanno mostrato, per la prima volta, la presenza di numerose cellule MAIT V α 7.2+ positive anche per IL-17 in tutte le lesioni analizzate.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio e in particolare la dimostrazione che negli infiltrati cellulari del tessuto cerebrale *post mortem* di pazienti con SM sono presenti numerose cellule MAIT IL-17+ dà forza all'ipotesi di un ruolo di queste cellule nella patogenesi della SM. La citochina IL17 ha potenti attività proinfiammatorie e promuove quindi il mantenimento dell'infiammazione. Il nostro studio ha dimostrato che le cellule MAIT producono anche altre citochine proinfiammatorie, e che sono presenti in misura maggiore e in forma attivata nei pazienti rispetto ai soggetti sani.

Le potenziali implicazioni terapeutiche che emergono da questo studio sono che un controllo sull'educazione alimentare potrebbe modificare l'ambiente intestinale da pro-infiammatorio ad uno anti-infiammatorio, influenzando la risposta adattativa anche in altri distretti dell'organismo, come nel cervello.

Role of MAIT cells in multiple sclerosis: how can the gut flora influence autoimmune responses?

INTRODUCTION AND AIMS

To explain the significant increased frequency of autoimmune diseases observed in western societies, the hygiene hypothesis speculates that modern life styles and wide spread use of antibiotics have reduced the exposure of humans to microbial pathogens. This decreased microbial load contrasts with the situation observed in humans in third world countries where infections with pathogens are highly prevalent. In diseases such as inflammatory bowel disease or asthma, alterations in the composition of the gut flora seem also to be a critical factor for the development of inflammatory T cell responses. Links between gut microbiota and inflammatory bowel disease are intuitive and easy to understand, but how intestinal commensals may influence immunity at distant sites needs to be clarified. However, convincing reports are been now published which show instances in which certain microbes, through their ability to promote a specific T cell subset, can drive autoimmunity at a distant organ. Recently, a novel T cell subset with anti-microbial activity has been described: the mucosal associated invariant T (MAIT) cells. These cells expand after birth after contact with the commensal flora, and they are character-

ized by the expression of a semi-invariant TCR, high levels of CD161 and IL18R, and high levels of IFN- γ and IL-17: most, if not all, IL-17-producing CD8+ T cells are MAIT cells. Given the established link between this cytokine and MS, this population of cells are worth investigating in MS patients. We have investigated the involvement of MAIT cells in MS, by studying their frequency and phenotype, and their proinflammatory capabilities.

RESULTS

In this study we initially confirmed that CD8+CD161^{high} T cells correspond to MAIT cells, and that they are significantly expanded in the peripheral blood of MS patients. These cells express IL18R and CCR6, in agreement with their target tissue; CCR6 expression also enables MAIT cells with the ability to enter the central nervous system (CNS). We studied patients with the relapsing-remitting form of MS, and we noted that during the stable phase of the disease the frequency of MAIT cells is significantly higher than that measured in the acute phase or in healthy subjects. Moreover, the fraction of MAIT cells within PBLs increases with the MS Progression Index, the ratio between disability

(EDSS) and disease duration. This data was confirmed also in pairs of homozygous twins discordant for disease: the affected twin consistently showed higher frequencies of circulating MAIT cells compared to their healthy counterparts.

The activation state and cytotoxic potential of MAIT cells was also determined. These cells, analyzed ex vivo, have an activated phenotype, and following maximal stimulation they release large amounts of proinflammatory cytokines: IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, and, most of all, IL-17. Moreover, in MS patients the fraction of cytokine-producing MAIT cells was significantly higher compared to healthy individuals.

Finally, we show for the first time that V α 7.2+ MAIT cells are present in the cellular infiltrates of the white matter which surround the MS lesions, and that these cells colocalize perfectly with the IL-17 detected in the same lesions.

CONCLUSIONS

The results obtained in this study and in particular the demonstration that in post-mortem brains from

MS patients the cellular infiltrates surrounding the lesions there is a large component of V α 7.2+ MAIT cells loaded with IL17 strengthens the hypothesis that these cells are involved in disease pathogenesis. IL-17 has potent proinflammatory properties, and the finding that IL17-secreting MAIT cells are expanded also in the peripheral blood of MS patients is particularly intriguing. Moreover, our data shows that in patients these cells are not only expanded: they also are more efficient producers of proinflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF.

Since IL-17 cells are expanded in the intestine following interactions with microbial antigens, it is possible that changes in diet may modify the intestinal environment from proinflammatory to anti-inflammatory, thus influencing immune responses also at distant sites, such as the CNS.

Novel therapeutic approaches aimed at reestablishing of a “healthy” gut microenvironment may be beneficial for the treatment of MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Camperio C, Muscolini M, Volpe E, Di Mitri D, Mechelli R, Buscarinu MC, Ruggieri S, Piccolella E, Salvetti M, Gasperini C, Battistini L, Tuosto L. CD28 ligation in the absence of TCR stimulation up-regulates IL-17A and pro-inflammatory cytokines in relapsing-remitting multiple sclerosis T lymphocytes. *Immunol Lett.* 2014 Jan 8;158(1-2):134-142.

Picozza M, Battistini L, Borsellino G. Mononuclear phagocytes and marker modulation: when CD16 disappears, CD38 takes the stage. *Blood.* 2013 Jul 18;122(3):456-7.

Abrahamsson SV, Angelini DF, Dubinsky AN, Morel E, Oh U, Jones JL, Carassiti D, Reynolds R, Salvetti M, Calabresi PA, Coles AJ, Battistini L, Martin R, Burt RK, Muraro PA. Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in multiple sclerosis. *Brain.* 2013 Sep;136(Pt 9):2888-903 Epub 2013 Jul 17.

Angelini DF, Serafini B, Piras E, Severa M, Coccia EM, Rosicarelli B, Ruggieri S, Gasperini C, Buttari F, Centonze D, Mechelli R, Salvetti M, Borsellino G, Aloisi F, Battistini L. Increased CD8+ T cell response to Epstein-Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003220. Epub 2013 Apr 11.

Chiurchiù V, Cencioni MT, Bisicchia E, De Bardi M, Gasperini C, Borsellino G, Centonze D, Battistini L, Maccarrone M. Distinct modulation of human myeloid and plasmacytoid dendritic cells by anandamide in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2013 May;73(5):626-36. Epub 2013 Apr 17.

Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Motta C, Studer V, Mori F, Musella A, Bergami A, Muzio L, Bernardi G, Battistini L, Martino G, Centonze D. Interleukin-1 β causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2012 Jan;71(1):76-83

Rossi S, Motta C, Studer V, Monteleone F, De Chiara V, Buttari F, Barbieri F, Bernardi G, Battistini L, Cutter G, Stüve O, Salvetti M, Centonze D. A genetic variant of the anti-apoptotic protein Akt predicts natalizumab-induced lymphocytosis and post-natalizumab multiple sclerosis reactivation. *Mult Scler.* 2013 Jan;19(1):59-68 Epub 2012 May 10.

Piras, E.; Annibali, V.; Mechelli, R.; et al. MAIT cells display proinflammatory characteristics in multiple sclerosis *Journal of Neuroimmunology.* Volume: 253 Issue: 1-2 Pages: 163-164 Published: DEC 15 2012

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 50.000 €

Paolo Riccio

Dipartimento di Scienze, Università della Basilicata, Potenza

COLLABORATORI:

Rocco Rossano, Marilena Larocca

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Ghislain Opdenakker, Jennifer Vandooren, Dept. of Microbiology and Immunology, KU Leuven, Rega Institute for Medical Research, University of Leuven, Leuven, Belgium

Annamaria Colangelo, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Lab. di Neuroscienze "Rita Levi-Montalcini", Università di Milano-Bicocca (UNIMIB), Milano

M. Gabriella Coniglio, Clinica Neurologica, Centro per la Sclerosi Multipla, Ospedale "Madonna delle Grazie", Matera

Michele Ettorre, Centro di Nutrizione Applicata, Statte, Taranto

Vincenzo Fogliano WU Agrotechnology and Food Sciences, Food Quality and Design, Wageningen, NL

Le basi molecolari per un intervento nutrizionale nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Quando, con il nostro primo progetto, abbiamo cominciato i nostri studi sulla nutrizione nella sclerosi multipla (SM), non esisteva neanche il più piccolo indizio che ci fosse un collegamento fra loro. Ai quei tempi si definiva la SM come multifattoriale, con possibili implicazioni virali o dietetiche, ma senza che queste fossero chiare. Noi stessi abbiamo iniziato a interessarci dell'alimentazione nella SM soltanto perché avevamo scoperto che una proteina del latte, la butirofilina, è molto simile alla MOG, il principale autoantigene della guaina mielinica. Sconsigliammo quindi di assumere latte bovino intero.

I nostri studi stanno ora chiarendo che la sclerosi multipla è in realtà una malattia cronica infiammatoria e neurodegenerativa con un forte collegamento fra alimentazione, microflora intestinale, infiammazione intestinale e sistemica, e decorso della SM.

RISULTATI

Le attività principali svolte nel nostro progetto sono state quattro. Qui di seguito, i risultati ottenuti.

Studi sulla correlazione fra nutrizione e SM

Il primo obiettivo è stato quello di fornire delle solide

basi molecolari per un intervento nutrizionale nella SM e favorire con cognizione di causa il benessere dei pazienti. Allo stato attuale, le abitudini alimentari e lo stato nutrizionale del paziente con SM non sono presi in considerazione. I nostri lavori hanno chiarito perché una dieta ipercalorica, ricca di sale, grassi animali, carni rosse, bevande zuccherate, e frittura, favorisca l'aumento dell'infiammazione e peggiori il corso della malattia; e perché, al contrario, una dieta ipo- o normo-calorica basata sull'assunzione di pesce, verdure, frutta fresca o con guscio, ortaggi, legumi, e fibre, possa agire favorevolmente sul nostro organismo e sulla nostra popolazione batterica intestinale, contrastando la malattia. In breve, specifici fattori della dieta agiscono su "interruttori" cellulari: i nutrienti da evitare favoriscono la sintesi di molecole lipidiche e/o pro-infiammatorie, quelli da preferire la loro inibizione. Per quanto riguarda la microflora intestinale, questa è composta, semplificando, da batteri "buoni" e da batteri "cattivi", il cui rapporto è influenzato dallo stile di vita. Con la dieta basata su pesce, verdure, assunzione di fibre e moderata attività fisica si selezionano i batteri buoni, che contrastano l'infiammazione intestinale. Con la dieta ipercalorica si favorisce invece la crescita della popolazione batterica disbiotica che sa meglio smaltire le calorie in eccesso, ma favorisce an-

che l'infiammazione intestinale, l'autoimmunità e la neurodegenerazione.

Studi su colture cellulari.

In questi studi abbiamo dimostrato che alcuni fattori della dieta possono influenzare l'attività delle cellule gliali (astrociti e microglia) e dei neuroni di ratto e topo. Molecole come i polifenoli dei vegetali (anti-ossidanti) o gli acidi grassi poli-insaturi omega-3 dei pesci hanno un'azione neuroprotettiva già a basse concentrazioni, agendo sui fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione del metabolismo e dell'infiammazione. Quindi l'uso combinato di integratori dietetici può rappresentare un potente strumento di neuroprotezione in corso di SM.

Trials clinici.

A Matera è stata effettuata una sperimentazione clinica nutrizionale su pazienti con SM recidivante remittente (RR), in terapia con IFN-beta (T), o con SM primariamente progressiva (PP). I pazienti, tutti con deficienza di vitamina D, ricevevano colecalciferolo insieme a una dieta (D) ipocalorica con vegetali, frutta e pesce, e integratori (I) (olio di pesce, polifenoli, composti tiolici e complesso multivitaminico). In tutti i gruppi si è osservata una forte resistenza all'aumento dei livelli di 25(OH)D (calcidiolo), che sono rimasti bassi nonostante l'assunzione di pe-

sce (nei gruppi TD) e olio di pesce (nei gruppi TDI). I pazienti erano in genere soddisfatti del trattamento nutrizionale.

Analisi delle gelatinasi nei sieri dei pazienti con SM.

Il nostro gruppo di ricerca a Potenza ha messo su una nuova metodica [zimografia bidimensionale (2-DZ)] che ha permesso di identificare tutte le diverse isoforme e varianti delle gelatinasi, enzimi che sono coinvolti nella rottura della barriera emato-encefalica e nella degradazione della mielina nella SM. In particolare, è stato possibile osservare per la prima volta gli isomeri della 65 kDa MMP-9, una isoforma che aumenta con l'infiammazione ed è difficile da distinguere dalla MMP-2. L'analisi delle gelatinasi può essere utile per valutare l'efficacia della terapia.

CONCLUSIONI

I nostri studi stanno dimostrando l'importanza della nutrizione nella SM, sia per quanto riguarda le implicazioni a breve, che la caratterizzazione di nuovi meccanismi patogenetici. Abitudini alimentari, tese a ridurre l'infiammazione e la disbiosi intestinale, possono migliorare il corso della malattia e prevenire l'insorgenza di ricadute.

Il nostro primo obiettivo è ora rappresentato dalla divulgazione di questa conoscenza in campo biomedico e fra gli stessi pazienti.

The molecular basis of nutritional intervention in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

When, with our first project, we began our studies on the impact of nutrition in multiple sclerosis (MS), there was not even the slightest clue that there was a link between them. MS was seen as a multifactorial disease, with possible implications for viral or dietary supplements, just to justify the difficulty to understand its etiopathogenesis. We ourselves began to take an interest in the nutrition in SM only because we had found that a milk protein, butyrophilin, is very similar to MOG, the major myelin auto-antigen. Consequently, we discouraged the assumption of whole cow's milk. Our studies are now proving that multiple sclerosis is actually a chronic inflammatory and neurodegenerative disorder

with a strong link between nutrition, intestinal microbiota, intestinal and systemic inflammation, and progression of MS.

RESULTS

The main activities in this project have been four. Below, the results obtained.

Studies on the relationship between nutrition and MS.

The first objective was to provide a solid molecular basis for a nutritional intervention in MS, aimed to improve the wellness of MS patients. At present, dietary habits, life style and nutritional status of patients with MS are not taken into account. Our works have explained why a high-calorie diet, rich in salt,

animal fats, red meat, sweetened drinks and fried food, favors the increase of inflammation and worsens the course of the disease, and why, on the contrary, a hypo- or standard caloric diet based on the assumption of fish, vegetables, fruit or nuts, legumes, and fiber, may act favorably on our body and our intestinal bacterial population, counteracting the disease. In short, specific dietary factors act on a sort of cellular switches enabling one or the other metabolic fate: the nutrients to avoid are those favoring the synthesis of lipids and/or pro-inflammatory molecules, those to prefer their inhibition. Regarding the intestinal microflora, this is made in simple terms by “good” bacteria and “bad” bacteria, whose relationship is affected by lifestyle. With the diet based on fish, vegetables, dietary fiber and moderate physical activity it is possible to select the good bacteria, which counteracts intestinal inflammation. With the high-calorie diet, instead, is favored the growth of the dysbiotic bacterial population, which is good for calorie disposal, but promotes intestinal inflammation, autoimmunity and neurodegeneration.

Studies on cell cultures.

In these studies we have shown that specific dietary factors can influence the activity of glial cells (astrocytes and microglia) and neurons of rat and mouse. Molecules such as polyphenols of plants (anti-oxidants) or omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish or fish oil have neuroprotective action already at low concentrations, by acting on the transcription factors (the “switches” above) involved in the regulation of metabolism and inflammation. Thus the combined use of dietary supplements may represent a powerful tool to neuroprotection in the course of MS.

Clinical trials.

We have performed a nutritional clinical study at the

Hospital in Matera on RR-MS patients, under treatment with IFN-beta (T), or with PP-MS. The patients, all with deficiency of vitamin D, received cholecalciferol along with low-calorie diet (D) based on vegetables, fruit and fish, and supplements (I) (fish oil, polyphenols, thiol compounds and multivitaminic complex). In all groups there was a strong resistance to the increase of 25 (OH) D (calcidiol), whose levels remained unchanged or even decreased, despite the intake of fish (in groups TD) and fish and fish oil (groups TDI). Patients were generally satisfied with the nutritional treatment.

Assessment of gelatinases in the sera of MS patients.

Our research group in Potenza has developed a new method [two-dimensional zymography (2-DZ)], which allow the detection of all the different isoforms and variants of gelatinases, the enzymes that are involved in the disruption of blood brain barrier and the breakdown of myelin in MS. In particular, it has been possible to observe for the first time the isoforms of 65 kDa MMP-9, an isoform which increases with inflammation and is usually difficult to distinguish from the other gelatinase MMP-2. The analysis of the isoforms and the variants of gelatinases may be useful to study the effectiveness of therapy.

CONCLUSIONS

Our studies are showing the relevance of nutrition in MS. The achievements obtained have important implications in the short term, and open new perspectives in the characterization of new pathogenetic mechanisms. Healthy dietary habits and physical exercise aimed at reducing inflammation and intestinal dysbiosis may improve the course of the disease and prevent the onset of relapse.

Our first objective is now represented by the dissemination of this knowledge in the biomedical field and among MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Rossano R, Larocca M, Riviello L, Coniglio MG, Vandooren J, Liuzzi GM, Ghislain Opdenakker Gh, Riccio P. Heterogeneity of serum gelatinases MMP-2 and MMP-9 isoforms and charge variants in multiple sclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2013; 18 (2), 242–252. doi:10.1111/jcmm.12181, 2013

Riccio P, Rossano R. The role of nutrition in multiple sclerosis: a story yet to be written. *Rev. Esp. Esclerosis Multiple.* 2013; 5 (25), 24-37. Invited Review.

Riccio P, Coniglio MG, Ettore M, Rossano R. Il ruolo della nutrizione nella Sclerosi Multipla e nelle altre malattie infiammatorie croniche. Un'introduzione alle basi molecolari per un intervento complementare alla terapia farmacologica. *ENPAB Magazine* 2013 anno 4; n. 2/2013, 9-22

Rossano R, Larocca M, Polito T, Perna AM, Padula MC, Martelli G, Riccio P. What Are the Proteolytic Enzymes of Honey and What They Do Tell Us? A Fingerprint Analysis by 2-D Zymography of Unifloral Honeys. *PLoS One* 2012; 7(11):e49164. Epub 2012 Nov 7.

Liuzzi GM, Latronico T, Branà MT, Gramegna P, Coniglio MG, Rossano R, Larocca M, Riccio P. Structure-dependent inhibition of gelatinases by dietary antioxidants in rat astrocytes and sera of multiple sclerosis patients. *Neurochem. Res* 2011; 36 (3), 518-27. doi: 10.1007/s11064-010-0373-2,

Rossano R, Larocca M, Riccio P. 2-D zymographic analysis of Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica) florets proteases: Follow up of cysteine protease isotypes in the course of post-harvest senescence. *J. Plant Physiol* 2011; 168, 1517–1525.

Riccio P, Rossano R, Liuzzi GM. May diet and dietary supplements improve the wellness of multiple sclerosis patients? A molecular approach. *Autoimm. Dis* 2011; Feb 24;2010:249842. doi: 10.4061/2010/249842,

Riccio P. The molecular basis of nutritional intervention in multiple sclerosis: A narrative review. *Complem. Therapies Med* 2011; 19 (4), 228-237,

Lipid-Bound Myelin Proteins: the First Step Towards the Discovery of Myelin Rafts ISN satellite Meeting on: "Myelin: From Basic to Translational Research" Session on "Myelin Membrane - History, Structure and Function" - Co-Chair Cancun, Mexico. 17 April 2013

The molecular basis for a nutritional intervention in multiple sclerosis. ISN satellite Meeting on: "Myelin: From Basic to Translational Research" Cancun, Mexico. 18 April 2013

Tipo di alimentazione e stile di vita nella sclerosi multipla Conv. della sez. AISM di Matera su: "Funzionare bene ovunque. Sclerosi multipla e sistema digerente: alimentazione e digestione", Chiesa di San Giacomo, Matera. 1 Febbraio 2013

Nutrizione e Sclerosi Multipla: Una storia da scrivere. Convegno Sezione AISM di Potenza "Giovani oltre la SM: Convivere con la SM" Museo Provinciale di Potenza. 24 Novembre 2012

Le basi molecolari per un intervento nutrizionale nelle malattie croniche infiammatorie e nella sclerosi multipla Convegno sulla "Qualità di vita nella Sclerosi Multipla", AOSG Moscati, Sezione AISM di Avellino. 17 Novembre 2012

The Molecular Basis for Nutritional Intervention in multiple sclerosis 2012 International Symposium: The multiple sclerosis BRAIN Mandell Center for Multiple Sclerosis, Hartford CT 06112, 6 October 2012. Invited talk.

Le basi molecolari per un intervento nutrizionale nella sclerosi multipla, nelle malattie infiammatorie croniche e nel cancro Convegno ENPAB su "La diagnostica molecolare clinica: Attualità e prospettive" Mercure Hotel, Rende, Cosenza. 14 Luglio 2012

Progetto di ricerca finanziato con il bando 2010 per il periodo di 2 anni (prorogato di 5 mesi) e l'ammontare di 60.000 €

Simona Casazza

Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili
Università degli studi di Genova, Genova

MENTORE: **Antonio Uccelli**

Le cellule mesenchimali staminali influenzano l'ambiente microgliale? Implicazioni per il trattamento della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) mostrano una notevole capacità di modulare la risposta immunitaria e proteggere il sistema nervoso centrale principalmente attraverso il rilascio di fattori solubili in modo paracrino, influenzando il comportamento funzionale delle cellule nei tessuti. Qui abbiamo studiato l'effetto dell'interazione tra MSC e microglia *in vitro*, e abbiamo sezionato i meccanismi cellulari e molecolari di questa interazione.

RISULTATI

Abbiamo dimostrato che le MSC sono in grado di compromettere l'attivazione della microglia da stimoli infiammatori, attraverso l'inibizione dell'espressione e rilascio di molecole infiammatorie e proteine associate allo stress. Abbiamo dimostrato che le MSC aumentano significativamente l'espressione microgliale e il rilascio di molecole associate con un fenotipo neuroprotettivo come CX3CR1. Le MSC possono potenziare i cambiamenti funzionali sulla microglia come rappresentato dall'incremento della concentrazione di calcio intracellulare e dell'attività fagocitaria. Gli effetti osservati sull'espressione di CX3CR1 da parte della microglia sono dovuti al rilascio di CX3CL1 da parte delle MSC, guidato da segnali infiammatori, come dimostrato dal capovolgimento dei risultati quando CX3CL1 è reso silente sulle MSC o il suo rilascio è stato bloccato. Infine, abbiamo dimostrato che CX3CL1 esogeno induce cambiamenti fenotipici e funzionali della microglia simili a quelli indotti da MSC. Questi risultati dimostrano che le MSC, attraverso il rilascio di CX3CL1, determinano un cambiamento della risposta microgliale ai segnali proinfiammatori, modulando i recettori "calming" costitutivi tipicamente espressi dalla microglia in stato stazionario, commutando così il fenotipo della microglia da dannoso a neuroprotettivo.

CONCLUSIONI

Abbiamo dimostrato che le MSC, un sottogruppo di cellule progenitrici che mostrano una notevole capacità di modulare le funzioni effettrici delle cellule dell'immunità innata e adattativa, possono influenzare diverse caratteristiche della microglia dopo l'attivazione di stimoli proinfiammatori. In primo luogo abbiamo dimostrato che le MSC riducono l'aumento dell'espressione di TNF, iNOS e proteine associate allo stress ossidativo, indotte da LPS e altre molecole infiammatorie, da parte della microglia. In secondo luogo abbiamo dimostrato che le MSC possono indurre una significativa up-regolazione di molecole di superficie che gioca un effetto calmante sulla microglia ed è associata ad un fenotipo neuroprotettivo. Abbiamo rilevato una significativa up-regolazione di IL-1 β , una citochina non solo coinvolta nella risposta infiammatoria, ma anche considerata svolgere un ruolo chiave nel promuovere la riparazione del SNC, probabilmente inducendo la sintesi e il rilascio di IGF dalle cellule gliali. L'up-regolazione delle molecole sopra riportate suggerisce che le MSC possono istruire la risposta microgliale a segnali proinfiammatorie quali LPS, IFN γ , e CpG. Abbiamo dimostrato che le MSC possono anche indurre modificazioni funzionali della microglia, come illustrato dal rilevamento dell'aumento della concentrazione di calcio intracellulare e dell'attività fagocitaria, senza intaccare la capacità di proliferazione della microglia. Questo ultimo evento è associato con l'acquisizione di un fenotipo neuroprotettivo da parte della microglia come ulteriormente confermato dall'espressione up-regolata di TREM2, un recettore immunitario innato espresso dalla microglia coinvolta nella fagocitosi in assenza di infiammazione. Ancora più importante, abbiamo dimostrato che, in seguito a stimolazione con LPS e IFN γ , due molecole coinvolte in eventi infiamma-

tori del sistema nervoso centrale, le MSC modulano le funzioni effettrici microgliali attraverso il rilascio di CX3CL1. La capacità di CX3CL1 rilasciato da MSC di promuovere il cambiamento della microglia da un fenotipo dannoso, neurotossico dominato dal rilascio di molecole proinfiammatorie, ad uno fenotipo benefico, neuroprotettivo associato alla produzione di fattori anti-infiammatori e trofici, espressione di recettori "calming", aumento delle concentrazioni di calcio intracellulare e fagocitosi, è stata confermata da esperimenti in cui CX3CL1 è stato aggiunto in modo esogeno alla microglia attivata con LPS in assenza di MSC. Questi risultati sono in linea con l'evidenza corrente che le MSC agiscono principalmente attraverso il rilascio di fattori solubili in modo paracrino, forse influenzando il comportamento funzionale delle cellule dei tessuti residenti. È interessante notare che le MSC possono indurre le cellule dendritiche ad acquisire un fenotipo tollerogenico *in vitro* e *in vivo* ed educare

macrofagi attivati in modo alternativo, che hanno dimostrato di essere attori essenziali nella riparazione del SNC. Inoltre le MSC esercitano effetti neuroprotettivi sui neuroni dopaminergici attraverso un meccanismo anti-infiammatorio mediato dalla modulazione dell'attivazione della microglia.

Questi risultati dimostrano che le MSC sono in grado di influenzare funzionalmente il comportamento delle cellule mieloidi compresa la microglia, che viene indotta verso un fenotipo protettivo, possibilmente tenendo conto di alcuni degli effetti benefici che sono stati associati con la plasticità terapeutica delle MSC nel modello sperimentale di SM (encefalite sperimentale autoimmune, ESA) e in altri modelli sperimentali di malattie neurologiche. Nel complesso questi risultati confermano ulteriormente l'importanza di trasferire la terapia cellulare delle MSC dai modelli sperimentali a malattie neurologiche umane dove la microglia può svolgere un importante ruolo patogenetico.

Do mesenchymal stem cells impact microglia behavior? Implications for the treatment of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Mesenchymal stem cells (MSC) display a remarkable ability to modulate the immune response and protect the central nervous system mainly through the release of soluble factors in a paracrine fashion, affecting the functional behavior of cells in the tissues. Here we investigated the effect of the interaction between MSC and microglia *in vitro*, and we dissected the molecular and cellular mechanisms of this crosstalk.

RESULTS

We demonstrated that MSC impair microglia activation by inflammatory cues through the inhibition of the expression and release of inflammatory molecules and stress-associated proteins. We showed that MSC significantly increase microglial expression and release of molecules associated with a neuroprotective phenotype such as CX3CR1. MSC can enhance functional changes on microglia as depicted by the increase of intracellular calcium concentration and phagocytic activity. The observed effects on CX3CR1-expressing microglia are

due to the release of CX3CL1 by MSC, driven by inflammatory signals, as demonstrated by the reversal of the observed results when CX3CL1 expression was silenced in MSC or its release was blocked. Finally, we showed that exogenous CX3CL1 induce phenotypic and functional changes of microglia similar to those induced by MSC. These findings demonstrate that MSC instruct, through the release of CX3CL1, microglia responsiveness to proinflammatory signals by modulating constitutive "calming" receptors, typically expressed by "steady-state microglia" thus switching microglia from a detrimental phenotype to a neuroprotective one.

CONCLUSIONS

We demonstrate that MSC, a subset of progenitor cells displaying a remarkable ability to modulate effector functions of cells of the innate and adaptive immunity, can affect several features of microglia following activation with proinflammatory stimuli. First, we observed that MSC reduce the increase of the expression of TNF, iNOS and oxidative stress-associated proteins, induced by LPS and other

proinflammatory molecules, by microglia. Second, we demonstrated that MSC can induce a significant upregulation of surface molecules playing a calming influence on microglia and associated with a neuroprotective phenotype. We detected a significant upregulation of IL-1 β , a cytokine not only often involved in the inflammatory response but also considered to play a key role in promoting repair of the CNS, possibly inducing the synthesis and release of IGF by glial cells. The reported upregulation of the above-mentioned molecules suggests that MSC can instruct microglia responsiveness to proinflammatory signals such as LPS, IFN γ , and CpG.

We demonstrated that MSC also induce functional modifications of microglia as depicted by the detection of enhanced intracellular calcium concentration and phagocytic activity without affecting the proliferation capacity of microglia. This last event is associated with the acquisition of a neuroprotective phenotype by microglia as further confirmed by the upregulated expression of TREM2, an innate immune receptor expressed by microglia involved in phagocytosis in the absence of inflammation. More importantly, we demonstrated that, following stimulation with LPS and IFN γ , two molecules involved in CNS inflammatory events, MSC modulate microglia effector functions through the release of CX3CL1.

The ability of CX3CL1 released by MSC to promote the switch of microglia from a detrimental, neurotoxic phenotype dominated by the release of proinflam-

matory molecules to a beneficial, neuroprotective phenotype associated with the production of anti-inflammatory and trophic factors, enhanced expression of calming receptors, increased intracellular calcium concentrations, and phagocytosis was confirmed by experiments where CX3CL1 was added exogenously to microglia activated with LPS in the absence of MSC.

These results are also in line with the current evidence that MSC act mainly through the release of soluble factors in a paracrine fashion, possibly affecting the functional behavior of tissue-resident cells. Interestingly, MSC can induce dendritic cells to acquire a tolerogenic phenotype *in vitro* and *in vivo* and educate alternatively activated macrophages which have been demonstrated to be essential players in CNS healing. In addition, MSC exert neuroprotective effects on dopaminergic neurons via an anti-inflammatory mechanism mediated by the modulation of microglia activation.

These findings demonstrate that MSC are capable of functionally affecting myeloid cells behavior including microglia which is induced toward a protective phenotype, possibly accounting for some of the beneficial effects that have been associated with the therapeutic plasticity of MSC in experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE, and other experimental models of neurological diseases. Overall these results further confirm the incumbent translation of MSC cell therapy from experimental models to human neurological diseases where microglia may play a major pathogenic role.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Giunti D, Parodi B, Usai C, Vergani, L, Casazza, S, Bruzzone S, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1. *Stem Cells*. 2012 Sep;30(9):2044-53.

Borsa di studio finanziata con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 64.000 €

Riccardo Saccardi

Sezione Ematologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

COLLABORATORI:

Benedetta Mazzanti, Massimo Di Gioia, Irene Donnini, Simone dal Pozzo, Valentina Carrai

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Clara Ballerini, Dipartimento NEUROFARBA Università di Firenze, Firenze

Elisabetta Traggiati, Dipartimento di Scienze Pediatriche, Istituto G. Gaslini, Genova

Valutazione immunologica del midollo osseo in pazienti affetti da sclerosi multipla severa sottoposti ad autotrapianto di cellule staminali ematopoietiche

PREMESSE E OBIETTIVI

Il trapianto di cellule staminali del sangue è da considerare una terapia immunosoppressiva ad alta intensità da attuare in pazienti selezionati che presentano caratteristiche di particolare aggressività della malattia e che progrediscono nella loro disabilità nonostante la somministrazione di terapie consolidate. I dati riportati fino ad ora nella letteratura scientifica indicano che la maggior parte dei pazienti con sclerosi multipla (SM) sottoposti a questa procedura hanno mostrato un arresto nella progressione della disabilità con spunti di miglioramento nei pazienti trapiantati in fase precoce e molto attiva. In un precedente studio abbiamo dimostrato che cellule staminali mesenchimali (MSC) isolate dal midollo osseo (MO) di pazienti con SM prima del trapianto producono una maggiore quantità della chemochina CXCL10 rispetto a soggetti sani, suggerendo che un'alterata funzionalità delle MSC potrebbe giocare un ruolo nella eziopatogenesi della SM. Tale chemochina ha un ruolo chiave nella infiammazione e nel reclutamento dei linfociti T ed è stata trovata aumentata nel liquor di pazienti con SM. Il primo obiettivo del progetto è stato quindi quello di caratterizzare funzionalmente e fenotipicamente MSC isolate da MO di pazienti con SM che si sono sottoposti a trapianto e correlare i dati ottenuti con il risultato clinico. Il secondo obiettivo è stato caratterizzare il compartimento B del MO e del sangue periferico, prima e dopo trapianto nei pazienti con SM. Il MO è infatti un organo linfoide centrale per lo sviluppo delle cellule B, contenente le nicchie cellulari in cui si realizza sia la fase pre-

coce che quella tardiva della loro maturazione. Studi recenti hanno dimostrato l'efficacia di terapie che colpiscono selettivamente le cellule B nel trattamento della SM, supportando la teoria che i linfociti B giochino un ruolo nella patogenesi della malattia. Non ci sono ad oggi studi sul compartimento midollare e periferico dei linfociti B in pazienti con SM prima e dopo trapianto.

RISULTATI

Lo studio è stato condotto sul sangue midollare di 19 pazienti con SM prelevato un mese prima del trapianto, e di 7 pazienti prelevato ad una distanza mediana di 4,5 anni (*range* 3-6) dal trapianto. I risultati ottenuti dall'analisi istologica delle biopsie midollari hanno dimostrato che il microambiente midollare, sia prima che dopo il trapianto, presenta una morfologia con caratteristiche simili e comparabili a quelle di un midollo sano.

È stato inoltre possibile isolare e caratterizzare le MSC dal MO di tutti i pazienti arruolati, sia prima che dopo trapianto. Le MSC hanno dimostrato caratteristiche comparabili in termini di crescita, fenotipo, potenziale differenziativo e immunosoppressivo. In particolare, dopo il trapianto rimane inalterata la produzione della chemochina proinfiammatoria CXCL10 in quantità significativamente più elevata rispetto alle MSC isolate da donatori sani. Questa produzione avviene anche in altri distretti dell'organismo, in particolare, è stata dimostrata a carico dei monociti del sangue periferico (SP) e dipende da una alterazione del *signaling pathways* del recettore TLR4, uno dei principali recettori dell'immunità in-

nata. Soprattutto, abbiamo dimostrato una aumentata fosforilazione dei fattori (p38, CREB, JNK e STAT1) che formano la cascata delle molecole responsabili della produzione e della secrezione di CXCL10. Tali risultati sono indicativi di un ambiente infiammatorio alterato in due compartimenti coinvolti nel trapianto: il midollo e il sangue periferico.

Su 5 pazienti di questa stessa coorte, è stata condotta un'analisi citofluorimetrica multiparametrica che ci ha permesso di quantificare le sottopopolazioni di linfociti B e T sia nel MO che nel SP nello stesso momento. Globalmente la frequenza dei linfociti B totali è aumentata nel MO nei pazienti dopo trapianto. I progenitori pro-B midollari non sono alterati nei pazienti con MS rispetto ai controlli sia prima che dopo trapianto. Invece il compartimento delle cellule mature B residenti nel MO mostra un significativo aumento dei linfociti B *naïve* nei pazienti dopo trapianto, mentre le cellule B della memoria e le plasmacellule non sono alterate. La parallela analisi del SP ha permesso di evidenziare un au-

mento della frequenza dei linfociti B *transitional* immaturi nei pazienti rispetto ai controlli che diminuiscono normalizzandosi dopo trapianto.

CONCLUSIONI

La produzione di CXCL10 in due diversi compartimenti anatomici (MO e SP) rimane inalterata dopo trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche, nonostante che la maggior parte dei pazienti si trovi in fase di remissione clinica e in assenza di attività di malattia. Questo dato sembra quindi una caratteristica strettamente associata al sottogruppo di pazienti con una forma aggressiva di malattia che non rispondono alle terapie convenzionali. Inoltre il nostro è il primo studio condotto sulla caratterizzazione delle sottopopolazioni di linfociti B midollari e periferici in pazienti affetti da SM prima e dopo trapianto i cui risultati forniscono importanti e nuove informazioni per la comprensione del meccanismo d'azione del trapianto e della patogenesi della malattia.

Immunological evaluation of bone marrow in severe multiple sclerosis patients undergoing autologous haematopoietic stem cell transplantation

INTRODUCTION AND AIMS

Autologous hematopoietic stem cells transplantation (AH SCT) has been considered as a novel therapy for the treatment of multiple sclerosis (MS) patients who are resistant to conventional treatments, but so far no data are available on bone marrow (BM) of MS patients before and after AH SCT. AH SCT may re-induce a condition of self-tolerance leading the patient to a condition of clinical latency. We have already demonstrated that bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSC) isolated from MS patients before AH SCT have a significantly different cytokine profile in comparison to healthy donors (HD). In particular, we demonstrated that MS-MSC show a higher production of the CXCL10 chemokine, suggesting that an altered MSC function in MS patients may play some role in the development of the disease. The first aim of the present project was to characterize functionally and phenotypically MSC, isolated from BM of MS patients who have undergone AH SCT and to correlate the results with the clinical outcome. The second

aim of this study was to characterize BM and peripheral blood B cell compartment before and after AH SCT in MS patients. BM is a crucial lymphoid organ for B cell development, containing the cellular niches not only for the early phases of B cell development but also for the late effector phases of B cell differentiation. Recent studies have demonstrated a potential effect of B cells targeted therapies in the treatment of MS. These findings have supported the concept that B cells play a role in the pathogenesis of multiple sclerosis, not only as precursors of antibody-producing cells, but also as important regulators of the T-cell activation process. No studies have been so far published to investigate BM and peripheral B cell compartment in MS patients before and after AH SCT.

RESULTS

The study has been carried out on BM of 19 MS patients one month before transplantation and on 7 patients at a median follow-up of 4,5 years (range 3 – 6) post-transplantation. Morphological analysis

of BM biopsies revealed a normal microenvironment in BM of MS patients both before and after transplantation. In addition, no differences were found in colony forming efficiency, as well as in growth potential, expression of MSC surface markers, differentiation potential toward osteo- and adipocytes and immunosuppressive ability of MSC pre and post AHSCT. MS MSCs showed significant increased production of CXCL10, a T cell recall chemokine, compared to MSC isolated from normal donors. This altered production is maintained after AHSCT and is due to altered signaling pathways of innate immune reaction mediated by TLR4. We observed an increased phosphorylation of p38, CREB, JNK, and STAT1, factors forming signaling cascade responsible of CXCL10 production and secretion. We further analyzed CXCL10 production in peripheral blood (PB), and we found in a sample of 19 MS patients refractory to conventional therapies, augmented CXCL10 production in monocytes. This observation indicates an altered inflammatory environment in the two compartment involved in AHSCT: bone marrow and blood circulating cells. Multicolor flow cytometer analysis has been performed in 5 MS patients on BM and PB to enumerate the frequencies of B and T lymphocytes subsets. Total CD19⁺ B cells are increased after HSCT in MS patients. Naïve B cells show a tendency to increase while memory and plasma cell compartment are

decreased in BM after HSCT but also compared to HD BM samples. Pro-B cell subsets were equally represented in BM of MS and HD samples with no changes after HSCT. Overall the immature B cell compartment was not altered after HSCT. Also in the periphery we observed an increase in total CD19⁺ B cells after HSCT in MS patients. Transitional B cells are increased in MS patients before HSCT compared to age matched control, while they decreased after HSCT. Naïve and memory B cells do not show any change, while plasma cells already increased in MS before HSCT, show a tendency to increase after HSCT.

CONCLUSIONS

Despite in almost all patients no further disease activity has been detected by MRI at a median follow-up of 4.5 years (range 3–6) post-transplantation the increased production of CXCL10 in two different compartments (BM and PB) persisted after AHSCT. This data seems therefore a characteristics of this subgroup of patients refractory to conventional treatments. Notably this is the first study conducted in parallel in BM and PB of MS patients before and after transplantation aimed at evaluating B cell compartment. Results of this analysis provide novel and important informations on the mechanism of action of transplantation as well as on the pathogenesis of this aggressive form of the disease.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Carrai V, Donnini I, Mazzanti B, Alterini R, Amato MP, Barilaro A, Bosi A, Massacesi L, Portaccio E, Repice AM, Rotunno G, Saccardi R. Immunohistochemistry analysis of bone marrow biopsies in multiple sclerosis patients undergoing autologous haematopoietic stem cells transplantation. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013 Jul;115(7):1044-8.

Mazzanti B, Aldinucci, A; Bonechi, E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell characterization in severe multiple sclerosis patients treated with autologous haematopoietic stem cell transplantation. 39th Annual Meeting of the European-Group-for-Blood-and-Marrow-Transplantation (EBMT) London, UK: Apr 07-10, 2013 Bone Marrow Transplantation volume 48, Supplement: 2: S39-S39 Published: Apr 2013

Aldinucci A; Bonechi E; Galante A; et al. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases: the case of multiple sclerosis. 38th Annual Meeting of the European-Group-for-Blood-and-Marrow-Transplantation (EBMT) Location: Geneva, Switzerland April 01-04, 2012. Bone Marrow Transplantation volume:47, Supplement:1:S229-S229; April 2012

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni (prorogato di 12 mesi) e l'ammontare di 183.745 €

Maria Pia Abbracchio

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano

COLLABORATORI:

Marta Fumagalli, Elisabetta Bonfanti, Davide Lecca, Chiara Parravicini, Gianluca Menichetti, Giusy Coppolino

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Roberto Furlan, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Milano

Strategie rimielinizzanti innovative per la sclerosi multipla: focus su GPR17, nuovo recettore coinvolto nel differenziamento oligodendrocitario

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) secondaria progressiva è una malattia ancora incurabile per la quale la stimolazione della rimielinizzazione rimane tuttora il più importante obiettivo terapeutico. Nostri studi precedenti suggeriscono che il recettore di membrana GPR17 possa guidare la transizione di precursori oligodendrogliali (OPC) a cellule mielinizzanti. È tuttavia necessario comprendere il ruolo di GPR17, il suo sistema di segnalazione e le sue variazioni durante la maturazione degli OPC. Su queste basi, gli obiettivi del nostro progetto sono stati: (1) comprendere il ruolo di GPR17 nel differenziamento degli OPC; (2) definire la via di segnalazione di GPR17 e le sue alterazioni durante la maturazione degli OPC; (3) analizzare GPR17 nel topo ESA, un modello sperimentale di SM.

RISULTATI

In relazione all'obiettivo 1, abbiamo dimostrato che GPR17 appare precocemente negli OPC NG2-positivi, raggiunge la sua massima espressione allo stadio O4 ed è poi progressivamente spento. Anche *in vivo*, GPR17 è presente in OPC esprimenti NG2 o Olig2, ma non negli oligodendrociti maturi MBP-positivi. Analogamente, durante lo sviluppo nel ratto, l'espressione di GPR17 è massima al decimo giorno postnatale e diminuisce col procedere della mielinizzazione. L'esposizione precoce degli OPC agli agonisti di GPR17 promuove il loro differenziamento, mentre il trattamento con antagonisti o con RNA interferenti ne riduce la maturazione. Inoltre, la sovraespressione forzata del recettore a stadi tardivi del

differenziamento compromette la maturazione cellulare, suggerendo la necessità di un silenziamento spontaneo del recettore affinché gli OPC completino il loro differenziamento. Abbiamo poi identificato la desensibilizzazione indotta da agonisti e successiva internalizzazione come un potenziale meccanismo alla base dello spegnimento fisiologico di GPR17 negli OPC e dimostrato che questo avviene via fosforilazione da parte di chinasi dei recettori a G-proteine. Abbiamo anche messo a punto co-culture di OPC con neuroni dei gangli dorsali, dimostrando che gli agonisti di GPR17 promuovono la mielinizzazione degli assoni. Per rispondere all'obiettivo 2, abbiamo identificato il sistema di trasduzione nativo di GPR17, dimostrando che gli agonisti recettoriali inibiscono specificatamente la formazione di cAMP. Abbiamo inoltre descritto che, in pre-oligodendrociti immaturi, UDP-glucosio aumenta le correnti dei canali di potassio (K⁺) rettificanti-ritardati senza alcun effetto sulle cellule mature, a suggerire che (i) la stimolazione delle correnti di K⁺ partecipi al differenziamento degli OPC indotto da GPR17 e che (ii) sia la stimolazione delle correnti di K⁺ sia GPR17 sono gradualmente spenti nel corso della maturazione terminale. Infine, l'attivazione di GPR17 stimola la migrazione degli OPC.

In accordo con l'obiettivo 3, abbiamo caratterizzato il fenotipo di OPC esprimenti GPR17 nel midollo spinale di topi ESA. In questi midolli, il numero di cellule GPR17 e CC1-positive diminuisce sia nella sostanza grigia che nella bianca, a causa della morte cellulare generalizzata correlata alla malattia. Tuttavia, è stato osservato un incremento del numero

di OPC esprimenti GPR17 in prossimità delle aree del midollo spinale infiammate e infiltrate da cellule del sangue, in parallelo ad un marcato aumento del trascritto di GPR17. In linea con questi risultati, nella maggioranza (66,7%) dei pazienti con trauma cranico deceduti per complicazioni intracraniche, si osserva un aumento di GPR17 negli OPC molto più alto rispetto al 20% dei pazienti deceduti per complicazioni extracraniche. Non abbiamo isolato e caratterizzato gli OPC da topi ESA, a causa del tempo necessario per la messa a punto del modello animale di SM, ma prevediamo di farlo utilizzando un topo reporter GPR17iCreER^{T2}, in cui dopo induzione con tamoxifene, le cellule esprimenti GPR17 (e la loro progenie) risultano fluorescenti. Questa linea murina agevolerà notevolmente l'isolamento e la purificazione di OPC esprimenti GPR17 e permetterà di seguire il loro destino finale.

CONCLUSIONI

In conclusione, abbiamo proposto un nuovo approccio terapeutico che prevede una strategia di rimielinizzazione basata su GPR17. I dati *in vitro*, ottenuti finora, stabiliscono inequivocabilmente un ruolo cruciale per GPR17 nel differenziamento e mielinizzazione degli OPC. Tuttavia, nel modello di topo ESA e nei pazienti con trauma cranico, si osserva un aumento aberrante di GPR17 in prossimità delle lesioni. Sulla base dei nostri dati *in vitro*, che dimostrano che la sovra-espressione di GPR17 a stadi tardivi del differenziamento degli OPC compromette la loro maturazione, ipotizziamo che questa alterazione possa contribuire al difetto di rimielinizzazione nella SM e rappresentare un nuovo meccanismo patogenetico della malattia. Proponiamo, inoltre, che agenti farmacologici in grado di correggere l'espressione aberrante di GPR17 possano favorire la rimielinizzazione nella SM.

Innovative re-myelinating strategies for multiple sclerosis via the exploitation of the new oligodendrocyte receptor GPR17

INTRODUCTION AND AIMS

Secondary progressive chronic multiple sclerosis (MS) is an unmet medical need for which re-myelination still remains a desired therapeutic goal. Our previous studies suggested that the membrane receptor GPR17 orchestrates the transition from immature oligodendrocyte precursor cells (OPCs) to mature myelinating cells. However, more data were needed to understand the exact roles and signaling of GPR17 in OPCs and their changes during OPC maturation and under demyelinating conditions, like MS. On this basis, our project aimed at (1) unveiling GPR17 roles in OPC specification; (2) defining GPR17 signaling pathways and changes during OPC maturation; (3) analysing GPR17 in the EAE MS model in mice.

RESULTS

To fulfill Aim 1, we showed that GPR17 is already present in early NG2-positive cells, reaches its maximal expression levels at the O4 stage and is then progressively downregulated. Consistent with these data, *in vivo*, GPR17 was present in early OPCs expressing NG2 or Olig2, but was never found in cells expressing mature myelin markers like MBP. Similarly,

during rodent brain development, GPR17 expression was maximal at postnatal day 10 and then progressively declined along with myelination. In early cultured OPCs, activation of GPR17 by its endogenous agonists promoted cell differentiation, while its inhibition by either receptor antagonist or acute knock down with small interfering RNAs markedly impaired cell maturation. Moreover, interference with the timely physiological downregulation of GPR17 by forcing its expression at late OPC stages markedly impaired cells' terminal maturation, suggesting that spontaneous receptor silencing is needed for cells to complete their differentiation program. We then identified agonist-induced GPR17 desensitization and internalization as a potential mechanism at the basis of its physiological silencing in late OPCs, and demonstrated that this occurred by phosphorylation via G-protein receptor kinases. We also established the Dorsal Root Ganglia neuron-OPC co-cultures and demonstrated that GPR17 agonists significantly increase axonal myelination index compared to control. To fulfill Aim 2, we identified GPR17 native transduction pathway, demonstrating that GPR17 agonists specifically inhibit cAMP formation.

We also showed that, in pre-immature oligodendrocytes, UDP-glucose enhanced delayed rectifier K⁺ currents with no effect on mature cells, to suggest that (i) stimulation of K⁺ currents participates to GPR17-induced OPC differentiation and (ii) stimulation of both K⁺ currents and GPR17 are gradually downregulated along with cells' terminal maturation. GPR17 activation also stimulated OPC migration.

According to Aim 3, we characterized the phenotype of GPR17 expressing OPCs in the spinal cord of EAE mice. The total number of both GPR17- and CC1-positive cells was decreased in both the grey and white matter of EAE mice compared to control, likely due to generalized disease-related cell loss. However, increased numbers of GPR17-expressing OPCs were found to accumulate around spinal cord inflamed areas where circulating blood cells were infiltrating the tissue. To confirm that this actually reflected receptor up-regulation, we showed a marked increase of GPR17 mRNA in EAE compared to control spinal cord tissue. In line with these findings, the majority (66.7%) of patients with traumatic brain injury (TBI) deceased from intracranial complications showed increased GPR17 in OPCs, compared to only 20% in patients deceased from extracranial complications. Globally, these findings suggest that GPR17 is up-regulated in both rodent and human OPCs as a result of injury. Due to the

time required to set up the EAE model, we have not been able to characterize the *in vitro* behavior of OPCs from EAE mice, but plan to address this issue in our new GPR17iCreER^{T2} fluorescent reporter mouse where, upon tamoxifen induction, cells expressing GPR17 (and their progeny) become green. This mouse line will greatly facilitate the isolation and purification of GPR17 expressing OPCs and allow to follow their final destiny.

CONCLUSIONS

With this project, we have proposed a new therapeutic approach based on a GPR17-based re-myelinating strategy. The *in vitro* data produced so far have unequivocally established a crucial role of GPR17 in physiological OPC differentiation and myelination. However, our data in both a rodent EAE model and in human TBI have highlighted an aberrant upregulation of GPR17 at lesion sites. Based on our *in vitro* data demonstrating that interferences resulting in inappropriate GPR17 expression in late OPCs impair progression to myelinating phenotypes, we propose that this dysfunction may contribute to defective re-myelination in MS and represent a new pathogenic disease mechanism. We also propose that pharmacological agents that are able to revert GPR17 aberrant expression may induce OPCs to resume myelination and prove effective in MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Fratangeli A, Parmigiani E, Fumagalli M, Lecca D, Benfante R, Passafaro M, Buffo A, Abbraccio MP, Rosa P. The Regulated Expression, Intracellular Trafficking, and Membrane Recycling of the P2Y-like Receptor GPR17 in Oli-neu Oligodendroglial Cells. *J Biol Chem* 2013; 288:5241-5256.

Coppi E, Maraula G, Fumagalli M, Failli P, Cellai L, Bonfanti E, Mazzoni L, Coppini R, Abbraccio MP, Pedata F, Pugliese AM. UDP-Glucose Enhances Outward K⁺ Currents Necessary for Cell Differentiation and Stimulates Cell Migration by Activating the GPR17 Receptor in Oligodendrocyte Precursors. *Glia* 2013; 61:1155-71.

Franke H, Parravicini C, Lecca D, Zanier E, Heine C, Bremicker K, Fumagalli M, Rosa P, Longhi L, Stocchetti N, De Simoni MG, Weber M, Abbraccio MP. Changes of the GPR17 receptor, a new target for neurorepair, in neurons and glial cells in patients with traumatic brain injury. *Purinergic Signal* 2013; 9:451-62.

Lecca D, Ceruti S, Fumagalli M, Abbraccio MP. Purinergic trophic signalling in glial cells: functional effects and modulation of cell proliferation, differentiation, and death. *Purinergic Signal* 2012; 8:539-557.

Ulrich H, Abbraccio MP, Burnstock G. Extrinsic purinergic regulation of neural stem/progenitor cells: implications for CNS development and repair. *Stem Cell Rev* 2012; 8:755-67.

Fumagalli M, Daniele S, Lecca D, Lee PR, Parravicini C, Fields RD, Rosa P, Antonucci F, Verderio C, Trincavelli ML, Bramanti P, Martini C, Abbraccio MP. Phenotypic changes, signaling pathway and functional correlates of GPR17-expressing neural precursor cells during oligodendrocyte differentiation. *J Biol Chem* 2011; 286:10593-604.

Boda E, Vigano F, Rosa P, Fumagalli M, Labat-gest V, Tempia F, Abbraccio MP, Dimou L, Buffo A. The GPR17 receptor in NG2 expressing cells: focus on *in vivo* cell maturation and participation in acute trauma and chronic damage. *Glia* 2011; 59:1958-1973.

Meraviglia V, Ulivi AF, Fratangeli A, Valenza F, Lecca D, Sironi L, Abbraccio MP, Rosa P. Poster titled: A PDZ binding motif controls G protein-coupled receptor 17 trafficking in differentiating oligodendrocytes. FENS, Milano 5-9 July 2014.

Bonfanti E, Fumagalli M, Daniele S, Margaroli N, Lecca D, Martini C, Trincavelli ML, Abbraccio MP (2013). Oral communication titled: "The mammalian target of rapamycin (mTOR) controls oligodendrocyte maturation by fine-tuning the activity of GPR17 receptor via G protein-coupled receptor kinases". 36° Congresso Nazionale SIF, Torino 23-26 Ottobre 2013.

Lecca L, Coppolino G, Menichetti G, Marangon D, Bonfanti E, Fratangeli A, Fumagalli M, Rosa P, Abbraccio MP (2013). Oral communication titled: "Gene regulation of the receptor GPR17 in oligodendroglial cells: expression pattern and pathological alterations in a mouse model of multiple sclerosis". 36^o Congresso Nazionale SIF, Torino 23-26 Ottobre 2013.

Lecca L, Coppolino G, Menichetti G, Marangon D, Bonfanti E, Fratangeli A, Fumagalli M, Rosa P, Abbraccio MP (2013). Poster titled: "Gene regulation of the P2Y-like receptor GPR17 in oligodendrocytes, and pathological alterations in a mouse model of multiple sclerosis". 5th Joint Italian-German Purine Club Meeting – Fostering translational research on Purines by Italian-German joint efforts, Rimini 18-21 Settembre 2013.

Bonfanti E, Fumagalli M, Daniele S, Margaroli N, Lecca D, Martini C, Trincavelli ML, Abbraccio MP. Oral communication titled: "The mammalian target of rapamycin (mTOR) controls oligodendrocyte maturation by fine-tuning the activity of GPR17 receptor via G protein-coupled receptor kinases". Next Step 4, la giovane ricerca avanza, Milano 17 luglio 2013.

Fumagalli M, Bonfanti E, Daniele S, Lecca D, Coppolino GT, Trincavelli ML, Martini C, Abbraccio MP (2013). Dysregulation of GPR17, a key receptor involved in oligodendrocyte maturation, as a novel potential pathogenetic mechanism in demyelinating diseases. Euroglia 2013 XI European Meeting on Glial cells in Health and Disease, Berlin July 3-6, 2013. Glia, Volume: 61, Supplement: 1, Pages: S137-S137, Published: Jul 2013.

Fumagalli M, Bonfanti E, Coppolino G, Parravicini C, Menichetti G, Furlan R, Lecca D, Abbraccio MP (2013). Poster titled: "Innovative re-myelinating strategies for multiple sclerosis via the exploitation of the new oligodendrocyte receptor GPR17". Congresso Scientifico Annuale FISM 29-30 Maggio 2013.

Abbraccio MP, Fumagalli M, Lecca D, Bonfanti E, Parravicini C, Coppolino G, Daniele S, Trincavelli M, Martini C. "Extracellular purine and pyrimidine nucleotide as local extrinsic regulators of adult neural progenitor cells in the diseased CNS". 24th Biennial Meeting of the International and the American Society for Neurochemistry, April, 20-24, 2013, Cancun, Mexico, Invited Lecturer.

Fumagalli M, Daniele S, Bonfanti E, Parravicini C, Lecca D, Rosa P, Verderio C, Trincavelli ML, Martini C, Abbraccio MP. Oral communication titled: "The P2Y-like GPR17 receptor regulates the differentiation of NG2+ neural precursor cells into mature oligodendrocytes" at Purine 2012, Fukuoka, Japan, May 31-June 2, 2012.

Bonfanti E, Fumagalli M, Daniele S, Parravicini C, Lecca D, Trincavelli L, Abbraccio MP. Poster presentation titled: "Time-dependent and critical role of the P2Y-like GPR17 receptor at distinct stages of oligodendrocyte" at NEXT STEP3, la giovane ricerca avanza, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, via Balzaretto 9, 20133, Milan, June 26, 2012.

Bonfanti E, Fumagalli M, Daniele S, Parravicini C, Lecca D, Trincavelli L, Abbraccio MP. Poster presentation titled: "Time-dependent and critical role of the P2Y-like GPR17 receptor at distinct stages of oligodendrocyte" at XVI seminario nazionale SIF dottorandi ed assegnisti in Farmacologia ed affini, Rimini, September 16-19, 2012.

Bonfanti E, Fumagalli M, Parravicini C, Daniele S, Lecca D, Coppolino G, Martini C, Trincavelli L, M.P. Abbraccio. Oral communication titled: "Dysregulation of GPR17, a key receptor involved in NG2+ progenitor cells differentiation to mature oligodendrocytes, as a novel potential pathogenetic mechanism in demyelinating diseases" at VII convegno monotematico SIF 2nd meeting "Opportunity and challenges in the pharmacological modulation of adult neural stem cells", Novara, December 14-15, 2012.

Abbraccio MP, Fumagalli M, Lecca D, Bonfanti E, Parravicini C, Daniele S, Trincavelli L, Martini C. Regulation of oligodendrocyte precursor cells differentiation by the P2Y-like GPR17 receptor. Society for Neuroscience Annual Meeting, New Orleans, Oct. 13-17, 2012, Selected oral communication.

Fumagalli M, Bonfanti E, Daniele S, Parravicini C, Lecca D, Rosa P, Verderio C, Trincavelli ML, Martini C, Abbraccio MP. Oral communication titled: "Role of the P2Y-like receptor in neural precursor cells", "IV convegno monotematico SIF", Immunity and Inflammation in brain diseases", Milan, November 14, 2011.

Fumagalli M, Daniele S, Parravicini C, Lecca D, Bonfanti E, Lee PR, Fields RD, Rosa P, Verderio C, Trincavelli ML, Martini C, Abbraccio MP. Poster presentation titled: "Biotechnological and pharmacological in vitro approaches unveil the role of GPR17 signaling in regulating the timing of oligodendroglial differentiation" at 35[^] SIF national conference, Bologna, September 14-17, 2011.

Parravicini C, Eberini I, Daniele S, Sensi C, Trincavelli ML, Martini C and Abbraccio MP. Poster presentation titled: "An integrated pipeline for the identification of novel GPCR ligands: lessons from GPR17, a promising therapeutic target for neurodegenerative diseases" at 35[^] SIF national conference, Bologna, September 14-17, 2011.

Bonfanti E, Fumagalli M, Parravicini C, Lecca D, Abbraccio MP. Poster presentation titled: "Pharmacological and biotechnological in vitro approaches unveil the role of GPR17 signaling in regulating the timing of oligodendroglial differentiation" at NEXT STEP2, la giovane ricerca avanza, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, via Balzaretto 9, 20133, Milan, June 24, 2011.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 100.000 €

Marilena Palmisano

Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Ospedale San Raffaele, Milano
Hunter James Kelly Research Institute, University at Buffalo, Buffalo (NY), USA

MENTORE: **M. Laura Feltri**

Ruolo delle MAP chinasi p38 nella mielinizzazione

PREMESSE E OBIETTIVI

La mielina è una guaina che avvolge gli assoni nel sistema nervoso. È costituita da strati di membrana plasmatica ed è prodotta dalle cellule gliali, che nel sistema nervoso centrale (SNC) sono gli oligodendrociti. Vari segnali assonali e gliali cooperano durante lo sviluppo per indurre la formazione di mielina. La mielina è danneggiata in pazienti con SM ed altre malattie demielinizzanti. Nella SM, dopo fasi iniziali in cui gli assoni sono de-mielinizzati e ri-mielinizzati, gli oligodendrociti non sono più in grado di ri-mielinizzare gli assoni, provocando perdita assonale e inabilità funzionale. Si ipotizza che nel cervello dei pazienti con SM in stadi avanzati vengano espressi inibitori della mielinizzazione che ostacolano la ri-mielinizzazione. L'obiettivo principale di questo progetto è stato di chiarire come la cascata delle MAP chinasi p38 partecipi nei meccanismi di mielinizzazione e ri-mielinizzazione del SNC. La famiglia delle p38 è costituita da quattro isoforme codificate da quattro geni diversi (α , β , γ , δ), con varie funzioni nel differenziamento cellulare. In alcuni tessuti, come per esempio nel muscolo, è stato dimostrato che diverse isoforme hanno funzioni opposte, piuttosto che ridondanti. Studi *in vitro* sul ruolo di p38 nella mielinizzazione da parte degli oligodendrociti suggeriscono che p38 α favorisca la mielinizzazione. Dato che p38 α *in vitro* sembra promuovere la mielinizzazione, ma si sa poco sulla funzione di ciascuna isoforma e sul loro ruolo *in vivo*, ci siamo chiesti quali isoforme della famiglia di p38 siano espresse nel SNC e come esse siano coinvolte nello sviluppo del SNC e nei meccanismi di ri-mielinizzazione.

RISULTATI

L'analisi del pattern di espressione di p38 ha mostrato che p38 α e β sono espresse nel cervello, ma γ e δ sono arricchite in regioni di sostanza bianca. Abbiamo anche analizzato oligodendrociti in coltura in condizioni proliferanti o differenziati. p38 α è espressa in entrambi

gli stadi di differenziamento, mentre γ e δ sono espresse dinamicamente durante lo sviluppo, suggerendo funzioni specifiche. Inoltre, l'espressione di p38 γ nel cervello di ratto risulta piuttosto bassa 5-15 giorni dopo la nascita (P5-P15), durante la fase di mielinizzazione attiva, ed aumenta dopo che la mielinizzazione è completata. Visto l'interessante pattern di espressione, abbiamo analizzato il SNC di topi nulli per p38 γ e δ . I cervelli nulli per p38 δ non hanno mostrato alcun fenotipo. Al contrario, l'analisi *Western Blot* su lisati di cervello ha mostrato che in topi P15 nulli per p38 γ sono presenti più proteine mieliniche che nei *wildtype*. Da un'analisi morfologica di sezioni di cervello abbiamo osservato una diffusa mielinizzazione precoce a P15 nel cervello in assenza di p38 γ . Il livello di proteine di mielina e mielinizzazione ritorna a condizioni normali nell'adulto. Questi risultati *in vivo* suggeriscono che p38 γ sia un inibitore del differenziamento degli oligodendrociti. Per testare quest'ipotesi abbiamo utilizzato un sistema *in vitro* che consente di purificare via *immunopanning* precursori degli oligodendrociti, che possono poi essere tenuti in coltura con mezzi di crescita che inducono la proliferazione o il differenziamento. Lo stadio di differenziamento di singole cellule può essere stabilito effettuando colorazione con vari marker. Per verificare che p38 γ sia un inibitore del differenziamento degli oligodendrociti, abbiamo trasfettato precursori degli oligodendrociti con un plasmide contenente p38 γ fusa a GFP, abbiamo poi indotto il differenziamento delle cellule trasfettate e contato il numero di oligodendrociti immaturi e maturi. Il numero di oligodendrociti differenziati diminuisce quando p38 γ viene over-espressa, dimostrando che p38 γ inibisce il differenziamento. La mielinizzazione precoce osservata a P15 nei cervelli in assenza di p38 γ potrebbe dipendere da alterazioni nel numero di oligodendrociti, o nella loro capacità di differenziarsi o mielinizzare. Per verificare se la quantità di oligodendrociti cambia in assenza di p38 γ , abbiamo effettuato esperimenti di immunostaining con CC1, un marker di oligodendrociti

differenziati, su sezioni di cervello e midollo spinale ed abbiamo contato il numero di cellule positive nelle regioni di sostanza bianca. Questa conta ha mostrato che in assenza di p38 γ il numero totale di oligodendrociti maturi non è alterato ad un mese di età. Infine, ci siamo chiesti se p38 γ possa essere indotto in situazioni patologiche del SNC ed inibire la ri-mielinizzazione. I nostri studi hanno mostrato che il livello di mRNA di p38 γ è aumentato nella sostanza bianca di lesioni leucocorticali in cervelli *post-mortem* di pazienti con SM, se confrontato con regioni adiacenti non affette. Abbiamo anche analizzato un altro modello di lesione della sostanza bianca, in cui il rallentamento della crescita intrauterina nei ratti causa un ritardo nella mielinizzazione da parte degli oligodendrociti, dovuto a stress ossidativo. Anche in queste condizioni, i livelli proteici di p38 γ aumentano, suggerendo che questa molecola possa essere uno dei fattori che causano un ritardo nella mielinizzazione.

Il nostro studio ha mostrato che p38 γ è un nuovo regolatore della mielinizzazione, e un potenziale target molecolare nella SM. Infatti p38 γ è regolata durante lo sviluppo del SNC ed inibisce il differenziamento degli oligodendrociti. In assenza di p38 γ la mieliniz-

zazione del cervello avviene precocemente, per poi procedere normalmente nell'adulto, indicando che la sua assenza non genera alcun effetto dannoso, il che rende questa molecola un target farmacologico molto promettente. Infine, p38 γ è over-espressa in condizioni patologiche del SNC riguardanti la mielinizzazione, come per esempio nel caso di SM, suggerendo che la sua up-regolazione negli oligodendrociti possa essere una delle cause che impediscono la ri-mielinizzazione.

CONCLUSIONI

I nostri studi hanno permesso di identificare p38 γ come un nuovo inibitore della mielinizzazione. Poiché p38 γ può essere indotto da citochine infiammatorie e da stress ossidativo, è possibile che questa molecola possa inibire la rimielinizzazione da parte degli oligodendrociti nel contesto della SM. Questa idea è supportata dal fatto che l'mRNA di p38 è up-regolato nelle placche di SM. Studi futuri saranno condotti allo scopo di determinare se p38 γ possa rappresentare un nuovo target farmacologico al fine di promuovere la ri-mielinizzazione in caso di SM.

Role of p38 MAP kinases in myelination

INTRODUCTION AND AIMS

Myelin is a sheath that envelops axons in the nervous system. It consists of layers of plasma membrane and is produced by glial cells, which are oligodendrocytes in the central nervous system (CNS). Various axonal and glial signals cooperate during development to induce myelin formation. Myelin is damaged in MS and other demyelinating diseases. In MS, after initial stages where the axons are de-myelinated and re-myelinated, oligodendrocytes are not able to re-myelinate axons, leading to axonal loss and functional disability. It is postulated that myelin inhibitors are induced in later stages in MS brain, preventing re-myelination. The goal of this project was to elucidate how the p38 MAP kinases pathway participates in CNS myelination and re-myelination. p38 family is comprised of four isoforms coded by different genes (α , β , γ , δ), playing functions in cellular differentiation. In certain tissues, such as muscle, different isoforms have distinct rather than redundant functions. Studies *in vitro* an-

alyzed the role of p38 signaling in oligodendrocytes myelination, and suggested that p38 α promotes myelination. Since p38 α *in vitro* seems to promote myelination, but little is known about the function of each isoform and about their role *in vivo*, we have asked which p38 isoforms are expressed in the CNS and how they are involved in CNS development and in the mechanisms of re-myelination.

RESULTS

Analysis of p38 expression pattern showed that p38 α and β isoforms are expressed in the brain, but γ and δ are enriched in white matter regions. We also analyzed proliferating and differentiated oligodendrocytes. p38 α is expressed at both the stages, while γ and δ are expressed dynamically during development, suggesting specific functions. Moreover, p38 γ expression in the rat brain is low at 5-15 days after birth (P5-P15), during active myelination, and increases when myelination is completed. Given the interesting expression patterns, we analyzed

the CNS of p38 γ and δ null mice. p38 δ null brains showed no phenotype. In contrast, western blot on brain lysates showed that p38 γ null brains at P15 contain more myelin proteins than the wildtype. Morphological examination of the mutant brain sections showed widespread earlier myelination at P15 in p38 γ null brains. Myelin protein levels and extent of myelination go back to normal in the adult. These *in vivo* results suggest that p38 γ is an inhibitor of oligodendrocytes differentiation. To test this hypothesis we set up an *in vitro* system consisting of immunopanning-purified oligodendrocytes precursors, kept in culture with proliferating or differentiating growth media. The differentiation state can be recognized by staining with various markers. To test if p38 γ is an inhibitor of oligodendrocytes differentiation, we transfected purified oligodendrocytes precursors with a plasmid containing a GFP-tagged p38 γ , we induced differentiation of transfected cells and counted the number of immature and mature oligodendrocytes. The number of differentiated oligodendrocytes decreases when overexpressing p38 γ , proving that p38 γ inhibits differentiation. The earlier myelination observed at P15 in the p38 γ null brains could arise from changes in the number of oligodendrocytes, their ability to differentiate or to initiate myelination. To examine if the amount of oligodendrocytes changes in the absence of p38 γ , we performed immunostaining with CC1, a marker of differentiated oligodendrocytes, on sections of brain and spinal cord and we counted the number of positive cells in white matter tracts. The counts indicate that the absence of p38 γ does not alter the

total number of mature oligodendrocytes at one month. Finally, we asked if p38 γ could be induced in pathological situations and inhibit re-myelination. We found that mRNA level of p38 γ is upregulated in white matter leukocortical lesions of *post-mortem* brains from MS patients compared to normal appearing areas. We also looked at another model of white matter injury, where intrauterine growth retardation induced in rats triggers delay in oligodendrocytes myelination due to oxidative stress. In these conditions p38 γ protein level increases, suggesting that it may be one of the factors that delay myelination.

Our study revealed that p38 γ is a novel player in the mechanism of myelination and a possible molecular target to promote re-myelination in MS. p38 γ is regulated during oligodendrocytes development and inhibits their differentiation. In the absence of p38 γ , myelination in the brain occurs earlier and proceeds normally in the adult. Finally, p38 γ is overexpressed in myelin-related pathological conditions of the CNS, such as MS, suggesting that its over-expression in the oligodendrocytes could prevent re-myelination.

CONCLUSIONS

Our study identified p38 γ as a novel inhibitor of myelination. Because p38 γ is induced by inflammatory cytokines and oxidative stress, it could inhibit oligodendrocytes re-myelination in the context of MS. Indeed, p38 γ mRNA is induced in MS plaques. Future studies will determine if p38 γ represents a new pharmacological target to promote re-myelination in MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Palmisano M, Abiko K, Hurley E, Taveggia C, Cuenda A, Grinspan J, Trapp B, Wrabetz L, Feltri ML. Role of p38 MAP kinases in central myelination. Poster presentation. 43rd Society for Neuroscience meeting, San Diego, CA (USA), November 9-13 2013

Palmisano M, Cuenda A, Taveggia C, Abiko K, Wrabetz L, Feltri ML. Role of p38 MAPKs in peripheral and central myelination. Poster presentation. 42nd Society for Neuroscience meeting, New Orleans, LA (USA) October 13-17, 2012

Borsa di studio finanziata con il Bando 2010 per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 50.000 €

Pasquale Annunziata

Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze, Università degli Studi di Siena, Siena

COLLABORATORI:

Chiara Cioni

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Federico Corelli, Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia, Università degli Studi di Siena, Siena

Studio degli effetti immunomodulatori di un nuovo cannabinoide agonista selettivo per il recettore CB2 su cellule immunocompetenti nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La discrepanza tra i risultati *in vitro* ed *in vivo* riguardo agli effetti anti-infiammatori di estratti di cannabinoidi in pazienti con sclerosi multipla (SM) e nell'encefalomielite sperimentale autoimmune può dipendere dalla presenza di agonisti che si legano ad entrambi i recettori CB1 e CB2 attenuando il ruolo del singolo tipo di recettore. Scopo di questo progetto è stato quello di caratterizzare gli effetti immunomodulatori ed anti-infiammatori di un nuovo agonista cannabinoide (COR167), che presenta un'alta affinità di legame esclusivamente per il recettore CB2 e non per il sottotipo CB1. Tali effetti sono stati testati su cellule T, monociti e linee cellulari T reattive alla proteina mielinica basica, di persone con SM remittente-recidivante in fase di stabilità e di attività di malattia e comparati con quelle di soggetti sani.

RISULTATI

COR167 è risultato capace di esercitare *in vitro* un potente effetto inibitorio sulla proliferazione delle cellule immunocompetenti a concentrazioni più basse di quelle riportate per altri agonisti CB2. Tale attività inibitoria era significativamente maggiore di quella mostrata dal JWH133, un CB2 agonista pre-

cedentemente usato in modelli murini di SM ed era esercitata attraverso un significativo *shift* del fenotipo proinfiammatorio Th1 e Th17 verso il fenotipo antiinfiammatorio Th2. Il COR167 è, inoltre, risultato in grado di ridurre la migrazione delle cellule immunocompetenti attraverso l'endotelio cerebrale umano in un modello *in vitro* di barriera emato-encefalica mediante una significativa diminuzione dei livelli di chemochine, noti fattori di regolazione del traffico cellulare immunologico.

CONCLUSIONI

Questi dati dimostrano che il COR167 è capace di esercitare un potente effetto anti-infiammatorio in termini anti-proliferativi ed anti-migratori a dosi significativamente più basse e in entità maggiore rispetto ad altri agonisti noti del recettore CB2. Tale attività è legata alla sua alta selettività per il recettore CB2 che si conferma essere un nuovo efficace bersaglio farmacologico per contrastare la neuroinfiammazione. Questi risultati sono incoraggianti per futuri sviluppi della molecola volti a creare una forma farmaceutica non tossica utilizzabile in soggetti umani e per esplorare altre proprietà farmacologiche utili nel trattamento della SM.

Study of immunomodulatory effects of a new cannabinoid CB2-selective agonist on immunocompetent cells from multiple sclerosis patients

INTRODUCTION AND AIMS

The discrepancy between *in vitro* and *in vivo* results regarding anti-inflammatory effects of cannabinoid mixtures or extracts both in multiple sclerosis (MS) patients and in animal models such as experimental autoimmune encephalomyelitis may partly depend on the availability of mixtures containing agonists binding to both cannabinoid CB1 and CB2 receptors that could attenuate the respective role played by single receptor type. The lack of conclusive results as to the exact role of CB2 agonists in MS may at least in part reflect the lack of synthetic molecules exclusively acting at CB2 receptor, being devoid of any affinity for the CB1 receptor. Aim of this project was to characterize the immunomodulatory and anti-inflammatory effects of a new cannabinoid CB2-selective agonist (COR167) displaying high affinity for CB2 but not affinity at all for CB1 receptor on immunocompetent cells including T lymphocytes, monocytes and myelin protein-reactive T cell lines isolated from relapsing-remitting MS patients with different disease activity as well as from healthy control subjects.

RESULTS

The cannabinoid CB2-selective agonist COR167 was able to exert a powerful *in vitro* inhibitory effect on T cell proliferation at lower concentrations than those reported for other less specific CB2 agonists in similar *in vitro* models. In addition, this inhibitory

activity was significantly higher than those shown by JWH133, another CB2 agonist previously used in murine models of MS, providing strong evidence that COR167 represents one of the most selective and powerful CB2 agonists ever synthesized. The anti-inflammatory activity of COR167 on T cells was exerted through a substantial and significant *shift* of proinflammatory Th1 and TH17 phenotype towards Th2 phenotype as demonstrated by strong reduction of levels of Th1- and TH17-related cytokines and significant increase of levels of Th2-related cytokines. COR167 was also able to reduce migration of immunocompetent cells through human brain endothelium in a reliable model of human blood-brain barrier model.

CONCLUSIONS

These findings demonstrate that COR167 is able to exert potent anti-inflammatory and anti-migratory effects at significantly lower doses and to greater extent than other known CB2 agonists. This activity is likely to be linked to its high selectivity for the cannabinoid CB2 receptor that is confirmed to be a novel pharmacological target for counteracting neuroinflammation. These data encourage further work to achieve a pharmaceutical form suitable for use in human subjects for future clinical trials and to explore any other pharmacological property to be used in treatment of MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Annunziata P, Cioni C, De Santi L, Mugnaini C, Pasquini S, Corelli F. Immunomodulatory effects of a new CB2-selective cannabinoid agonist on T-cells from multiple sclerosis patients. *J. Neurol.* 2013; 260 (Suppl.1) P390.

Annunziata P, Cioni C, De Santi L, Mugnaini C, Pasquini S, Corelli F. Immunomodulatory effects of a new CB2-selective cannabinoid agonist on T-cells from multiple sclerosis patients. Twenty-third Meeting of the European Neurological Society, 8-11 June, 2013 Barcelona, Spain.

Progetto di ricerca finanziato con il bando 2011 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 40.000 €

Mauro Maccarrone

Facoltà di Medicina e Chirurgia e Centro Integrato di Ricerca, Università Campus Bio-Medico di Roma, Roma

COLLABORATORI:

Silvia Rossi, Natalia Battista, Sergio Oddi, Mariangela Pucci, Manuela Talamonti, Valerio Chiurchiù, Luca Battistini, Domenico Tallarida

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Benjamin Cravatt, Department of Chemical Physiology - The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA

Beat Lutz, Department of Physiological Chemistry, Johannes Gutenberg University Mainz/Mainz, Germany

Ruolo del sistema endocannabinoide nel processo neurodegenerativo della sclerosi multipla sperimentale

PREMESSE E OBIETTIVI

Negli ultimi anni è stato evidenziato il ruolo del sistema endocannabinoide (SE) nella regolazione di diversi aspetti della fisiopatologia umana, mediante l'attivazione dei recettori cannabinici e vanilloidi, e/o attraverso un'azione diretta non recettoriale. Dati recenti suggeriscono il coinvolgimento del SE non solo nel processo infiammatorio tipico della sclerosi multipla (SM), ma anche nella sua componente neurodegenerativa. Il nostro obiettivo è stato quello di fornire ulteriori dettagli sul ruolo del SE in un modello sperimentale di SM (noto come encefalomielite sperimentale autoimmune, ESA), per verificare come il SE moduli la neurodegenerazione infiammatoria caratteristica di questa patologia. Inoltre, abbiamo cercato d'identificare all'interno del SE alterazioni funzionali, da sfruttare come biomarcatori periferici di SM utili nella diagnosi della malattia e/o come potenziale bersagli farmacologici per terapie innovative. A questo scopo, abbiamo eseguito su topi ESA analisi biochimiche, valutazioni cliniche e misure neurofisiologiche della trasmissione sinaptica che ci hanno permesso di acquisire indicazioni sulla relazione tra l'entità del danno infiammatorio e quello degenerativo, ed anche di ottenere ulteriori informazioni sui meccanismi di azione del SE nella fisiopatologia della SM. L'ESA è stata indotta anche nei seguenti topi geneticamente modificati: i) animali privi del recettore CB₁ in tutti i tessuti, solamente sulle terminazioni nervose glutammatergiche o

solo su quelle GABAergiche; ii) topi privi dei recettori CB₂; iii) topi privi dei recettori TRPV1; iv) topi privi dell'enzima FAAH. In aggiunta agli obiettivi originali del progetto, nel secondo anno abbiamo avuto l'opportunità di analizzare il profilo delle citochine di due diverse sottopopolazioni di cellule dendritiche (CD) umane, isolate dal sangue di soggetti sani o di pazienti affetti da SM.

RISULTATI

Nel primo anno del progetto abbiamo caratterizzato l'espressione genica e proteica dei principali componenti del SE nello striato di topi con ESA a diversi stadi di progressione della malattia. I nostri dati hanno mostrato un aumento significativo dei livelli di mRNA solo per la FAAH (l'enzima di degradazione dell'anandamide) durante la fase cronica della malattia, ed una lieve alterazione delle altre componenti del SE a livello proteico. È interessante sottolineare che i risultati hanno dimostrato che il SE non è alterato nella fase di esordio della malattia. Successivamente, le analisi biochimiche sono state eseguite su animali ESA geneticamente modificati. I dati hanno mostrato una riorganizzazione degli elementi del SE striatale dipendente dall'espressione dei recettori CB₁. In particolare, abbiamo trovato un incremento del TRPV1 nei topi CB₁^{-/-} e Glu-CB₁^{-/-}, ma non nei GABA-CB₁^{-/-}. Inoltre, abbiamo rilevato un aumento dei livelli di mRNA dell'enzima FAAH e del recettore GPR55 nei topi CB₁^{-/-} rispetto agli animali

controllo (WT), mentre abbiamo misurato una diminuzione dell'espressione di questi elementi nei topi GABA-CB₁^{-/-} e Glu-CB₁^{-/-}.

Nel secondo anno di attività, i dati ottenuti dalle analisi delle citochine di due diverse sottopopolazioni di cellule dendritiche (CD) isolate dal sangue di soggetti sani e pazienti affetti da SM hanno rivelato uno scenario interessante, in cui le CD mieloidi (mCD) dei pazienti SM producono livelli significativamente più elevati di IL-12 e IL-6 rispetto ai controlli sani, mentre quelle plasmacitoidi (pCD) mostrano una capacità ridotta di produrre IFN- α . Abbiamo successivamente dimostrato che l'anandamide (AEA) è capace d'inibire la produzione di TNF- α , IL-12 e IL-6 dalle mCD isolate sia dai controlli sani che dai pazienti SM, mediante un meccanismo dipendente dal CB₂; invece, l'effetto immunosoppressivo dell'AEA sulle pCD risulta evidente nei soggetti sani, ma non nei pazienti affetti da SM. Considerato il diverso effetto dell'AEA nel modulare la produzione di citochine in ciascuna sottopopolazione di CD, abbiamo anche evidenziato che l'immunomodulazione dell'AEA avviene principalmente a livello di inibizione del rilascio di citochine piuttosto che di riduzione dell'espressione dei marcatori di attivazione. Va infine notato che le mCD e le pCD presentano livelli diversi di espressione genica di CB₂ e FAAH, solo quando isolate da pazienti affetti da SM.

Inoltre, sulla base di precedenti evidenze sperimentali, che hanno dimostrato un potenziamento della trasmissione sinaptica glutammatergica a livello dei neuroni striatali, e il ruolo modulatore fondamentale dei CB₁ su tale alterazione sinaptica, abbiamo condotto esperimenti elettrofisiologici per chiarire ulteriormente la funzione dei CB₁ nell'ESA.

In particolare, per valutare quale sottotipo di CB₁ fosse coinvolto nelle alterazioni pre e postsinaptiche indotte dall'ESA, abbiamo registrato le correnti eccitatorie postsinaptiche spontanee (sEPSCs) in topi selettivamente privi dei CB₁ a livello di neuroni GABAergici striatali e a livello dei neuroni glutammatergici corticali durante la fase acuta dell'ESA.

I nostri dati dimostrano che i CB₁ localizzati sui terminali GABAergici e glutammatergici sono coinvolti in maniera differente nelle alterazioni pre- e postsinaptiche della trasmissione glutammatergica.

Dopo l'induzione dell'ESA, infatti, i topi selettivamente privi di CB₁ sui neuroni GABAergici hanno presentato un più evidente incremento della durata delle sEPSC registrate da neuroni striatali, come da potenziamento postsinaptico della trasmissione glutammatergica. Il medesimo effetto è stato riscontrato anche in preparati striatali incubati in presenza di tumor necrosis factor.

Al contrario, le alterazioni della frequenza delle sEPSC indotte dall'ESA sono risultate potenziate solo in topi privi del CB₁ sui neuroni glutammatergici, indicando che questo specifico sottotipo di recettori modula gli effetti dell'infiammazione sul rilascio di glutammato.

I nostri risultati confermano, quindi, il coinvolgimento dei CB₁ nella patofisiologia dell'ESA, e suggeriscono che alterazioni della trasmissione sinaptica glutammatergica sia a livello presinaptico che postsinaptico concorrono alla realizzazione della neurodegenerazione su base eccitotossica tipica di questa patologia.

CONCLUSIONI

I nostri dati supportano un ruolo chiave per la FAAH nel controllo del tono endogeno (e quindi della sua attività biologica) dell'AEA nella SM. Infatti, la riduzione di questo enzima nello striato dei topi ESA correla con l'aumento dei livelli di AEA, e con le diverse risposte elettrofisiologiche nei topi con ablazione dei recettori CB₁ su terminazioni nervose selettive. Quindi, questi risultati possono riflettere un meccanismo adattativo finalizzato a limitare il danno neuronale. In accordo con i risultati ottenuti sul modello sperimentale, l'immunomodulazione differente delle mCD e delle pCD umane da parte dell'AEA si può attribuire ad un'alterata espressione della FAAH. Pertanto, i nostri risultati rappresentano una base per il disegno razionale di nuovi trattamenti farmacologici, orientati verso gli elementi del SE (soprattutto la FAAH) per poter rallentare il decorso della SM, esercitando un ruolo neuroprotettivo in aggiunta alla convenzionale azione immunomodulante. In questo modo la progressione di malattia viene limitata. Ciò potrebbe rivelarsi utile anche in altre patologie del sistema nervoso centrale in cui processi neurodegenerativi mediati dall'infiammazione svolgono un ruolo fondamentale.

Role of the endocannabinoid system in the neurodegenerative process of experimental multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The last few years have remarked the involvement of the endocannabinoid system (ECS) in the regulation of several aspects of human (patho)physiology, through the activation of cannabinoid and vanilloid receptors, and/or through non-receptor mediated actions. Increasing evidence supports the involvement of the ECS not only in the inflammatory process typical of multiple sclerosis (MS), but also in the neurodegeneration related to this disease. Our aim was to provide further details on the role of the ECS in experimental MS (namely experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), to see how the ECS modulates inflammatory neurodegeneration typical of this disorder, and to identify, within the ECS, new biomarkers to be used for MS diagnosis and follow-up. Additionally, we aim at identifying distinct elements of the same system as possible targets for novel immunomodulatory and neuroprotective therapies. In order to reach these aims, we performed on animal models biochemical studies, clinical evaluations and neurophysiological measures of synaptic transmission analyses, that allowed us to increase our understanding on the relationship between inflammation and degenerative damage, and to gain insights into modulation of MS pathophysiology by ECS. EAE was induced in mice lacking CB₁ receptors in all tissues, in mice with the selective ablation of CB₁ receptors on glutamate nerve terminals, in mice lacking CB₁ receptor only on GABAergic neuronal elements, as well as in mice lacking CB₂ receptors or TRPV1 receptors, and finally in mice lacking FAAH in all tissues or only at the periphery. In addition to the planned experimental activity, in the second year of this project we had the chance to also obtain blood samples from MS patients and healthy subjects, and to perform several studies on critical immune cells where we analyzed the cytokine profile of the dendritic cell (DC) subsets in MS pathogenesis.

RESULTS

During the first year of this project, we evaluated gene and protein expression of the main ECS elements, at presymptomatic, acute and chronic stages of MS progression. Our mRNA results in

striatum showed that only FAAH levels increased in EAE mice during the chronic phase of the disease, whereas all other ECS elements were slightly, but not significantly, modulated at translational level. Interestingly, none of ECS components was affected during the early phases of the disease. We next performed biochemical analyses in striatum obtained from wild-type (WT) and knock-out (KO) mice, affected by MS. Our mRNA results showed a different rearrangement of striatal ECS elements in EAE mice, depending on the expression of CB₁. In particular, we found an increase of TRPV1 in CB₁^{-/-} and Glu-CB₁^{-/-}, but not in GABA-CB₁^{-/-}. We also detected an increased mRNA of FAAH (the main responsible for AEA hydrolysis) and of GPR55 receptor in CB₁^{-/-} mice with respect to WT animals, but decreased mRNA of both elements in GABA-CB₁^{-/-} and Glu-CB₁^{-/-} EAE mice.

In the second year of research activity, data obtained from the analyses of cytokine profile of the dendritic cell (DC) subsets isolated from the blood samples of healthy subjects and MS patients, depicted an interesting scenario, where myeloid DC (mDC) from MS patients produced significantly higher levels of IL-12 and IL-6 compared to healthy subjects, whereas plasmacytoid DC (pDC) showed a reduced capacity to produce IFN- α . We next demonstrated that AEA was able to inhibit TNF- α , IL-12 and IL-6 production from mDC of both healthy subjects and MS patients, and that these effects were specifically mediated by CB₂. Instead, the immunosuppressive effect of AEA in pDC was only evident in healthy subjects, but not in MS patients. Given the distinct effect of AEA in modulating cytokine production in each DC subset, we also demonstrated that immunomodulation by AEA mainly occurred at the level of cytokine inhibition, rather than at that of downregulation of activation markers. Interestingly, mRNA analysis showed a different expression of CB₂ and FAAH in mDC and pDC of MS patients.

Furthermore, on the base of previous experimental evidences, revealing that EAE induces an enhancement of glutamate transmission of striatal neurons, and that CB₁ plays a fundamental modulatory role on these synaptic alterations, we performed elec-

trophysiological experiments aimed at better clarifying CB₁ function in EAE.

In particular, in order to investigate the CB₁ subset involved in the modulation of EAE-induced pre- and postsynaptic alterations, we recorded spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) in mice lacking CB₁ in forebrain GABAergic and in cortical glutamatergic neurons, respectively, during the acute phase of EAE.

Interestingly, our data demonstrated that CB₁ located on GABAergic and glutamatergic terminals are differentially involved in the pre- and postsynaptic alterations of glutamate transmission caused by EAE. After induction of EAE, mice selectively lacking CB₁ on GABAergic neurons showed exacerbated alterations of sEPSC duration in GABAergic striatal neurons, indicating a postsynaptic enhancement of glutamatergic transmission. This effect was also seen in striatal brain slices incubated with TNF α . On the other hand, EAE-induced alterations of corticostriatal sEPSC frequency were exacerbated only in mice lacking CB₁ on glutamatergic neurons, indicating that this subset of receptors controls the effects of inflammation on glutamate release.

Our results provided further evidence that CB₁ are involved in EAE pathophysiology, and suggested

that both pre- and postsynaptic alterations of glutamate transmission are necessary to drive excitotoxic neurodegeneration typical of this disorder.

CONCLUSIONS

Altogether, our findings support a key-role of FAAH in controlling the endogenous tone (and hence the biological activity) of AEA in MS. Indeed, the reduction of this enzyme in the striatum of EAE mice is paralleled by an increase of AEA levels, and hence by different electrophysiological responses in mutant mice lacking CB₁ on selected neurons. These events might reflect an adaptive mechanism aimed at limiting neuronal damage. In line with this, the distinct immunomodulation of mDC and pDC by AEA in MS patients is attributable to an altered expression of FAAH, thus affecting the endogenous tone and subsequent immunomodulatory activity of AEA on these cells. Therefore, the present findings might form the basis for the rational design of new ECS-oriented therapeutics, able to slow-down MS, exerting neuroprotective effect other than conventional immunomodulatory action, thus limiting disability progression. This might be helpful also in other disorders of central nervous system in which inflammation-driven neurodegeneration process plays a role.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Chiurchiù V, Cencioni MT, Bisicchia E, De Bardi M, Gasperini C, Borsellino G, Centonze D, Battistini L, Maccarrone M. Distinct modulation of human myeloid and plasmacytoid dendritic cells by anandamide in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2013;73:626-36.

Dainese E, De Fabritiis G, Sabatucci A, Oddi S, Angelucci CB, Di Pancrazio C, Giorgino T, Stanley N, Del Carlo M, Cravatt B, Maccarrone M. Membrane lipids are key-modulators of the endocannabinoid-hydrolase FAAH. *Biochem. J*. 2014;457:463-71.

Den Boon FS, Chameau P, Schaafsma-Zhao Q, van Aken W, Bari M, Oddi S, Kruse CG, Wadman WJ*, Werkman TR*, Maccarrone M*. Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:3534-9. *[Equally senior authors]

Rossi S, Sacchetti L, Napolitano F, De Chiara V, Motta C, Studer V, Musella A, Barbieri F, Bari M, Bernardi G, Maccarrone M, Usiello A, Centonze D. Interleukin-1 β causes anxiety by interacting with the endocannabinoid system. *J Neurosci*. 2012;32:13896-905.

Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Motta C, Studer V, Mori F, Musella A, Bergami A, Muzio L, Bernardi G, Battistini L, Martino G, Centonze D. Interleukin-1 β causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2012;71:76-83.

Musumeci G, Grasselli G, Rossi S, De Chiara V, Musella A, Motta C, Studer V, Bernardi G, Haji N, Sepman H, Fresegna D, Maccarrone M, Mandolesi G, Centonze D. Transient receptor potential vanilloid 1 channels modulate the synaptic effects of TNF- α and of IL-1 β in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis*. 2011;43:669-77.

Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Muzio L, Musella A, Motta C, Studer V, Cavasinni F, Bernardi G, Martino G, Cravatt BF, Lutz B, Maccarrone M, Centonze D. Cannabinoid CB1 receptors regulate neuronal TNF α effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 2011;25:1242-8.

Maccarrone M, Rossi S, Battista N, Studer V, Motta C, Di Tommaso M, Bari M, De Chiara V, Centonze D. Role of the Endocannabinoid System in the Neurodegenerative Process of Experimental Multiple Sclerosis. *FISM Scientific Congress, Rome, May 25-26, 2011*.

Maccarrone M, Chiurchiù V, Cencioni MT, Bisicchia E, Lanuti M, Fezza F, Centonze D, Luca Battistini L and Rossi S. Role of the Endocannabinoid System in Authentic and Experimental Multiple Sclerosis. *FISM, Scientific Congress Rome, May 30-31, 2012*.

Maccarrone M, Chiurchiù V, Cencioni MT, Lanuti M, Fezza F, Centonze D, Luca Battistini L and Rossi S. Role of the Endocannabinoid System in the Neurodegenerative Process of Experimental Multiple Sclerosis. *FISM Scientific Congress, Rome, May 29-30, 2013*.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2010 per un periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 130.000 €

Rosetta Pedotti

Unità di Neuroimmunologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano

COLLABORATORI:

Mohamad Abou-Hamdan, Silvia Musio, Massimo Costanza

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Gianfranco Balboni, Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università di Cagliari, Cagliari

Pietro Luigi Poliani, Dipartimento di Patologia, Università of Brescia, Ospedali Civili of Brescia, Brescia

Lawrence Steinman, Department of Neurology and Neurological Sciences, Stanford University, Stanford, CA, USA

Gabriela Constantin, Dipartimento di Patologia, Università di Verona, Verona

Il sistema delle prokineticine nelle malattie demielinizzanti autoimmuni del sistema nervoso centrale: meccanismi patogenetici e possibili nuovi bersagli di terapia per la sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La patogenesi della sclerosi multipla (SM), una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC) che colpisce giovani adulti, non è ancora del tutto chiarita, e il successo terapeutico per questa malattia è limitato. È quindi necessario trovare terapie più efficaci per la SM, e possibilmente una cura definitiva.

Le prokineticine sono due piccole proteine scoperte di recente, prokineticina-1 (PK-1) e prokineticina-2 (PK-2). Ampiamente espresse in diversi tessuti, queste molecole sono coinvolte in un ampio spettro di funzioni biologiche, tra cui la modulazione della risposta immunitaria. In particolare PK-2, molto espressa nei tessuti infiammati, può indurre attivazione e migrazione di cellule immunitarie chiamate macrofagi, e agire sui linfociti T promuovendo l'infiammazione.

Le proprietà immunomodulatorie delle prokineticine rendono queste molecole particolarmente interessanti da studiare nella SM e nel suo modello animale, l'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), dato il ben noto squilibrio tra le risposte proinfiammatorie Th1/Th17 e anti-infiammatorie Th2 in queste malattie, che sono invece associate a risposte Th1 e Th17 contro la mielina del SNC. Lo scopo

del nostro progetto era di investigare il ruolo di queste proteine nella patogenesi dell'infiammazione e della demielinizzazione nel SNC durante la SM, utilizzando l'ESA. Questo studio è stato finanziato dalla FISM come un progetto pilota di un anno al fine di confermare i nostri risultati preliminari che suggerivano che il blocco dei recettori per le prokineticine fosse terapeutico nell'ESA.

RISULTATI

Il finanziamento pilota ottenuto dalla FISM è stato molto importante per portare avanti il progetto di ricerca proposto. Con l'aiuto di questo finanziamento siamo riusciti ad ottenere i reagenti e gli animali necessari per i nostri esperimenti, e partecipare a congressi per presentare i dati di questo progetto e per interagire con persone del campo della neuroinfiammazione e della SM che ci hanno dato importanti *feedback* sul progetto. Nel lavoro condotto crediamo di essere riusciti a confermare i nostri risultati preliminari sul ruolo delle prokineticine nell'ESA, che ci permetteranno di portare avanti il nostro progetto e di verificare l'eventualità che le prokineticine possano essere un nuovo target terapeutico nella SM. La ricerca che abbiamo condotto può essere riassunta come segue.

Abbiamo studiato l'espressione di PK-2 e dei suoi recettori nelle cellule linfonodali ottenute da topi *naïve* o topi con ESA. I linfonodi sono noti per essere un sito di *priming* dei linfociti T autoreattivi che attaccano la mielina del SNC durante lo sviluppo dell'ESA. Nel nostro lavoro, abbiamo usato il modello murino di ESA cronico indotto con la glicoproteina *myelin oligodendrocyte 35-55* (MOG₃₅₋₅₅). L'espressione di PK-2 non era rilevabile nelle cellule linfonodali di topi *naïve*. Tuttavia, PK-2 era significativamente aumentato nelle cellule linfonodali durante le fasi di "*priming*" di ESA e dello sviluppo dei sintomi neurologici della malattia. I recettori per PK-2 sono stati entrambi espressi nelle cellule linfonodali di topi *naïve*. Nelle cellule linfonodali di topi con ESA, l'espressione di PK-R1 non era cambiata, mentre quella di PK-R2 è stata significativamente ridotta. Abbiamo misurato anche le concentrazioni delle proteina PK-2 nel siero di topi con ESA e osservato un significativo aumento di PK-2 rispetto ai topi *naïve*. Successivamente abbiamo studiato il ruolo di PK-2 in ESA interferendo farmacologicamente su PK2 e i suoi recettori. Abbiamo utilizzato negli studi ESA il PC-7, un potente antagonista non peptidico dei recettori delle prokineticine, che blocca preferenzialmente PK-R1. Topi con ESA cronica sono stati trattati con iniezioni quotidiane di PC7, oppure solo con soluzione fisiologica (controllo). Abbiamo osservato una significativa riduzione di espressione di ESA in topi trattati con PC7 rispetto ai topi di controllo. In seguito, abbiamo esaminato se l'antagonista PC7 poteva ridurre la gravità della malattia in un altro modello di sperimentale. Abbiamo usato il modello murino di ESA recidivante-re-

mittente indotto con *myelin proteolipid protein 139-151* (PLP₁₃₉₋₁₅₁). Il trattamento con PC7 ha significativamente ridotto la gravità della malattia anche in questo modello.

La riduzione di espressione della malattia in topi con ESA trattati con l'antagonista PC7 era accompagnata da un'alterazione dell'attivazione delle cellule T e della regolazione delle cellule Th. Per entrambi i modelli di ESA, cronica e recidivante-remittente, abbiamo esaminato la risposta specifica delle cellule linfonodali alla stimolazione con il peptide usato per l'immunizzazione. Le cellule linfonodali dei topi ESA trattati con PC7 mostravano una proliferazione cellulare ridotta rispetto a quelli di controllo. Inoltre, la secrezione di citochine proinfiammatorie, IFN- γ e IL-17A, era ridotta, mentre quella della citochina soppressiva IL-10 era aumentata nelle cellule linfonodali di topi trattati con PC7, rispetto a quelle dei topi di controllo. Questi risultati dimostrano che il blocco di PK-Rs induce un'importante modulazione delle risposte delle cellule T e compromette nel complesso lo sviluppo di risposte pro-infiammatorie contro la mielina del SNC in due modelli murini di ESA. Questo deterioramento è coerente con la riduzione della gravità della malattia osservata in entrambi i modelli di EAE dopo il trattamento con PC7.

CONCLUSIONI

Questi dati supportano significativamente l'ipotesi che la prokineticina-2 e i suoi recettori abbiano un ruolo importante nel modello sperimentale di SM. Sulla base dei dati ottenuti il progetto è stato finanziato da FISM per altri due anni.

The prokineticin system in autoimmune demyelinating disease of the central nervous system: pathogenetic mechanisms and possible novel target of therapy for human multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The pathogenesis of multiple sclerosis (MS) is still not completely understood, and the success of immune intervention in this disease is limited. Thus, tremendous clinical need exists for more effective, and fundamentally curative, therapies for MS. Prokineticins are relatively newly discovered secreted proteins. They comprise two distinct small molecules, prokineticin 1 (PK-1) and prokineticin 2

(PK-2). Prokineticins are widely expressed in different tissues and involved in a wide spectrum of biological and pathological functions. Recently they were found to modulate the immune response. In particular PK-2, highly expressed in inflamed tissues, can induce macrophage activation and migration, and can act on lymphocytes T to promote inflammation. The immune-modulating properties of prokineticins make these novel molecules particu-

larly interesting to be studied in MS and in its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), given the well known imbalance between Th1 and Th2 responses in these diseases, where Th1 and Th17 responses against CNS myelin play a crucial role.

The aim of our project was to investigate the role of prokineticins in the pathogenesis of CNS inflammation and demyelination of multiple sclerosis by using the animal model EAE. This project was funded from FISM as a one-year pilot grant in order to confirm the observed our preliminary results that blocking the receptors for Prokineticins was beneficial in EAE.

RESULTS

The one-year pilot grant received from FISM has been a very important funding to perform our studies and to develop the project. With the help of this grant, we have been able to obtain the needed reagents and animals to carry on the different experiments, and participate to meetings to either present the data of the project or interact with people of the field of neuroinflammation and MS that gave important feedbacks and suggestions on this research. We trust that in the work performed we confirmed our preliminary results about the role of prokineticins in EAE. This work will permit us to carry on our project, which has been funded from FISM for another two years. The research that we performed can be summarized as follows.

We evaluated the expression of PK-2 and its receptors in lymph node cells (LNC) of mice with EAE and naïve mice. Lymph nodes are known to be a site for priming of lymphocyte T targeting self-antigens of the CNS during the development of EAE. We used the chronic mouse model of EAE induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55 (MOG₃₅₋₅₅). The expression of PK-2 was undetectable in LNC of naïve mice. However, PK-2 expression was significantly increased in LNC during the priming phase of EAE and onset of neurological symptoms.

The receptors for PK-2 were both expressed in naïve LNC. While the expression of PK-R1 did not change in LNC during EAE, that of PK-R2 was dramatically reduced during EAE. We measured also by ELISA the concentrations of PK-2 protein in the sera of mice with EAE and observed a significant increase of PK-2 compared with naïve mice. Next we investigated the potential role of PK-2 in CNS demyelinating disease by pharmacological interfering with PK2 and PK2 receptors. We used in EAE studies the antagonist PC-7, a potent nonpeptidic PK-Rs antagonist that blocks preferentially PK-R1. We treated mice with chronic-EAE with daily intraperitoneal injections of PC7 (0.5 mg/kg/day). As controls, mice were treated with vehicle alone. Treatment with PC7 significantly reduced the clinical expression of chronic EAE. We next examined whether PK-Rs antagonism with PC7 was effective in reducing disease severity in a different EAE model. We used the relapsing-remitting mouse model of EAE induced with Myelin Proteolipid Protein 139-151 (PLP₁₃₉₋₁₅₁). Treatment with PC7 significantly reduced disease severity and CNS inflammation also in this model.

This reduction of the disease expression observed in EAE mice treated with PC7 were accompanied by an alteration of T cell activation and Th regulation. Indeed, LNC from animals treated with PC7 displayed a significantly reduced proliferation in response to peptide-stimulation if compared with mice treated with the vehicle alone. Moreover, in LNC of PC7-treated mice the secretion of proinflammatory cytokines (i.e. IFN- γ and IL-17A) was reduced, while that of the suppressor cytokine IL-10 was increased compared with vehicle treated mice.

CONCLUSIONS

Taken together, these data strongly support the hypothesis of an important role for prokineticin-2 and its receptors in the pathobiology of EAE, the experimental model of multiple sclerosis. Based on these data the research project has been funded from FISM for other two years.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Bosticardo M[§], Silvia Musio[§], Elena Fontana, Stefano Angiari, Elena Draghici, Gabriela Constantin, Pietro Luigi Poliani, Rosetta Pedotti * and Anna Villa *. Development of central nervous system autoimmunity is impaired in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein. PLoS One. 2014 Jan 23;9(1):e86942. [§] *Equal contribution as first authors* * *Equal contribution as last authors*.

Costanza M, Musio S, Abou-Hamdan M, Binart N, Pedotti R. Prolactin Is Not Required for the Development of Severe Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Immunology. 2013 Sep 1;191(5):2082-8.

Pedotti R, Musio M, Scabeni S, Farina C, Poliani PL, Colombo E, Costanza M, Berzi A, Castellucci F, Ciusani E, Confalonieri P, Hemmer B, Mantegazza R, Antozzi C. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis by passive transfer of IgG antibodies from a multiple sclerosis patient responsive to immunoadsorption. Journal of Neuroimmunology 2013 Sep 15;262(1-2):19-26.

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

Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Negri L, Poliani PL, Farina C, Balboni GF, Pedotti R. The Prokineticin system in EAE: possible novel target for immune intervention. XXIII AINI Congress (Associazione Italiana Neuroimmunologia), 22 September 2012, Milan – Italy.

Pedotti R, Abou-Hamdan M, Costanza M, Fontana E, Di Dario M, Musio S, Congiu C, Onnis V, Negri L, Poliani PL, Farina C, Balboni GF. The Prokineticin system in EAE: possible novel target for immune intervention. Congresso Scientifico Annuale FISM 29-30 May 2013 Roma, Italy,

Abou-Hamdan M, Costanza M, Musio S, Fontana E, Pokiani PL, Balboni GF, Pedotti R. The Prokineticin system in EAE: possible novel target for immune intervention. XI ISNI Congress (International Congress of Neuroimmunology), 4-8 Novembre 2012, Boston – USA.

Abou-Hamdan M, Costanza M, Musio S, Fontana E, Pokiani PL, Balboni GF, Pedotti R. The Prokineticin system in EAE: possible novel target for immune intervention. XXII AINI Congress (Associazione Italiana Neuroimmunologia), 26-29 September 2012, Catania-Italy.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Carlo Avolio

Dipartimento Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia, Foggia

COLLABORATORI:

Maria Blonda, Roberta Grasso, Luigi Maria Specchio

Recettore purinergico P2X7 su monociti di pazienti con sclerosi multipla ed effetti degli attuali trattamenti immunomodulanti per la malattia

PREMESSE E OBIETTIVI

L'ATP, la più comune fonte di energia del metabolismo cellulare, ed i suoi recettori sono certamente coinvolti nel processo infiammatorio. In particolare, il recettore P2X7 (P2X7R) si suppone giochi un ruolo importante nella funzione dei macrofagi, cellule dell'infiammazione con funzione di fagocitosi e di presentazione dell'antigene, regolando la produzione di citochine ed i meccanismi di morte cellulare. Poiché l'espressione di P2X7R è incrementata durante l'infiammazione, suoi antagonisti potrebbero possibilmente agire come nuovi agenti antiinfiammatori. Evidenze sperimentali mostrano che il P2X7R è certamente coinvolto nel processo patologico della Sclerosi Multipla (SM). Abbiamo per questo pianificato di studiare l'espressione del recettore P2X7, della citochina IL-1beta (prodotta dall'attivazione del recettore) e dell'enzima CD39 (capace di distruggere ATP e dunque ridurre lo stimolo del recettore) su monociti di sangue periferico, cellule con proprietà simili ai macrofagi, in pazienti con SM e in una popolazione di controllo e di seguito vedere se gli effetti terapeutici del Glatiramer Acetate (GA) e dell'Interferon beta (IFNB), i due farmaci immunomodulanti di prima linea registrati per il trattamento della malattia, possano essere mediati da meccanismi che interferiscano con dette molecole.

RISULTATI

Abbiamo condotto sia uno studio *in vitro* che *in vivo*. Studio *in vitro*. Dodici pazienti con SM a decorso recidivante-remittente e liberi da trattamento sono stati selezionati e prelevati per ottenere monociti di sangue periferico. Si è studiata (mediante PCR) sui monociti l'espressione di P2X7R, IL-1beta e CD39 e, successivamente, gli effetti *in vitro* di GA su detta espressione. Nella stessa maniera sono stati studiati 10 donatori sani.

Studio *in vivo*. A cinque pazienti con SM veniva iniziata terapia con GA e i monociti venivano prelevati al pretrattamento, a 3 e 12 mesi di trattamento per studiarne l'espressione di P2X7R, IL-1beta e CD39. Ancora a 6 pazienti veniva iniziata terapia con IFNB (Rebif44) e a 4 con natalizumab (Tysabri) e nella stessa maniera venivano studiati i monociti ricavati al pretrattamento, a 3 e 6 mesi.

Abbiamo osservato che, sia *in vitro* che *in vivo*, i monociti sia di pazienti che di donatori sani esprimevano P2X7R, IL-1beta e CD39 e che sia il GA che altri trattamenti correnti per la malattia sembravano interferire con detta espressione.

In vitro, abbiamo osservato che il GA riduceva l'espressione di P2X7R e IL-1beta su monociti stimolati con ATP sia di pazienti che di donatori sani laddove l'espressione di CD39 tendeva ad incrementare. Sulla base di questi risultati potevamo concludere che il GA era in grado di contrastare gli effetti proinfiammatori di P2X7R mentre era forse in grado di indurre una via regolatoria (CD39) che specificamente demolisce ATP consentendo così di abolire lo stimolo del recettore P2X7.

I risultati dello studio *in vivo* erano per lo più in linea con quelli dello studio *in vitro*. Infatti, i pazienti mostravano un decremento di espressione monocitaria di P2X7 e IL-1beta dopo 12 mesi di trattamento. Anche il CD39 decrementava a 12 mesi di trattamento, comportandosi così in maniera differente in corso di GA se confrontato al dato *in vitro* e per questo fornendo evidenze contro un possibile ruolo regolatore evidenziato *in vitro*. Volendo interpretare questa discrepanza, una decrementata espressione potrebbe essere dovuta al fatto che P2X7R non aveva bisogno di essere protetto da ATP poiché già sotto-espresso esso stesso.

In entrambi i casi il piccolo numero di pazienti certamente rappresentava un limite dello studio al fine

di delineare chiare conclusioni che per questo necessitano di essere confermate su una più ampia popolazione di pazienti.

CONCLUSIONI

I monociti sia di pazienti con SM che donatori sani esprimono P2X7R insieme con IL-1beta e CD39. L'immunomodulazione da parte di GA sembra interferire con l'espressione di P2X7R ma anche con IL-1beta e CD39 su monociti sia di SM che di donatori sani. Non erano indotti fenomeni di morte cellulare nelle colture di monociti da parte del GA e dunque gli effetti osservati sembrano rappresentare effetti netti del GA.

Per il fatto che sono stati ottenuti risultati simili con altri due trattamenti immunomodulanti per la SM, quali IFNB e Natalizumab, un meccanismo d'azione sull'apparato di P2X7R può essere ipotizzato da parte di differenti trattamenti immunomodulanti. Uno studio più sistematico di dette espressioni su monociti di sangue periferico su una coorte più ampia di pazienti che assumono detti trattamenti potrebbe auspicabilmente fornire tale risposta. Questo appare rilevante dal momento che una possibile migliore comprensione dei meccanismi d'azione dei farmaci attualmente in uso potrebbe migliorare la qualità della scelta terapeutica per ogni singolo paziente.

P2X7 purinergic receptor on monocytes of patients with multiple sclerosis and effects of current immune treatments of the disease

INTRODUCTION AND AIMS

ATP represents the main source of energy for the cellular metabolism and its receptors are certainly involved in the inflammatory process. Especially the P2X7 receptor (P2X7R) is supposed to have a main role in the macrophage functions, inflammation cells with capacity of phagocytosis and antigen presentation, regulating cytokine production and cell death mechanisms. Since P2X7R expression is increased during inflammation, its antagonists may possibly act as new anti-inflammatory agents. Experimental evidences show that P2X7R is certainly involved in the Multiple Sclerosis (MS) pathological process. We have therefore planned to study P2X7R, IL-1beta (a cytokine produced by the receptor activation) and CD39 (an enzyme able to destroy the ATP and therefore to reduce the receptor stimulation) expression on peripheral blood monocytes, cells with properties similar to macrophages, from MS patients and healthy donors and to see thereafter whether therapeutical effects of Glatiramer Acetate (GA) and Interferon beta (IFNB), the two first line approved drugs for MS, may be possibly mediated by mechanisms interfering with such molecules.

RESULTS

We performed both an *in vitro* and *in vivo* study. *In vitro* study. Twelve relapsing-remitting and treatment-free MS patients have been selected and pe-

ripheral blood monocytes have been obtained. We investigated (by PCR) the expression of P2X7R, IL-1beta and CD39 on monocytes and, following, the *in vitro* effects of GA on such expression. Ten healthy donors (HDs) were similarly investigated.

In vivo study. Five MS patients were given GA therapy and monocytes were obtained before, at 3 and 12 months of treatment in order to study the expression of the P2X7R, IL-1beta and CD39. Moreover, six MS patients were given IFNB (Rebif44) and four Natalizumab (Tysabri) and monocytes obtained before, at 3 and 6 months of treatment were similarly studied.

We observed that, either *in vitro* or *in vivo*, monocytes from both MS and control subjects expressed P2X7R, IL-1beta and CD39, and GA as well as other current MS therapies seem to interfere with such expression.

In vitro, we observed that GA downregulated P2X7R and IL-1beta expression in both MS and HDs ATP-stimulated cultured monocytes whereas CD39 trended to be upregulated. Based on these results we concluded that GA was able to contrast the P2X7R-mediated proinflammatory effect while it was possibly able to induce a regulatory pattern (CD39) that specifically hydrolyses ATP so allowing the P2X7R stimulation to terminate.

In vivo results were mostly in line with those *in vitro*. In fact, patients showed a decrease in monocyte P2X7R and IL-1beta expression after 12 months of

GA treatment. CD39 decreased in expression after 12 months as well, so it behaved differently *in vivo* under GA compared to *in vitro*, therefore providing evidence against a possible regulatory role shown *in vitro*. Interpreting this discrepancy, the decreased expression could maybe due because P2X7R would no longer need to be protected from ATP since it was downexpressed itself.

In both cases the small number of patients certainly represented a limitation of the present study in order to draw clear conclusions that therefore need to be confirmed in a wider population of patients.

CONCLUSIONS

Monocytes either from MS or controls express P2X7R, together with IL-1beta and CD39. GA immune modulation seems to interfere with the P2X7R

but also with IL-1beta and CD39 expression on monocytes of both patients and controls. No cell death phenomena are induced on cultured monocytes by GA conditioning, therefore the observed changes seem to represent a GA net effect. Because of the similar results obtained with other two immunomodulatory treatments for MS, such as IFNB and Natalizumab, a mechanism of action on the P2X7R machinery by different immunomodulatory treatments in MS might be speculated. A more systematic study of such expression on peripheral blood monocytes of a larger cohort of patients assuming such treatments may hopefully provide such a response. This appears to be relevant since possibly to better understand the mechanisms of action of the current drugs may improve the therapeutic choice for each single patient.

Paola Tirassa

Istituto di Biologia Cellulare & Neurobiologia, CNR, Roma

COLLABORATORI:

Mattia Maccarone, Valentina Carito, Sara De Nicolò, Marco Fiore

Il nerve growth factor somministrato in forma di collirio in un modello animale di sclerosi multipla: uno studio prospettico sul trattamento durante le fasi precoci della malattia

PREMESSE E OBIETTIVI

La somministrazione di *nerve growth factor* (NGF) o il trapianto di cellule in grado di produrre NGF nel cervello ha dimostrato essere in grado di ridurre la progressione patologica nel modello animale di SM, cioè l'encefalite sperimentale allergica (ESA), supportando e prospettando l'uso terapeutico del NGF. Malgrado le premesse sperimentali, l'invasività delle procedure chirurgiche per inoculare NGF nel cervello rimane di difficile applicazione nei pazienti con SM che necessiterebbero di un continuo o ripetuto trattamento durante il corso della loro vita. Strategie alternative per innalzare i livelli di NGF endogeno o facilitarne la penetrazione nel cervello appaiono quindi più applicabili.

Lavorando in collaborazione con medici oculisti, il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato la capacità del NGF somministrato come collirio (c-NGF) di stimolare il recupero del danno strutturale e funzionale in pazienti affetti da patologie oculari. Nei modelli animali è stato dimostrato che il c-NGF agisce sulla retina ed il nervo ottico, ed è in grado di stimolare l'attività neuronale nel cervello ed esercitare un'azione trofica e neuroprotettiva.

Lo scopo del nostro progetto è stato di validare l'efficacia di questo nuovo e non invasivo mezzo di somministrazione del NGF nell'ESA con il principale obiettivo di raccogliere informazioni utili agli studi pre-clinici e clinici per il trattamento della SM con NGF umano ricombinante o molecole mimetiche.

Per raggiungere questo obiettivo, il progetto – finanziato come progetto pilota – ha avuto lo scopo di studiare gli effetti della somministrazione di c-NGF sullo sviluppo e la progressione della forma monofasica di ESA in ratti del ceppo Lewis, che è il modello sperimentale indicato per lo sviluppo di sostanze che contrastino la fase infiammatoria acuta della malattia.

In analogia con i precedenti studi sugli effetti della somministrazione cerebrale di NGF, i nostri esperimenti sono stati focalizzati sugli effetti della reazione immunitaria nel cervello durante il picco infiammatorio della ESA che normalmente interviene durante le prime due settimane dopo l'induzione.

RISULTATI

I dati mostrano che il trattamento con c-NGF altera il corso della ESA limitandone le manifestazioni cliniche. Infatti, a differenza degli animali trattati con c-NGF, i ratti con ESA non trattati mostrano una riduzione del peso corporeo ed una precoce atassia che culmina nella paralisi degli arti entro 15 giorni dall'induzione della patologia. Anche i livelli di ansia risultano elevati nei ratti non trattati, mentre nessuna alterazione comportamentale è osservabile nei ratti a cui è stato somministrato c-NGF.

In accordo con l'andamento dei segni clinici, i risultati dell'analisi istologica e biochimica dei tessuti cerebrali indicano una diminuzione dell'infiammazione a seguito del trattamento con c-NGF. Infatti, mentre i tessuti cerebrali dei ratti ESA non trattati mostrano un'intensa concentrazione di cellule macrofagiche e leucocitarie in particolare nel cervelletto, nella regione del setto e dell'ippocampo e nelle aree periventricolari del terzo e quarto ventricolo cerebrale, in quelli dei ratti trattati con c-NGF si osserva una limitata distribuzione degli infiltrati infiammatori.

L'analisi, mediante tecniche di Elisa e Western blot, dell'espressione dei marcatori di attività delle cellule immunitarie e degli endoteli vasali nelle aree cerebrali del cervelletto, dell'ippocampo e della corteccia frontale confermano i dati istologici. Inoltre, utilizzando dei test che contemporaneamente analizzano 8 citochine, è stato osservato che nelle regioni come il cervelletto dove si ha la massima infiammazione, il c-NGF è in grado di contrastare l'induzione di TNF,

IFN γ e dei marcatori di attivazione dell'endotelio vasale. Nessun effetto così significativo è stato evidenziato nell'ippocampo, dove comunque l'ESA produce un innalzamento delle citochine suggerendo una diversa attività del c-NGF nelle aree cerebrali.

Nelle nostre condizioni sperimentali non sono stati osservati chiari segni di demielinizzazione nel cervello dei ratti ESA così come nei ratti trattati con c-NGF. Ma, a differenza di questi ultimi, negli ESA si osserva una significativa diminuzione del marcatore degli oligodendrociti nel cervelletto, nell'ippocampo ed in altre aree del prosencefalo, inclusa la regione subventricolare (SVZ) e dorso laterale dei ventricoli laterali, conosciuta come una delle aree generative del cervello. Nella SVZ, comparati agli animali sani ed a quelli trattati con c-NGF, i ratti ESA mostrano diminuzione delle cellule neuroblastiche ed un aumento delle cellule immature e mature che esprimono marcatori degli astrociti. Questi dati sono in linea con l'idea che le fasi precoci della ESA non sono caratterizzate da demielinizzazione nel cervello e suggeriscono una compromissione degli oligodendrociti e dei precursori neuronali che potrebbero quindi rappresentare dei bersagli del trattamento con c-NGF.

CONCLUSIONI

I nostri dati indicano che il trattamento oculare con NGF è in grado di alterare lo sviluppo dell'ESA molto probabilmente contrastando l'infiammazione cerebrale che favorisce la neurodegenerazione anche interferendo con i processi di neurogenesi e remielinizzazione.

Sono necessari ulteriori studi per consolidare ed approfondire questi risultati ed identificare i meccanismi di azione e/o le cellule responsive al c-NGF nel cervello ESA a differenti stadi della patologia.

I risultati di questo e di studi futuri possono aiutare a caratterizzare marcatori prognostici ed individuare efficaci finestre di trattamento degli stati precoci della SM. In particolare, la possibile applicazione del trattamento con collirio NGF per la terapia della neurite ottica e del deficit visivo nella SM potrebbe essere di notevole rilevanza per migliorare la qualità di vita delle persone con SM.

Il recente sviluppo della forma ricombinante umana di NGF, che rappresenta la *condicio sine qua non* per l'applicazione clinica, lascia immaginare un futuro non così lontano per l'uso di NGF umano nei trials clinici.

Nerve growth factor given as eye drops in the animal model of multiple sclerosis: a prospective study of treatment in early stage of disease

INTRODUCTION AND AIMS

Nerve Growth Factor (NGF) administration or transplantation of NGF-producing cells in the brain has proved to reduce disease progression in animal models of experimental allergic encephalitis (EAE) supporting and prospecting the NGF use in the treatment of multiple sclerosis (MS). In spite of the experimental promise, the invasiveness of the surgical procedure to injected NGF in brain is unlikely to be feasible in patients who might need early, repeated and/or continuous treatment during their life. Alternative strategies for enhancing endogenous NGF or facilitate NGF penetration in brain appear therefore more attractive.

Recently, working in collaboration with clinicians, we have demonstrated that NGF applied as eye drops (eNGF) stimulates tissue repair and functional recovery in patients with ocular pathologies. In animal models, eNGF has proved to act both at the retinal

and post-retinal visual pathway levels, exerts reparative effects in brain visual areas and forebrain, and stimulates the neuronal and behavioral functions.

Scope of our project was to validate the efficacy of this novel safe and not invasive route of NGF administration in EAE with the main objective to provide information to support the preclinical/clinical studies using human recombinant NGF or NGF mimetic drugs as new agents for the treatment of MS patients.

To achieve this objective, the project - funded as pilot study - was addressed to validate the efficacy of eNGF treatment to influence disease development in a model of monophasic acute EAE in adult female Lewis rats, which is suggested for drug discovery directed against acute inflammatory processes.

In analogy with our previous evidences on the intracerebral NGF injection in EAE, the experiments were focused on inflammatory-mediated events in brain

at the peak of inflammatory phase of disease, normally occurring two weeks after disease induction.

RESULTS

The data show that eNGF treatment affects the EAE course by limiting its clinical manifestations. Indeed, at variance with the other experimental rat groups, EAE rats show body weight reductions, manifest ataxia early after induction and rich the limb paralysis. A different trend is observable in EAE rats receiving NGF, which show ataxia and limp tail later than EAE rats and no paralysis. No signs of ataxia or paralysis were reported in Control rats also receiving NGF.

EAE group also show a significant increase of anxiety, while a behavioural recovery is notable in EAE+NGF rats, which behaved similar to Control groups without manifest anxiety. No behavioural changes were reported in healthy rats receiving ocular NGF.

In accordance with the clinical manifestations, both the histological and biochemical data indicate reduced signs of inflammation in brain of EAE rats treated with eyeNGF. A limited amount of immune infiltrates were detectable in the brain of EAE+NGF rats when compared to EAE rats, which show many macrophages and CD8-CD4 cells in the parenchyma and vascular proximity particularly in cerebellum, septo-hippocampal area and periventricular zones (III and IV ventricles). No inflammation was observed in brain areas of control healthy rats, also after NGF treatment.

The expression of inflammatory markers for immune and vassal endothelial cells in different brain areas, such as the hippocampus, the cerebellum, and the frontal cortex - analyzed by Western blot and Elisa techniques - confirm the histological observations, showing that eNGF is able to reduce the effects of EAE-induced inflammation in cerebellum and hippocampus, but not in the Frontal cortex.

Further, using a multi assay detecting contemporaneously eight cytokines to profile the immune reaction, it was observed that in the cerebellum - which is the most inflamed brain area in our experimental con-

dition - eNGF counteracts the EAE-induced enhancement of TNF, IFN γ , IL1 β , Rantes and MIP expression supporting an involvement of vassal endothelium activation. No recovery or changes were observed in the hippocampus of EAE+NGF rats, suggesting a regional specific response to the treatment.

Although no clear sign of demyelination were observed, decreased expression of NG2 oligodendrocyte marker was noted in the Cerebellum and Forebrain of EAE rats but not in EAE+NGF. Reduced NG2 cell distribution was also observed in dorso-lateral corner of the lateral ventricle, of EAE rats compared to control and eNGF groups. In the same area, the confocal studies show a decreased presence of neuroblasts and an increase of mature and immature cells committed versus the glia phenotypes in EAE rats, respect to the healthy and EAE+NGF rats. Confirming previous investigations, these results suggest that demyelination is not featuring the early stage of monophasic EAE, but that oligodendrocytes and/or immature brain cells might be affected, and therefore represent a targets for the eNGF treatment.

CONCLUSIONS

eNGF is able to affect the disease development most probably by contrasting the brain inflammatory events, which favour the white and grey matter degeneration also by interfering with neurogenesis and re-myelination. New experiments are going to be performed to consolidate the obtained results and identify the mechanism of action and the cell targets of the eNGF in the EAE brain at the different disease stages.

The results might be relevant to individuate prognostic markers and select efficacy windows for treatment in early stages of MS. In particular, the eventual use of eye drop NGF to treat optic neuritis and visual impairment occurring in MS might be of extreme relevance to decrease the life discomfort in patients. The recent development of human NGF recombinant, which is a *condicio sine qua non* to endorse the clinical applications, lead to speculate a not so far human NGF availability for clinical trials.



NEURORIABILITAZIONE E NEUROPLASTICITÀ

Pasquina Marzola

Dipartimento di Informatica, Università di Verona, Verona

COLLABORATORI:

Pietro Bontempi, Dipartimento di Informatica, Università di Verona, Verona

Stefano Tambalo Silvia Fiorini, Andrea Sbarbati, Dipartimento di Scienze Neurologiche e del Movimento, Università di Verona, Verona

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Guido Cavaletti, Roberta Rigolio, Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale, Università di Milano Bicocca, Milano

Imaging funzionale nello studio della plasticità neuronale in un modello sperimentale di sclerosi multipla su ratto

PREMESSE E OBIETTIVI

L'encefalomielite sperimentale autoimmune (abbreviata con ESA) rappresenta un modello affidabile per la forma cronico-progressiva della sclerosi multipla ed è stata ampiamente studiata tramite tecniche convenzionali di Risonanza Magnetica (RM). Sorprendentemente le moderne tecniche di RM funzionale, che permettono di mappare in modo non invasivo le aree attivate durante un certo stimolo, non sono ancora state utilizzate nell'ESA. Questo nonostante una ampia letteratura clinica abbia dimostrato come la RM funzionale fornisca importanti informazioni circa la riorganizzazione corticale e/o la risposta alle terapie. Il principale scopo di questo studio è stato quello di definire ed ottimizzare protocolli di RM funzionale per studiare la plasticità cerebrale in ratti con ESA e di studiare la possibile correlazione con esami patologici.

RISULTATI

In questo progetto abbiamo applicato la tecnica di RM funzionale con stimolazione somatosensoriale della zampa anteriore destra e studiato le alterazioni nella risposta funzionale in ratti con ESA cronica. Ab-

biamo dimostrato, per la prima volta in letteratura, che la risposta corticale evocata è fortemente alterata nei cervelli di ratto con ESA, rispetto ai controlli. Sia a 30 che a 60 giorni dopo l'induzione di ESA, la RM funzionale ha mostrato un forte aumento del volume attivato coinvolgendo anche la corteccia ipsilaterale alla zampa stimolata ed alcune aree extra-corticali.

CONCLUSIONI

In questo studio è stato dimostrato, per la prima volta ed utilizzando la tecnica non invasiva di RM funzionale, che la plasticità corticale è osservabile nel modello sperimentale di ESA, uno dei modelli animali più usati nella sclerosi multipla. Questo lavoro rappresenta un primo tentativo di definire un modello sperimentale affidabile per studiare la plasticità cerebrale che si riscontra nei pazienti. Abbiamo definito uno strumento che potrà essere utilizzato come un indicatore sensibile ed innovativo dell'efficacia terapeutica negli studi preclinici. Rappresentando una piattaforma innovativa per testare nuovi farmaci, il metodo proposto potrebbe migliorare, sebbene a lungo termine, la qualità della vita delle persone con sclerosi multipla.

Functional MRI to study brain plasticity in an experimental model of MS in rats

INTRODUCTION AND AIMS

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) represents a reliable model of chronic-progressive variant of multiple sclerosis (MS) and has been extensively characterized by conventional magnetic resonance imaging (MRI) techniques. Modern MRI techniques, as functional MRI (fMRI), allowing non-invasive mapping of the cerebral areas activated during a certain stimulus have not been used yet in EAE, regardless of wide clinical evidence that fMRI provides important information about cortical reorganization and/or response to a given therapy.

The major aim of the present study was to design and optimize fMRI protocols to study brain plasticity in rats affected by chronic EAE and to investigate the possible correlation between brain damage, as observed by ex vivo examinations, and brain plasticity.

RESULTS

In the present work we have applied fMRI techniques with somatosensory stimulation of the right forepaw and investigated the alterations in function-

al response that occur in rats with chronic EAE. We demonstrate for the first time that the evoked cortical activation is strongly altered in EAE rat brain, compared to controls. At both 30 and 60 after EAE induction, fMRI showed a strong increase in the activated volume compared to the pre-induction value involving also the cortex ipsilateral to the stimulated forelimb and some extra-cortical areas.

CONCLUSIONS

We have demonstrated that cortical plasticity does occur in EAE, one of the most widely used animal models for MS, for the first time by using the non-invasive fMRI technique. This work represents the first attempt to define a reliable experimental model to dissect the brain plasticity phenomenon occurring in MS patients. Moreover such a tool could be also used as a sensitive and innovative indicator of therapeutic intervention in preclinical studies. As an innovative platform for testing the efficacy of new drug efficacy, the method developed could improve, although in the long term, the quality of life of patients with multiple sclerosis.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Tambalo S, Fiorini S, Rigolio R, Sbarbati A, Pluchino S, Marmioli P, Cavaletti G, Marzola P, Functional magnetic resonance imaging reveals brain cortex remodeling in a rat model of chronic multiple sclerosis, ISMRM Italian Chapter, Annual Meeting, Perugia 24-25 Ottobre 2013

Rigolio R, Tambalo S, Fiorini S, Sbarbati A, Marmioli P, Pluchino S, Cavaletti G, Marzola P, Functional Magnetic Resonance Imaging reveals brain cortex remodeling in a rat model of chronic multiple sclerosis. *Manuscript in preparation.*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 50.000 €

Paolo Calabresi

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

COLLABORATORI:

Massimiliano Di Filippo, Paola Sarchielli, Cinzia Costa, Davide Chiasserini, Antonio de Iure, Alessandro Tozzi, Michela Tantucci, Cristiano Spaccatini

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Francesca R. Fusco, Carmela Giampà, IRCCS Fondazione S. Lucia, Roma

Uno studio elettrofisiologico dei meccanismi di alterata plasticità sinaptica in modelli sperimentali di sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Nella sclerosi multipla (SM) i fenomeni di plasticità cerebrale potrebbero giocare un ruolo cruciale. In corso di SM, la plasticità cerebrale può essere mediata da diversi processi, come ad esempio le forme di plasticità sinaptica a lungo termine, la formazione di nuove terminazioni sinaptiche ed infine la modulazione e la variazione dell'espressione dei canali ionici di membrana. Questi fenomeni potrebbero ridurre le conseguenze funzionali legate alle lesioni cerebrali in corso di SM, prevenendone o limitandone l'espressione clinica. Il potenziale plastico cerebrale è soprattutto correlato all'abilità delle sinapsi neuronali di modificare a lungo termine la loro capacità di trasmettere informazioni, un processo chiamato "long-term potentiation" (LTP). Come parte di un Progetto Pilota FISM 2010, il nostro gruppo aveva già studiato, utilizzando tecniche di elettrofisiologia sperimentale (registrazioni extracellulari di potenziali di campo o "*field potentials*"), l'abilità delle sinapsi eccitatorie ippocampali di esprimere LTP durante la fase di acuta della malattia, in un modello sperimentale di sclerosi multipla (ESA, encefalite autoimmune sperimentale). Oltre alle indagini elettrofisiologiche, erano state indagate le possibili alterazioni molecolari (come le variazioni di composizione del recettore glutammatergico NMDA e l'aumentata espressione di citochine pro-infiammatorie) associate all'alterazione della plasticità sinaptica, sempre nello stesso modello sperimentale. I principali risultati ottenuti durante il Progetto FISM 2010 evidenziavano come la plasticità sinaptica sia conservata negli animali di controllo, ma sia alterata nell'ippocampo dei topi con ESA. In particolare nei topi affetti da ESA, il deficit del po-

tenziamento post-sinaptico (LTP) osservato nell'ippocampo è risultato essere associato ad una selettiva iper-espressione di interleuchina-1- β ed al riarrangiamento del recettore glutammatergico NMDA, in particolare alla riduzione della subunità NR2B. Pertanto, l'obiettivo del Progetto 2011 è stato quello di approfondire i risultati ottenuti nel precedente anno, continuando lo studio elettrofisiologico delle principali forme di plasticità sinaptica, LTP e LTD, nel modello sperimentale di sclerosi multipla. Tale studio è stato effettuato in due differenti strutture cerebrali, l'ippocampo ed il nucleo striato. Sono stati inoltre indagati i meccanismi potenzialmente alla base dell'alterata plasticità sinaptica ippocampale, ponendo particolare attenzione al possibile ruolo svolto nel processo infiammatorio centrale dalla microglia attivata. Inoltre, la plasticità sinaptica è stata studiata non solo durante la fase acuta della malattia, ma anche durante la fase di remissione clinica, dopo la risoluzione dei deficit motori correlati all'ESA.

RISULTATI

Durante il Progetto FISM 2011 abbiamo utilizzato la tecnica elettrofisiologica del "patch-clamp" per registrare l'attività elettrica dei singoli neuroni nell'area CA1 dell'ippocampo, in topi affetti da ESA. Le registrazioni sono state effettuate per confermare i dati ottenuti precedentemente con la tecnica extracellulare di registrazione dei potenziali di campo ("*field potentials*"). Le registrazioni sono state effettuate sia durante la fase acuta, che durante la remissione clinica dell'ESA. Da questo studio è emerso che il potenziamento sinaptico a lungo termine (LTP) è significativamente ridotto nei neuroni dei topi affetti

da ESA, rispetto ai controlli sani (controllo 174 ± 19 %; ESA 120 ± 3 %, $P < 0.001$). Inoltre, è stato possibile dimostrare che l'alterazione dell'LTP nei neuroni ippocampali persiste anche durante la fase di remissione clinica del modello sperimentale, quando non sono presenti manifesti deficit neurologici. Infatti, l'LTP registrato nei neuroni ippocampali dei topi affetti da ESA in fase di remissione è risultato significativamente ridotto rispetto a quello osservato nei controlli sani (controllo 174 ± 19 %; ESA in remissione 128 ± 3 %; $P < 0.001$). Al fine di analizzare i possibili meccanismi legati alla perdita della fisiologica plasticità sinaptica abbiamo effettuato, con la collaborazione del gruppo di ricerca della Professoressa Fusco (IRCCS, Fondazione S. Lucia), un'analisi immunoistochimica, per verificare se il deficit di plasticità sinaptica fosse associato ad una concomitante attivazione microgliale nell'ippocampo. Da tale analisi è emerso come nell'ippocampo dei controlli sani ($n=4$) era presente solo una popolazione quiescente e sparsa di cellule microgliali, a fronte di un'intensa reazione microgliale, con aspetti di attivazione cellulare come arborizzazioni ed aumento del volume citoplasmatico ($P < 0.005$) nell'ippocampo dei topi affetti da ESA ($n=4$). Abbiamo pertanto somministrato ad un gruppo di animali affetti da ESA la minociclina, un inibitore dell'attivazione microgliale. La somministrazione di minociclina per via peritoneale (alla dose di 50 mg/kg due volte al giorno per i primi due giorni, una volta al giorno fino al settimo giorno, seguita da una somministrazione giornaliera di 25mg/kg per i successivi giorni) si è dimostrata in grado di ripristinare la plasticità sinaptica a livello ippocampale. Infatti il potenziamento sinaptico registrato a livello ippocampale nei topi affetti da ESA dopo trattamento con minociclina, non era significativamente ridotto rispetto ai controlli sani (controllo 172.8 ± 15.68 %; ESA trattato con minociclina 156.7 ± 9.5 %; n.s.). Infine abbiamo verificato se l'alterazione della plasticità sinaptica osservata in ippocampo fosse presente anche in altre aree cerebrali durante il corso della malattia nel modello sperimentale ESA. In particolare è stata effettuata un'analisi elettrofisiologica dell'attività sinaptica dei neuroni del nucleo striato, una struttura particolarmente coinvolta da processi neurodegenerativi durante la SM. A questo livello è stata valutata la capacità delle sinapsi dei neuroni spinosi striatali di sviluppare una depressione della loro attività a lungo termine (depressione a lungo termine, LTD). Come risultato delle registrazioni di "patch clamp" è emerso come la capacità di esprimere LTD dei neuroni spinosi striatali di topi affetti da ESA (durante la fase acuta della malattia), non sia significativamente differente da quella osservata nei controlli sani (controllo 32.7 ± 6 %; ESA 34.9 ± 7.5 %; $P > 0.05$).

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati ottenuti confermano la presenza di un'alterazione della plasticità sinaptica ippocampale durante la fase acuta di malattia del modello ESA. Questo dato, già descritto con registrazioni extracellulari di potenziali di campo, è stato ora confermato con l'utilizzo della tecnica di registrazione "patch clamp" su singola cellula, in particolare valutando la capacità delle cellule ippocampali di sviluppare potenziamento sinaptico a lungo termine (LTP). È stata così rinforzata l'evidenza che le cellule ippocampali, durante il decorso della malattia in un modello sperimentale di SM, perdono la loro capacità di esprimere questa forma di plasticità a lungo termine. Questo è un risultato di particolare rilevanza, considerando che la perdita della plasticità neuronale può essere determinante nel ridurre la capacità cerebrale di fronteggiare il danno infiammatorio durante il decorso della SM. Inoltre, dato che il potenziamento post sinaptico rappresenta un meccanismo possibilmente alla base della memoria e delle funzioni cognitive, un danno alla plasticità potrebbe spiegare la frequente presenza di un deficit cognitivo nei pazienti con SM, ed il suo rapporto con la neuroinfiammazione. Infatti un'intensa reazione microgliale è stata osservata nell'ippocampo dei topi affetti da ESA. La microglia attivata è in grado di secernere molte molecole immuni, che si sono dimostrate in grado di influenzare i processi di plasticità sinaptica, come l'interleuchina-1- β . Per questo si può ipotizzare come la presenza di una reazione microgliale abbia un ruolo centrale nel processo che porta al deficit plastico neuronale. In accordo con ciò, dal nostro studio emerge come l'utilizzo di farmaci che inibiscono l'attivazione microgliale (minociclina) sia in grado di ripristinare e prevenire il danno sinaptico ippocampale. Da ultimo è importante sottolineare come il deficit dei meccanismi di plasticità sinaptica sia stato osservato anche durante la fase di remissione clinica della SM sperimentale, quando nessun deficit neurologico era evidente nell'animale. Questo risultato sperimentale ha due importanti implicazioni. Come prima cosa, suggerisce che il processo patologico che danneggia la plasticità sinaptica permane a quel livello anche dopo la risoluzione clinica della fase acuta. È possibile ipotizzare che, in assenza di deficit motori nella fase di remissione, il danno sinaptico ippocampale possa essere invece associato ad un'alterazione nella sfera cognitiva. Infine, lo studio della funzione sinaptica a livello del nucleo striato ha rivelato come la principale forma di plasticità a questo livello (LTD) non sia alterata durante la fase acuta della malattia sperimentale. Questo può indicare come le alterazioni della pla-

sticità sinaptica durante il decorso della malattia siano struttura-specifiche.

I meccanismi della plasticità sinaptica hanno la capacità di prendere parte ai processi riparativi cerebrali ed al perfezionamento dei circuiti neuronali. I risultati ottenuti in questo studio rafforzano l'ipotesi secondo

cui il deficit della plasticità sinaptica giochi un ruolo nel modello sperimentale di SM. Gli studi futuri dovranno focalizzarsi su quali possibili strategie possano essere utilizzate per contrastare il danno a carico della plasticità, al fine di avere un nuovo approccio terapeutico contro la progressione della malattia.

An electrophysiological study of the mechanisms of synaptic plasticity impairment in experimental multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

A large amount of evidence suggests the potentially crucial role of neuroplasticity processes in multiple sclerosis (MS). During MS, functional brain plasticity may be mediated by various processes, such as long-term forms of synaptic plasticity, new synapses formation and ion channel redistribution and may reduce the functional consequences of MS lesions, preventing or limiting the clinical expression of the symptoms. The plastic potential of the brain is based on the ability of the synapses to undergo long-term changes in the efficacy of synaptic transmission, such as long-term potentiation (LTP). As a part of a 2010 FISM Pilot Project, we investigated, by utilizing electrophysiological techniques (field potential extracellular recordings) the ability of hippocampal excitatory synapses to undergo LTP during the acute relapse of an experimental model of MS (chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE,) and the molecular alterations (modifications of NMDA receptor subunit composition and overexpression of pro-inflammatory cytokines) associated with synaptic plasticity impairment in experimental MS. The main results obtained during the 2010 FISM PROJECT suggested that synaptic plasticity was normal in control mice but impaired in the hippocampus of EAE mice. In EAE mice the LTP deficit was found to be associated with a selective overexpression of interleukin-1- β and with the rearrangement of NMDA glutamate receptors (selective reduction of the NR2B subunit) in the hippocampus. Thus, the aim of the 2011 project, as a prosecution of the 2010 Project, was to continue to investigate, by utilizing experimental electrophysiological techniques, the ability of excitatory synapses to undergo the main forms of synaptic plasticity, named LTP and LTD. In

particular, we investigated synaptic plasticity in two different neural structures (hippocampus and striatum) during the course of EAE and the potential mechanisms underlying their impairment, with particular regard to the role played by activated microglial cells. Moreover, we investigated the presence of synaptic plasticity abnormalities not only during the acute disease relapse but also during the remission phase of the experimental disease, after the resolution of EAE-associated motor deficits.

RESULTS

During the 2011 FISM project we performed patch clamp electrophysiological recordings of hippocampal neurons in the CA1 area of relapsing EAE mice, in order to confirm the data previously obtained with field potential electrophysiological recordings on the presence of abnormalities in the induction of long-term potentiation (LTP) in this specific neuronal population, that is crucial for cognitive and memory mechanisms. These specific experiments have been performed in order to have a more precise electrophysiological analysis of the observed deficit in synaptic plasticity and to compare it with the electrophysiological parameters recorded with the same technique in another neural structure (the striatum) and in another stage of the experimental disease (remission phase). Interestingly, LTP recorded in neurons from EAE was significantly reduced with respect to that observed in neurons from control animals (control 174 ± 19 %; EAE 120 ± 3 %, $P < 0.001$). We also investigated if the alteration of CA1 hippocampal LTP persists in the remission phase of the experimental disease, when no apparent neurological deficits are visible. The results of patch-clamp electrophysiological experi-

ments suggest that also in the remission phase of EAE, hippocampal LTP is altered. Indeed, hippocampal CA1 LTP recorded in neurons from remitting EAE mice was significantly reduced with respect to that observed in neurons from controls (control $174 \pm 19\%$; EAE in remission phase $128 \pm 3\%$; $P < 0.001$). In order to analyse the potential mechanisms underlying the loss of physiological plasticity at hippocampal synapses we performed, in collaboration with the group of Professor Fusco in Rome (IRCCS S Lucia Foundation), an immunohistochemical analysis, to explore if the alteration in hippocampal synaptic plasticity observed in the hippocampi of EAE mice was associated with an activation of microglia, the CNS resident immune cells. We found that only scattered, quiescent microglia was observed in the healthy control mice experimental group ($n = 4$). Conversely, during EAE ($n = 4$) an intense microglial reaction was observed with numerous microglial cells showing coarse arborizations and enlarged cell bodies ($P < 0.005$). Interestingly, the intraperitoneal treatment with the inhibitor of microglial activation minocycline (50 mg/kg twice a day for the first 2 days, once daily for the next 5 days, followed by 25 mg/kg once daily for the subsequent days) was found to be able to restore synaptic plasticity in the hippocampus. Hippocampal CA1 LTP recorded in neurons from minocycline-treated EAE mice was not significantly reduced with respect to that recorded in neurons from controls (control $172.8 \pm 15.68\%$; m.t. EAE $156.7 \pm 9.5\%$; n.s.). Finally, we investigated if an alteration of synaptic plasticity also exists in another neural structure during the course of EAE. In particular, we investigated synaptic plasticity in the nucleus striatum, a subcortical brain structure particularly prone to develop neurodegenerative changes during the course of MS. In particular, we investigated the presence of alterations of long-term depression (LTD) in striatal medium spiny neurons (MSNs). In striatal spiny neurons recorded from EAE mice during the acute clinical attack (clinical score 3-4) with patch clamp techniques, the HFS protocol induced a LTD of $34.9 \pm 7.5\%$, that was not significantly different from the LTD observed in control mice ($32.7 \pm 6\%$, $P > 0.05$).

CONCLUSIONS

In conclusion the main results obtained suggest that the presence of an altered synaptic LTP in hippocampal neurons of EAE mice during the first neurological attack, already described with electrophysiological field potential recordings, is

confirmed by single cell patch clamp recordings. This evidence strengthens the observation that during the course of experimental MS, excitatory synapses in the CA1 region of the hippocampus lose their physiological ability to express this specific form of long-term plasticity. This result is of particular relevance. Indeed, the impairment of long-term synaptic plasticity associated with clinical disease may exert a deleterious effect on the long-term ability of the EAE/MS brain to cope with inflammatory injuries. Moreover, since LTP represents a widely-accepted synaptic model of memory and cognitive functions, its impairment could represent a molecular contributing factor explaining the high prevalence of MS-associated cognitive dysfunction and their close relation with active neuroinflammation. Interestingly, the presence of activated microglia in the hippocampus of EAE mice was found to be associated with the LTP deficit. Activated microglia is able to release many immune molecules that are known to influence synaptic plasticity, such as interleukin 1-beta. Thus, it is possible to hypothesize that the presence of an activated microglia may represent a cause of the observed deficit in synaptic plasticity. Accordingly, the results of our experiments demonstrate that the inhibition of microglial activation prevents hippocampal synaptic plasticity deficits. Interestingly, the hippocampal LTP deficit was found to persist in the remission phase of EAE, when no apparent motor deficits are present. This experimental result has two main implications. First of all, the synaptic alteration (LTP impairment) is also evident when no apparent neurological deficit are present, suggesting that the pathological process persists at the synaptic site even after the clinical resolution of the acute relapse. Second, it is possible to hypothesize that even if no motor deficits are observed in the remission phase of the experimental disease, the LTP deficit at hippocampal synapses may be associated with cognitive alterations. Finally, we found that the main form of synaptic plasticity in the nucleus striatum is not altered during EAE. These results suggest that the alteration of synaptic plasticity occurring during the course of experimental MS might be structure-specific.

Synaptic plasticity mechanisms have the potential to participate to repair mechanisms in the brain and to refine neuronal circuits. The obtained results strengthen the possible pathogenetic role played by synaptic plasticity alterations in experimental MS, suggesting that future studies may investigate in detail strategies aimed to counteract synaptic abnormalities with therapeutic potential.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Di Filippo M, Chiasserini D, Gardoni F, Viviani B, Tozzi A, Giampà C, Costa C, Tantucci M, Zianni E, Boraso M, Siliquini S, de Iure A, Ghiglieri V, Colcelli E, Baker D, Sarchielli P, Fusco FR, Di Luca M, Calabresi P. Effects of central and peripheral inflammation on hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiol Dis.* 2013 Apr;52:229-36.

Di Filippo M., de Iure A, Giampà C, Ghiglieri V, Tozzi A, Tantucci M, Costa C, Sarchielli P, Fusco FR, Calabresi P. Microglia drives cognitive and synaptic dysfunction in experimental multiple sclerosis. In preparation.

Di Filippo M. Effect of central inflammation on synaptic plasticity. IX Convegno Nazionale SINDEM, 13-15 Marzo 2014, Firenze.

Di Filippo M, Chiasserini D, Gardoni F, Viviani B, Tozzi A, Costa C, Tantucci M, Zianni E, Boraso M, Siliquini S, De Iure A, Baker D, Di Luca M, Sarchielli P, Calabresi P. Hippocampal synaptic plasticity is impaired in both experimental multiple sclerosis and systemic inflammation XLIII Congress of the Italian Neurological Society (Rimini, 2012).

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2011 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 35.000 €

Franca Tecchio

Laboratory of Electrophysiology for Translational neuroscience (LET'S)–ISTC–CNR,
Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale Fatebenefratelli, Roma

COLLABORATORI:

Andrea Cancelli, Carlo Cottone

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Filippo Carducci, Sapienza Università di Roma, Roma

Maria Filippi, Marina Di Giorgio, Domenico Lupoi, Ospedale Fatebenefratelli, Roma

Dorian Landi, Anna Ghazaryan, Università Campus Bio-Medico di Roma, Roma

Patrizio Pasqualetti, Paolo M. Rossini, Giancarlo Zito, Associazione Fatebenefratelli
per la Ricerca (AFaR)

Alberto Priori, Roberta Ferrucci, Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico

Alleviare la fatica nella sclerosi multipla: un intervento con stimolazione transcranica in corrente continua (studi FaMuSNe e FaReMuS DiCDiT)

PREMESSE E OBIETTIVI

La fatica è un sintomo frequente e altamente invalidante nella sclerosi multipla, con grave impatto sulla vita quotidiana dei soggetti sin dalle prime fasi della malattia. Precedenti risultati raccolti da progetti di ricerca concessi dalla FISM al nostro laboratorio (progetti FaMuS-e FaMuSNeP) indicano che modelli di connettività alterata all'interno del sistema sensorimotorio, specie coinvolgenti le reti parieto-frontali, giocano un ruolo patogenetico rilevante nella fatica legata alla SM. Pazienti con un minimo deficit neurologico [punteggio EDSS (Extended Disability Status Scale) < 3,5], in fase di remissione ed affaticati [punteggio MFIS (Modified Fatigue Impact Scale > 15] sono stati sottoposti a stimolazione transcranica con corrente anodica diretta (tDCS) in uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato verso *sham* (ovvero un controllo con falsa stimolazione). Sono stati arruolati 18 pazienti sottoposti ad un ciclo iniziale di cinque giorni di trattamento con tDCS (1,5 mA d'intensità, durata 15 minuti) in corrispondenza della corteccia somatosensoriale primaria bilaterale, che interessa la proiezione dell'intera rappresentazione del corpo (elettrodo S1wb personalizzato, 10 pazienti), oppure delle aree sensorimotorie dedicate al controllo del movimento volontario delle mani (elettrodo SM1h standard ,7x5 cm², 8 pazienti). Per stimolare S1wb, abbiamo sviluppato una procedura non inva-

siva, sia per modellare che per posizionare un elettrodo personalizzato sulla proiezione di S1 sullo scalp di ciascun individuo, derivata dalle immagini di risonanza magnetica ad alta risoluzione del cervello. Abbiamo valutato la fatica dei pazienti con scale fisica e totale della MFIS (MFIS Phys finali totali). I punteggi MFIS sono stati raccolti prima del tDCS (T0), alla fine di un ciclo di trattamento di 5 giorni (T1), e quattro (T4) ed otto (T8) settimane dopo, in accordo alla scala MFIS che si riferisce alle ultime 4 settimane.

In mancanza di dati definitivi dalla letteratura circa la possibile durata degli effetti del nostro trattamento tDCS, abbiamo raccolto MFIS ogni 4 settimane, oltre T8 per verificare che un valore simile a quello di riferimento (definito come la differenza rispetto al basale < 50% del T1-T0 differenza) fosse raggiunto prima di indirizzare i pazienti alla seconda sessione (cioè assicurare la scomparsa dell'effetto del primo trattamento tDCS).

Per testare le modifiche di eccitabilità corticale indotte dall'intervento tDCS di 5 giorni e l'eventuale associazione a cambiamenti della sensazione di fatica, sono stati registrati i potenziali motori evocati (MEP) da stimolazione magnetica transcranica (TMS) e i potenziali evocati somatosensoriali (SEP) valutati con elettroencefalografia (EEG) durante la stimolazione galvanica del nervo mediano.

RISULTATI

L'affaticamento è risultato ridotto di circa il 25% dopo tDCS reale, mentre l'affaticamento non si modificava con la stimolazione *sham*.

Abbiamo anche osservato un aumento bilaterale dell'eccitabilità di M1 misurata dall'aumento di ampiezza del MEP ($p=0,073$), con un incremento del 38% del livello basale solo dopo stimolo reale. Non sono stati rilevati cambiamenti di ampiezza del potenziale N20 del SEP. Da notare inoltre l'incremento dell'eccitabilità di M1 correlata alla riduzione dei punteggi MFIS (r di Pearson=-0,728, $p=.022$).

La procedura di neuromodulazione personalizzata proposta selettivamente su S1 bilaterale è in grado

di modificare l'eccitabilità corticale in associazione con il sollievo da fatica.

CONCLUSIONI

I nostri risultati supportano il concetto che gli interventi capaci di modificare gli equilibri tra le attività di reti neuronali all'interno del sistema sensomotorio possono costituire un valido trattamento non farmacologico della fatica correlata alla SM.

Questi risultati migliorano la comprensione dei meccanismi patogenetici della fatica lamentata dalle persone con SM, e pongono le basi per terapie non farmacologiche efficaci, da utilizzare anche a casa.

Fatigue relief in multiple sclerosis by neuromodulation: a transcranial direct current stimulation intervention [FaMuSNe & FaReMuS DiCDiT]

INTRODUCTION AND AIMS

Fatigue is a frequent and highly disabling symptom in multiple sclerosis, severely impacting patients' daily lives from the early stages of the condition. Previous findings gathered from research projects granted by FISM to our lab (projects FaMuS and FaMuSNeP) indicate that altered connectivity patterns within the sensorimotor system, especially involving the parieto-frontal networks, play a relevant pathogenic role in MS-related fatigue. Patients with minimal neurological deficit (Extended Disability Status Scale, EDSS < 3.5), in remission phase and experiencing fatigue (physical items score of the Modified Fatigue Impact Scale MFIS > 15) received sham (false) or real anodal transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) in a randomized, double blind, sham-controlled study. Five-day tDCS treatment (1.5 mA intensity, 15 min duration) was applied in 18 patients on bilateral primary somatosensory cortices covering either the whole body representation (personalized S1wb, 10 patients) or sensorimotor areas devoted to the hand control (standard 7x5 cm² SM1h, 8 patients). To target S1wb, we implemented a non-invasive procedure to shape and position a personalized electrode on the individual S1 strip derived by high-resolution brain magnetic resonance images.

We assessed patients' fatigue through the physical and total items of MFIS (Total end Phys). The MFIS

scores were collected before tDCS (T0), at the end of 5-day treatment cycle (T1) and at four (T4) and eight (T8) weeks later, according to MFIS (referring to the past 4 weeks). Since no definitive data about the possible effects of our tDCS treatment could be retrieved from the literature, we collected MFIS every 4 weeks even after T8 to check that a value similar to the baseline (defined as a difference from baseline < 50% of the T1-T0 difference) was reached before directing patients to the second session (i.e. ensuring an effective washout of the first tDCS treatment effect).

To test for the excitability changes induced by the 5-day tDCS intervention at cortical level and whether they were associated to fatigue symptoms' changes, motor potentials evoked (MEP) by transcranial magnetic stimulation (TMS) and somatosensory evoked potentials (SEP) assessed by electroencephalography (EEG) during galvanic median nerve stimulation were collected.

RESULTS

The real neuromodulation reduced fatigue by about 25%, which did not change after accounting for the sham. We also observed an increase of bilateral M1 excitability measured by MEP amplitude increase (Stimulation*Time $p=.073$), with a 38% increase of the baseline level after Real stimulation only. No

changes of N20 SEP amplitude were detected. Noteworthy, the increase of M1 excitability correlated with the reduction of MFIS (Pearson's $r=-.728$, $p=.022$).

The proposed personalized neuromodulation procedure selectively targeting bilateral S1 is able to modify the cortical excitability in association with fatigue relief.

CONCLUSIONS

Present results support the concept that interventions capable of modifying the balances among neuronal network activities within the sensorimotor system could be a suitable non-pharmacological treatment of MS-related fatigue. Our results strongly point towards the finding of new strategies to understand either the pathogenic mechanisms beneath the fatigue complained by patients with MS and to lay the groundwork to develop easy and affordable devices to be used by the patients at home to treat it.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Zito G, Luders E, Tomasevic L, Lupoi D, Toga AW, Thompson PM, Rossini PM, Filippi MM, Tecchio F. Interhemispheric functional connectivity changes with corpus callosum morphology in multiple sclerosis. *Neuroscience*. 2014 Jan 28. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.039.

Giambattistelli F, Tomasevic L, Pellegrino G, Porcaro C, Melgari JM, Rossini PM, Tecchio F. The spontaneous fluctuation of the excitability of a single node modulates the internodes connectivity: A TMS-EEG study. *Hum Brain Mapp*. 2013 doi: 10.1002/hbm.22288.

Ferrucci R, Priori A. Transcranial cerebellar direct current stimulation(tcDCS): Motor control, cognition, learning and emotions. *Neuroimage*. 2013; doi:pii: S1053-8119(13)00490-4. 10.1016/j.neuroimage.2013.04.122.

Spitoni GF, Pireddu G, Cimmino RL, Galati G, Priori A, Lavidor M, Jacobson L, Pizzamiglio L. Right but not left angular gyrus modulates the metric component of the mental body representation: a tDCS study. *Exp Brain Res*. 2013;228(1):63-72. doi: 10.1007/s00221-013-3538-9.

Bocci T, Caleo M, Tognazzi S, Francini N, Briscese L, Maffei L, Rossi S, Priori A, Sartucci F. Evidence for metaplasticity in the human visual cortex. *J Neural Transm*. 2013 Oct 27.

Ferrucci R, Brunoni AR, Parazzini M, Vergari M, Rossi E, Fumagalli M, Mameli F, Rosa M, Giannicola G, Zago S, Priori A. Modulating human procedural learning by cerebellar transcranial direct current stimulation. *Cerebellum*. 2013;12(4):485-92. doi: 10.1007/s12311-012-0436-9.

Parazzini M, Rossi E, Ferrucci R, Liorni I, Priori A, Ravazzani P. Modelling the electric field and the current density generated by cerebellar transcranial DC stimulation in humans. *Clin Neurophysiol*. 2013 Oct 28. doi:pii: S1388-2457(13)01105-X 10.1016/j.clinph.2013.09.039.

Tecchio F, Cancelli A, Cottone C, Tomasevic L, Devigus B, Zito G, Ercolani M, Carducci F. Regional personalized electrodes to select transcranial current stimulation target. *Front Hum Neurosci*. 2013 Apr 22;7:131. doi: 10.3389/fnhum.2013.00131.

Brunoni AR, Boggio PS, Ferrucci R, Priori A, Fregni F. Transcranial direct current stimulation: challenges, opportunities, and impact on psychiatry and neurorehabilitation. *Front Psychiatry*. 2013 Mar 27;4:19. doi:10.3389/fpsy.2013.00019

Tecchio F, Assenza G, Zappasodi F, Mariani S, Salustri C, Squitti R. Glutamate-mediated primary somatosensory cortex excitability correlated with circulating copper and ceruloplasmin. *Int J Alzheimers Dis*. 2011; 292593. doi: 10.4061/2011/292593.

Porcaro C, Coppola G, Pierelli F, Seri S, Di Lorenzo G, Tomasevic L, Salustri C, Tecchio F. Multiple frequency functional connectivity in the hand somatosensory network: an EEG study. *Clin Neurophysiol* 2013 doi:pii:S1388-2457(12)00798-5. 10.1016/j.clinph.2012.12.004.

Cottone C*, Tomasevic L*, Porcaro C, Filligoi G, Tecchio F. Physiological Aging Impacts the Hemispheric Balances of Resting State Primary Somatosensory Activities. *Brain Topogr*. 2013; 26: 186-1990

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; 19:334-43 www.aism.it/index.aspx?codpage=2012_07_ricerca_fatica

Cerasa A, Bilotta E, Augimeri A, Cherubini A, Pantano P, Zito G, Lanza P, Valentino P, Gioia MC, Quattrone A. A Cellular Neural Network methodology for the automated segmentation of multiple sclerosis lesions. *J Neurosci Methods* 2011; doi:10.1016/j.jneumeth.2011.08.047

Cancelli A, Cottone C, Tomasevic L, Zito G, Devigus B, Pasqualetti P, Tecchio F. "Inhibitory vs. excitatory neuromodulation by regional personalized electrodes", submitted.

Cancelli A, Cottone C, Tomasevic L, Zito G, Devigus B, Pasqualetti P, Tecchio F. "Inhibitory vs. excitatory neuromodulation by regional personalized electrodes". Congresso SISMEC, Sapienza - Università di Roma Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo Facciali, 25-28 settembre 2013.

Cancelli A, Cottone C, Tomasevic L, Zito G, Devigus B, Pasqualetti P, Tecchio F. "Inhibitory vs. excitatory neuromodulation by regional personalized electrodes". Workshop "Non-invasive Electrical Brain Stimulation, Basic and Applied Research, Brescia, 30 settembre 2013.

Cancelli A, Carducci F, Cottone C, Cogiamanian F, Devigus B, Di Giorgio M, Ferrucci R, Filippi M, Ghazaryan A, Landi D, Lupoi D, Pasqualetti P, Porcaro C, Priori A, Rango M, Rossini PM, Salustri C, Squitti R, Tomasevic L, Tecchio F. Ventriglia MC, Zito G. "Fatigue Relief in Multiple Sclerosis by transcranial Direct Current stimulation (tDCS): can we Differentiate stimulation Targets within the primary sensorimotor cortices?", Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 29 -30 maggio 2013.

Cancelli A, Carducci F, Cottone C, Cogiamanian F, Devigus B, Di Giorgio M, Ferrucci R, Filippi M, Ghazaryan A, Landi D, Lupoi D, Pasqualetti P, Porcaro C, Priori A, Rango M, Rossini PM, Salustri C, Squitti R, Tomasevic L, Tecchio F. MC Ventriglia, G Zito. "Fatigue Relief in Multiple Sclerosis by Neuromodulation: a transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Intervention", Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 29 -30 maggio 2013.

Progetto di ricerca finanziato nel 2010 per il periodo di 1 anno (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 30.000 €
&
Progetto di ricerca finanziato nel 2011 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 24.000 €

Valentina Tomassini

Institute of Psychological Medicine and Clinical Neurosciences, School of Medicine, University Hospital of Wales, Cardiff, UK & Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia

COLLABORATORI:

Emilia Sbardella, Nikolaos Petsas, Fondazione Santa Lucia, Roma

Valentina Bianchi, Laura Leonardi, Carlo Pozzilli, Ospedale Sant'Andrea, Sapienza Università di Roma, Roma

Valutazione dell'immaginazione motoria e degli effetti della pratica mentale di un compito motorio in pazienti con sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Nonostante i recenti progressi terapeutici nella prevenzione della disabilità clinica, la maggior parte della gestione della sclerosi multipla (SM) si basa ancora sul controllo dei sintomi. La neuroriabilitazione è un approccio terapeutico non farmacologico che migliora la qualità di vita dei pazienti con SM. Sono stati compiuti molti sforzi per migliorare le tecniche riabilitative già esistenti. La pratica mentale è stata proposta come potenziale intervento che facilita gli effetti della riabilitazione. Essa consiste nella ripetizione mentale di atti motori e si basa sulla capacità di immaginazione motoria (*motor imagery*, MI) che rappresenta la capacità del cervello di simulare le azioni motorie senza eseguirle. Poiché le attività simulate e quelle eseguite coinvolgono circuiti cerebrali simili, la pratica mentale in combinazione con l'esercizio fisico potrebbe facilitare i miglioramenti delle performance motorie nella SM. Questo progetto si propone di valutare la capacità di MI che sottende la pratica mentale nei pazienti con SM e di verificare se la pratica mentale possa potenziare l'effetto dell'esercizio fisico.

RISULTATI

Dei 40 volontari sani e degli 80 pazienti con SM, finora abbiamo reclutato consecutivamente 24 volontari sani e 77 pazienti con SM destrimani di età compresa tra i 18 e i 50 anni. I pazienti sono stati considerati eleggibili se clinicamente e farmacologicamente stabili nei 3 mesi precedenti l'ingresso nello studio e se il loro punteggio EDSS era inferiore a 6.5. I volontari sani sono stati considerati eleggibili se la loro età, il loro sesso e il loro livello di scolarità

era comparabile con quello dei pazienti.

Tutti i partecipanti hanno eseguito un compito motorio della durata di circa 13 minuti detto *serial reaction time* (SRT). Durante il SRT, ai partecipanti era richiesto di rispondere a stimoli visivi che apparivano sullo schermo del computer in una delle 5 possibili posizioni, premendo il tasto corrispondente su una tastiera. La latenza tra la presentazione dello stimolo e la risposta, così come il numero di risposte corrette, era registrato per verificare i miglioramenti dovuti all'esercizio. Dopo la fase iniziale di pratica motoria, i partecipanti sono stati randomizzati nel gruppo di pratica mentale (G1) o nel gruppo di controllo (G2) in un rapporto 1:1. Nella fase di intervento, i partecipanti del gruppo G1 hanno eseguito l'esercizio di pratica mentale che consisteva nell'osservare lo stimolo visivo sullo schermo e nell'immaginare se stessi mentre eseguivano il SRT senza compiere alcuna azione. L'immaginazione motoria era guidata da un ricercatore esperto. I partecipanti del gruppo G2 eseguivano il conto alla rovescia a partire da 100, guidati dagli stimoli visivi sullo schermo. Dopo la fase di intervento, tutti i partecipanti eseguivano di nuovo il SRT per circa 13 minuti. Tutti i partecipanti erano valutati anche con scale di capacità di immaginazione motoria, scale cognitive e motorie, scale per la fatica e per il tono dell'umore.

Complessivamente, in un'analisi preliminare, i pazienti e i volontari sani non si sono rivelati significativamente diversi nelle scale di immaginazione motoria.

Finora, 41 pazienti e 14 volontari sani sono stati assegnati al gruppo G1, 36 pazienti e 10 volontari sani al gruppo G2. Non è stata trovata una significativa differenza tra i 4 gruppi nelle caratteristiche demo-

grafiche. I pazienti del gruppo G1 non differivano significativamente nel punteggio EDSS ($p=0.48$) e nella durata di malattia ($p=0.71$) rispetto a quelli del gruppo G2, sebbene questi ultimi avessero un più alto numero di ricadute nei due anni precedenti l'inclusione (media \pm DS 0.34 ± 0.58 vs 0.03 ± 0.19 , $p<0.001$).

Non è stata trovata una differenza significativa tra i pazienti del gruppo G1 e quelli del gruppo G2 nel tempo medio di latenza ($p=0.20$) e nel numero di risposte corrette ($p=0.27$) nella fase di pratica motoria pre-intervento. I cambiamenti nella latenza media e nel numero medio di risposte corrette erano più pronunciati nella fase post-intervento rispetto a quella pre-intervento sia in G1 ($p=0.02$ e $p<0.001$ rispettivamente), sia in G2 ($p<0.001$ e $p<0.001$, rispettivamente).

Allo stesso modo, non è stata trovata una differenza significativa tra i gruppi G1 e G2 di volontari sani nella media del tempo di latenza e nella media del numero di risposte corrette ($p=0.32$ e $p=0.09$, rispettivamente) nella fase di pratica motoria pre-intervento. Comparando le fasi pre- e post-intervento nei due gruppi di volontari sani, i volontari sani di G1 mostravano miglioramenti significativi più pronunciati nella media della latenza e nel numero medio di risposte corrette nella fase post-intervento ($p<0.001$ e $p<0.001$, rispettivamente), mentre i volontari sani di G2 mostravano miglioramenti significativi solo nel numero medio di risposte corrette

($p=0.09$ e $p<0.02$, rispettivamente).

Questa analisi preliminare ha consentito di esplorare i cambiamenti delle performance motorie dovuti all'esercizio fisico nei pazienti con SM e nei volontari sani. Ulteriori analisi sulla coorte completa consentiranno di testare se la capacità di immaginazione motoria che sottende la pratica mentale sia preservata nei pazienti con SM anche a livelli crescenti di disabilità, così come se questa capacità di immaginazione conferisca ai pazienti con SM una maggiore abilità di migliorare le performance con l'esercizio fisico e potenzi l'effetto dell'esercizio stesso.

CONCLUSIONI

La riabilitazione rappresenta un'importante strategia terapeutica nella gestione della SM. Pertanto, lo sviluppo di interventi di recupero che promuovano i suoi effetti è un obiettivo primario della ricerca clinica nella SM. I risultati del nostro studio contribuiscono direttamente allo sviluppo di nuove strategie di recupero, chiarendo se la pratica mentale possa potenziare l'effetto dell'esercizio fisico nei pazienti con SM. Essi, perciò, avranno un impatto sulla gestione clinica dei pazienti con SM. I risultati di questa analisi preliminare suggeriscono che la capacità di immaginazione motoria è preservata nei pazienti con SM. Ciò supporta l'ipotesi che la capacità di immaginazione motoria possa costituire una riserva individuale che può essere sfruttata dalla pratica mentale per potenziare il recupero funzionale.

Assessing motor imagery and the effects of mental practice of a motor task in patients with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Despite recent therapeutic advances in preventing clinical disability, most of the management in multiple sclerosis (MS) is still based on symptom control. Neurorehabilitation is a non-pharmacological approach that improves quality of life in MS. Many efforts have been made to improve the existing rehabilitation techniques. Mental practice has been proposed as a potential intervention to facilitate the effects of rehabilitation. It consists of the mental rehearsing of motor acts and is based on motor imagery (MI) that is the brain's ability to simulate motor actions without executing them. Since simulated and executed ac-

tions involve similar brain networks, mental practice in combination with physical practice may facilitate improvements in motor performance in MS. Here we aim to assess the capacity for MI that underlies mental practice in MS patients and to test whether mental practice enhances the effect of motor practice.

RESULTS

Out of the planned 40 healthy volunteers and 80 MS patients, so far we have consecutively recruited 24 right-handed healthy volunteers and 77 right-handed MS patients aged between 18 and 50 years. Patients were eligible if clinically and pharmacologically

stable in the 3 months prior to inclusion and if their EDSS score was lower than 6.5. Healthy volunteers were eligible if matched by age, sex and education. All participants practised a right hand serial reaction time task (SRT) lasting about 13 minutes. During SRT subjects were asked to respond to visual cues appearing on a computer screen in one of 5 possible positions by pressing the corresponding key on a pad. The latency between the stimulus presentation and the response, as well as the number of correct responses, were recorded to assess improvements on the task with practice. After this initial phase of motor practice, they were randomised to the mental practice group (G1) or to the control group (G2) in a 1:1 ratio. The intervention phase lasted for about 13 minutes. During this phase, G1 participants performed the mental practice consisting of observing the visual cue on the screen that moved sequentially and imagining themselves performing the SRT without executing any action. The imagery was guided by a trained researcher. The G2 participants performed a count-down from 100, paced by the visual cues on the screen. After the intervention phase, all subjects performed the SRT again for about 13 minutes. All participants were also assessed using scales testing motor imagery capacity, cognitive and motor performances, fatigue and mood.

Overall, from a preliminary analysis, motor imagery scores did not differ significantly between patients and healthy volunteers.

So far, 41 patients and 14 healthy volunteers have been assigned to G1, 36 patients and 10 healthy volunteers to G2. There was no significant difference in the demographic characteristics among the 4 groups. G1 patients did not differ significantly in the EDSS score ($p=0.48$) and in the disease duration ($p=0.71$) when compared to G2 patients, although they had higher number of relapses in the previous two years (mean \pm SD number of relapses in G1 vs. G2 0.34 ± 0.58 vs 0.03 ± 0.19 , $p<0.001$).

There was no difference between G1 and G2 patients in the mean latency and in the mean number of correct responses ($p=0.20$ and $p=0.27$, respectively) in the pre-intervention motor practice. Changes in the mean latency and in the mean number of correct re-

sponses were more pronounced in the post-intervention than in the pre-intervention phase in both G1 ($p=0.02$ and $p<0.001$ respectively) and G2 ($p<0.001$ and $p<0.001$, respectively).

Similarly, there was no difference between G1 and G2 healthy volunteers in the mean latency and in the mean number of correct responses ($p=0.32$ and $p=0.09$, respectively) in the pre-intervention motor practice. Comparing the pre- and the post-intervention phases between the two groups of healthy volunteers, G1 healthy volunteers showed improvements significantly more pronounced in the mean latency and in the mean number of correct responses in the post-intervention phase ($p<0.001$ and $p<0.001$, respectively), whereas G2 healthy volunteers showed significant improvements in the mean number of correct responses only ($p=0.09$ and $p<0.02$ respectively).

This preliminary analysis allowed us to explore changes in motor performance with practice in the patients and in the healthy volunteers. Further analysis on the completed cohorts will allow testing of whether the behavioural capacity for motor imagery underlying mental practice is preserved in MS patients despite increasing levels of disease burden, as well as whether this capacity confers a greater ability to improve performance with motor practice in patients and enhances the effect of motor practice on performance improvements in MS.

CONCLUSIONS

Rehabilitation represents a major therapeutic strategy in MS management. Therefore, developing novel recovery-oriented strategies that promote its effects is a major goal in MS clinical research. Results from this study contribute directly to the development of novel recovery strategies by clarifying whether mental practice can enhance the effects of motor practice in patients with MS. They, therefore, will have an impact on the clinical management of MS patients. The results of this preliminary analysis suggest a preserved motor imagery capacity in MS patients. This supports the hypothesis that the capacity for motor imagery may form an individual reserve that can be exploited by mental practice for enhancing functional recovery.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Sbardella E, Bianchi V, Petsas N, Pozzilli C, Tomassini V. Assessing motor imagery and the effects of mental practice of a motor task in patients with Multiple Sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 29-30 Maggio 2013

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

Nino Basaglia

Unità di Medicina Riabilitativa, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Ferrara

COLLABORATORI:

Sofia Straudi, Carlotta Martinuzzi, Claudia Pavarelli, Livio Balugani, Daniela Ripa

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Carmelo Chisari, Irene Sabella, Martina Venturi, Chiara Fanciullacci,

Unità di Neuroriabilitazione - Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa

Federica Aprigliano, Unità di Neuroriabilitazione - Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana e Istituto di BioRobotica, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

Gli effetti della rieducazione robot-assistita sulla funzionalità deambulatoria e sull'attivazione delle unità motorie in persone con sclerosi multipla. Uno studio randomizzato controllato

PREMESSE E OBIETTIVI

Le disabilità del cammino sono una problematica assai frequente nella sclerosi multipla (SM), con un impatto negativo sulle attività quotidiane e la qualità di vita. Nell'80% dei casi, la malattia causa l'alterazione della funzionalità deambulatoria, con un'aumentata percezione di fatica, dolore, declino o perdita di mobilità e partecipazione. L'alterazione della funzione motoria dovuta ad un danno del sistema nervoso centrale è una delle principali conseguenze della SM, che può portare a significativi cambiamenti nei distretti periferici, come ad esempio la debolezza muscolare. Inoltre, è stata osservata una maggiore percezione di fatica nei pazienti con SM in parte dovuta all'alterazione dell'attivazione motoria centrale, anche in assenza di un evidente affaticamento muscolare. La valutazione elettromiografica (EMG) ha mostrato delle alterazioni nei pattern di reclutamento muscolare, ovvero un ridotto numero di potenziali d'azione di unità motoria di normale ampiezza (MUAPs). Recentemente è stata dimostrata la necessità di fornire un allenamento intenso e specifico per ottenere il recupero della funzionalità motoria. Per questo motivo l'utilizzo di dispositivi robotici è considerato dai ricercatori un mezzo per garantire un'alta intensità e specificità di allenamento. Nello studio proposto è stata utilizzata un'ortesi per il cammino (Lokomat, Hocoma, Svizzera) che consiste in un esoscheletro robotizzato con un sistema di sgravo del peso corporeo e un tapis roulant. Le gambe della persona sono guidate in uno schema fisiologico di cammino pre-imposta-

to. Abbiamo ipotizzato che un programma personalizzato che prevede un sostegno del peso corporeo e movimenti assistiti del cammino possa diminuire la percezione di fatica dei pazienti con SM, consentendo un periodo di trattamento più lungo. Gli obiettivi di questo studio randomizzato controllato sono stati la verifica degli effetti di un allenamento robot-assistito del cammino in pazienti con SM; inoltre, abbiamo indagato gli effetti di questo intervento sulla fatica, la qualità di vita e l'attivazione delle unità motorie.

RISULTATI

Sono stati reclutati 58 pazienti con SM e grave disabilità deambulatoria (EDSS 6-7) in due cliniche italiane. Di questi, 49 hanno completato lo studio (15 maschi e 34 femmine, 53.2 ± 11.01 anni, EDSS 6.40 ± 0.39 , esordio SM 15 ± 7.83 anni). I partecipanti sono stati randomizzati nel gruppo di cammino robot-assistito (Lokomat, Hocoma, Svizzera) o nel gruppo di fisioterapia convenzionale (12 sessioni in sei settimane). Per osservare i potenziali benefici sono stati condotti test clinici e neurofisiologici. I test clinici hanno rilevato la velocità del cammino (Test dei 10m), la resistenza deambulatoria (Test dei sei minuti), l'equilibrio (Berg Balance Test) e la mobilità (Up and Go Test); sono state inoltre valutate la fatica percepita (Fatigue Severity Scale), il tono dell'umore (Patients Health Questionnaire) e la qualità di vita (SF-36). I principali risultati di questo studio sono stati osservati nella resistenza deambulatoria ed equilibrio: i pazienti sottoposti a rieducazione ro-

bot-assistita dopo sei sedute hanno ottenuto miglioramenti in questi parametri con ulteriori incrementi alla fine del trattamento ($p < 0,01$). Tuttavia, non abbiamo rilevato effetti significativi sulla velocità del cammino e sulla mobilità. Per quanto riguarda la fatica non abbiamo osservato cambiamenti nella percezione di questo sintomo al termine dei trattamenti. Tutti i pazienti hanno riportato un miglioramento del tono dell'umore ($p < 0,01$) e della qualità di vita. A distanza di tre mesi i risultati ottenuti non sono stati mantenuti. In diciannove pazienti è stato possibile studiare le caratteristiche di attivazione dell'unità motoria attraverso l'analisi EMG di superficie del muscolo vasto mediale durante l'estensione isometrica del ginocchio. Abbiamo registrato sia la contrazione volontaria massimale (CVM) che a diverse percentuali di forza. Al termine della riabilitazione, i pazienti erano in grado di evocare una CVM maggiore rispetto alle valutazioni ini-

ziali; per quanto riguarda l'analisi di frequenza dello spettro di potenza, abbiamo osservato un aumentato reclutamento di unità motorie in entrambi i gruppi.

CONCLUSIONI

La rieducazione robot-assistita del cammino può essere considerata un valido trattamento nei pazienti con SM e grave disabilità del cammino. Al termine di questo trattamento intensivo e specifico, i pazienti hanno migliorato la capacità deambulatoria e l'equilibrio. Tali effetti non sono stati mantenuti a distanza di tre mesi. La riabilitazione motoria, sia robot-assistita che convenzionale, ha portato a un miglioramento del tono dell'umore e della qualità di vita. Inoltre, i nostri dati preliminari circa le caratteristiche di attivazione delle unità motorie ci forniscono interessanti considerazioni riguardo ai possibili meccanismi di recupero motorio in pazienti con SM.

The effects of robot-assisted gait training on locomotor function and motor unit firing in multiple sclerosis subjects. A randomized control trial

INTRODUCTION AND AIMS

Gait disabilities are very common in multiple sclerosis (MS) with a negative impact on personal activities and quality of life. It has been shown that 80% of them experience a loss of ambulation function, with an increased prevalence of fatigue, pain, decline or loss of mobility and participation. Central motor impairment is a primary consequence of MS, and significant peripheral changes like muscle weakness, may arise from chronically altered central motor function. In addition, it has been suggested that impaired central motor activation is associated with the symptomatic fatigue of MS patients even in absence of overt muscle fatigue. Electromyographic (EMG) abnormalities have been shown in multiple sclerosis patients, such as abnormal recruitment patterns with decreased numbers of motor unit action potentials (MUAPs) of normal amplitude. Ongoing researches show that the intensity and specificity of motor training is necessary to achieve recovery of motor functions. For this reason robotics has been introduced by researchers as a tool to achieve high intensity and specific motor training. In the proposed project we used a robotic driven gait orthosis (Lokomat, Hoco-

ma, Switzerland) to deliver motor training therapy. The system consists of a robotic gait orthosis with a body weight support system that is used in combination with a treadmill. The subject's legs are guided according to a pre-programmed physiological gait pattern. We assumed that individually adjusted body weight support and assisted walking movements might reduce central fatigability in multiple sclerosis patients, allowing a longer effective treatment time. The aims of this randomized controlled study were to test the effects of robot-assisted gait training in improving locomotor function in multiple sclerosis patients with gait impairments; moreover, we explored its effects on fatigue, quality of life and motor unit firing rate.

RESULTS

We enrolled 58 multiple sclerosis patients with moderate to severe gait impairment (EDSS 6-7) in two Italian outpatient clinics. 49 of them (15 men and 34 females, 53.2 ± 11.01 years, EDSS 6.40 ± 0.39 , MS onset 15 ± 7.83 years) completed the study. Participants were randomized to Robot-assisted gait training (Lokomat, Hocoma, Switzerland) or conven-

tional therapy and they received 12 sessions over six weeks (two sessions/week). To reveal potential benefits on motor function, mobility and gait abilities we performed both clinical and neurophysiological tests (motor unit firing rate characteristics). Clinical tests explored gait speed (10m walking test), walking endurance (Six minute walking test), balance (Berg Balance Test) and mobility (Up and Go Test); furthermore, motor fatigue (Fatigue Severity Scale) depression (Patients Health Questionnaire) and quality of life (SF-36) were assessed. Our main findings regarded walking endurance and balance: patients who underwent robot-assisted gait training significantly improved their walking endurance after six sessions ($p < 0.01$) with additional gains at the end of the training ($p < 0.01$). We highlighted similar effects on balance as well. On the other hand we didn't find significant effects on gait speed or mobility. Focusing on fatigue, which is a highly disabling symptom in multiple sclerosis patients, we didn't find any detrimental or beneficial effects of motor training on perceived fatigue. After rehabilitation, we found a significant improvement in mood in both groups ($p < 0.01$). In addition to functional gains, rehabilitation might seem to offer a positive impact on different Quality of Life domains.

At three month follow-up, there was no retention of all clinical gains. In 19 patients, motor unit firing rate analysis was performed by recording the surface EMG signal of the vastus medialis, during isometric knee extension. Each patient performed two different types of exercise: a maximum voluntary contraction (MVC) and subsequent contractions at different force level. After rehabilitation, patients were able to deliver a MVC greater than at the baseline; concerning the analysis of frequency power spectrum we observed an increased trend in motor unit firing after the rehabilitation protocol in both groups.

CONCLUSIONS

Our main findings suggested that robot-assisted gait training could be a valuable option in motor rehabilitation for MS patients with severe gait impairments. After this high-intensity and task-specific intervention, they increased their walking competency and balance activities with no retention after three months. Motor rehabilitation, both robot-assisted and conventional, had positive effects on mood and Quality of Life. Moreover, our preliminary data on motor firing unit rate characteristics, gave us an insight into mechanisms underlying the motor impairment and recovery in MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Venturi M, Straudi S, Martinuzzi C, Pavarelli C, Simonella C, Fanciullacci C, Martelli D, Micera S, Rossi B, Basaglia N, Chisari C: Riabilitazione robotica del cammino con ortesi robotica Lokomat: effetto sulla deambulazione e sul firing motoneuronale in pazienti affetti da sclerosi multipla. XIV SIAMOC, 26-28 Settembre 2013, Pisa, Italy

Venturi M, Straudi S, Martinuzzi C, Pavarelli C, Martelli D, Fanciullacci C, Simonella C, Manca M, Chisari C, Basaglia N: The effects of robot-assisted gait training on locomotor function and motor unit firing in multiple sclerosis subjects. A randomized control trial. Congresso Scientifico Annuale FISM, 29-30 Maggio 2013, Roma, Italy

Venturi M, Fanciullacci C, Simonella C, Rossi B, Straudi S, Basaglia N, Chisari C: Effects of robot-assisted gait training on locomotor function and motor units firing rate in Multiple Sclerosis. 40 SIMFER, Società Italiana di Medicina Fisica e Riabilitazione, 21-25 Ottobre 2012, Sorrento, Italy.

Martinuzzi C, Pavarelli C, Straudi S, Ferraresi G, Balugani L, Manca M, Monaco V, Venturi M, Fanciullacci C, Simonella C, Chisari C, Basaglia N: The effects of robot-assisted gait training on locomotor function and motor unit firing in multiple sclerosis subjects with severe gait impairments. Congresso Scientifico Annuale FISM, 30-31 Maggio 2012, Roma, Italy

Straudi S, Venturini E, Ferraresi G, Manca M, Benedetti MG, Muscari S, Sabbagh Charabati A, Bonato M, Basaglia N: Influenza del training dambulatorio robot-assistito sul pattern di cammino in pazienti con sclerosi multipla. XII SIAMOC, 20-1 Ottobre 2011, Bosisio Parini, Italy

Zancato E, Venturini E, Balugani L, Ripa D, Straudi S, Basaglia N: Gli effetti della rieducazione robot-assistita del cammino vs la rieducazione motoria convenzionale nella sclerosi multipla: uno studio cross-over. 39 SIMFER, Società Italiana di Medicina Fisica e Riabilitazione, 16-19 Ottobre 2011, Reggio Calabria, Italy

Straudi S, Venturini E, Balugani L, Ripa D, Ferraresi G, Marchi P, Manca M, Basaglia N: Gli effetti della rieducazione robot-assistita del cammino in pazienti affetti da sclerosi multipla. Studio pilota. Congresso Scientifico Annuale FISM, 25-26 Maggio, Roma, Italy

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni (prorogato di 9 mesi) e l'ammontare di 85.000 €



QUALITÀ DELLA VITA

Marta Bassi

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

COLLABORATORI:

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

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Monica Falautano, Mauro Comola, Vittorio Martinelli, Rosalinda Cardamone, Eleonora Minacapelli, Giancarlo Comi, Dipartimento di Neurologia, Ospedale San Raffaele, Milano

Benedetta Goretti, Emilio Portaccio, Bahia Hakiki, Maria Pia Amato, Dipartimento di Neuroscienze, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Università degli Studi di Firenze, Firenze

Monica Grobberio, Miriam Benin, Samuela Turati, Manuela Valsecchi, Monica Rezzonico, Franco Di Palma, Azienda Ospedaliera S. Anna di Como, Como

Marianna Pattini, Francesca Cenci, Beatrice Allegri Rossi, Ilaria Pesci, Angelica Guareschi, Enrico Montanari, Centro di Sclerosi Multipla, UOC di Neurologia, Ospedale di Vaio-Fidenza, Fidenza

Erika Pietrolongo, Daniela Travaglini, Giovanni De Luca, Alessandra Lugaresi, Dipartimento di Neuroscienze e Imaging, Università G. d'Annunzio, Chieti

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

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

Il sistema della cura: promozione del benessere tra persone con sclerosi multipla, caregiver ed operatori sanitari. Uno studio pilota

PREMESSE E OBIETTIVI

Una delle sfide più attuali per la ricerca è la promozione del benessere di persone con sclerosi multipla (SM). Lo studio scientifico del benessere è stato avviato solo di recente, e deriva dalla constatazione che le persone che vivono una condizione problematica non sviluppano solo malessere, ma anche capacità, risorse e strategie adeguate a fronteggiare la situazione. Nonostante queste evidenze di ricerca, gli interventi volti alla promozione della qualità di vita privilegiano l'analisi delle dimensioni fisiche del benessere e sono finalizzati alla riduzione delle infermità e difficoltà anziché alla costruzione e consolidamento delle risorse personali e sociali. Il benessere in realtà è un fenomeno complesso, che include componenti fisiche, psicologiche e sociali. Inoltre è un concetto soggettivo: ogni individuo va-

luta il proprio livello di benessere in base alla personale rappresentazione delle proprie condizioni di vita. Obiettivo di questo studio pilota è quindi fornire per la prima volta nella ricerca su SM una visione integrata del benessere percepito dai protagonisti del sistema della cura: persone con SM, caregiver e operatori sanitari. Il benessere dei partecipanti è stato studiato sia in relazione alla salute che alla percezione della vita in generale.

RISULTATI

Lo studio ha coinvolto 168 partecipanti reclutati in sette centri italiani: 71 persone con SM, 71 caregiver e 26 operatori sanitari. Tutti gli obiettivi del progetto sono stati raggiunti. In particolare lo studio ha fornito due contributi importanti.

Il primo riguarda la percezione dell'impatto della ma-

lattia sul benessere da parte delle persone con SM. I risultati hanno mostrato che la percezione di fatica connessa alla malattia influenza il benessere personale più di misure oggettive quali il tipo di SM, la sua durata e il livello di disabilità (EDSS). Coloro che riportano livelli di fatica più elevati attribuiscono alla malattia conseguenze più negative sui livelli di funzionamento fisico, cognitivo e sociale, sulle limitazioni fisiche ed emotive, sui livelli percepiti di energia e di benessere emotivo e sul dolore fisico. La fatica percepita ha anche un impatto negativo sulla percezione di benessere psicologico e si associa a livelli di depressione più elevati. Tuttavia alcuni ambiti della vita non risultano influenzati dalle condizioni oggettive e percepite di malattia. Essi sono in particolare la sfera delle relazioni familiari e sociali, il lavoro e la dimensione della spiritualità/religione. Il secondo contributo della ricerca è costituito dall'analisi comparativa del benessere percepito da persone con SM, loro caregiver e operatori. Le principali differenze tra i gruppi riguardano l'ambito della salute. Rispetto a caregiver e operatori, le persone con SM riportano livelli inferiori di funzionamento fisico, salute generale e vitalità, e maggiori limitazioni dovute a problemi fisici. Rispetto ai caregiver riportano, inoltre, livelli inferiori di funzionamento sociale, maggiori limitazioni a livello emotivo e livelli più elevati di depressione. Per contro, i tre gruppi di partecipanti non differiscono per livelli di benessere psicologico. Inoltre, rispetto ai caregiver i pazienti percepiscono maggior supporto sociale e maggiori opportunità di reperire nella vita quotidiana esperienze ottimali, cioè condizioni di coinvolgimento,

gratificazione ed impegno nel fronteggiare sfide percepite come significative.

CONCLUSIONI

Questo studio apre nuove e promettenti prospettive. I risultati evidenziano l'importanza di valutare, anche in condizioni di malattia, il benessere percepito dagli individui e di analizzarne non solo limiti e deficit ma anche risorse e punti di forza. Benché, come atteso, le persone con SM riportino livelli di benessere inferiori agli altri gruppi nella sfera della salute fisica, esse percepiscono maggior supporto sociale rispetto ai caregiver e maggiori opportunità di investire le proprie capacità in sfide complesse e significative. Ciò mette in luce la coesistenza di limitazioni e malessere con risorse personali e contestuali che possono compensare le problematiche legate alla salute, supportando il concetto di persona quale insieme di componenti fisiche, psichiche e sociali il cui funzionamento è il risultato integrato delle parti. I risultati evidenziano inoltre l'utilità di valutare il benessere percepito da parte degli altri protagonisti della cura. A livello di intervento, questo studio enfatizza la necessità di un'analisi integrata che si articoli su diversi ambiti di vita, per apportare modifiche a quelli maggiormente associati a malessere e compromissione del funzionamento, ma anche per valorizzare quelli che alimentano risorse personali e sociali. In particolare, l'investimento di risorse in ambiti di vita percepiti come gratificanti permette di compensare le limitazioni percepite in altri ambiti, contribuendo così a promuovere il benessere generale.

The care system: well-being promotion among people with multiple sclerosis, caregivers and health professionals. A pilot study

INTRODUCTION AND AIMS

One of the challenges research has to face today involves well-being promotion of persons with multiple sclerosis (MS). The scientific investigation of well-being has just recently started, and stems from the evidence that individuals living under adverse conditions do not only develop ill-being, but also capacities, resources and adequate strategies to cope with the situation. In spite of this research evidence, intervention to promote quality of life tends

to privilege the analysis of the physical aspects of well-being, and to focus on impairment and difficulties reduction rather than on the construction and strengthening of personal and social resources. Well-being is a complex phenomenon, including physical, psychological and social components. Moreover, it is a subjective concept: individuals appraise their well-being level according to their personal representation of living conditions. For the first time in MS research, the present pilot study

thus aimed at providing a comprehensive analysis of well-being among the major characters of the MS care system: persons with MS, their caregivers and health professionals. It investigated participants' well-being, focusing on both health-related and general life evaluations.

RESULTS

A group of 168 participants were enrolled in seven MS centers in Italy: 71 persons with MS, 71 caregivers and 26 health professionals. The study achieved all the initial project aims and provided two main relevant contributions.

The first one concerns the perceived illness impact on well-being among persons with MS. Results highlighted that the perception of illness-related fatigue influences personal well-being more than objective assessments of MS type, disease duration, and disability level (EDSS). Those persons who perceive higher fatigue levels attribute to disease more negative consequences in terms of lower physical, cognitive and social functioning, more limitations due to physical and emotional problems, lower energy and emotional well-being as well as higher bodily pain. Perceived fatigue also has a negative impact on the perception of psychological well-being and is associated with higher levels of depression. However, findings show that there are some life areas which are not affected by illness conditions, be they evaluated subjectively or objectively. These include family and interpersonal relations, work and spirituality/religion.

The second important contribution stems from the comparative analysis of perceived well-being among persons with MS, caregivers and health professionals. Differences between the groups mainly regard the health domain. Compared to caregivers and professionals, persons with MS report lower levels of physical functioning, general health, and vitality, as well as more limitations due to physical problems. Compared to caregivers, persons with

MS also report lower social functioning, more limitations due to emotional problems, and higher levels of depression. By contrast, the three groups do not differ in their levels of psychological well-being. In addition, compared to caregivers, patients perceive receiving more social support and retrieve more opportunities for optimal experiences in their lives, namely conditions of deep involvement, gratification and commitment in facing meaningful challenges.

CONCLUSIONS

Altogether, this pilot study opens up new and promising perspectives. Results stress the importance of evaluating perceived well-being among individuals coping with disease and analyzing not only their weaknesses and impairments but also their resources and strengths. Even though persons with MS expectedly report lower health-related well-being levels compared to the other groups, they perceive more social support than caregivers as well as more opportunities to invest their skills in complex and meaningful challenges. Findings point to the coexistence of limitations and ill-being with personal and contextual resources which can compensate for health-related difficulties, thus supporting the concept of a person as a set of physical, psychological and social components whose functioning is the integrated result of her parts. Results further stress the need to assess the perceived well-being of the other characters involved in the care system. At the level of intervention, this study emphasizes the need to carry out an integrated analysis of well-being encompassing the whole life of individuals, not just health, in order to help mend areas of impaired functioning, but also to enhance those areas that contribute to personal and social resources. In particular, resource investment in life domains that are perceived as gratifying can allow individuals to compensate for limitations in other domains, thus contributing to promote their general well-being.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Bassi M, Falautano M, Cilia S, Goretti B, Grobberio M, Pattini M, Pietrolongo E, Viterbo RG, Amato MP, Benin M, Lugaesi A, Martinelli V, Montanari E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. The coexistence of well- and ill-being in persons with multiple sclerosis, their caregivers and health professionals. *Journal of the Neurological Sciences*, 2014;337:67-73

Bassi M, Pietrolongo E, Falautano M, Cilia S, Goretti B, Grobberio M, Pattini M, Viterbo RG, Amato MP, Lugaesi A, Martinelli V, Montanari E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. Well-being and health-related quality of life among persons with MS, caregivers and health professionals: A comparative study. *29th Congress of the European Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis (ECTRIMS)*, Copenhagen, 2-5 October 2013.

Bassi M, Falautano M, Cilia S, Goretti B, Grobberio M, Pattini M, Pietrolongo E, Viterbo RG, Amato MP, Lugaesi A, Martinelli V, Montanari E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. Il sistema della cura: promozione del benessere tra persone con sclerosi multipla, caregiver ed operatori sanitari. Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma, 29-30 maggio 2013.

Bassi M, Falautano M, Cilia S, Goretti B, Grobberio M, Pattini M, Pietrolongo E, Viterbo RG, Amato MP, Lugaesi A, Martinelli V, Montanari E, Patti F, Trojano M, Delle Fave A. The care system: Well-being promotion among people with multiple sclerosis, caregivers, and health professionals. *XLIII Congresso della Società Italiana di Neurologia*, Rimini, 6-9 ottobre 2012. *Neurological Sciences*, 33, 148.

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

Graziella Filippini

Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano

COLLABORATORI:

Paolo Confalonieri, Irene Tramacere

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Paola Mosconi, Cinzia Colombo, IRCCS-Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano

Roberta Amadeo, Isabella Baroni, Silvia Traversa, Paola Zaratin, Associazione Italiana SM (AISM), Genova

Anneliese Synnot, Sophie Hill, Centre for Health Communication and Participation, La Trobe University (CHCP), Australia

Michael Summers, MS Australia, The Nerve Centre, Melbourne, Australia

Sue Shapland, MS Australia, Perth, Australia

Integrare le esperienze e le preferenze dei pazienti con sclerosi multipla con i risultati della ricerca scientifica per sviluppare informazioni sulla salute utili per decisioni informate e condivise

PREMESSE E OBIETTIVI

Le informazioni di salute basate su evidenze sono sempre di più facile reperibilità per i cittadini. Gli sforzi della ricerca si sono focalizzati sulle diverse modalità di presentare i dati scientifici ad un pubblico non specialista. Tuttavia, la disponibilità di dati su come le persone integrino le informazioni di salute basate sui risultati della ricerca con le loro preferenze personali e i propri valori sono ad oggi scarse. Il progetto IN-DEEP è una collaborazione tra ricercatori australiani e italiani, le associazioni dei pazienti, e le persone con sclerosi multipla (SM). Lo scopo è quello di esplorare come le persone con SM integrino le informazioni di salute con le proprie necessità, esperienze, preferenze e valori, e come queste caratteristiche possano essere incorporate in uno strumento informativo online accessibile alle persone con SM e familiari.

RISULTATI

Utilizzando un disegno a quattro stadi, è stato sviluppato un modello informativo via internet per persone con SM e familiari. In un primo stadio, abbiamo organizzato sei *focus-group* ed un forum online al fine di documentare e analizzare le espe-

rienze dei pazienti con SM nel trovare, valutare e integrare informazioni di salute basate sui risultati della ricerca tenuto conto delle preferenze personali e dei propri valori, finalizzando il tutto al prendere decisioni per la propria salute. A tale fase hanno partecipato 40 persone con SM e 20 familiari. La disponibilità di informazioni aggiornate e non distorte e informazioni di carattere pratico è un bisogno informativo riportato da molti partecipanti. Il comportamento informativo cambia nel tempo in base ai bisogni, allo stato emotivo e alla conoscenza della malattia. Molti dei partecipanti hanno riportato una certa sfiducia riguardo alla veridicità delle informazioni online e il desiderio di imparare a valutare qualità e credibilità dei siti sulla salute. Dai risultati della prima fase, abbiamo sviluppato un modello (*template*) di informazione scritta dei risultati della ricerca. Il modello deve permettere ai pazienti/familiari SM di usare le informazioni in modo significativo per la propria condizione/esperienza (Stadio 2). Nel primo *template* sono stati utilizzati revisioni sistematiche, studi clinici di buona qualità e report delle agenzie regolatorie sull'interferone. Il *template* è stato revisionato e finalizzato con l'aiuto di persone/familiari SM, neu-

rologi ed esperti AISM di informazione, ed è stato caricato in internet (<http://indeep.istituto-besta.it/>) dopo un pre-test (Stadio 3). Il formato del sito web è stato sviluppato su tre livelli di complessità (“In breve”, “Nel dettaglio”, e “Per approfondire”), ciascuno caratterizzato da una combinazione di frasi, numeri e figure per spiegare benefici e rischi del trattamento, e ulteriori sezioni con informazioni di carattere pratico, questioni di metodo, esperienze in prima persona e un glossario. È stata realizzata un’indagine online per valutare il modello e il sito web con la collaborazione di AISM e pazienti afferenti a centri SM in Italia. (Stadio 4). Agli utilizzatori del sito, persone/familiari/amici SM, è stato chiesto di compilare un questionario online sul grado di comprensione delle informazioni, sulla loro utilità nel prendere decisioni, e se avessero compreso perché l’informazione fosse di buona qualità. Il questionario è stato compilato da 374 persone. I risultati principali sono stati: (i) la maggior parte delle persone ha risposto positivamente alle domande riguardanti la struttura del sito web, giudicandolo di facile navigabilità e comprensibilità delle informazioni; (ii) la maggior parte aveva chiari quali fossero i rischi e i benefici dell’interferone; (iii) più dell’80% riportava che le informazioni riportate avevano soddisfatto i loro bisogni e si sentivano

ora più sicuri nel prendere decisioni riguardo al trattamento; (iv) oltre l’80% pensava che il sito web proposto fosse affidabile e si augurava che venisse ampliato con altri argomenti.

CONCLUSIONI

Questo progetto ha raggiunto lo scopo che si era prefissato, ovvero di fornire informazioni di salute basate sull’evidenza, accessibili e significative per persone con SM. I partecipanti hanno manifestato entusiasmo per una risorsa informativa indipendente basata sulle evidenze. A breve verrà messo online un modulo sui trattamenti e le strategie per gestire e prevenire la fatica. In accordo con i suggerimenti emersi dall’indagine effettuata, uno sviluppo futuro del progetto includerà nuovi moduli su trattamenti farmacologici e non-farmacologici. Un nuovo modello verrà dedicato al confronto tra trattamenti, dati i numerosi trattamenti disponibili e l’incertezza su quale sia il migliore. Tali risultati verranno mostrati attraverso grafici ed analisi della network meta-analisi, con modalità accessibili e comprensibili ai pazienti. Infine, all’interno di un progetto che mette in luce cosa è conosciuto e cosa non lo è, sarà possibile sviluppare un modello condiviso tra medici e pazienti per valutare quali siano ad oggi le priorità della ricerca sulla SM.

IN-DEEP-integrating and deriving evidence, experiences, preferences: developing research-based health information applicable to decision making and self-management by people with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Increasingly, evidence-based health information is being made available to lay audiences, in addition to health professionals. Research efforts have focused on different formats for the lay presentation of health information. However, there is a paucity of data on how people integrate evidence-based health information with other factors such as their preferences for information and experiences with information-seeking. The IN-DEEP project is an Australian-Italian collaboration between researchers, multiple sclerosis (MS) societies and people with MS (PwMS). The aim is to explore how PwMS integrate health information with their needs, experiences,

preferences and values and how these factors can be incorporated into an online resource of health information provision for PwMS and their families.

RESULTS

Using a four-stage design, an information model was developed on the Internet for PwMS and their families. In Stage one six focus groups and an online forum to analyse the experiences of PwMS and families in finding, assessing and integrating health information with personal values were organised. Forty PwMS and 20 family members participated. The availability of up-to-date and unbiased information on treatments, including practical informa-

tion, was important to many. Information-seeking behaviour changed over time with relation to changing needs, emotional state and growing expertise about MS. Most people reported their inability to trust online health information and desire to learn about good quality websites. Using the data from Stage 1, a template to help people understand the summarizing evidence, apply it to their personal circumstances, and use it when making health-related decisions was developed (Stage 2). The template was created using systematic reviews and good quality clinical studies on interferon treatment as a first topic. Data from national regulatory agencies were also used. The template was reviewed and finalized with PwMS, family members, neurologists and AISM staff and was uploaded to the Internet (<http://indeep.istituto-besta.it/>) after a short pre-test (Stage 3). The website format reflected preferences for layered information complexity (i.e. 'The short answer', 'The detailed answer', 'The deep answer') and a combination of words, numbers and pictures to explain benefits and adverse events, with additional sections on practical information, research methodology, and personal histories. Three sections strongly endorsed by PwMS - 'Does this apply to me?' 'Questions for my neurologist' 'How to assess information' - and a glossary were added. An online survey was developed to evaluate the web site (Stage 4). Web-site users - PwMS and family members/friends of PwMS - were asked to complete an online questionnaire about the degree to which they understood the information; if the information was helpful; if they used or planned to use the information in discussions with neurologists or to make decisions about treatment with interferon; and if they understood why the information was of good quality. The questionnaire was completed by 374 people. The main results

were: (i) most people evaluated positively the web site, considering it easy to navigate and the information easy to understand; (ii) the majority considered clear information about the risks and benefits of interferon; (iii) more than 80% of responders stated that the available information met their needs and felt they can decide about the treatment; (iv) over 80% thought the website was a trustworthy source of information and they hoped it will be enriched and grow.

CONCLUSIONS

This project hits the goal to produce accessible and meaningful evidence-based health information to PwMS for use in the varied decision making and management situations they encounter in everyday life. There is enthusiasm among participants for an Italian, independent evidence-based MS resource. Summary on treatments and strategies to manage or prevent fatigue will soon be uploaded to the site. This new online resource will allow to present information on a topic most relevant to PwMS but with few available evidence and still many uncertainties. According to the main themes arising from the survey, the future development of the project will include new modules on pharmacological and non-pharmacological treatments. A new model will be dedicated to treatments comparison because several competitive treatments are available for MS and uncertainty about which intervention is better to use. For this reason results from multiple interventions, such as network graphs and network meta-analyses, will be presented and summarised in an accessible way for laypeople. Moreover in the framework of this project that highlights what is known and what is not known it will be possible to develop a sharing model to evaluate research priorities involving patients and clinicians.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Advisory Committee, people with MS and family members participating in the focus groups and the forum, people with MS interviewed at the IRCCS Foundation "Carlo Besta" Neurological Institute, Milano, Italy.
Advisory Committee: Amadeo Roberta, Battaglia Mario Alberto, Borla Paolo, Simi Silvana, Trevisan Silene, Zaratini Paola.
Neurologists involving patients for focus groups: Benedetti Maria Donata, Dipartimento Universitario Neurologia Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona; Giuliani Giorgio, Ospedale provinciale di Macerata; Leone Maurizio, Ospedale Maggiore della Carità Novara; Salemi Giuseppe, Azienda Ospedaliera Universitaria Paolo Giaccone Palermo.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Filippini G, Beecher D, Simi S, Mosconi P, Colombo C, Battaglia MA, Hill S, Summers M, Osborne RH, Shapland S. Integrating and deriving evidence, experiences and preferences (IN-DEEP): developing research-based health information applicable to decision making and self-management by people with multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev Suppl* 121-2 (2010) DOI:10.1002/14651858.CD000002.

Hill S, Filippini G, Summers M, Beecher D, Synnot A, Mosconi P, Shapland S, Colombo C, Baroni I, Osborne R, Traversa S. Treatment information-seeking by people with multiple sclerosis in the internet age: Stage 1 findings of the IN-DEEP project. *Cochrane Database Syst Rev Suppl* 3-233 (2011) DOI:10.1002/14651858.CD000003.

Synnot A, Hill S, Beecher D, Colombo C, Filippini G, Mosconi P, Osborne R, Shapland S, Summers M. The Internet and treatment information-seeking by people with multiple sclerosis. *The International Journal of MS Care* 2011;13(Suppl 3):58.

Hill S, Filippini G, Synnot A, Summers M, Beecher D, Colombo C, Mosconi P, Shapland S, Osborne R. Presenting evidence-based health information for people with multiple sclerosis: the IN-DEEP project protocol. *BMC Medical Informatics and Decision Making* 2012;12:20-8.

Synnot A, Hill S, Summers M, Filippini G, Garner K, Osborne RH, Shapland S, Beecher D, Mosconi P, Colombo C. Providing evidence-based health information for people with MS: The IN-DEEP project update. *Multiple Sclerosis Journal* 2012;18:691-6.

Colombo C, Filippini G, Mosconi P, Synnot A, Hill S. The Italian IN-DEEP project - Integrating and deriving evidence, experiences and preferences: developing research-based health information applicable to decision making and self-management by people with multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev Suppl* 39-40 (2013) DOI:10.1002/14651858.CD201300.

Colombo C, Hill S, Filippini G, Mosconi P, Synnot A, Summers M, Osborne R, Hawkins M, Shapland S, Confalonieri P, Traversa S, Baroni I. Translating Cochrane Reviews to lay people through the web: the IN-DEEP project. *Cochrane Database Syst Rev Suppl* 128 (2013) DOI:10.1002/14651858.CD201300.

Colombo C, Mosconi P, Confalonieri P, Baroni I, Traversa S, Hill S, Synnot A, Oprandi N, Filippini G. Web search behavior and information needs of people with multiple sclerosis: analysis of focus groups in the Italian IN-DEEP project. *Journal of Medical Internet Research* (submitted)

Filippini G, Beecher D, Simi S, Mosconi P, Colombo C, Battaglia M, Hill S, Summers M, Shapland S, Osborne RH. Integrating and deriving evidence, experiences and preferences (IN-DEEP): developing research-based health information applicable to decision making and self-management by people with multiple sclerosis. *Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma* 25-26 maggio 2011

Filippini G, Colombo C, Amadeo R, Baroni I, Battaglia MA, Borla F, Confalonieri P, Hill S, Oprandi NC, Synnot A, Traversa S, Zaratini P, Mosconi P. Integrating and deriving evidence, experiences and preferences (IN-DEEP): developing research-based health information applicable to decision making and self-management by people with multiple sclerosis. *Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma* 30-31 maggio 2012.

Synnot A, Hill S, Filippini G, Summers M, Shapland S, Osborne R. Knowledge translation for consumers: development of an evidence-based health information website. *Communication, Medicine & Ethics (COMET) Conference, Melbourne, Australia* July 11th- 13th, 2013

G Filippini, C Colombo, R Amadeo, I Baroni, MA Battaglia, PA Confalonieri, S Hill, A Synnot, S Traversa, P Zaratini, P Mosconi. Integrating and deriving evidence, experiences and preferences (IN-DEEP): Developing research-based health information applicable to decision making and self-management by people with multiple sclerosis (MS). *Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma* 29-30 maggio 2013.

Progetto di ricerca finanziato con il bando 2010 per un periodo di 3 anni e l'ammontare di 110.680 €

Alessandra Solari

Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano

COLLABORATORI:

Andrea Giordano, Monica Kleinefeld, Giusi Ferrari

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI:

Paolo Confalonieri, Carlo Antozzi, Unità di Neuroimmunologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano, Italia

Alessandra Lugaresi, Erika Pietrolongo, Deborah Farina, Marco Onofri, Dipartimento di Neuroscienze e Imaging, Università di Chieti-Pescara "G. d'Annunzio", Chieti, Italia

Maria Trojano, Carla Tortorella, Damiano Paolicelli, Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche Università di Bari, Bari, Italia

Maura Pugliatti, Veronica Pisccedda, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Sassari, Sassari, Italia

Claudia Goss, Dipartimento di Sanità Pubblica Medicina di Comunità, Università di Verona, Verona, Italia

Christoph Heesen, Imke Backhus, Jana Poettgen, Institute for Neuroimmunology and Clinical MS Research (inims), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Sascha Köpke, Institute for Social Medicine, University of Lubeck, Lubeck, Germany

Jurgen Kasper, Department of Primary Medical Care, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Jelena Drulovic, Tatjana Pekmezovic. Institute of Neurology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

An van Nunen, Michelle Pirard, Anoenk Symons, National MS-Centrum, Melsbroek, Belgium

Liina Vahter, Karin Kannel, Department of Neurology, West-Tallinn Central Hospital, Tallinn, Estonia

Preferenze di ruolo, conoscenza del rischio e *decision-making* nelle persone con sclerosi multipla (AutoMS)

PREMESSE E OBIETTIVI

Le persone con sclerosi multipla (PcSM) devono affrontare, sin dal momento della comunicazione della diagnosi, una malattia cronica, a prognosi variabile, e complesse scelte terapeutiche e personali. Negli anni recenti hanno preso piede iniziative di promozione della partecipazione dei cittadini e dei pazienti alla programmazione sanitaria ed alla *shared decision making* (SDM). Vi è evidenza che la SDM possa migliorare la conoscenza dei pazienti, la loro soddisfazione, la concordanza/aderenza alle terapie, l'allineamento delle cure con i valori e le preferenze dei pazienti, e la soddisfazione del personale sanitario. I nostri obiettivi erano:

(1) Validare linguisticamente il *Control Preference Scale* (CPS) nei Paesi dell'AutoMS, e "migrare" la versione originale della scala, somministrata da un esaminatore, in forma elettronica, auto-somministrata (eCPS)

(2) Produrre un questionario di conoscenza del rischio specifico per le PcSM remittente, chiamato RRMS-IRKQ

(3) Valutare la relazione medico-paziente mediante la scala *Observing Patient Involvement* (OPTION) (<http://www.optioninstrument.com/>).

Questa collaborazione internazionale ha coinvolto principalmente cinque Paesi Europei: Italia, Germania, Serbia, Estonia e Belgio.

RISULTATI

(1) Il CPS è lo strumento maggiormente impiegato per valutare le preferenze di ruolo dei pazienti nelle decisioni mediche. Un esaminatore mostra cinque carte al soggetto, ciascuna consistente in una vignetta ed una breve affermazione, e gli chiede di ordinarle in ordine di preferenza. In base alle prime due scelte, sono possibili sei diversi punteggi che possono essere categorizzati in: attivo, collaborativo, e passivo. Impiegando una metodologia rigorosa, abbiamo tradotto ed adattato culturalmente il testo nelle lingue dei Paesi coinvolti. Abbiamo inoltre prodotto nuove vignette, con il contributo di PcSM e personale sanitario dei Paesi partecipanti. Infine, è stata allestita una versione elettronica, auto-somministrata (eCPS) la cui accettabilità e riproducibilità (κ pesato, $w\kappa$) rispetto al CPS è stata verificata in 92 PcMS che hanno ricevuto entrambe le forme (elettronica e tradizionale) in ordine *random*. La riproducibilità è risultata moderata ($w\kappa$ 0.53, intervallo di confidenza al 95% [CI] 0.40–0.65) e simile a quella del CPS somministrato dall'esaminatore ($w\kappa$ 0.65, 95% CI 0.45–0.81). Le PcSM tedesche preferivano un ruolo attivo significativamente più di italiani, serbi ed estoni, che presentavano invece un comportamento piuttosto omogeneo. La scolarità elevata risultava anch'essa associata alla preferenza per il ruolo attivo nel modello multivariato logistico.

(2) Da un pool di 197 domande, abbiamo prodotto il questionario RRMS-IRKQ al termine di un approccio multifasico, che ha tenuto conto di rilevanza e difficoltà delle stesse. Il questionario ottenuto è stato tradotto-adattato in inglese UK, Italiano, Fiammingo e Serbo. Sono state quindi valutate chiarezza, leggibilità e rilevanza dell'RRMS-IRKQ è stata quindi valutata in quattro *focus group meeting* di PcSM in Italia, Germania, Serbia ed Estonia, ed in quattro *focus group meeting* di professionisti in UK (MS Trust), Germania, Serbia ed Estonia. È stato infine prodotto un questionario consensuale, in inglese.

(3) Le registrazioni audio di prime visite, effettuate presso quattro centri SM italiani (88 PcSM, 10 medici), sono state valutate impiegando lo strumento OPTION da un operatore terzo. L'esperienza delle PcSM che hanno effettuato la visita è stata valutata

dalle stesse mediante il questionario *Perceived Involvement in Care Scale* (PICS). L'età media delle PcSM era 37.5 anni, il 66% erano donne, il 72% aveva la SM, mentre il 28% una possibile SM o altre condizioni. Il punteggio medio alle sottoscale del PICS (0 peggiore, 100 migliore) era 71.9 (SD 24.3) per "facilitazione da parte del medico" (PICS-F); 74.6 (SD 22.9) per "informazioni al paziente" (PICS-I) e solo 22.5 (SD 16.2) per "decision making del paziente" (PICS-DM). Il punteggio medio OPTION (0 peggiore, 100 migliore) era 29.6 (SD 10.3). La durata della visita, l'essere un medico donna, la concordanza di genere tra medico e paziente ed un punteggio elevato al PICS-F sono risultati associati ad un punteggio elevato all'OPTION.

La scala OPTION è stata tradotta-adattata in serbo ed estone (per gli altri Paesi erano già disponibili versioni ufficiali). Il PICS è stato tradotto-adattato in italiano, tedesco, serbo ed estone.

CONCLUSIONI

Il progetto AutoMS (<http://www.automsproject.org/>) rappresenta la principale collaborazione internazionale sulla SDM nella SM. È in allestimento una sottomissione per Horizon 2020 (progetto IteMS), che costituisce l'evoluzione dell'AutoMS. Grazie a questo grant FISM, strumenti come CPS, PICS e OPTION sono ora disponibili in diverse lingue per applicazioni cliniche e di ricerca (il CPS in una forma rivista, e che non richiede l'intervento di un operatore esterno, eCPS). Proprio i risultati ottenuti con l'eCPS hanno evidenziato l'influenza delle caratteristiche culturali e della scolarità sulle preferenze di ruolo delle PcSM. A tale scopo, va segnalato come in Germania, dove il ruolo autonomo è molto più rappresentato, iniziative di SDM siano state introdotte a livello governativo molto prima che negli altri Paesi dell'AutoMS. Infine, ma non da ultimo, i dati ottenuti impiegando l'OPTION indicano chiaramente la necessità di migliorare le abilità di coinvolgimento dei pazienti (SDM *skills*) da parte dei medici, ponendo particolare attenzione alle preferenze del singolo individuo riguardo alla modalità di ricevere informazioni ed al grado di coinvolgimento nelle decisioni.

Autonomy preferences, risk knowledge and decision-making performance in multiple sclerosis patients (AutoMS)

INTRODUCTION AND AIMS

People with MS (PwMS) have to cope with a chronic condition of uncertain prognosis, and face complex therapeutic and personal decisions shortly after diagnosis. Recently, initiatives to enhance citizen and patient influence on health care and encourage shared decision making (SDM) have started to gain ground. Implementation of SDM can improve patient knowledge and satisfaction, concordance/adherence to treatment, alignment of care with patient values and preferences, and clinician satisfaction.

We aimed at:

- (1) Linguistically validate the Control Preference Scale (CPS) in the AutoMS countries, and migrate the interview-based version into an electronic self-administered version (eCPS).
- (2) Produce a risk knowledge questionnaire for relapsing-remitting PwMS (RRMS-IRKQ).
- (3) Assess the patient-physician relationship using the Observing Patient Involvement (OPTION) scale (<http://www.optioninstrument.com/>).

This international project involved five main EU countries: Italy, Germany, Serbia, Estonia and Belgium.

RESULTS

RESULTS

(1) The CPS is the most used instrument to assess patient preferences for involvement in decisions about their health. An interviewer asks the subject to rank in order of preference five cards, each containing a cartoon and a short descriptive statement, about the different roles he/she prefers to assume when making medical decision. Six scores are possible based on subject's two most preferred roles, which can be grouped as: active, collaborative, or passive. We cross-culturally translated and validate the CPS into the languages of the participating countries, using recognized guidelines. New cartoons were produced, based on MS health professional and PwMS input/feedback. We revised the CPS cartoons, and produced an electronic version (eCPS), whose acceptability and reliability (weighted kappa statistic, wK) in comparison to the original tool, was determined in 92 PwMS who received both CPS versions in random order. eCPS reliability

was moderate (wK 0.53, 95% confidence interval [CI] 0.40–0.65) and similar to the test-retest reliability of face-to-face administration (wK 0.65, 95% CI 0.45–0.81). German PwMS significantly preferred an active role, while Italian, Serbian and Estonian PwMS did not differ significantly from each other. Higher education was the other variable significantly associated with preference for an active role in a logistic model.

(2) We produced the RRMS-IRKQ from a pool of 197 items, which were assessed in a multi-step approach based on their relevance and difficulty. The questionnaire obtained was translated and adapted into UK English, Italian, Dutch for Belgium, Serbian and Estonian. The RRMS-IRKQ was assessed for legibility/readability, clarity, and relevance in four focus group meetings of PwMS in Germany, Italy, Serbia, and Estonia, and in four focus group meetings of health professionals carried in the UK (MS Trust), Germany, Serbia and Estonia. A consensus questionnaire was then prepared in English.

(3) Audio recordings of first-ever consultations with a participating physician (88 outpatients, 10 physicians) at four tertiary MS care clinics in Italy were rated by a third observer using the OPTION scale and by patients using the Perceived Involvement in Care Scale (PICS). Mean patient age was 37.5, 66% were women, 72% had MS, and 28% had possible MS or other disease. Mean PICS subscale scores (range 0 poor, 100 best possible) were 71.9 (SD 24.3) for “physician facilitation” (PICS-F); 74.6 (SD 22.9) for “patient information exchange” (PICS-I); and only 22.5 (SD 16.2) for “patient decision making” (PICS-DM). Mean OPTION total score (0 poor, 100 best possible) was 29.6 (SD 10.3). Consultation time, woman physician, patient-physician gender concordance and PICS-F were associated with higher OPTION total score; older physician and second opinion consultation were associated with lower OPTION score. The OPTION scale was translated/adapted into Serbian and Estonian (for the remaining languages, linguistically validated versions were already available). The PICS was translated/adapted into Italian, German, Serbian and Estonian.

CONCLUSIONS

The AutoMS project (<http://www.automsproject.org/>) is the main international collaboration on SDM in MS. The Horizon 2020 application named IteMS, now in preparation, is the evolution of the project. Thanks to the present application, instruments such as the CPS, the PICS and the OPTION scale are now available in several languages. The CPS is available in an examiner-free, improved version (eCPS), and can be properly used in clinical care and research. Our eCPS

findings have revealed that PwMS role preferences are affected by cultural characteristics and education: it is noteworthy that SDM promotion initiatives started being implemented earlier in Germany than other European countries. Last but not least, our OPTION sub-study points to a need to empower MS physicians with better communication and SDM skills, and show in particular that attention to MS patient preferences for reception of information and involvement in health decisions need to be improved.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Pietrolongo E, Giordano A, Kleinfeld M, Confalonieri P, Lugaresi A, Tortorella C, Pugliatti M, Radice D, Goss C, Heesen C, Solari A on behalf of the AutoMS project. Decision-making in multiple sclerosis consultations in Italy: Third observer and patient assessments. *PLoS ONE* 2013; 8(4): e60721. doi:10.1371/journal.pone.0060721

Heesen C, Köpke S, Solari A, Geiger F, Kasper J. Patient autonomy in multiple sclerosis - Possible goals and assessment strategies. *J Neurol Sci*. 2013 May 25. doi: 10.1016/j.jns.2013.02.018. Epub 2013 May 25. [Epub ahead of print]

Solari A, Giordano A, Kasper J, Drulovic J, van Nunen A, et al. Role Preferences of People with Multiple Sclerosis: Image-Revised, Computerized Self-Administered Version of the Control Preference Scale. *PLoS ONE* 2013; 8(6): e66127. doi:10.1371/journal.pone.0066127

Kasper J, Köpke S, Fischer K, Backhus I, Schäffler N, Solari A, Heesen C. Applying the theory of planned behavior to multiple sclerosis patients' decisions on disease modifying therapy - questionnaire concept and validation. *BMC Medical Informatics and Decision Making* 2012;12(1):60. [Epub ahead of print]

Giordano A, Kasper J, Pietrolongo E, Antozzi C, Moretti G, Pugliatti M, Van Nunen A, Drulovich Y, Vahter L, Köpke S, Heesen C, Solari A on behalf of the AutoMS project. The electronic, cartoon-revised self-administered version of the Control Preference Scale. *Mult Scler* 2012; 18(4): S695

Pietrolongo E, Giordano A, Kleinfeld M, Tortorella C, Confalonieri P, Pugliatti M, Goss C, Solari A, on behalf of the AutoMS project. Involving multiple sclerosis patients in medical decisions: The Italian experience. *Neurol Sci* 2012; 33: S141

Giordano A, Kasper J, Pietrolongo E, Antozzi C, Moretti G, Pugliatti M, Van Nunen A, Drulovich Y, Vahter L, Köpke S, Heesen C, Solari A on behalf of the AutoMS project. The electronic, cartoon-revised self-administered version of the Control Preference Scale. *Neurol Sci* 2012; 33: S145-146

Heesen C, Köpke S, Kasper J, Drulovic J, van Nunen A, Vahter L, Viala F, Fulcher G, Giordano A, Solari A, on behalf of the AutoMS project. Multi-language translation and cross-cultural adaptation of the patient-reported relapsing-remitting MS risk knowledge questionnaire on immunotherapy (RRMS-IRKQ): methodological issues. *Neurol Sci* 2012; 33: S144

Heesen C, Köpke S, Kasper J, Drulovic J, van Nunen A, Vahter L, Viala F, Fulcher G, Giordano A, Solari A on behalf of the AutoMS project. Multi-language translation and cross-cultural adaptation of the patient-reported relapsing-remitting MS risk knowledge questionnaire on immunotherapy (RRMS-IRKQ): methodological issues (#52). *Mult Scler* 2012; 18: S25-S28

Solari A, Giordano A, Köpke S, Kasper J, Lugaresi A, Pugliatti M, Van Nunen A, Vahter L, Drulovic J, Clanet M, Sharrack B, Fulcher G, Heesen C on behalf of the AutoMS-group. Autonomy preferences, risk knowledge and decision making performance in ms (AutoMS): the Control Preference Scale. RIMS 2011 Conference, May 13-14 Turku, Finland

Heesen C, Köpke S, Kasper J, Giordano A, Van Nunen A, Vahter L, Drulovic J, Clanet M, Sharrack B, Fulcher G, Solari A on behalf of the AutoMS-group. Risk knowledge and planned behavior questionnaires - new tools to assess decision-making in MS. RIMS 2011 Conference, May 13-14 Turku, Finland

AutoMS Investigators' Meeting and OPTION training. Casa Vacanze "I Girasoli", Lucignano (Siena), Italy. 7 October 2011

Progetto di ricerca finanziato con il Bando 2010 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 130.000 €



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

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DALLA FISM 2013

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

Antonio CATTANEO

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

Francesco CECCONI

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

Maria Teresa CENCIONI

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

Eliana Marina COCCIA

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

Silvia DUSI

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

Fabia FILIPELLO

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

Bruno GRAN

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

Giuseppe MAMELI

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

Luca MUZIO

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

Barbara ROSSI

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

Barbara SERAFINI

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

Claudio SETTE

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

Ada Maria TATA

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

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

Christian Cordano

MS Center, University of California, San Francisco (UCSF)
San Francisco, CA, USA

Tomografia a coerenza ottica ad altissima risoluzione nell'encefalomielite autoimmune sperimentale - un modello per la comprensione del ruolo clinico dell'OCT nella SM

Borsa di addestramento € 65.000 - 2 anni

Maria Petracca

Estelle and Daniel Maggin Department of Neurology,
Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA

Determinazione delle concentrazioni intra ed extracellulari di sodio a livello encefalico in pazienti affetti da SM mediante l'impiego di RM a 7.0 Tesla

Borsa di ricerca € 80.000 - 2 anni

Dario Seppi

Dipartimento di Biologia cellulare e Neuroscienze,
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Tecniche avanzate di analisi molecolare volte all'identificazione di biomarker predittori di progressione di malattia nella sclerosi multipla

Borsa di addestramento € 41.000 - 2 anni

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

Maria Pia Abbraccio

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,
Università degli Studi di Milano, Milano

Strategie rimielinizzanti innovative per la sclerosi multipla: focus su GPR17, nuovo recettore coinvolto nel differenziamento oligodendrocitario

Progetto di ricerca € 170.000 - 2 anni

Luca Battistini

Unità di Neuroimmunologia, Fondazione Santa Lucia, Roma

Ruolo delle cellule MAIT nella sclerosi multipla: come la flora intestinale influenza le risposte autoimmuni

Progetto di ricerca € 110.000 - 2 anni

Bruno Bonetti

Dipartimento di Neuroscienze, Università di Verona, Ospedale Policlinico, Verona

Esosomi da cellule staminali mesenchimali adipose: un innovativo approccio terapeutico nell'encefalomielite autoimmune sperimentale

Progetto di ricerca € 120.000 - 2 anni

Erica Butti

Divisione di Neuroscienze, Fondazione Centro San Raffaele,
Milano

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

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Giacomo Casella

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

Microvescicole microgliali come vettore terapeutico in neuroinfiammazione

Borsa di addestramento € 40.000 - 2 anni

Emanuela Colombo

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

Astroцитi per la terapia cellulare della sclerosi multipla

Borsa di ricerca € 52.000 - 2 anni

Massimiliano Di Filippo

Clinica Neurologica, Università degli Studi di Perugia,
Ospedale S. Maria della Misericordia, Perugia

Inibizione mitocondriale ed encefalomielite autoimmune sperimentale: possibili strategie neuroprotettive

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Federica Eva Esposito

Dipartimento di Neurologia e Istituto di Neurologia
Sperimentale (INSPE), Fondazione Centro San Raffaele,
Milano

Un modello predittivo di risposta a fingolimod: integrazione di clinica, neuroradiologia e genetica

Progetto di ricerca € 175.000 - 2 anni

Giovanni Luigi Mancardi

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

Intensa immunosoppressione seguita da trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche e mesenchimali nella encefalite autoimmune sperimentale e in forme gravi di sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 150.000 - 3 anni

Carla Taveggia

Divisione di Neuroscienze e INSPE,
Fondazione Centro San Raffaele, Milano

Modulazione dell'attività enzimatica di TACE nella mielinizzazione e nella rimielinizzazione del SNC

Progetto di ricerca € 115.000 - 2 anni

NEURORIABILITAZIONE E NEUROPLASTICITÀ

Maura Casadio

Dipartimento di Informatica Bioingegneria Robotica e Ingegneria dei Sistemi (DIBRIS), Università degli Studi di Genova, Genova

Interfacce corpo-macchina basate sulle sinergie muscolari per riabilitazione neuromotoria personalizzata di persone affette da sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Valerio Chiurchiù

Unità di Neuroimmunologia, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

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

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Ugo Della Croce

Dipartimento POLCOMING, Università degli Studi di Sassari, Sassari

Un intervento riabilitativo basato sull'uso di realtà virtuale e treadmill per migliorare il cammino in individui affetti da sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 85.000 - 2 anni

Franca Deriu

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

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

Progetto di ricerca € 29.000 - 1 anno

Luca Ostacoli

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino, Orbassano (TO)

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

Progetto di ricerca € 60.000 - 3 anni

Nicola Smania

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Neuropsicologiche, Morfologiche e Motorie, Università di Verona, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona, Verona

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

Progetto di ricerca € 75.000 - 2 anni

Eleonora Tavazzi

Unità di Neuroriabilitazione, Centro Sclerosi Multipla, Istituto IRCCS Santa Maria Nascente, Fondazione Don Gnocchi, Milano

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

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

QUALITÀ DELLA VITA

Enrico Molinari

Dipartimento di Psicologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Milano

Migliorare la qualità di vita di persone con sclerosi multipla e dei loro familiari tramite un intervento di Mindfulness e Telemedicina

Progetto di ricerca € 117.075 - 2 anni

Rosalba Rosato

Dipartimento di Psicologia, Università degli Studi di Torino, Torino

Sviluppo e validazione preliminare della versione abbreviata e computerizzata dell'MSQL-54

Progetto di ricerca € 110.000 - 2 anni

PROGETTI SPECIALI 2013

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

Antonio Bertolotto

Neurologia 2, CRESM, AOU San Luigi, Orbassano (TO)

Biomarcatori di diagnosi e prognosi nella sclerosi multipla: possibile ruolo delle isoforme della Vitamina D Binding Protein

Progetto speciale € 80.000 - 1 anno

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

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

Progetto speciale € 450.000 - 2 anni

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

Maria Pia Abbracchio, Ivano Eberini

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Laboratorio di Farmacologia Cellulare e Molecolare della Trasmissione Purinergica, Università degli Studi di Milano, Milano

Sviluppo di un brevetto di nuovi modulatori di GPR17, un recettore chiave nei processi di rimielinizzazione

Progetto speciale € 100.000 - 1 anno

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DALLA FISM 2012

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

Francesca BOSCIA

Università di Napoli "Federico II", Facoltà di Medicina,
Dipartimento di Neuroscienze, Napoli

Studio del ruolo dell'isoforma dello scambiatore Na⁺/Ca²⁺ NCX3 nelle cellule oligodendrocitiche per individuare nuove strategie terapeutiche per il controllo della demielinizzazione e rimielinizzazione nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Roberta BRAMBILLA

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

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

Progetto di ricerca € 236.000 - 3 anni

Marika Maria Caterina FALCONE

Ospedale San Raffaele, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Milano

Ruolo dei meccanismi immunoregolatori intestinali nella patogenesi della sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Cinthia FARINA

Ospedale San Raffaele, Dipartimento di Neuroscienze, Milano

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

Progetto di ricerca € 155.000 - 2 anni

Giuseppe MATARESE

Facoltà di Medicina, Università degli Studi di Salerno, Dipartimento di Medicina e Chirurgia Baronissi, Salerno

Paradossi nella biologia delle cellule T regolatorie: la base molecolare per uno "switch" metabolico oscillatorio mTOR-dipendente nel controllo della tolleranza immunologica nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 300.000 - 3 anni

Claudia CANTONI

Washington University School of Medicine Neurology St. Louis, Missouri, USA

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

Borsa di ricerca € 85.000 - 2 anni

Diego FRESEGNA

Centro Europeo di Ricerca sul Cervello (CERC), Fondazione Santa Lucia, Roma

Il potenziale coinvolgimento dell'interleuchina-1beta nelle alterazioni dell'umore in un modello animale di sclerosi multipla

Borsa di addestramento € 41.500 - 2 anni

Fabrizia Claudia GUARNIERI

Ospedale San Raffaele, Divisione di Neuroscienze, Milano

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

Borsa di addestramento € 38.000 - 2 anni

Liliana Elisa LUCCA

Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Inserm UMR 1043, Toulouse, France

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

Borsa di addestramento € 56.000 - 2 anni

Claudia MINICI

Ospedale San Raffaele, DIBIT, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Milano

Caratterizzazione strutturale e biochimica della peptidil-arginina deiminasi 2, una proteina coinvolta nella destabilizzazione della guaina mielinica nella sclerosi multipla

Borsa di ricerca € 53.100 - 2 anni

Linda OTTOBONI

Ospedale San Raffaele, Istituto di Neurologia Sperimentale INSpe, Laboratorio di Neuroimmunologia, Milano

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

Borsa di ricerca senior € 72.000 - 2 anni

Simone PATERGNANI

Università di Ferrara, Dipartimento di medicina sperimentale e diagnostica - Sezione di patologia generale, Ferrara

Analisi della funzionalità e dell'energetica mitocondriale come caratteristiche principali del differenziamento oligodendrocitario

Borsa di ricerca € 50.000 - 2 anni

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI
DELLA MALATTIA**Andrea COSSARIZZA**

Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Modena

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

Progetto di ricerca € 172.000 - 2 anni

Maria DI IOIA

Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Dipartimento di Scienze Biomediche, Ce.SI, CHIETI

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

Borsa di addestramento € 40.000 - 2 anni

Massimo FILIPPI

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

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

Progetto di ricerca € 97.500 - 1 anno

Costanza GIANNÌ

Massachusetts General Hospital (MGH), Harvard Medical School (HMS), Boston, Massachusetts, USA

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

Borsa di addestramento € 56.000 - 2 anni

Claudia VERDERIO

Istituto CNR di Neuroscienze, Dipartimento di Farmacologia Medica, Milano

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

Progetto di ricerca € 170.000 - 3 anni

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

Sabina LUCHETTI

Netherlands Institute for Neuroscience (NIN), Department of Neuroimmunology, Amsterdam, The Netherlands

Neurosteroidi come agenti neuroprotettivi, pro-mielinizzanti e anti-infiammatori nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 140.000 - 3 anni

Serena MARTIRE

Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri Ottolenghi, Unità di Neurobiologia Clinica, Orbassano, Torino

La deregolazione di microRNAs e dei loro mRNAs bersaglio causa un difetto nel circuito di retroazione negativa che sopprime l'infiammazione in pazienti con sclerosi multipla

Borsa di addestramento € 22.000 - 1 anno

Miriam MATTOSCO

Imperial College London, Division of Brain Sciences, Centre for Neuroscience, London, UK

Rilevanza clinica del diverso effetto della terapia con anticorpo monoclonale anti alfa-4 integrina sulla mobilizzazione di cellule staminali ematopoietiche in pazienti affetti da sclerosi multipla

Borsa di ricerca € 78.000 - 2 anni

Rosetta PEDOTTI

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Unità di Neuroimmunologia e Patologia Muscolare, Milano

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

Progetto di ricerca € 87.000 - 2 anni

NEURORABILITAZIONE
E NEUROPLASTICITÀ**Letizia LEOCANI**

Ospedale San Raffaele, Dipartimento Neurologico, Milano

Effetto della stimolazione magnetica ripetitiva sulla deambulazione nella SM: studio di fase III controllato, randomizzato, in doppio cieco

Progetto di ricerca € 178.000 - 2 anni

Patrizia PANTANO

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

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

Progetto di ricerca € 50.000 - 2 anni

Maria Assunta ROCCA

Ospedale San Raffaele, Neuroimaging Research Unit Institute of Experimental Neurology, Milano

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

Progetto di ricerca € 183.200 - 2 anni

Domenico Antonio RESTIVO

Unità Operativa di Neurologia, Dipartimento di Medicina, Ospedale Garibaldi, Catania

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

Progetto di ricerca € 35.000 - 1 anno

Giorgio SANDRINI

IRCCS Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino e Università degli Studi di Pavia, Dipartimento di Sanità Pubblica, Neuroscienze, Medicina Sperimentale e Forense, Pavia

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

Progetto di ricerca € 54.000 - 2 anni

QUALITÀ DELLA VITA**Eleonora COCCO**

Università di Cagliari, Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, Centro Sclerosi Multipla, Ospedale Binaghi, Cagliari

Geoepidemiologia della sclerosi multipla: i fattori ambientali

Progetto di ricerca € 220.000 - 3 anni

Roberto D'AMICO

Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Oncologia, Ematologia e Patologie dell'Apparato Respiratorio, Unità di Statistica Medica, Modena

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

Progetto di ricerca € 200.000 - 3 anni

PROGETTI SPECIALI 2012**PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO**

Giancarlo COMI, Gianluigi MANCARDI on behalf of CoSMo Collaborative Study Group

Estensione "Studio di prevalenza della CCSVI nella sclerosi multipla e in altre malattie neurodegenerative (CoSMo)"

Progetto speciale € 100.000 - 1 anno

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

Antonio UCCELLI

CBA, Laboratorio di Neuroimmunobiologia, Genova

Studio immunologico ancillare al protocollo: cellule staminali mesenchimali per la terapia della sclerosi multipla-Progetto MESEM

Progetto speciale € 170.000 - 2 anni

NEURORIABILITAZIONE E NEUROPLASTICITÀ

Giampaolo BRICHETTO

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova

Multiple sclerosis rehabilitation outcomes

Progetto speciale € 380.000 - 2 anni

NEURORIABILITAZIONE E NEUROPLASTICITÀ

Maria Laura LOPES DE CARVALHO

Associazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova

Balance disorders in multiple sclerosis

Progetto speciale € 320.000 - 2 anni

QUALITÀ DELLA VITA

Alessandra SOLARI

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Unità di Neuroepidemiologia, Milano

Home-based palliative care for people with severe multiple sclerosis: developmental phase of the Palliative Network for Severely Affected Adults with MS in Italy (PeNSAMI) study

Progetto speciale € 60.000 - 1 anno

QUALITÀ DELLA VITA

Michela PONZIO

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, Genova

Famiglia e persona di fronte alla disabilità: il caso della sclerosi multipla (analisi stakeholder)

Progetto speciale € 114.000 - 1 anno

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DALLA FISM 2011

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

Cristina AGRESTI

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

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

Progetto di ricerca € 117.600 - 2 anni

Francesca ALOISI

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

Analisi dell'infezione con virus di Epstein-Barr e della risposta immunitaria nel fluido cerebrospinale e nel sangue di pazienti con sclerosi multipla mediante tecniche altamente sensibili di PCR

Progetto di ricerca € 97.000 - 1 anno

Vincenzo BARNABA

Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Roma

Immuno-attivazione cronica nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 100.000 - 1 anno

Paola CAIAFA

Sapienza Università di Roma, Facoltà di Farmacia e Medicina, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Roma

Riprogrammazione epigenetica nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 40.000 - 1 anno

Paolo CALABRESI

Università di Perugia, Clinica Neurologica, Laboratori di Neurologia Sperimentale, Dipartimento Specialità Medico-Chirurgiche e Sanità Pubblica, Ospedale S Maria della Misericordia, Perugia

Uno studio elettrofisiologico dei meccanismi di alterata plasticità sinaptica in modelli sperimentali di sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 35.000 - 1 anno

Annalisa CHIOCCHETTI

IRCAD & Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara

Ruolo di Osteopontina e degli anticorpi anti-Osteopontina nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 70.000 - 2 anni

Sandra D'ALFONSO

Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze Mediche, Novara

Mappatura fine dei loci di suscettibilità alla SM nella

popolazione dell'Italia continentale: dai marcatori genetici identificati attraverso studi di associazione genome-wide alla varianti causali

Progetto di ricerca € 150.000 - 2 anni

Dario DI LUCA

Università degli Studi di Ferrara, Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Diagnostica e Sperimentale, Ferrara

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

Progetto di ricerca € 100.000 - 1 anno

Bruno GRAN

University of Nottingham, Division of Clinical Neurology, Nottingham (UK)

Modulazione dell'equilibrio tra cellule T regolatrici e T helper 17 da parte di recettori Toll-like: implicazioni per la sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 28.000 - 1 anno

Roberta MAGLIOZZI

Istituto Superiore di Sanità, Biologia Cellulare e Neuroscienze, Roma

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

Progetto di ricerca € 69.300 - 2 anni

Mara MARONGIU

CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche, IRGB - Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica, Cittadella Universitaria Monserrato, Monserrato (CA)

Studio del meccanismo funzionale alla base dell'associazione di CBLB con la sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Stefano MORARA

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Neuroscienze, Milano

Ruolo protettivo di Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) nella patogenesi dell'EAE

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Francesco NOVELLI

Università di Torino, Dipartimento Medicina e Oncologia Sperimentale, Centro Ricerche Medicina Sperimentale, AOU San Giovanni Battista, Torino

Regolazione interferone-dipendente dei linfociti Th17 e Th22 nella sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 40.000 - 1 anno

Stefano PREVITALI

Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, INSPE,
Divisione di Neuroscienze, Milano

Ruolo di COP5/Jab1 nella mielinizzazione e nella rimielinizzazione del sistema nervoso centrale (SCN)

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Marco SALVETTI

Sapienza Università di Roma, Neurologia e Centro
Neurologico Terapie Sperimentali, Dipartimento
di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso, Roma

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

Progetto di ricerca € 150.000 - 2 anni

Antonio UCCELLI

Università di Genova, Dipartimento di Neuroscienze,
Oftalmologia e Genetica, Genova

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

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Flavia VALTORTA

Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor,
Divisione di Neuroscienze, Laboratorio
di Neuropsicofarmacologia Sperimentale, Milano

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

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Laura BERGAMASCHI

Duke University - Medical Center, Center for Human
Genetics, Durham, NC

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

Borsa di ricerca € 37.000 - 1 anno

Giuseppe CHIAPPETTA

Istituto Superiore di Sanità, Reparto di "Malattie
infiammatorie e demielinizzanti del sistema nervoso",
Dipartimento di "Biologia Cellulare e Neuroscienze", Roma

Ricerca di interazioni patogeneticamente rilevanti tra EBV e il retrovirus endogeno della famiglia W MSRV nel cervello con sclerosi multipla

Borsa di addestramento € 22.000 - 1 anno

Manolo SAMBUCCI

Istituto di ricovero e cura a carattere scientifico
Fondazione Santa Lucia, Unità di Neuroimmunologia, Roma

Ruolo svolto dall'immunosenescenza nell'insorgenza e nella progressione della sclerosi multipla

Borsa di ricerca senior € 64.000 - 2 anni

Anna FALCO

Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor,
Istituto Scientifico, Divisione di Neuroscienze, Milano

Regolazione degli interneuroni cerebrali e spinali da parte delle GTPasi Rac

Borsa di addestramento € 37.000 - 2 anni

Silvia MUSIO

IRCCS Istituto Neurologico C.Besta, Immunologia e Patologia
Muscolare, Milano

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

Borsa di ricerca € 52.000 - 2 anni

Jonathan VINET

Department of Neuroscience, section Medical Physiology,
University Medical Center Groningen, Groningen, The
Netherlands

Caratterizzazione di un fenotipo microgliale favorevole alla rimielinizzazione

Borsa di ricerca € 55.000 - 2 anni

CLASSIFICAZIONE E DIAGNOSI DELLA MALATTIA

Andrea COSSARIZZA

Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di
Scienze Biomediche, Sezione di Patologia Generale, Modena

Polifunzionalità delle cellule iNKT periferiche come marcatore immunologico delle differenti forme di sclerosi multipla

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Massimo FILIPPI

Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor,
Neuroimaging Research Unit, INSPE, Divisione
di Neuroscienze, Milano

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

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Pasquina MARZOLA

Università di Verona, Dipartimento di Informatica, Verona

Imaging funzionale nello studio della plasticità neuronale in un modello sperimentale di sclerosi multipla su ratto

Progetto di ricerca € 50.000 - 1 anno

Franca DERIU

Università di Sassari, Dipartimento di Scienze Biomediche, Lab di Fisiologia e Bioingegneria dell'Uomo, Sassari
Studio neurofisiologico, neuroradiologico e clinico del tronco encefalico in pazienti con sclerosi multipla
 Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Morena MARTUCCI

Charité Medical University, Institute of Biochemistry, Berlin (Germany)
Identificazione di marcatori infiammatori e dei relativi meccanismi specifici per la sclerosi multipla
 Borsa di addestramento € 58.000 - 2 anni

VERSO NUOVI TRATTAMENTI

Pasquale ANNUNZIATA

Università degli Studi di Siena, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Neurochirurgiche e del Comportamento, Siena
Studio degli effetti immunomodulatori di un nuovo cannabinoide agonista selettivo per il recettore CB2 su cellule immunocompetenti nella sclerosi multipla
 Progetto di ricerca € 40.000 - 1 anno

Luca BATTISTINI

Fondazione Santa Lucia, Neuroscienze Sperimentali, Roma
Ruolo delle cellule MAIT nella sclerosi multipla: come la flora intestinale influenza le risposte autoimmuni
 Progetto di ricerca € 50.000 - 1 anno

Francesco CUCCA

IRGB "Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica" (IRGB) of CNR, Dipartimento di Biomedicina del CNRIRGB, Cittadella Universitaria di Monserrato, Monserrato (CA)
Approccio razionale per la ricerca di composti per la cura della sclerosi multipla basato sull'analisi dei target biologici individuati dagli studi di associazione sull'intero genoma in Sardegna
 Progetto di ricerca € 100.000 - 1 anno

Roberta DE SIMONE

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma
I mitocondri come bersagli e mediatori degli effetti benefici degli agonisti PPAR γ nella sclerosi multipla
 Progetto di ricerca € 61.000 - 2 anni

Massimo DEGANO

Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Milano
Comprendere il meccanismo ed aumentare l'efficacia del composto FTY720 (Fingolimod) nella terapia della sclerosi multipla tramite un approccio di biologia strutturale
 Progetto di ricerca € 70.000 - 1 anno

Rosetta PEDOTTI

Neurological Institute Foundation IRCCS Carlo Besta, Neuroimmunology and Muscular Pathology Unit, Milano
Il sistema delle prokineticine nelle malattie demielinizzanti autoimmuni del sistema nervoso centrale: meccanismi patogenetici e possibili nuovi bersagli di terapia per la sclerosi multipla
 Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Paola TIRASSA

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto Biologia Cellulare & Neurobiologia, Roma
Il nerve growth Factor dato in forma di collirio in un modello animale di sclerosi multipla: uno studio prospettico sul trattamento durante le fasi precoci della malattia
 Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Loretta TUOSTO

Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin, Roma
Caratterizzazione delle vie di segnalazione del CD28 come bersagli terapeutici nella regolazione della tolleranza immunologica nella sclerosi multipla
 Progetto di ricerca € 100.000 - 2 anni

NEURORIABILITAZIONE E NEUROPLASTICITÀ

Laura BONZANO

Università degli Studi di Genova, DINOG - Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica, Genova
Performance motoria della mano come nuovo endpoint clinico quantitativo nella SM: valutazione longitudinale su pazienti CIS e correlazione con accumulo di disabilità e integrità tissutale alla RM
 Progetto di ricerca € 50.400 - 1 anno

Marco BOVE

Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Fisiologia Umana, Genova
L'impatto della riabilitazione motoria e cognitiva sulle proprietà dinamiche della struttura cerebrale: verso la personalizzazione di interventi terapeutici in pazienti affetti da sclerosi multipla
 Progetto di ricerca € 146.000 - 2 anni

Flavia MATTIOLI

Ospedali Civili di Brescia, UO Riabilitazione Specialistica, Brescia
L'efficacia della stimolazione tramite tDCS (transcranial Direct Current Stimulation) nella riabilitazione cognitiva della sclerosi multipla: studio clinico controllato
 Progetto di ricerca € 50.000 - 1 anno

Letizia LEOCANI

IRCCS university Hospital San Raffaele, Neurological Dep.t;
INSPE-Experimental Neurophysiology, Milano

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

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Franca TECCHIO

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), ISTC, LET'S,
Dip. di Neuroscienze, Ospedale Fatebenefratelli, Roma

**Alleviare la Fatica nella sclerosi multipla mediante
stimolazione transcranica in corrente continua (tDCS):
è possibile differenziare target di stimolazione entro
le corteccie primarie sensorimotorie?**

Progetto di ricerca € 24.000 - 1 anno

Valentina TOMASSINI

University of Oxford, Nuffield Department of Clinical
Neurosciences, (fMRIB Centre and Clinical Neurology),
fMRIB Centre, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford,
Cardiff (UK)

**Valutazione delle capacità di immaginazione motoria e
degli effetti della pratica mentale di un compito motorio
in pazienti affetti da sclerosi multipla**

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

Carlo TROMPETTO

Istituto di Neurologia, Dipartimento di Neuroscienze,
Oftalmologia e Genetica, Università di Genova, Genova

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

Progetto di ricerca € 41.300 - 2 anni

QUALITÀ DELLA VITA**Marta BASSI**

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze
Cliniche, Milano

**Il sistema della cura: promozione del benessere tra
persone con sclerosi multipla, caregiver ed operatori
sanitari**

Progetto di ricerca € 30.000 - 1 anno

PROGETTI SPECIALI 2011**VERSO NUOVI TRATTAMENTI****Carla TAVEGGIA**

Istituto di Neurologia Sperimentale, Ospedale San Raffaele,
Milano

Laboratorio Interazioni Axo-Gliali

Progetto speciale € 240.000 - 3 anni

NEURORIABILITAZIONE E NEUROPLASTICITÀ**Diego CENTONZE**

Università Tor Vergata, Dipartimento di Neuroscienze,
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Roma

**Trattamento sintomatico per persone con SM mediante
procedure di neurostimolazione centrale e periferica**

Progetto speciale € 401.100 - 3 anni



**COMITATO SCIENTIFICO
FISM 2013**

BIOMEDICAL RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Antonio Bertolotto

AOU S. Luigi Gonzaga, Centro di riferimento Regionale Sclerosi Multipla (CReSM) – Orbassano (TO)

Luca Battistini

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

Diego Centonze

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

Gabriela Constantin

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

Francesco Cucca

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

Roberto Furlan

Unità di Neuroimmunologia Clinica, Ospedale San Raffaele, DIBIT – MILANO

Peter Goodfellow

Visiting Professor in Biosciences at the University of Kent, UK

Matilde Inglese

Mount Sinai School of Medicine – NEW YORK, USA

Paolo Muraro

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

Stefano Pluchino

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

Lawrence Wrabetz

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

**SOCIAL & BEHAVIOURAL SCIENCE RESEARCH FISM
SCIENTIFIC COMMITTEE**

Franco Franchignoni

Fondazione Salvatore Maugeri, Istituto Scientifico di Riabilitazione – VERUNO (NO)

Olga Ciccarelli

Department Brain Repair and Rehabilitation, University College London, Institute of Neurology – LONDON, UK

Monica Falautano

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

Peter Feys

REVAL Rehabilitation Research Center. BIOMED. University of Hasselt – DIEPENBEEK, Belgium

Maura Pugliatti

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

Marco Rovaris

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

Alessandra Solari

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

DIRETTORE RICERCA SCIENTIFICA

Paola Zarin

Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Fondazione Italiana Sclerosi Multipla – GENOVA



**COMITATO SCIENTIFICO
FISM 2012**

BIOMEDICAL RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Antonio Bertolotto

AOU S. Luigi Gonzaga, Centro di riferimento Regionale Sclerosi Multipla (CReSM) – Orbassano (TO)

Luca Battistini

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

Diego Centonze

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

Gabriela Constantin

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

Francesco Cucca

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

Roberto Furlan

Unità di Neuroimmunologia Clinica, Ospedale San Raffaele, DIBIT – MILANO

Peter Goodfellow

Visiting Professor in Biosciences at the University of Kent, UK

Matilde Inglese

Mount Sinai School of Medicine – NEW YORK, USA

Paolo Muraro

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

Stefano Pluchino

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

Lawrence Wrabetz

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

**SOCIAL & BEHAVIOURAL SCIENCE RESEARCH FISM
SCIENTIFIC COMMITTEE****Olga Ciccarelli**

Department Brain Repair and Rehabilitation, University College London, Institute of Neurology – LONDON, UK

Monica Falautano

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

Peter Feys

Department of Physical Medicine and Rehabilitation, AZ Sint-Blasius – DENDERMONDE, BELGIUM

Franco Franchignoni

Fondazione Salvatore Maugeri, Istituto Scientifico di Riabilitazione – Veruno, NOVARA

Maura Pugliatti

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

Marco Rovaris

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

Jean-Louis Thonnard

Universite catholique de Louvain, Institute of NeuroScience (IoNS) – BRUXELLES, BELGIQUE

DIRETTORE RICERCA SCIENTIFICA**Paola Zarin**

Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Fondazione Italiana Sclerosi Multipla – GENOVA



**COMITATO SCIENTIFICO
FISM 2011**

Francesca Bagnato

Department of Radiology and Radiological Sciences, Institute of Imaging Science; Vanderbilt University – Nashville, USA

Luca Battistini

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

Antonio Bertolotto

ASO S. Luigi Gonzaga, Centro di riferimento Regionale Sclerosi Multipla (CReSM) – Orbassano, TORINO

Diego Centonze

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

Gabriela Constantin

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

Francesco Cucca

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

Umberto Dianzani

Dipartimento di Scienze Mediche, I.R.C.A.D., Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro – NOVARA

Roberto Furlan

Unità di Neuroimmunologia Clinica, IRCCS Ospedale San Raffaele, DIBIT – MILANO

Maria Grazia Grasso

IRCCS Fondazione Santa Lucia – ROMA

Matilde Inglese

Mount Sinai School of Medicine – NEW YORK, USA

Gianvito Martino

Unità di Neuroimmunologia, IRCCS Ospedale San Raffaele, DIBIT – MILANO

Paolo Muraro

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

Vito Pistoia

Laboratorio di Oncologia, I.R.C.C.S. G. Gaslini – GENOVA

Paolo Riccio

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università della Basilicata – POTENZA

Marco Salvetti

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

Alessandra Solari

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

Jean-Louis Thonnard

Université catholique de Louvain, Institute of NeuroScience (IoNS) – BRUXELLES, BELGIQUE

Bernard Zalc

Bâtiment ICM, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Hôpital de la Salpêtrière – PARIS, FRANCE

CHAIRMAN COMITATO SCIENTIFICO FISM**Giulio Levi**

Istituto Superiore di Sanita', Laboratorio Fisiopatologia di Organo e Sistema - ROMA

LISTA DEGLI AUTORI / LIST OF THE AUTHORS

Abbracchio Maria Pia	85	Filippini Graziella	131
Aloisi Francesca	49	Gran Bruno	30
Annunziata Pasquale	92	Maccarrone Mauro	94
Avolio Carlo	102	Marongiu Mara	17
Baldari Cosima	26	Marzola Pasquina	109
Barnaba Vincenzo	60	Morara Stefano	39
Basaglia Nino	123	Novelli Francesco	33
Bassi Marta	127	Palmisano Marilena	89
Battistini Luca	72	Pedotti Rosetta	98
Bononi Angela	36	Perga Simona	20
Caiafa Paola	23	Piccio Laura	42
Calabresi Paolo	111	Ria Francesco	46
Casazza Simona	79	Riccio Paolo	75
Chiappetta Giuseppe	52	Saccardi Riccardo	82
Cossarizza Andrea	62	Solari Alessandra	135
De Stefano Nicola	65	Tecchio Franca	116
Deriu Franca	68	Tirassa Paola	105
Disanto Giulio	14	Tomassini Valentina	120
Dolei Antonina	56		

Finito di stampare nel mese di maggio 2014
da Arti Grafiche Bicidi srl - Genova

