

2017

La ricerca

sulla

sclerosi
multipla

Finanziata dalla Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

SCLE^{ONLUS}
ROSI
MULT
IPLA
associazione
italiana

un mondo
libero dalla SM

AISM. INSIEME, UNA CONQUISTA DOPO L'ALTRA

2017

LA RICERCA SULLA SCLEROSI MULTIPLA

Finanziata dalla
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

A cura di
Roberta Guglielmino
Area Ricerca Scientifica AISM-FISM

Coordinamento editoriale
Manuela Capelli
Area Comunicazione e Ufficio Stampa AISM

Progetto grafico
Francesca Massa

Copyright 2017
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

Finito di stampare nel mese di maggio 2017
da Arti Grafiche Bicidi srl - Genova

ISBN 978-88-7148-122-7

INTRODUZIONE / INTRODUCTION**Mario A. Battaglia**

7

**INSIEME CAMBIAMO LA REALTÀ DELLA SCLEROSI MULTIPLA /
TOGETHER WE WILL CHANGE THE LIFE WITH MULTIPLE SCLEROSIS****Paola Zaratin**

9

SM PROGRESSIVA / PROGRESSIVE MS *Special call progressive***Stefano Pluchino**

12

Cellule staminali neurali direttamente indotte per il trattamento della sclerosi multipla progressiva (iNSC-MS)
Stably expandable induced neural stem cells for the treatment of progressive multiple sclerosis (iNSC_MS)

Stefano Carlo Previtali

15

Ruolo di Jab1 nella differenziazione e sopravvivenza degli oligodendrociti: un nuovo modello murino
di progressiva demielinizzazione e degenerazione del sistema nervoso centrale
Role of Jab1 in oligodendrocyte differentiation and survival: a new mouse model of progressive
CNS demyelination and axonal degeneration

Maria Assunta Rocca

18

La misura dell'atrofia del midollo cervicale come strumento per il monitoraggio della malattia e
per la predizione della disabilità a lungo termine in pazienti con sclerosi multipla
Assessment of cervical cord atrophy as a tool for monitoring disease evolution and for predicting
long-term disability in patients with multiple sclerosis

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

22

Sviluppo e validazione preliminare della versione abbreviata e computerizzata dell'MSQOL-54
An abbreviated computerized version of the MSQOL-54: development and preliminary validation
using confirmatory factor analysis and item response theory

Ambra Bisio

25

La riabilitazione della scrittura nella sclerosi multipla: un approccio innovativo per valutare e contrastare
il deterioramento della scrittura in pazienti affetti da sclerosi multipla
Re-writing in multiple sclerosis: a novel approach to evaluate and cope with the writing deterioration
in patients with multiple sclerosis

Elise Houdayer

28

Stimolazione magnetica transcranica profonda con H-coil per il trattamento non invasivo del dolore
degli arti inferiori nella sclerosi multipla
Deep transcranial magnetic stimulation with H-coil for the non-invasive treatment of lower limb pain in multiple sclerosis

Maura Casadio

31

Interfacce corpo-macchina basate sulle sinergie muscolari per riabilitazione neuromotoria personalizzata
di persone affette da sclerosi multipla
Body-machine interfaces based on muscle synergies for adaptive and personalized neuromotor rehabilitation
of persons with multiple sclerosis

Ugo Della Croce

34

Un intervento riabilitativo basato sull'uso di realtà virtuale e treadmill per migliorare il cammino in individui
affetti da sclerosi multipla
Virtual reality - treadmill combined intervention for improving gait in individuals affected by multiple sclerosis

Luca Prosperini

38

Studio pilota sull'associazione tra compromissione cognitiva e disturbo dell'equilibrio
in pazienti con sclerosi multipla
Investigating the association between cognitive impairment and balance disturbance: a pilot study
in patients with multiple sclerosis

Massimiliano Pau	41
Sviluppo di una piattaforma hardware-software innovativa per la riabilitazione dell'equilibrio in individui affetti da SM basata sulla Balance Board Nintendo Wii	
Development of an innovative hardware-software platform for balance rehabilitation in people with MS based on Nintendo Wii Balance Board system	
DIAGNOSI E MONITRAGGIO DELLA MALATTIA / DISEASE DIAGNOSIS AND MONITORING	
Massimo Filippi	44
Valutazione delle modifiche longitudinali della rete di connettività funzionale (connectome) nei pazienti con sclerosi multipla	
Longitudinal assessment of large-scale brain functional networks (connectome) in patients with multiple sclerosis	
Christian Cordano	48
Tomografia a coerenza ottica ad altissima risoluzione nell'encefalomielite autoimmune sperimentale: un modello per la comprensione del ruolo clinico dell'OCT nella sclerosi multipla	
Ultra-high resolution Optical Coherence Tomography in experimental autoimmune encephalomyelitis: a model for understanding the clinical role for OCT in multiple sclerosis	
Maria Petracca	52
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	
Quantification of extra-and intracellular brain sodium concentration in MS using 7.0 Tesla MRI	
Marcello Pinti	54
Respirazione e glicolisi nei linfociti di pazienti con diverse forme di sclerosi multipla	
Respiration and glycolysis in lymphocytes from patients with different forms of multiple sclerosis	
Dario Seppi	57
Tecniche avanzate di analisi molecolare volte all'identificazione di biomarker predittori di progressione di malattia nella sclerosi multipla	
Advanced molecular analyses for the identification of biomarkers of disease progression in multiple sclerosis	
PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO / PATHOGENESIS AND RISK FACTORS	
Barbara Serafini	61
Studio dell'espressione genica degli infiltrati immunitari isolati mediante microdissezione laser da tessuto cerebrale di persone con sclerosi multipla	
Gene expression analysis of laser microdissected immune infiltrates in the multiple sclerosis brain	
Silvia Romano	64
Studio della noise di espressione genica di singola cellula in linee cellulari linfoblastoidi di gemelli monozigoti discordanti per sclerosi multipla, pazienti sporadici e controlli	
Analysis of gene expression noise at the single cell level in lymphoblastoid cell lines obtained from identical twins discordant for multiple sclerosis, unrelated multiple sclerosis patients and controls	
Luca Battistini	67
Cellule MAIT e SM: come la flora intestinale influenza le risposte autoimmuni	
Role of MAIT cells in MS: how the gut flora influence autoimmune responses	
Giuseppe Matarese	70
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	
Unravelling paradoxes in regulatory T cell biology: the molecular basis for an mTOR-dependent oscillatory metabolic switch controlling immune tolerance in multiple sclerosis	
Fabia Filipello	73
Interazione tra astrociti e cellule T nel corso della sclerosi multipla	
Astrocyte-T cell interaction in multiple sclerosis	

Bruno Gran	76
Ruolo dei recettori TLR2 nell'attivazione dell'inflammatione da parte di infezioni nella SM	
How do infections activate inflammation in MS? Role of TLR2	
Ada Maria Tata	79
Relazione tra alterazione del sistema colinergico e l'inflammatione nella SM: studi in topi ESA e in pazienti in fase recidivante remittente	
Relationship between cholinergic dysfunction and inflammation in multiple sclerosis: studies in EAE mice and RRMS patients	
Claudio Sette	83
Coinvolgimento della via di segnale IL-1β/MyD88 nel differenziamento delle cellule umane Th17 patogeniche nella SM	
Implication of the IL-1 β /MyD88 pathway in the differentiation of human Th17 pathogenic cells in multiple sclerosis	
VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS	
Federica Eva Esposito	87
Un modello predittivo di risposta a fingolimod: integrazione di clinica, neuroradiologia e genetica	
A predictive model of response to fingolimod: integration of clinics, neuroradiology and genetics	
Maria Pia Abbracchio	91
Strategie rimielinizzanti innovative per la SM: focus su GPR17, nuovo recettore coinvolto nel differenziamento oligodendrocitario	
Innovative re-myelinating strategies for MS via the exploitment of the new oligodendrocyte receptor GPR17	
Luca Palazzolo	96
Modellazione molecolare di GPR17: interazioni con ligandi pro-infiammatori non convenzionali	
GPR17 molecular modelling: interactions with non-conventional pro-inflammatory ligands	
Bruno Bonetti	99
Eosomi da cellule staminali mesenchimali adipose: un approccio innovativo nell'encefalomielite sperimentale autoimmune	
Exosomes from adipose mesenchymal stem cells: innovative therapeutic approach in experimental autoimmune encephalomyelitis	
Luca Muzio	102
Acidosi nelle malattie neuroinfiammatorie: il ruolo dei canali Asics	
ACidosis in CNS Inflammatory Diseases: the role of Asics channels (ACCIDIA)	
Giacomo Casella	105
Microvescicole microgliali come vettore terapeutico per la neuroinflammatione	
Microglial microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation	
Emanuela Colombo	108
Astrociti per la terapia cellulare della sclerosi multipla	
Astrocytes for cell-therapy in multiple sclerosis	
Alessandra Mallano	111
Sviluppo di un anticorpo umano in grado di interrompere il pathway mediato da CD161 allo scopo di definire nuove strategie terapeutiche nella SM	
Development of a human antibody able to break the CD161-mediated pathway in order to design new therapeutic strategies in MS disease	
PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM /	
FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS	
2016, 2015	114-124
COMITATO SCIENTIFICO FISM / FISM SCIENTIFIC COMMITTEE	
2016, 2015	125-128

LISTA DEGLI AUTORI / LIST OF THE AUTHORS

Abbracchio Maria Pia	91	Muzio Luca	102
Battistini Luca	67	Palazzolo Luca	96
Bisio Ambra	25	Pau Massimiliano	41
Bonetti Bruno	99	Petracca Maria	52
Casadio Maura	31	Pinti Marcello	54
Casella Giacomo	105	Pluchino Stefano	12
Colombo Emanuela	108	Previtali Stefano Carlo	15
Cordano Christian	48	Prosperini Luca	38
Della Croce Ugo	34	Rocca Maria Assunta	18
Esposito Federica Eva	87	Romano Silvia	64
Filipello Fabia	73	Rosato Rosalba	22
Filippi Massimo	44	Seppi Dario	57
Gran Bruno	76	Serafini Barbara	61
Houdayer Elise	28	Sette Claudio	83
Mallano Alessandra	111	Tata Ada Maria	79
Matarese Giuseppe	70		

Introduzione

«Tutte le persone con sclerosi multipla hanno diritto a una ricerca innovativa, rigorosa e di eccellenza». Questo, nel 2014, le persone con SM hanno voluto scrivere nella “Carta dei diritti” che più di 55 mila italiani hanno firmato, a partire dal Ministro per la Salute.

Cosa vuol dire “eccellenza”?

Nel 1996 AISM è stata la prima organizzazione ‘privata’ a introdurre in Italia la *peer review* proprio per selezionare la “ricerca di eccellenza”, per aprire una competizione tra i migliori e ricevere in modo sempre più ampio libere proposte da ciascuno di voi.

Oggi ne stiamo raccogliendo i frutti, come questo Compendio documenta.

Per il Bando del 2016, che prosegue il percorso dei progetti qui documentati, l’Associazione ha ricevuto 157 progetti di ricerca, e 30 richieste di Borse di studio: i valutatori internazionali e il Comitato scientifico avrebbero finanziato, per la loro eccellenza, 78 di questi progetti e 13 Borse di ricerca, per un totale di oltre 11 milioni di euro. Il Bando 2016 ha potuto finanziare progetti per 3 milioni: è tanto, ma non basta. Siamo tutti impegnati ad aumentare i fondi disponibili, perché i progetti e i ricercatori eccellenti ci sono.

Dal 1987, infatti, AISM con la sua Fondazione ha finanziato 389 ricercatori: alcuni erano ai primi passi, e oggi sono ritenuti tra i più autorevoli esperti mondiali nella sclerosi multipla.

Questa è dunque la *mission* della nostra Associazione: fare emergere l’eccellenza della ricerca per trovare la soluzione della SM. Prima ancora dei progetti che realizzate, la risorsa decisiva per rispondere ai problemi ancora insoluti della SM siete voi, come persone e come scienziati. È importante sapere che il 76% dei ricercatori da noi finanziati negli anni continua a svolgere ricerca sulla SM: L’apporto di ciascuno di voi è unico e insostituibile, decisivo. Come ha scritto Goethe: «Non è abbastanza fare dei passi che un giorno ci condurranno alla meta, ogni passo deve essere esso stesso una meta».

Una meta importante è certamente rappresentata, per AISM e la sua Fondazione, dall’aver superato il traguardo dei 61,3 milioni di euro investiti negli ultimi 29 anni per la ricerca.

Una meta altrettanto prestigiosa sono le 144 pubblicazioni di studi FISM, con impact factor medio di 5,2, registrate nel 2016 sulle più importanti riviste scientifiche. Vuol dire che la ricerca finanziata da FISM è efficace e riconosciuta.

Tuttavia, non basta: nell’eccellenza che vi chiediamo - e che troviamo nelle conclusioni di questi progetti - c’è molto di più.

Quando, come si legge nelle prossime pagine, scrivete che «i nostri risultati hanno implicazioni future per lo sviluppo di strategie terapeutiche farmacologiche e riabilitative» voi date sostanza alle aspettative di tante persone, che chiedono alla ricerca le risposte per migliorare la qualità della propria vita. L’eccellenza della ricerca è solo quella che cambia la vita delle persone.

Con il vostro apporto voi contribuite a realizzare l’Agenda della ricerca internazionale e l’Agenda della Sclerosi Multipla 2020. Date vigore all’azione di AISM che, grazie alla ricerca, ha i numeri e la forza per chiedere alle Istituzioni la messa in atto di una politica sanitaria *evidence based*: l’eccellenza della ricerca è solo quella che genera politiche sanitarie sostenibili, efficaci, di lungo termine.

Insieme stiamo cambiando la realtà della sclerosi multipla. Ma non abbiamo ancora concluso il nostro compito. Una cosa sola ci chiedono le 110.000 mila persone con SM che vivono in Italia: dobbiamo tenere alto il livello della nostra ricerca, dobbiamo tenere alta la passione per risolvere una volta per tutte il problema della sclerosi multipla.

Mario Alberto Battaglia
Presidente Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

Introduction

«Everyone with multiple sclerosis has the right to an innovative and rigorous research of excellence». This is what, in 2014, people with MS wished to write in their “Bill of Rights” that more than 55,000 Italians signed, starting by the Minister of Health.

What does “excellence” mean?

In 1996, the Italian MS Society was the first ‘private’ organisation to introduce peer review in Italy in order to select a “research of excellence”, open a competition between the best and receive ever-larger, free proposals from each of you.

Today we are gathering the fruits, as this compendium documents.

For the 2016 Call for Proposals, which continues the path of the projects documented here, our Society received 157 research projects and 30 fellowships applications: international evaluators and the Scientific Committees would have liked to have funded, for their excellence, 78 of these projects and 13 research fellowships, adding up to more than 11 million euros. The 2016 Call was only able to fund projects for 3 millions: it’s a lot, but not enough. We are all committed to increase the available funds as there are more excellent projects and researchers to be funded.

Indeed, since 1987, the Italian MS Society and its Foundation have funded 389 researchers, some of whom were moving the first steps in this field and are now considered to be among the world’s leading experts on multiple sclerosis.

This is the “mission” of our Society: to bring out the excellence of research in order to find the solution to MS. Beyond the projects you are carrying out, the determining resource to respond to the still unsolved problems of MS, are you, as people and as scientists. It is important to know that 76% of the researchers we have funded over the years continue research on MS: each and every one of you is unique and decisive. As Goethe wrote, “It is not enough to take steps that will lead us to the goal one day, every step must be a goal in itself”.

For the Italian MS Society and its Foundation an important goal is certainly represented by having exceeded the amount of 61.3 million euros invested in research over the last 29 years.

An equally prestigious goal is reached by the 144 publications of Italian MS Society studies, with an average impact factor of 5.2, recorded in 2016 major scientific journals. This means that the research funded by the Italian MS Foundation is effective and recognized.

However, it is not enough: in the excellence that we ask you for - and that we find in the conclusions of these projects - there is much more.

When you write that “our findings have future implications for the development of pharmacological and rehabilitative therapeutic strategies”, you give substance to the expectations of so many people who ask the researchers for improving the quality of their lives. Only excellence in research can change people’s lives.

With your contribution, you are collaborating to achieve the International Research Agenda and the 2020 Multiple Sclerosis Agenda. You are giving strength to the Italian MS Society action that, through the research, has the numbers and force to ask institutions for implementing an “evidence based” health policy: excellence in research is the only one which can generate sustainable, effective and long-term health policies.

This is the responsibility of those who choose to act for the common good.

Together we are changing life with multiple sclerosis. But we have not yet completed our job. One thing we are asked by the 110,000 people with MS living in Italy: we have to keep up our level of research, we have to keep our passion high in order to defeat the problem of multiple sclerosis once and for all.

Mario Alberto Battaglia

Chairman of the Italian Multiple Sclerosis Foundation

Insieme cambiamo la realtà della sclerosi multipla

«**Insieme cambiamo la realtà della sclerosi multipla**» è il titolo del Congresso Scientifico Annuale 2017 di AISM e la sua Fondazione. La nostra capacità di concretizzare le priorità della ricerca dell'Agenda SM 2020 sarà tanto maggiore quanto più diventerà l'agenda di tutti gli attori in gioco.

Per vincere questa sfida serve una scienza della sostenibilità collettiva: nuove metriche multidimensionali per valutare l'impatto collettivo della ricerca sulla persona e garantire a tutte le parti interessate di rimanere impegnate per cambiare la realtà della SM. **AISM attraverso la sua Fondazione, pioniera nella ricerca che risponde ai bisogni delle persone con SM, ha deciso di investire nello sviluppo di questa scienza.**

Puntare tramite il Bando annuale sull'innovazione, basata sulle idee del ricercatore, rimane un ingrediente chiave della dimensione di eccellenza che caratterizza la scienza della sostenibilità collettiva. Dal 2013 al 2016 tramite il proprio Bando annuale AISM ha finanziato la ricerca sulla SM per un totale di 12,3 milioni di euro. I risultati dei 31 progetti terminati nel 2016 hanno permesso di ottenere 60 pubblicazioni con Impact Factor medio di 4.6. Questi progetti hanno portato innovazione promuovendo un avanzamento significativo della conoscenza in ambiti strategici della nostra agenda scientifica: SM progressiva (3), neuroriabilitazione terapeutica (6), qualità della vita (1), diagnosi e monitoraggio della malattia (5), patogenesi e fattori di rischio (8), nuovi trattamenti (8).

Tre progetti in questo Compendio coprono aree rilevanti di studio per la **SM Progressiva**: il primo riguarda un nuovo trattamento con cellule staminali; il secondo individua un nuovo modello sperimentale che attualmente manca, rendendo difficile l'identificazione di terapie per contrastare la neurodegenerazione; il terzo identifica misure di risonanza magnetica cerebrali come strumento per il monitoraggio della malattia e la predizione della disabilità a lungo termine.

Sulla vita delle persone con SM incidono soprattutto le ricerche sul **valore terapeutico della neuroriabilitazione per la qualità della vita**. I 6 studi qui presentati propongono trattamenti neuroriabilitativi per contrastare il dolore e migliorare la funzionalità motoria e l'equilibrio. L'impegno dei ricercatori di FISM in questo ambito di ricerca ha portato a 8 pubblicazioni con Impact Factor medio di 3,34.

Per cambiare la realtà della SM sarà importante avere una migliore e più **tempestiva diagnosi insieme a un monitoraggio continuo ed efficace** dell'evoluzione della malattia. I progetti terminati mettono in evidenza l'importanza di avere analisi di risonanza magnetica sempre più specifiche e nuovi biomarcatori con valore prognostico e predittivo di malattia. Una borsa di ricerca di due anni, in questo ambito, ha prodotto 6 pubblicazioni con Impact Factor medio di 5,49.

Sono 8 i progetti conclusi che documentano l'importanza di aumentare la conoscenza sulla genetica e i meccanismi immunitari coinvolti nella **patogenesi della malattia**. L'impegno dei ricercatori di FISM in questo ambito di ricerca ha portato a 21 pubblicazioni. 7 con Impact Factor medio di 8,15 presentano i risultati di un progetto triennale focalizzato sulle cause dell'infiammazione nella SM.

Occorre poi che ogni conoscenza sia indirizzata alla messa a punto di **nuovi trattamenti** per combattere la malattia: qui sono presentati 8 progetti che propongono nuovi target o molecole da sviluppare per ottenere nuove terapie mirate a spegnere l'infiammazione caratteristica della malattia, o volti allo sviluppo di strategie rimielinizzanti per riparare i danni provocati dalla SM. 21 sono le pubblicazioni di questa area di ricerca, di cui 11 con Impact Factor medio di 6,11 presentano i risultati di un progetto biennale. Una borsa di ricerca di due anni, in questo stesso ambito, ha prodotto 3 pubblicazioni con Impact Factor medio di 10,71.

Sviluppare l'eccellenza di questa ricerca e trasformarla in salute e qualità della vita per la persona con SM è la sfida di tutti gli attori in gioco.

Paola Zarin

Direttore Ricerca Scientifica Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

Together we will change the life with multiple sclerosis

«**T**ogether to change life with MS» is the title of 2017 Annual Scientific Congress of the Italian MS Society and its Foundation. Our ability to concretise the research priorities of the 2020 MS Agenda will be much greater as it will become the agenda of all the actors at play.

To overcome this challenge, we need a science of collective sustainability: new multidimensional metrics to assess the collective impact of research on the individual and ensure that all the stakeholders remain committed to change life with MS. **Through its Foundation, a pioneer in research that responds to the needs of people with MS, the Italian MS Society has decided to invest in the development of this science.**

Aiming at innovation through the annual Call for proposals, based on researchers' ideas, remains a key factor of the excellence that characterises the science of collective sustainability. From 2013 to 2016, Italian MS Society has funded MS research for a total of 12.3 million euros, through its annual Call for proposals. The results of the 31 projects completed in 2016 have allowed 60 publications with an average Impact Factor of 4.6. These projects have led to innovation by promoting a significant advancement of knowledge in strategic areas of our scientific agenda: progressive MS (3), therapeutic neuro-rehabilitation (6), quality of life (1), disease diagnosis and monitoring (5), pathogenesis and risk factors (8), new treatments (8).

Three projects in this Compendium cover important study areas for **Progressive MS**: the first concerns a new stem cell treatment; the second identifies a new experimental model that is currently missing and fundamental to identify therapies to counteract neurodegeneration; the third identifies magnetic resonance imaging measures of the brain for monitoring disease evolution and predicting long-term disability.

Research on the therapeutic value of **neuro-rehabilitation for the quality of life** has a major impact on the lives of people with MS. The 6 studies presented here offer **neuro-rehabilitative treatments** to counteract pain and improve motor function and balance. The commitment in this field of the Italian MS Foundation researchers has led to 8 publications with an average Impact Factor of 3.34.

To change life with MS it will be important to have a better and **timely diagnosis together with a continuous and effective monitoring of the evolution of the disease**. The completed projects highlight the importance of having increasingly specific magnetic resonance imaging and new biomarkers with prognostic and predictive value of the disease. A two-year research grant in this field produced 6 publications with an average Impact Factor of 5.49.

There are 8 completed projects that document the importance of increasing knowledge about genetics and the immune mechanisms involved in the **pathogenesis of the disease**. The commitment of the Italian MS Foundation researchers in this field has led to 21 publications. Seven of these have an average Impact Factor of 8.15 and present the results of a three-year project focusing on the causes of inflammation in MS.

It is also necessary that all the knowledge is directed to the development of **new treatments** to fight the disease: 8 projects presented here propose new targets or molecules to obtain new therapies aimed at extinguishing the characteristic inflammation of the disease, or the development of remyelinating strategies to repair the damage caused by MS. There are 21 publications in this research area, 11 of which, with an average Impact Factor of 6.11, present the results of a two-year project. A two-year research grant, in this same field, has produced 3 publications with an average Impact Factor of 10.71.

Developing the excellence of this research and transforming it into health and quality of life for the person with MS is the challenge for all the involved stakeholders.

Paola Zaratin

Director of Scientific Research for the Italian Multiple Sclerosis Foundation

La ricerca

sulla

**sclerosi
multipla**

SM PROGRESSIVA

PROGRESSIVE MS

SPECIAL CALL PROGRESSIVE

Stefano Pluchino

Department of Clinical Neurosciences, Division of Stem Cell Neurobiology,
Wellcome Trust-Medical Research Council Stem Cell Institute,
University of Cambridge, Cambridge (UK)

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Luca Peruzzotti-Jametti, Giulio Volpe, Beatrice Balzarotti,
Tommaso Leonardi, Nunzio Vicario**

Cellule staminali neurali direttamente indotte per il trattamento della sclerosi multipla progressiva (iNSC-MS)

PREMESSE E OBIETTIVI

I recenti avanzamenti nel campo della biologia delle cellule staminali hanno generato aspettative positive sulla possibilità di trattare un ampio spettro di disturbi del sistema nervoso centrale (SNC) impiegando cellule staminali non emopoietiche.

L'idea iniziale era quella che i trapianti di cellule staminali agissero rimpiazzando le cellule danneggiate o disfunzionali. Oggi sappiamo che esistono diversi meccanismi esercitati dalle cellule staminali che sono in grado non solo di differenziare in cellule mature, ma anche di secernere fattori trofici e modulare l'attività delle cellule dell'ospite aumentando il recupero e la rigenerazione.

Questo progetto ha puntato a valutare il potenziale terapeutico e investigarne i meccanismi di una nuova classe di cellule staminali neurali direttamente indotte (iNSCs) ottenute dalla riprogrammazione di fibroblasti derivati dalla pelle e trapiantati in modelli sperimentali murini di SM cronica (EAS) e in un modello sperimentale di demielinizzazione focale. I principali vantaggi dell'utilizzo di iNSCs è che queste cellule sono stabili ed espandibili, non hanno problemi di compatibilità, perché ottenute dalla riprogrammazione di cellule autologhe, e mantengono la possibilità di differenziare nelle principali popolazioni cellulari del SNC.

RISULTATI

Al fine di valutare il potenziale delle iNSCs di esercitare un'azione trofica e immuno-modulante è stato utilizzato un modello sperimentale murino di EAS cronica e sono state iniettate le iNSCs per via intracerebroventricolare. Questo modello di malattia offre la possibilità di valutare il miglioramento funzionale nei topi mediante parametri comporta-

mentali e tramite analisi istopatologiche. I topi con EAS sono stati seguiti quotidianamente e i sintomi comportamentali registrati fino a 30 giorni dopo il trapianto. Abbiamo poi processato il SNC dei topi per l'analisi patologica. Il gruppo di topi EAS trapiantati con iNSCs ha mostrato un recupero funzionale superiore rispetto ai topi di controllo, e l'analisi patologica ha mostrato che le iNSCs trapiantate sono capaci di migrare nel SNC e localizzarsi a livello delle lesioni infiammatorie riducendo il numero di infiltrati infiammatori. Studi *in vitro* tramite co-culture di macrofagi e iNSCs hanno mostrato che le iNSCs sono in grado di ridurre il grado di attivazione dei macrofagi e di ridurre i livelli di espressione di geni associati con un fenotipo M1-like (pro-infiammatorio) a favore dell'espressione di geni associati ad un fenotipo M2-like (anti-infiammatorio).

È stato, inoltre, valutato il potenziale remielinizante delle iNSCs *in vivo* dopo trapianto focale in un modello murino di demielinizzazione focale mediata da lisolecitina. Le iNSCs sono state trapiantate intraliesionalmente e l'analisi patologica ha mostrato che le cellule sopravvivono al trapianto, riescono a integrarsi con le cellule dell'ospite e a differenziare verso la linea oligodendogliale, responsabile della formazione della mielina.

CONCLUSIONI

Le iNSCs hanno mostrato un elevato potenziale terapeutico nei modelli sperimentali animali utilizzati e i nostri risultati mostrano che le iNSCs sono in grado di svolgere questa azione non solo favorendo la rigenerazione per differenziazione diretta, ma anche esercitando un effetto modulante e trofico. Tuttavia prima dell'applicazione clinica, è importante trovare delle fonti di cellule staminali che siano si-

cure per i pazienti ed elucidare a pieno i meccanismi molecolari esercitati dal trapianto. Questo progetto ha permesso di raccogliere evidenze precliniche importanti sull'attività delle iNSCs *in vivo* e di sviluppare approcci *in vitro* che permettono di investigare, in un sistema meno complesso e ridu-

zionistico, i meccanismi molecolari alla base della loro azione. Come tale ha quindi contribuito a creare una solida base di partenza per elucidare i meccanismi delle iNSCs che rappresentano una delle linee di cellule staminali più promettenti per essere trasferite nella pratica clinica.

Stably expandable induced neural stem cells for the treatment of progressive multiple sclerosis (iNSC-MS)

INTRODUCTION AND AIMS

Recent advances in stem cell biology have raised great expectations that a wide range of diseases of the central nervous system (CNS) can be tackled using non-hematopoietic stem cells.

The initial idea was that stem cell transplants act replacing damaged or dysfunctional cells. Now we know that there are different mechanisms exerted by stem cells that are able not only to differentiate into mature cell, but also to secrete trophic factors and to modulate host cells activity exchanging recovery and regeneration.

This project aims to evaluate the therapeutic potential and to investigate the underlying mechanisms of a new class of direct induced neural stem cells (iNSCs) obtained by reprogramming of skin-derived fibroblasts and transplanted in murine experimental model of chronic MS and in an experimental model of focal demyelinated. The main advantages for using iNSCs is that those cells are stable and expandable, they skip biocompatibility problems because are obtained by reprogramming of autologous cells maintaining the differentiation potential towards the main neural cell population of CNS.

RESULTS

In order to evaluate the iNSCs potential to exert a trophic action and immune-modulating action we used an experimental model of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice and cells were transplanted intracerebroventricularly. This model is suitable to evaluate the functional improvement of mice throughout behavioural parameters and to analyse the pathological characteristics of tissues. Animals were followed during the study and behavioural symptoms were registered

up to 30 days post transplantation. The CNS of animals were used to pathological analysis. Transplanted group showed an increased functional recovery compared to non transplanted mice and pathological analysis showed that iNSCs were able to migrate into the CNS and localize close to inflammatory lesions reducing the infiltrates.

Reductionist study *in vitro* on cell cultures of activated macrophages and iNSCs showed that stem cells were capable to reduce the expression of M1-phenotype associated factors and to increase the M2 phenotype that are linked to rescue and regeneration after damage.

The remyelinating potential of iNSCs were evaluated *in vivo* using an experimental model of focal demyelination on mice mediated by a toxin, the lysolecithin. iNSCs were transplanted intralésionally and pathological analysis showed that cells survived up to 21 day post transplantation, are able to integrate with host cells and to differentiate towards oligodendroglial lineage, responsible of myelin formation.

CONCLUSIONS

Stem cells showed a high therapeutic potential in animal experimental model and our results showed that iNSCs are capable to develop this action not only supporting the regeneration through direct differentiation but also exerting a modulating and trophic effect. Nevertheless before clinical application, is required to find a safe stem cells source for patients and to fully elucidate the molecular mechanisms that cell grafts exert. This project allowed to collect important preclinical evidences on action of iNSCs *in vivo* and to develop *in vitro* approaches that allow to investigate, in a less complex and re-

ductionist system, the molecular mechanisms of their action.

As such it contributes to create a solid starting base

to elucidate the mechanisms of iNSCs that represent one of the most promising stem cell lines to be translate to be translate into clinical practice.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Publications

- Volpe G, Bernstock JD, Peruzzotti-Jametti L and Pluchino S. Modulation of host immune responses following non-hematopoietic stem cell transplantation: Translational implications in progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2016 Dec 15. pii: S0165-5728(16)30312-5.
- Pluchino S and Peruzzotti-Jametti L. Interleukin-four induced one (IL411) promotes central nervous system remyelination. *Brain.* 2016 Dec;139(Pt 12):3052-3054
- Pluchino S, Peruzzotti-Jametti L and Frezza C. Astrocytes power fuel neurons during stroke. *Swiss Med Wkly* 2016; 146:w14374
- Drago D, Basso V, Gaude E, Volpe G, Peruzzotti-Jametti L, Bachi A, Musco G, Andolfo A, Frezza C, Mondino A and Pluchino S. Metabolic determinants of the immune modulatory function of neural stem cells. *J Neuroinflammation* 2016 Sep 2;13(1):232
- Stewart S, Gessler F, Pluchino S and K Moreau. Inside out: unpredicted Annexin A2 localisation on the surface of extracellular vesicles. *Matters* Feb 19th, 2016 <https://www.sciencematters.io/articles/201602000015>
- Ossola B, Zhao C, Goedert M, Compston A, Pluchino S, Franklin RJM, Spillantini MG. Neuronal expression of pathological tau accelerates oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *GLIA.* 2016 Mar; 64(3):457-71
- Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B and Pluchino S. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci.* 2016 Feb 6;17(2)
- Bernstock JD, Lee Y, Peruzzotti-Jametti L, Southall N, Johnson KR, Maric D, Volpe G, Kouznetsova J, Zheng W, Pluchino S, Hallenbeck JM. A Novel Quantitative High-throughput Screen Identifies Drugs that both Activate SUMO-conjugation via the Inhibition of MicroRNAs 182 and 183 and Facilitate Neuroprotection in a Model of Oxygen and Glucose Deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Feb; 36(2): 426-41
- Fuster-Matanzo A, Gessler F, Leonardi T, Iraci N and Pluchino S. Acellular Approaches for Regenerative Medicine: on the Verge of Clinical Trials with Extracellular Membrane Vesicles? *Stem Cell Res Ther* 2015 Dec 2;6: 227
- Tambalo S, Peruzzotti-Jametti L, Rigolio R, Fiorini S, Bontempi P, Mallucci G, Sbarbati A, Marmiroli P, Cavaletti G, Pluchino S and Marzola P. Functional magnetic resonance imaging reveal brain cortex remodelling in a rat model of chronic multiple sclerosis. *J Neurosci* 2015 July 8;35(27): 10088 –10100
- Smith JA, Leonardi T, Huang B, Iraci N, Vega B, Pluchino S. Extracellular vesicles and their synthetic analogues in aging and age-associated brain diseases. *Biogerontology.* 2015 Apr;16(2):147-85
- Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, Pluchino S. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol.* 2015 Apr;127-128:1-22
- Tannahill GM, Iraci N, Gaude E, Frezza C, Pluchino S. Metabolic reprogramming of mononuclear phagocytes in progressive multiple sclerosis. *Front Immunol* 2015 Mar 11;6:106
- Lener T, Gimona M, Aigner L, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 2015 Dec 31; 4: 30087

Congress Presentations

- Pluchino S. *chair and invited lecture* .The Cambridge Centre for Brain Repair Spring School 2015: Inflammation: Its role in Degeneration and Regeneration, 30th March– 1st April 2015, Cambridge, UK
- Pluchino S. Introductory Lecture and Evs in Inflammation and Immunity. 2015 Meeting of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV), 23rd-26th April 2015, Washington (USA)
- Pluchino S. RNA non codificanti e plasticità terapeutica delle cellule staminali neurali. Congresso Scientifico Annuale AISM e la sua Fondazione, 27th-29th Maggio 2015, Roma, Italy
- Pluchino S. invited lecture. Biannual meeting of the International Society of Neurochemistry (ISN), 23rd-27th August 2015, Cairns (Australia)
- Pluchino S. Plenary lecture: How Stem Cells Signal to Host Immune Cells. Drug Discovery '15 ELRIG meeting, 2nd-3rd September 2015, Telford (UK)
- Pluchino S. Invited lecture: Exosomes. Joint European Neonatal Societies (jENS) Congress, 16th-20th September 2015, Budapest (Hungary)
- Pluchino S. How stem cells speak with immune cells FENS Featured Regional Meeting, 7th-10th October 2015, Thessaloniki (Greece)
- Pluchino S. International Conference on Cell-Based Therapies for Multiple Sclerosis, 19th-21th November 2015, Lisbon (Portugal)
- Pluchino S. keynote lecture :How Stem Cells Signal to the Host Immune System.Hong Kong & Guangzhou International Conference on Stem Cell and Regenerative Medicine, 21st December 2015, Hong Kong Science Park
- Pluchino S. keynote lecture: Signalling properties of stem cell EVs. Advanced Drug Delivery in Cancer: intracellular targets and vesicular carriers, 4th-5th March 2016, Manchester (UK)
- Pluchino S. *invited lecture* Signaling Properties Of Stem Cell Vesicles, Extracellular Vesicles: Biology and Therapeutic Potential, 12th-13th July 2016, Cambridge (UK)
- Pluchino S. Plenary Lecture: Neural stem cell-mediated brain repair. 67th National Congress of the Physiological Society of Italy, 21st-23rd September 2016, Catania (Italy) (*plenary lecture*)
- Pluchino S. Opening Lecture: Pre-clinical models to test EV therapies of complex CNS diseases 3rd International Symposium – The therapeutic applications of extracellular vesicles, 29th-30th September 2016, San Sebastian (Spain)
- Pluchino S. keynote lecture: Stem cell signalling and repair of multiple sclerosis brain More than neurons: toward a less neuronocentric view of brain disorders, 1st-3rd December, Turin (Italy)

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM Speciale Progressive 2014 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 61.000 €

Research project funded by FISM Special Call Progressive 2014 for the period of 1 year and the amount of € 61,000

Stefano Carlo Previtali

Unità di Rigenerazione Neuromuscolare, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE),
Divisione di Neuroscienze, Ospedale San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Cristina Rivellini, Emanuela Porrello

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Giorgia Dina, Angelo Quattrini, Neuropatologia sperimentale, INSPE,
Divisione di Neuroscienze, Ospedale San Raffaele, Milano

Roberto Furlan, Unità di Neuroimmunologia clinica, INSPE, Divisione di Neuroscienze,
Ospedale San Raffaele, Milano

Cinthia Farina, Unità di Immunobiologia delle malattie neurologiche, INSPE,
Divisione di Neuroscienze, Ospedale San Raffaele, Milano

Ruggero Pardi, Unità di Biologia leucocitaria, Divisione di Immunologia,
Ospedale San Raffaele, Milano

Klaus A. Nave, Corinna Lappe-Siefke, Department of Neurogenetics,
Max Planck Institute of Experimental Medicine, Gottingen, Germany

Ueli Suter, Institute of Molecular Health Sciences, Department of Biology, Swiss Federal
Institute of Technology Zurich, ETH Zurich, Switzerland

Ruolo di Jab1 nella differenziazione e sopravvivenza degli oligodendrociti: un nuovo modello murino di progressiva demielinizzazione e degenerazione del sistema nervoso centrale

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia cronica infiammatoria del sistema nervoso centrale (SNC). La demielinizzazione è comunemente attribuita ad un meccanismo infiammatorio di tipo autoimmune, a cui corrisponde una fase clinica a remissione-remittenza. Nella SM è presente anche una progressiva neurodegenerazione, che si può manifestare in forma primaria, o secondaria alla forma remittente-remissiva, configurando le cosiddette forme progressive di SM. Recenti dati di letteratura sottolineano come la neurodegenerazione del SNC sia parte integrante del processo patogenetico della SM. Infatti, le terapie anti-infiammatorie sono molto efficaci nelle fasi iniziali "infiammatorie", ma poco efficaci nelle fasi più tardive "neurodegenerative". Poco si sa dei meccanismi patogenetici delle fasi progressive di SM, e non esistono modelli animali su cui studiarli.

Noi abbiamo recentemente caratterizzato un modello animale murino conseguente all'inattivazione del gene Jab1 negli oligodendrociti (OL) che presenta pro-

gressiva demielinizzazione, infiammazione e neurodegenerazione del SNC, con quadro neuropatologico molto simile a quello delle forme progressive di SM. In questo progetto come primo obiettivo abbiamo caratterizzato questo modello animale nei suoi aspetti neuropatologici e molecolari, e come secondo obiettivo investigato il ruolo di Jab1 nella rimielinizzazione del SNC.

RISULTATI

Come primo obiettivo abbiamo completato di caratterizzare la demielinizzazione e neurodegenerazione dei topi mutanti (Jab1KO). Abbiamo constatato che il SNC si sviluppa normalmente fino a 30 giorni dopo la nascita (P30), per poi presentare una progressiva demielinizzazione, infiammazione del SNC (costituita prevalentemente da microglia/macrofagi) e neurodegenerazione (degenerazione assonale e perdita di fibre). Il quadro è progressivamente più grave passando da P40 a P60 e molto grave a P90 (età in cui molti topi già muoiono).

Abbiamo poi valutato se la demielinizzazione fosse una conseguenza di una progressiva riduzione del numero di OL o di suoi precursori (OPC), ma in realtà il numero di queste cellule non diminuisce nel tempo nel SNC dei topi mutanti. Neppure abbiamo riscontrato difetti di proliferazione, sopravvivenza o differenziazione di OL e OPC. Quello che abbiamo invece osservato è la presenza di un danno del DNA degli OL, indotto dall'assenza di Jab1, che porta a senescenza queste cellule. La senescenza si associa a cronica infiammazione e ad elevazione dei radicali dell'ossigeno (ROS), con conseguente degenerazione assonale.

In parallelo abbiamo fatto degli studi di trascrittomico a partire dai nervi ottici dei topi mutanti (rispetto ai controlli) per identificare altri *pathway* alterati, ed abbiamo riscontrato una modificazione in 1317 geni. Questi geni sono coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, risposta immunitaria, regolazione della trascrizione degli OL e inibizione della mielinizzazione.

Nel secondo obiettivo abbiamo valutato il ruolo di Jab1 nella rimielinizzazione. Abbiamo indotto un danno del SNC mediante il modello dell'encefalite

sperimentale autoimmune (ESA; demielinizzazione infiammatoria) e mediante assunzione di cuprizone (pura demielinizzazione). L'induzione di ESA nei topi Jab1KO non ha mostrato un peggioramento della malattia o un maggior difetto nella remissione, anche se la forma indotta anche nei topi di controllo è stata così grave da non poter osservare sostanziale recupero. Nei topi trattati con cuprizone, invece, abbiamo avuto una buona rimielinizzazione nei topi di controllo mentre i topi mutanti non hanno rimielinizzato, anzi hanno mostrato un ulteriore peggioramento del quadro con sovrapposta neurodegenerazione.

CONCLUSIONI

I nostri risultati suggeriscono che il topo KO per Jab1 costituisce un buon modello animale della SM progressiva. Questo modello sembra identificare un nuovo meccanismo potenzialmente coinvolto nella patogenesi della SM progressiva, che riguarda la senescenza degli oligodendrociti. Infine, presentiamo dati che assegnano un ruolo a Jab1 anche nei meccanismi di rimielinizzazione del sistema nervoso centrale.

Role of Jab1 in oligodendrocyte differentiation and survival: a new mouse model of progressive CNS demyelination and axonal degeneration

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Demyelination is commonly attributed to autoimmune mechanism. Indeed, active CNS inflammatory lesions cause the acute neurological symptoms in the relapsing-remitting form of MS. However, primary or secondary neurodegeneration is also present and correlates with patient disability in progressive forms of MS. Recent data suggest that neurodegeneration is part of the pathogenetic mechanism of MS and may initiate events that disrupt the immune response. Anti-inflammatory therapies are effective at reducing relapses and lesion frequency, however efficacious therapies to block progressive neurodegeneration in MS are not known. Moreover, there are no available animal models that mimic progressive MS to further understand the pathogenesis of progressive MS as well as to develop potential therapies. We recently generated and characterized

a new mouse mutant with the conditional deletion of Jab1 in oligodendrocytes (OLs) that develop progressive CNS demyelination, inflammation and axonal degeneration, thus mimicking most of the aspects of progressive MS. In the present research grant we aimed at (AIM1) to fully characterize this mouse model at pathological and molecular level, and (AIM2) to evaluate the role of Jab1 in CNS remyelination.

RESULTS

In AIM1, we characterized the extent of demyelination, axonal loss and inflammatory infiltration of the CNS in mice with conditional inactivation of Jab1 in oligodendrocytes (Jab1KO mice). Clinically, Jab1KO mice were normal until 30 days of age (P30), when they start to show progressive motor impairment and reduced size and weight as compared to controls. We also observed 50% mortality at P70, and that all Jab1KO mice die within six months of age.

We then analyzed histology. At P20, Jab1KO mice showed minimal signs of hypomyelination in the CNS and normal protein myelin content (as MBP, myelin basic protein). From P40 instead, we observed reduction progressive demyelination and reduced protein myelin content, which was more consistent at P60 and severe at P90.

From P60, CNS of Jab1KO mice also showed diffuse inflammatory infiltration and neurodegeneration (axonal loss), which significantly worsened at P90. Inflammatory cells were mainly composed by microglia/macrophages, with minimal signs of disrupted blood-brain-barrier only at later time points (P90).

Then, we quantified the number of OLs and OL-predecessors (OPCs), and investigated their ability to differentiate, proliferate and survive in mutant mice. Our results suggest that mutant OLs and OPCs can differentiate and proliferate properly, and we did not observe apoptosis. Instead, we revealed that demyelination is the consequence of DNA damage in OLs, as Jab1 disrupts the DNA damage response, resulting in OL senescence. Senescent OLs induce chronic neuro-inflammation with the activation of resident microglia and generation of reactive oxygen species (ROS). We measured high levels of ROS in mutant optic nerve, spinal cord and brain, thus sus-

taining progressive axonal degeneration and loss.

Moreover, we performed the transcriptome analysis from optic nerves of pre-symptomatic mutant mice (20 days old) to identify further molecular pathways involved in demyelination and neurodegeneration. The analysis showed 1317 genes dysregulated in mutant mice. These genes belong to pathways involved in cell cycle control, immune response, transcriptional regulation of OLs, and inhibition of myelination.

Finally, in AIM2 we evaluated the role of Jab1 in remyelination. We induced demyelination by the EAE and cuprizone model. While in EAE we did not detect significant differences between mutant mice and controls, we observed a significant defect in remyelination after cuprizone treatment. Difference may be due to defective regeneration already present in the mouse EAE model.

CONCLUSIONS

Our results suggest that Jab1KO is a good animal model to investigate progressive MS. This model also identified a new potential molecular mechanism involved in the pathogenesis of progressive MS, which resides in oligodendrocytes senescence. Further, our results outline a role for Jab1 also in the remyelination of the CNS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Rivellini C, Porrello E, Dina G, Nave KA, Lappe-Siefke C, Suter U, Pardi R, Quattrini A, Previtali SC. Role of Jun activating binding protein 1 (Jab1) in Central Nervous System (CNS) myelination. XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease; Bilbao, July 15-18, 2015

Rivellini C, Porrello E, Dina G, Nave KA, Lappe-Siefke C, Suter U, Pardi R, Quattrini A, Previtali SC. Jab1 inactivation in oligodendrocytes causes CNS demyelination and inflammation. Gordon Research Conference, Myelin – Rethinking Functions, Revealing Mechanisms, Developing Medicines-Renaissance Tuscany Il Ciocco Lucca (Barga), Italy May 15-20, 2016

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM Speciale Progressive 2014 per il periodo di un anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 74.000 €

Research project funded by FISM Special Call Progressive 2014 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 74,000

Maria Assunta Rocca

Unità di Neuroimaging Quantitativo, INSPE, Divisione di Neuroscienze,
Istituto scientifico San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Massimo Filippi, Andrea Falini, Giancarlo Comi, Paola Valsasina

La misura dell'atrofia del midollo cervicale come strumento per il monitoraggio della malattia e per la predizione della disabilità a lungo termine in pazienti con sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Il midollo spinale è frequentemente colpito nella sclerosi multipla (SM) con un notevole impatto sulla disabilità dei pazienti. Oltre a lesioni focali o diffuse, le persone con SM sviluppano atrofia del midollo. Precedenti studi hanno dimostrato che il midollo cervicale è il più colpito e che l'atrofia midollare è maggiore nei pazienti con forme progressive rispetto a quella recidivante-remittente (RR) ed è significativamente associata alla disabilità clinica.

La quantificazione dell'atrofia midollare è complessa nella SM. L'introduzione del metodo semiautomatico "active surface" (AS) ha migliorato la misurazione dell'area trasversa midollare (ATM) anche per lunghe porzioni del midollo, permettendo di caratterizzarne anche la distribuzione topografica. Malgrado ciò, nelle persone con SM molti aspetti di tale misurazione devono ancora essere indagati, tra cui la validazione della quantificazione longitudinale dell'atrofia e la definizione del valore prognostico delle misure di risonanza magnetica (RM) del midollo spinale a lungo termine.

Gli obiettivi del progetto sono:

obiettivo 1: validare l'analisi longitudinale dell'atrofia del midollo cervicale con il metodo AS e valutarne sensibilità e accuratezza rispetto a quelle ottenute con metodi convenzionali;

obiettivo 2: valutare il valore delle misure di RM convenzionali, dell'atrofia del midollo e delle loro variazioni dopo 2 anni nel predire il peggioramento della disabilità dopo 10 anni nei pazienti con SM.

RISULTATI

Abbiamo studiato una coorte di pazienti con SM e di controlli sani (CS), parte di uno studio prospettico clinico e di RM in corso presso la nostra Unità da 10 anni. Tutti i soggetti sono stati valutati clinica-

mente (incluso il punteggio EDSS [Expanded Disability Status Scale]) e con acquisizioni di RM a 1.5 Tesla dell'encefalo e del midollo cervicale al basale e dopo 2 anni. I pazienti sono stati contattati per una rivalutazione neurologica a 10 anni (follow-up [FU] a lungo termine).

Abbiamo reclutato 42 pazienti con SM e 9 CS. Al basale, 13 pazienti avevano una SMRR; 14 una SM secondariamente progressiva (SP) e 15 una SM primariamente progressiva. Alla rivalutazione a lungo termine (FU mediano=11.5 anni), due pazienti erano deceduti per cause legate alla SM (polmonite) ed è stato assegnato loro un EDSS=10. Due pazienti hanno rifiutato la rivalutazione. Durante il FU, l'EDSS è peggiorato in 21 pazienti, 6 pazienti SMRR sono evoluti a SMSP e 9 hanno cambiato terapia.

I risultati ottenuti sono i seguenti.

Obiettivo 1. L'ATM misurata con il metodo AS o Losseff si è ridotta significativamente nei pazienti con SM, ma non nei CS. Nei pazienti, rispetto ai CS, è stata trovata un'interazione significativa "tempo-per-gruppo" delle variazioni dell'atrofia midollare, mentre non è emerso alcun effetto del fenotipo di malattia. L'analisi delle curve normalizzate dell'ATM ha mostrato una distinzione netta delle curve dei CS rispetto a quelle dei pazienti al basale. La curva al FU dei CS si sovrapponeva con quella al basale, mentre quella dei pazienti mostrava una riduzione dell'ATM, soprattutto nelle porzioni inferiori del midollo cervicale. Il numero di soggetti necessari per osservare un effetto di un eventuale trattamento sulle misure di atrofia del midollo era circa dimezzato utilizzando il metodo AS rispetto a Losseff (n=72 vs n=164 per identificare un effetto del trattamento del 50%).

Obiettivo 2. All'analisi univariata, corretta per la durata del FU e il fenotipo di malattia, le variabili pre-

dittive del peggioramento dell'EDSS al FU a lungo termine risultavano: l'anisotropia frazionaria (AF) media basale della sostanza bianca apparentemente normale (SBAN) dell'encefalo ($r=-0.35$, $p=0.05$), la diffusività media (DM) basale della sostanza grigia (SG) dell'encefalo ($r=0.48$, $p=0.0057$), la DM basale della SBAN dell'encefalo ($r=0.36$, $p=0.048$) e le variazioni della DM del midollo ($r=0.28$, $p=0.09$). La DM basale della SG dell'encefalo ($\beta=0.57$, $p=0.002$), le variazioni della DM del midollo ($\beta=2.7$, $p=0.04$) e il numero di lesioni midollari al basale ($\beta=-0.21$, $p=0.12$) risultavano predittori indipendenti del peggioramento dell'EDSS ($r^2=61\%$), con un diverso effetto nelle forme progressive vs le forme RR di SM. Considerando solo le forme progressive, solo la DM basale della SG dell'encefalo ($\beta=0.39$, $p=0.039$) ed il numero di lesioni midollari al basale ($\beta=-0.23$,

$p=0.008$) predicevano il peggioramento dell'EDSS ($r^2=57\%$).

CONCLUSIONI

La quantificazione dell'atrofia midollare è possibile nei pazienti con SM e le misure dell'ATM con il metodo AS risultano più sensibili alle variazioni longitudinali rispetto al metodo Losseff, suggerendo che tale approccio potrebbe essere applicato per stimare la progressione dell'atrofia midollare, un'utile misura surrogata per monitorare la neuroprotezione nei pazienti con SM.

L'integrazione di differenti misure di RM di danno dell'encefalo e del midollo potrebbe migliorare la predizione dell'evoluzione clinica a lungo termine dei pazienti con SM, suggerendo la rilevanza delle misure di RM come marker per monitorare la progressione di malattia e gli interventi terapeutici.

Assessment of cervical cord atrophy as a tool for monitoring disease evolution and for predicting long-term disability in patients with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The spinal cord is frequently involved in multiple sclerosis (MS), with a relevant impact on patients' clinical disability. In addition to focal and/or diffuse lesions, MS patients usually develop cord atrophy. Previous studies have consistently demonstrated that the cervical portion of the cord is more affected than lower segments, cord tissue loss is more pronounced in patients with progressive than in relapsing MS, and cord atrophy is significantly associated with clinical disability.

Measuring cord atrophy in MS is challenging, but the introduction of the semi-automated active surface (AS) method improved the measurements of cord cross-sectional area (CSA) also along large portions of the cord and the characterization of cervical cord atrophy distribution along several vertebral levels. Despite this, there are still several unmet needs in MS patients' cord atrophy assessment, including the validation of atrophy quantification in a longitudinal setting and the definition of the long-term prognostic role of spinal cord MRI measures.

The specific aims of this project were:

aim 1. To validate the analysis of cervical cord atrophy with the AS in a longitudinal setting. Sensitivity and accuracy of AS-derived CSA measures over

time was compared with those of conventional methods;

aim 2. To assess the value of cervical cord atrophy and conventional MRI metrics and their changes over two years in predicting the accumulation of disability after 10 years in MS patients.

RESULTS

We evaluated a cohort of MS patients and healthy controls (HC), who are part of a prospective clinical and MRI study going on at our Unit since 10 years. All subjects have been assessed clinically (including Expanded Disability Status Scale [EDSS] rating) and with cervical cord and brain 1.5 Tesla MRI at baseline and after two years. All patients have been contacted for a 10-year neurological re-evaluation (long-term follow-up [LTFU]).

Forty-two MS patients and 9 HC were recruited. At baseline, 13 patients had relapsing-remitting (RR) MS; 14 secondary progressive (SP) MS and the remaining 15 primary progressive (PP) MS. A clinical re-assessment has been performed after a median FU of 11.5 years. At LTFU, two patients had died for reasons attributable to MS (pneumonia) and they were given an EDSS score of 10. Two patients refused the re-assessment. During the FU, 21 patients have worsened

clinical disability, 6 evolved from RRMS to SPMS, and 9 changed treatment. The following are the main results obtained.

Aim 1. CSA measured with AS and Losseff methods did not change significantly over time in HC, while it decreased significantly in MS patients. In MS patients vs controls, a significant “time-by-group” interaction of CSA change was found, whereas no significant “time-by-group” interaction was found when considering the effect of phenotype. The analysis of normalized curves of cord CSA identified a net separation of the curves of HC from those of MS patients at baseline. The FU curve for HC strictly overlapped with the baseline curve, while those for MS patients showed a CSA decrease compared with baseline, most evident in the caudal portions. The number of subjects needed to observe any treatment effect was almost halved when using the AS compared to the Losseff method (e.g., $n=72$ vs $n=164$ to detect a 50% treatment effect).

Aim 2. At the univariate analysis of prediction, after adjusting for FU duration and disease clinical phenotype, the following variables were associated with a significant worsening of EDSS at LTFU: brain baseline normal-appearing white matter (NAWM) average fractional anisotropy (FA) ($r=-0.35$, $p=0.05$), brain baseline gray matter (GM) average mean diffusivity (MD) ($r=0.48$, $p=0.0057$), brain baseline

NAWM average MD ($r=0.36$, $p=0.048$), longitudinal changes of cord MD ($r=0.28$, $p=0.09$). Brain baseline GM average MD ($\beta=0.57$, $p=0.002$), longitudinal changes of cord MD ($\beta=2.7$, $p=0.04$) and baseline number of cord lesions ($\beta=-0.21$, $p=0.12$) were identified as significant independent predictors of EDSS deterioration ($r^2=61\%$), with a differential effect in progressive vs relapsing MS patients. When only progressive MS patients were included into the model, brain baseline GM average MD ($\beta=0.39$, $p=0.039$) and baseline number of cord lesions ($\beta=-0.23$, $p=0.008$) were predictors of EDSS worsening ($r^2=57\%$).

CONCLUSIONS

Spinal cord atrophy quantification is feasible in MS patients and cord AS CSA measurements were more sensitive to longitudinal changes in MS patients than Losseff measurements, suggesting that such an approach might be applied to assess the rate of spinal cord atrophy as a valuable surrogate outcome measure for monitoring neuroprotection in MS.

The integration of different MRI measures of cord and brain damage might contribute to predict MS patients' longitudinal evolution over a long-term FU, suggesting the relevance of MRI measures as markers to monitor disease progression and therapeutic interventions in this condition.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Valsasina P, Rocca MA, Horsfield MA, Copetti M, Filippi M. A longitudinal MRI study of cervical cord atrophy in multiple sclerosis. *J Neurol* 2015; 262: 1622-1628 [Epub ahead of print 1 May 2015; doi: 10.1007/s00415-015-7754-z]

Abstract

Rocca MA, Valsasina P, Preziosa P, Aboulwafa M, Horsfield MA; Comi G, Falini A, Filippi M. A comprehensive assessment of cervical cord lesions in patients with multiple sclerosis on T1-MPRAGE at 3T: relationship with cord atrophy and disability. *Eur J Neurol* 2016; 23 (Suppl 1): 841

Storelli L, Aboulwafa M, Rocca MA, Valsasina P, Preziosa P, Copetti M, Rovira A, Montalban X, Kearney H, Ciccarelli O, Matthews L, Palace J, Gallo A, Bisecco A, Lukas C, Bellenberg B, Comi G, Filippi M. The combined use of 3D T1- and T2-weighted sequences improves cervical cord lesion detection in patients with multiple sclerosis: a multicenter study at 3T. *Mult Scler J* 2016; 22 (S3): 523-524

Rocca MA, Valsasina P, Preziosa P, Aboulwafa M, Horsfield MA, Comi G, Falini A, Filippi M. A comprehensive assessment of cervical cord lesions in patients with multiple sclerosis on T1-MPRAGE at 3T: relationship with cord atrophy and disability. *Mult Scler J* 2016; 22 (S3): 527

Rocca MA, Valsasina P, Preziosa P, Aboulwafa M, Horsfield MA, Comi G, Falini A, Filippi M. A comprehensive assessment of cervical cord lesions in patients with multiple sclerosis on T1-MPRAGE at 3T: relationship with cord atrophy and disability. *Neurol Sci* 2016; 37 (Suppl October 2016): S66

Storelli L, Aboulwafa M, Rocca MA, Valsasina P, Preziosa P, Copetti M, Rovira A, Montalban X, Kearney H, Ciccarelli O, Matthews L, Palace J, Gallo A, Bisecco A, Lukas C, Bellenberg B, Comi G, Filippi M. The combined use of 3D T1- and T2-weighted sequences improves cervical cord lesion detection in patients with multiple sclerosis: a multicenter study at 3T. *Neurol Sci* 2016; 37 (Suppl October 2016): S196

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

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

La ricerca

sulla

**sclerosi
multipla**

**NEURORIABILITAZIONE
E QUALITÀ DELLA VITA**

NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Rosalba Rosato

Dipartimento di Psicologia, Università degli Studi di Torino, Torino

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Silvia Testa, Barbara Loera, Giorgia Molinengo, Anna Toscano

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Alessandra Solari, Andrea Giordano, Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano

Antonio Bertolotto, Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino

Paolo Confalonieri, Centro SM, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano

Maria Grazia Grasso, Fondazione IRCCS S. Lucia, Roma

Alessandra Lugesesi, Centro SM, Università degli Studi di Chieti-Pescara, Chieti

Francesco Patti, Centro SM, Clinica Neurologica, Policlinico Vittorio Emanuele, Catania

Sviluppo e validazione preliminare della versione abbreviata e computerizzata dell'MSQOL-54

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è la più diffusa malattia neurologica disabilitante dei giovani adulti. Il crescente interesse per lo studio della Qualità della Vita (QOL) nelle persone con SM scaturisce dalla necessità di ampliare i consueti strumenti di misura per includere aspetti che sono rilevanti per il paziente, ma possono sfuggire nella valutazione clinica. Gli strumenti di QOL permettono al personale sanitario di cogliere le priorità dei pazienti, facilitano la comunicazione medico-paziente e la *shared decision making*. Tuttavia, la lunghezza dei questionari, la disponibilità in sola versione cartacea e l'impiego di algoritmi per il calcolo del punteggio costituiscono ostacoli alla diffusione di questi strumenti nella pratica clinica. Di questi limiti soffre anche l'MSQOL-54, il più utilizzato questionario di QOL per le persone con SM. L'MSQOL-54 è formato da 54 domande che indagano 12 diversi aspetti della QOL. La disponibilità di una sua versione breve e computerizzata, con calcolo automatico del punteggio, potrebbe aumentare diffusione e rendere più efficiente la valutazione (accorciando il tempo richiesto ai pazienti per la compilazione e al clinico per calcolare i punteggi, preservando la validità e attendibilità dei punteggi). Gli obiettivi principali dello studio sono stati: rivedere l'MSQOL-54 producendo una versione abbreviata,

somministrabile anche al computer ed integrata da una procedura automatica di calcolo del punteggio (fase 1); validare la versione abbreviata dell'MSQOL-54 (fase 2).

RISULTATI

Nella prima fase della ricerca si è lavorato con un archivio di dati contenente le risposte al questionario MSQOL-54 di 473 pazienti nel periodo compreso tra il 2002 e il 2009. I dati erano stati raccolti dai responsabili dei diversi centri partecipanti al progetto, nell'ambito di altre ricerche cliniche. L'analisi dei dati ha permesso di analizzare il funzionamento delle singole domande del questionario dal punto di vista psicometrico (contenuto informativo e capacità discriminante), e ha portato alla definizione di una versione abbreviata del questionario, chiamata 'MSQOL-29', formata da 29 domande, anziché 54. L'MSQOL-29 preserva la struttura a più dimensioni del questionario originale (al netto delle dimensioni riferite alle limitazioni fisiche ed emotive causate dalla malattia e della domanda relativa alla soddisfazione sessuale), e riporta una buona correlazione con lo strumento originale.

Nella seconda fase del progetto, l'MSQOL-29 è stato implementato in formato elettronico ed è stato validato su un campione indipendente di 582 pazienti. Nel questionario è stata aggiunta una 'domanda fil-

tro' sull'attività sessuale, che circostrive ai soli rispondenti che hanno avuto una vita sessuale attiva nelle ultime quattro settimane, la valutazione della qualità del funzionamento sessuale. Circa il 45% dei rispondenti ha risposto "no" alla domanda filtro. I partecipanti allo studio hanno compilato contestualmente altri strumenti volti a misurare la QOL o aspetti ad essa correlati (es. ansia e depressione). Questo ha permesso di analizzare la concordanza tra i diversi questionari e concludere che l'MSQOL-29 è uno strumento valido ed attendibile.

Un sottoinsieme di circa 200 pazienti ha compilato, a due settimane di distanza, l'MSQOL-29 anche in forma cartacea e questo ha consentito di valutare l'equivalenza tra i due formati di compilazione. La concordanza tra i punteggi ottenuti con le due modalità di somministrazione (cartacea/elettronica) è ri-

sultata elevata, avvalorando l'equivalenza dei due formati.

CONCLUSIONI

Lo studio ha consentito di produrre una versione abbreviata del questionario MSQOL-54. Il numero di domande è stato quasi dimezzato (29 rispetto a 54), accorciando notevolmente il tempo di compilazione, pur preservando la possibilità di indagare diverse dimensioni della QOL, quali ad esempio, il funzionamento fisico, cognitivo, sessuale, il benessere emotivo, l'energia, il dolore. La disponibilità di una versione elettronica (eMSQOL-29), che si è dimostrata equivalente a quella cartacea, consente inoltre di accorciare il tempo necessario per calcolare i punteggi, facilitando l'integrazione del parere dei pazienti nel processo di valutazione dei clinici.

An abbreviated computerized version of the MSQOL-54: development and preliminary validation using confirmatory factor analysis and item response theory

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is the most common disabling neurological disease in young adults, and is characterized by variable disease course and clinical manifestations. Interest in the Health Related Quality of Life (HRQOL) of people with MS (PwMS) has been driven by a desire to broaden traditional outcome measures to include those not always evident on clinical examination, but nevertheless important to the patient. HRQOL inventories help clinicians appreciate patient priorities, facilitate physician-patient communication and shared decision making. HRQOL inventories however are not used in MS routine health care because they must be administered, processed, scored, stored and retrieved with a relevant logistic and financial implication. Existing MS HRQOL tools are available in paper-pencil format and for most of them score calculation is burdensome, while score interpretation may not be straightforward.

The MSQOL-54 is the most used MS specific HRQOL inventory. It contains 52 items distributed into 12 sub-scales, and 2 single items. The availability of a shorter version in conjunction with a computerized one that immediately processes and scores the items may improve instrument usability and validity.

The main aims of the study were: to refine the MSQOL-54 producing an abbreviated version named "aMSQOL-54", also available in an electronic version, inclusive of a scoring routine (phase 1); to validate the shortened version in an independent sample (phase 2).

RESULTS

In the first phase of the study an existing MSQOL-54 databases coming from the neurological center participant to the study (overall 473 Italian person with MS of varied compromise, followed between 2002 and 2009) has been analyzed. The psychometric analysis allowed to identify a short form including 29 out the 54 original items. The resulting MSQOL-29 consists of 29 items (54% of the MSQOL-54), grouped in 7 multi-item and 4 single-item subscales. A filter question was added to allow to patients without sexual activity in the last 4 weeks to skip the items referred to the sexual functioning.

In the second phase of the project an electronic version of the MSQOL-29 has been provided; moreover a web application with a responsive interface that can be adapted to different electronic devices (tablet/pc) has been developed. The validity of the MSQOL-29 has been proved in an independent

sample of 582 patients recruited in the 5 neurological centers participating to the study. Almost half of the sample skipped the sexual functioning items after the screening sexual question. The MSQOL-29 showed a good internal consistency and validity. Moreover, a subset of 220 patients received the questionnaire both in electronic and paper-pencil versions, separated by a two-week interval. This allowed to test the two versions can be considered equivalent.

CONCLUSIONS

This study allowed to produce an abbreviated ver-

sion of the MSQOL-54. The MSQOL-29 is 50% shorter than the MSQOL-54, preserving 7 multi-item and 4 single key HRQOL dimensions. The number of questions was reduced by nearly half (29 compared to 54), considerably reducing the compilation time, whilst preserving the possibility to investigate the different dimensions of quality of life, such as physical functioning, cognitive, sexual, emotional well-being, energy and pain. The availability of an electronic version (eMSQOL-29) allows also shortening the time required to calculate the scores, facilitating the integration of the opinion of the patients in the clinical judgment.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Rosato R, Testa S, Bertolotto A, Confalonieri P, Patti F, Lugaesi A, Grasso MG, Toscano A, Giordano A, Solari A. Development of a short version of MSQOL-54 using factor analysis and item response theory. *PLoS One*. 2016 14;11:e0153466. doi: 10.1371/journal.pone.0153466

Rosato R, Solari A. Versione elettronica di misure patient-reported: l'MSQOL-29. Le mille facce della SM; Azienda Ospedaliera-Universitaria San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO), 3 febbraio 2017

Rosato R, Testa S, Bertolotto A, Scavelli F, Confalonieri P, Giovannetti AM, Patti F, Chisari CG, Lugaesi A, Pietrolongo E, Grasso, MG, Rossi I, Toscano A, Loera B, Giordano A, Solari A. Prospective validation of a short version of MSQOL-54 (MSQOL-29): preliminary findings. 23th annual conference of International Society for Quality of life research (ISOQOL), Copenhagen, 19-23 ottobre 2016

Rosato R, Testa S, Bertolotto A, Scavelli F, Confalonieri P, Giovannetti AM, Patti F, Chisari CG, Lugaesi A, Pietrolongo E, Grasso, MG, Rossi I, Toscano A, Loera B, Giordano A, Solari A. Prospective validation of a short version of MSQOL-54 (MSQOL-29): preliminary findings. 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), Londra, 14-17 settembre 2016

Rosato R, Testa S, Bertolotto A, Confalonieri P, Patti F, Lugaesi A, Grasso MG, Toscano A, Giordano A, Solari A, An abbreviated computerized version of the msqol-54: development and preliminary validation using confirmatory factor analysis and item response theory. Congresso Scientifico Annuale Associazione Italiana Sclerosi Multipla e la sua Fondazione, Roma 25-27 maggio 2016

Rosato R, Testa S, Bertolotto A, Confalonieri P, Patti F, Lugaesi A, Grasso MG, Toscano A, Giordano A, Solari A, An abbreviated computerized version of the msqol-54: development and preliminary validation using confirmatory factor analysis and item response theory. Congresso Scientifico Annuale Associazione Italiana Sclerosi Multipla e la sua Fondazione, Roma 27-29 maggio 2015

Rosato R, Testa S, Bertolotto A, Confalonieri P, Patti F, Lugaesi A, Grasso MG, Toscano A, Giordano A, Solari A, Development of an abbreviated, computerized version of the MSQOL-54 using Confirmatory Factor Analysis and Item Response Theory. XX Annual RISM Conference, Milano 9-11 aprile 2015

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 110.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 110,000

Ambra Bisio

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Istituto di Fisiologia Umana, Università degli Studi di Genova, Genova

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Laura Avanzino, Laura Bonzano, Marco Bove, Adriano Dessypris, Gianluigi Mancardi, Ludovico Pedullà

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Giampaolo Bricchetto, Andrea Tacchino, Ricerca Scientifica FISM, Genova

La riabilitazione della scrittura nella sclerosi multipla: un approccio innovativo per valutare e contrastare il deterioramento della scrittura in pazienti affetti da sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La scrittura è una forma di comunicazione che richiede abilità motorie, percettive e cognitive complesse. Se una di queste abilità viene alterata la scrittura può subire un deterioramento. Le persone con SM (PcSM) spesso riportano difficoltà nei compiti di scrittura, abilità che spesso subisce modifiche che inducono un senso di frustrazione. AISM propone interventi di terapia occupazionale (TO) mirati anche alla scrittura, ma non esistono metodologie per valutarne l'efficacia in maniera oggettiva da un punto di vista comportamentale e di modifiche a livello del sistema nervoso centrale.

L'obiettivo di questo progetto è stato la definizione di una metodologia di valutazione per descrivere quantitativamente i movimenti di scrittura in persone con SM mediante un test di scrittura su supporto cartaceo (DGM-P test) ed uno su supporto digitale (tablet SMART TAB, E.M.S., s.r.l.). Parallelamente, sono stati analizzati i correlati neurali acquisiti durante la scrittura su tablet mediante tecniche di risonanza magnetica (RM).

RISULTATI

Durante la prima fase del progetto abbiamo coinvolto 44 soggetti sani ed abbiamo testato se le caratteristiche cinematiche della scrittura acquisite mediante il tablet all'interno della RM rispecchiasero quelle acquisite in condizioni di scrittura convenzionale e se il protocollo di scrittura proposto fosse in grado di evocare le attivazioni cerebrali previste per compiti di scrittura. Il protocollo si è dimo-

strato affidabile e la cinematica della scrittura in RM, seppur ha subito prevedibili modifiche (movimenti più lenti ed ampiezza maggiore della frase rispetto alla condizione standard) dovute ai limiti fisici imposti dalla RM, è stata rappresentativa delle caratteristiche dei soggetti. Inoltre, i risultati dell'esame di RM funzionale hanno mostrato che durante il compito si attivavano le aree previste per i centri per la scrittura (parte posteriore del giro frontale superiore e medio sinistro, del lobo parietale superiore di sinistra, ed il cervelletto di destra).

Conclusa la fase di definizione e test del protocollo sperimentale, sono stati arruolati 18 persone con SM e 18 soggetti sani di controllo. Entrambi i gruppi sono stati sottoposti ad una valutazione della scrittura mediante DGM-P test e mediante tablet, quest'ultimo in condizioni di scrittura convenzionali.

Il DGM-P test valuta le abilità grafo-motorie e posturali in bambini in età scolare. Per la prima volta in questo progetto è stato somministrato a persone in età adulta allo scopo di valutare se e quali parti del test possano essere utili per identificare e descrivere problemi di scrittura in PcSM. Durante il test il soggetto deve scrivere una frase per due volte: il più accuratamente possibile ed il più velocemente possibile. Il confronto fra i gruppi ha mostrato un peggioramento della scrittura in PcSM rispetto ai soggetti di controllo, specialmente nella condizione di scrittura accurata. Le PcSM mostrano maggiori difficoltà nel seguire il rigo, una variabilità maggiore nell'altezza delle lettere ed una marcata lentezza rispetto ai controlli. Questi parametri correlano con le

valutazioni effettuate mediante test clinici volti all'accertamento delle funzioni cognitive e motorie, mostrando che un deficit in questi campi è sorgente di problemi nella scrittura rilevabili oggettivamente mediante questo test.

L'obiettivo del test eseguito su supporto digitale è quello di caratterizzare la cinematica della scrittura, valutando i parametri spazio-temporali. I soggetti dovevano scrivere per tre volte una frase sul tablet che acquisiva la traccia scritta. L'analisi cinematica ha mostrato un aumento significativo del tempo impiegato dalle PcSM per completare la frase, mentre nessuna differenza tra i gruppi è stata rilevata nell'ampiezza della frase stessa. L'analisi dei dati clinici ha mostrato l'esistenza di relazioni significative tra l'ampiezza della frase e misure di forza ed i risultati di test cognitivi, in accordo con i dati del DGM-P test. Il test di scrittura su supporto digitale è stato ripetuto da entrambi i gruppi durante una esame RM funzionale. I centri cerebrali attribuiti alla funzionalità della

scrittura si attivano in maniera simile nei due gruppi. I risultati del confronto tra i gruppi mostrano un minor coinvolgimento di aree sottocorticali (cervelletto, gangli della base e talamo) nel gruppo delle persone con SM, probabile indice di alterata funzionalità dei circuiti sottocorticali che si riferiscono al dominio cognitivo durante il compito di scrittura.

CONCLUSIONI

I test di scrittura utilizzati si sono dimostrati utili nel descrivere in maniera oggettiva e da diversi punti di vista le problematiche di scrittura riportate dalle persone con SM ed i correlati neurali ad essi associati. Questi test potranno quindi essere utilizzati per quantificare i miglioramenti dopo un intervento di terapia occupazionale. La relazione con i risultati delle scale cliniche potrebbe inoltre indirizzare la terapia occupazionale verso quella che è l'origine dei problemi per il singolo soggetto (cognitivo, motorio, sensoriale), portando ad un intervento più mirato.

Re-writing in multiple sclerosis: a novel approach to evaluate and cope with the writing deterioration in patients with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Handwriting is a form of communication that requires intact motor, sensory and cognitive skills. If one of these skills get lost, handwriting might be affected. Handwriting deficits are common in people with MS (PwMS). AISM proposes occupational therapy (OT) treatments focused on the recovery handwriting, but reliable quantitative data on the efficacy at behavioral level of this kind of interventions are lacking, as also what are their effects on brain networks.

The aim of this projects is to define an evaluation methodology that allows to quantitatively characterize handwriting movements in PwMS by means of a paper-and-pen writing test (DGM-P test) and kinematic acquisition over a digital tablet (SMART TAB, E.M.S., s.r.l.). Further, we evaluated neuroimaging data obtained with magnetic resonance imaging (MRI) techniques during writing movements.

RESULTS

Forty-four healthy subjects were enrolled to test how handwriting kinematic features acquired by means of the tablet in normal writing conditions changed in

MRI environment and whether the proposed protocol was able to activate the known cerebral writing centers. Results showed that the protocol performed in MRI environment reliably described the individual kinematic features, although with some modifications (slower movements and larger amplitude of the sentence in MRI scanner) due to the space-limits imposed by the scanner. Further, the protocol successfully activates the brain areas known to be involved in handwriting task (posterior part of the left superior and middle frontal gyrus, the left superior parietal lobule, and the right cerebellum).

After testing the reliability of the protocol, 18 PwMS and 18 healthy controls were enrolled. Handwriting abilities were tested with DGM-P test and digital tablet, in normal handwriting conditions.

The DGM-P test evaluates grapho-motor abilities in children. For the first time in this project was administered in adults aiming to evaluate which parts of the test are reliable to describe handwriting impairments in adults and in PwMS. The test requires the subject to write a sentence two times: as accurate as possible and as fast as possible. The comparison between

the two groups showed that PwMS were slower a more variable than healthy controls and had more difficulties to follow the line over the paper. These parameters correlate with clinical evaluations of the cognitive and motor functions, showing that a deficit in these fields is source of handwriting impairments that can be assessed with this test.

The aim of the test performed on the digital tablet was to characterize the kinematics of handwriting (spatio-temporal parameters). Subjects were required to write three times a sentence over the tablet, which was acquiring the written trace. Data analysis showed a significant increase in PwMS in movement duration, whereas no differences appeared in the sentence dimensions. Significant correlations appeared among these parameters and the clinical evaluations, in agreement with those obtained with the DGM-P test.

Then, the same participants performed the writing test over the tablet during a functional MRI (fMRI),

which allowed the characterization of the neural correlates of handwriting in the two populations of subjects. The cerebral-writing centers were similarly activated in the two groups. The comparisons between groups showed a lower involvement of subcortical regions (cerebellum, basal ganglia and thalamus) in PwMS, likely index of altered activity in the subcortical circuits involved in the cognitive component of handwriting.

CONCLUSIONS

Handwriting test proposed in this project were useful to quantitatively describe handwriting impairments in PwMS and the related cerebral activations. Therefore, these tests might be used in the future to describe the effects of an OT intervention. The correlation with the results of the clinical scales might help to address the OT towards the source of the individual impairments (cognitive, motor, sensory), giving the opportunity to design a tailored intervention.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Bisio A, Pedullà L, Bonzano L, Ruggeri P, Brichetto G, Bove M. Evaluation of Handwriting Movement Kinematics: From an Ecological to a Magnetic Resonance Environment. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10:488, 2016

Bisio A, Pedullà L, Bonzano L, Ruggeri P, Brichetto G, Bove M. Kinematic evaluation of handwriting movement in people with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. Proceeding of the 32th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), and 21th Annual Conference of Rehabilitation in MS (RIMS), London, September 16-17, 2016

Pedullà L, Bisio A, Bonzano L, Tacchino A, Brichetto G, Bove M. Integrated assessment of handwriting movement in people with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. Proceeding of the 32th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), and 21th Annual Conference of Rehabilitation in MS (RIMS), London, September 16-17, 2016

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di € 20.000

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 20,000

Elise Houdayer

Unità di Neurofisiologia Sperimentale, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), IRCCS San Raffaele, Milano

MENTORE / MENTOR: **Letizia Leocani**

Stimolazione magnetica transcranica profonda con H-coil per il trattamento non invasivo del dolore degli arti inferiori nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Il dolore neuropatico (DN) è uno tra i sintomi più frequenti e difficile da trattare nella sclerosi multipla (SM), presente in circa 63% dei soggetti. La maggior parte dei soggetti con SM sono resistenti ai trattamenti per il dolore, e lo riferiscono come il loro sintomo più invalidante. Il DN delle estremità e il mal di testa sono i dolori più comuni.

Il DN è associato ad un'iperattivazione dei nuclei talamici, del sistema limbico e delle corteccie sensorimotorie ed insulare. La stimolazione epidurale e la stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS) della corteccia motoria possono essere proposte come trattamenti del DN. Purtroppo questi trattamenti sono spesso inefficienti quando il dolore coinvolge le gambe, non permettendo di stimolare in profondità fino alla zona motoria delle gambe. Lo sviluppo di metodi alternativi è dunque necessario.

A questo scopo, una nuova bobina (coil) di stimolazione, l'"H-coil", permette di stimolare più in profondità rispetto ai coil tradizionali a forma di 8. Abbiamo recentemente ottenuto dei risultati incoraggianti sull'uso del H-coil per stimolare la corteccia motoria degli arti inferiori in persone con ictus e SM.

Proponiamo quindi uno studio crossover, in doppio cieco, controllato per effetto placebo per valutare l'efficacia di 5 giorni consecutivi di stimolazione profonda con H-coil in 20 soggetti con SM e DN degli arti inferiori resistente ai trattamenti farmacologici. I soggetti ricevono stimolazioni vere o "sham" (placebo) sulla corteccia motoria delle gambe, bilateralmente, per una durata totale della fase attiva dello studio di 2 mesi. Trenta treni consecutivi di 50 stimoli sono applicati ad una frequenza di 10Hz, al 90% della soglia motoria a riposo del muscolo tibiale anteriore, con un intervallo di interstimolo di 20s (i.e. totale 1500 stimoli in 10 min). Le stimolazioni sham sono effettuate con lo stesso coil, inducendo una sti-

molazione superficiale ed un suono percepito simile alla stimolazione vera, ma nessun campo magnetico viene erogato. Ciascuna stimolazione (vera e sham) viene somministrata ai pazienti in 5 giorni consecutivi). Un mese dopo la fine del primo ciclo (vero o sham), i pazienti effettuano il secondo ciclo, opposto rispetto al precedente. Dunque, i pazienti che avranno ricevuto la stimolazione sham riceveranno la vera stimolazione, e viceversa.

RISULTATI

Questo studio, realizzato in doppio cieco, è disegnato per includere 20 pazienti su una durata di 2 anni. Perciò, lo studio è ancora attivo. I dati saranno interpretati quando l'ultimo paziente avrà effettuato tutte le valutazioni cliniche e neurofisiologiche, in modo tale che si potrà levare il cieco degli sperimentatori. Gli outcome primari e secondari sono valutati prima e dopo ogni ciclo di trattamento e ad 1 mese dopo fine trattamento per follow-up. Le valutazioni includono misure soggettive (visual analogue scale - VAS (misura primaria), Neuropathic Pain Symptom Inventory score, Minnesota Multiphasic Personality Inventory score) ed oggettive (riflesso di flessione-RIII, prime soglie di percezione di sensazioni termiche e meccaniche) del dolore, e misure elettroencefalografiche e con TMS per indagare attività ed eccitabilità della corteccia sensorimotoria degli arti inferiori prima e dopo trattamento.

Ad un anno dall'inizio del progetto (metà studio), 9 pazienti sono stati inclusi. 6 hanno completato lo studio, 1 si è ritirato dallo studio dopo la prima fase (per ragioni personali) e 2 pazienti sono ancora in fase di trattamento. Nessun evento avverso è stato riportato. L'ordine dei trattamenti (vero-sham / sham-vero) è stato randomizzato. Sia gli sperimentatori sia i pazienti sono in cieco. Sono stati applicati cinque giorni consecutivi seguiti da 1 mese di

riposo per “wash-out”, dopo di che il trattamento opposto era eseguito per altri 5 giorni consecutivi. I pazienti sono stati valutati 4 settimane dopo quest’ultima settimana di trattamento, per follow-up. Le valutazioni cliniche e neurofisiologiche includono: Numeric Rating Scale (NRS) da 0 (assenza di dolore) a 10 (dolore insopportabile), Neuropathic Pain Symptom Inventory score (NPSI), Brief Pain Inventory, Beck Depression Inventory, impressione globale di cambiamento, RIII reflex, elettroencefalografia (riposo, occhi aperti/chiusi e sincronizzazione legata all’evento dopo stimolazione elettrica del nervo tibiale, e stimolazione magnetica trascranica

(soglia motoria di riposo, potenziale motorio evocato al 120% della soglia, e periodo di silenzio corticale).

CONCLUSIONI

A metà studio, i trattamenti con H-coil sono stati ben tollerati da tutte le persone. In caso di successo, la stimolazione profonda con H-coil offrirà un’alternativa valida, non-invasiva, alla neuromodulazione che coinvolge interventi chirurgici. Questa tecnica innovativa potrebbe dunque offrire un nuovo trattamento efficace e non-invasivo per soggetti con MS colpiti da dolore neuropatico.

Deep transcranial magnetic stimulation with H-coil for the non-invasive treatment of lower limb pain in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Neuropathic pain (NP) is a key symptom in multiple sclerosis (MS) that is present in about 63% of subjects with MS and is highly difficult to treat. Many MS sufferers present drug-resistance to NP, and report this pain as their main symptom. Extremity neuropathic pain and headache are the most common pain symptoms in MS.

NP is associated with hyperactivation of thalamic nuclei, limbic system, sensorimotor and insular cortices. Electrical epidural and repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) of the motor cortex can be applied for treatment of NP. Unfortunately, these treatments are not always responsive when pain involves the lower limbs, since the actual stimulation methods do not allow stimulations deep enough to target the lower limb representations. Development of alternative methods is thus needed.

To this aim, a new stimulation coil for rTMS treatments has been designed, the so-called H-coil, that allows deeper stimulation compared to the regular figure-of-eight coils. We already showed encouraging results of the use of such coil to target to the lower limbs in people affected with stroke in a previous study. Here, we propose a cross-over, double-blind placebo-controlled study to evaluate the efficacy of 5 consecutive days of deep rTMS with the H-coil, in 20 subjects with MS with lower-limb drug-resistant NP.

Participants will receive real and sham stimulation over bilateral leg primary motor cortex within a time-

interval of 2 months. Thirty consecutive trains of 50 stimuli will be delivered at a frequency of 10 Hz, at 90% of the resting motor threshold (RMT) of the dominant tibialis anterior muscle, with inter stimulus intervals of 20 seconds (i.e. a total of 1500 stimuli during a session of 10 minutes). The sham stimulation will be provided by the same coil delivering superficial stimulation with the same sound as the real one but no deep magnetic field will be produced. Both stimulation types (sham and real) will be applied on 5 days over 2 consecutive weeks. One month after, the treatment will be reversed, for both groups. Thus, the patients who received the real stimulation will receive the sham, and vice versa.

RESULTS

This study is a double-blind study, designed to include 20 patients over a period of 2 years. Therefore, this study is still ongoing. The data will be interpreted only when the last patient will have undergone all the clinical and neurophysiological evaluations, so that the blindness of investigators can be unveiled. Primary and secondary outcomes are evaluated before and after each treatment cycle as well as one month after, for follow-up. Assessments include subjective (including visual analogue scale (VAS, primary outcome), Neuropathic Pain Symptom Inventory score, Minnesota Multiphasic Personality Inventory score) and objective (flexion reflex-RIII, first perception thresholds for thermal and mechanical sensations)

pain evaluations, as well as electroencephalographic and TMS correlates of the sensorimotor cortex activity and excitability.

At one year (mid-term of project), 9 patients have been recruited. Six patients completed the treatments, one patients dropped out (refused to participate to the second phase of treatment for personal issues) and two patients are on-going. No adverse events have been reported. The order of treatments (real-sham / sham-real) has been randomized. Both experimenters and patients are blinded. Patients underwent 5 consecutive days of treatment followed by 1 month of wash-out after which they underwent the second treatment phase for 5 consecutive days. After this second week of treatment, patients were assessed a last time 4 weeks later, for follow-up. Patients underwent clinical and neurophysiological evaluations including: Numeric Rating Scale (NRS)

from 0 (no pain) to 10 (unbearable pain), Neuropathic Pain Symptom Inventory score (NPSI), Brief Pain Inventory, Beck Depression Inventory, global impression of change, RIII reflex, electroencephalography (resting state eyes open/eyes closed and event-related synchronization after tibial nerve electric stimulation) and TMS (resting motor threshold (RMT), motor evoked potentials amplitude at 120% RMT and cortical silent period).

CONCLUSIONS

At mid-term, H-coil rTMS treatments was well tolerated by patients. If proven effective, H-coil rTMS will offer a valid, non-invasive, alternative method to neuro-modulation approaches involving surgical interventions. This innovative technique might thus offer a new, non-invasive efficient treatment for MS subjects affected by NP.

Maura Casadio

Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi,
Università degli Studi di Genova, Genova

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Vittorio Sanguineti, Marco Fato, Laura Pellegrino *, Giorgia Stranieri*,
Alice De Luca, Camilla Pierella, Susanna Summa, Irene Tamagnone,
Riccardo Iandolo, Andrea Canessa, Elena Tiragallo, Gavina Salis**

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Claudio Solaro*, Margit Muller*, Erika Trabucco, Martina Cella*, ASL3, Genova
Ferdinando Mussa-Ivaldi, Rehabilitation Institute of Chicago, Chicago, USA
Martina Coscia*, Translational Neural Engineering Laboratory, Center for Neuroprosthetics
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne Lausanne, Switzerland

**Indicates main contributors to the grant work*

Interfacce corpo-macchina basate sulle sinergie muscolari per riabilitazione neuromotoria personalizzata di persone affette da sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Secondo diversi studi, i muscoli partecipano alla produzione di movimenti in gruppi funzionali ben definiti - chiamati "sinergie" - attivati da comandi corticali discendenti. Un recente studio ha suggerito che le sinergie muscolari possono essere considerate come marcatori fisiologici di danno motorio corticale. Il potenziale di questo approccio non è ancora stato sfruttato per comprendere e descrivere i deficit motori degli arti superiori dovuti all'SM.

Questo studio pilota ha avuto due obiettivi (1) quantificare i deficit motori degli arti superiori in soggetti con SM con una valutazione robot assistita che comprendesse cinematica e analisi delle sinergie muscolari, e (2) verificare la possibilità di utilizzare le sinergie muscolari nel disegno di interfacce corpo-macchina adatte per le persone con SM.

Abbiamo sviluppato un metodo per eseguire una valutazione quantitativa e ripetibile della cinematica degli arti superiori, e per individuare i fattori che possano avere un impatto sull'attività muscolare e sulla coordinazione, come descritto dall'analisi delle sinergie muscolari. Abbiamo mirato ad identificare fattori dipendenti da vincoli estrinseci quali diverse condizioni ambientali, da vincoli intrinseci dovuti al controllo motorio e, soprattutto, dalla malattia.

RISULTATI

11 soggetti con SM (9 femmine; 50 ± 10 anni) con lieve o moderata disabilità e 11 controlli di pari età e sesso (9 femmine; 50 ± 9 anni) hanno partecipato a questo studio. I compiti richiesti prevedevano movimenti della mano o applicazione di forze in diverse direzioni. I soggetti hanno eseguito tali compiti mentre afferravano la parte terminale di un robot che forniva diverse forze di interazione: nessuna forza, forza assistiva, forza resistente e vincoli rigidi. Abbiamo registrato l'attività di 15 muscoli della parte superiore del corpo. Sono state valutate entrambe le braccia. Le traiettorie della mano di persone con SM erano più lente, meno fluide e meno accurate rispetto ai soggetti di controllo. Le differenze nelle performance cinematiche tra le due popolazioni aumentavano quando le persone dovevano controllare una forza rispetto ad un movimento. Pertanto, il task di forza isometrico potrebbe essere più sensibile ad evidenziare differenze cinematiche dipendenti dalla malattia.

Per quanto riguarda le attivazioni muscolari durante i task dinamici abbiamo trovato differenze nei muscoli del tronco e nei muscoli della spalla (romboide e deltoide anteriore). Inoltre, la maggior parte delle persone con SM ha mostrato un'evidente co-contrazione bicipite-tricipite nei movimenti distali. Tuttavia,

nessuna differenza è stata osservata nella struttura (numero) delle sinergie tra controlli ed SM. D'altro canto la coordinazione muscolare, come descritto dall'analisi delle sinergie, era modificata nelle persone con SM rispetto ai controlli, sia in termini di organizzazione sia di attivazione. In presenza di forza assistiva, le due popolazioni hanno mostrato un comportamento simile. Nei movimenti liberi ed in presenza di una forza resistiva le persone con SM hanno modulato le sinergie in modi significativamente diversi dai controlli. Al variare delle forze di interazione i controlli hanno mantenuto simili pattern di coordinazione muscolare, mentre i soggetti con SM avevano maggiori cambiamenti nelle modulazione di tali pattern. Questo lavoro ha evidenziato la capacità delle sinergie muscolari di rivelare pattern di attività muscolare in persone con SM con una struttura stabile e simile ai soggetti di controllo, catturando, allo stesso tempo, differenze importanti riguardanti la coordinazione muscolare. Questa osservazione sostiene la nostra ipotesi che le sinergie muscolari siano un valido strumento da utilizzare nella progettazione di interfacce corpo-macchina a controllo elettromiografico per i soggetti con la SM.

CONCLUSIONI

Questo lavoro ha identificato marcatori cinematici e muscolari della sclerosi multipla, evidenziando le caratteristiche sensibili a vincoli estrinseci, come le condizioni ambientali, e a vincoli intrinseci propri del controllo motorio. L'analisi ed il protocollo proposti forniscono misure accurate, stabili e ripetibili e sono pertanto un valido strumento per indagare e monitorare i deficit motori degli arti superiori e i loro correlati elettromiografici. In generale, i risultati ottenuti forniscono linee guida per la definizione sia di valutazioni quantitative sia di trattamenti riabilitativi per migliorare la coordinazione motoria dell'arto superiore nella SM. Inoltre, tali risultati suggeriscono che le persone con SM presentino indicatori cinematici alterati ma conservino una struttura per lo più intatta delle sinergie muscolari. Questa capacità di rilevare pattern stabili di attività muscolare nella SM conferma che le sinergie muscolari hanno il potenziale per essere utilizzate con successo come strumento per la definizione di interfacce corpo-macchina a controllo mioelettrico per persone che soffrono di SM.

Body-machine interfaces based on muscle synergies for adaptive and personalized neuromotor rehabilitation of persons with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

According to several studies, muscles participate to the production of movements in well-defined functional groups - called "synergies" - activated by the descending cortical commands. A recent study (Cheung, 2012) has suggested that muscle synergies can be considered as physiological markers of motor cortical damage. The potential of this approach has not yet been exploited for understanding and describing the upper limb motor impairments caused by MS.

This pilot study had two objectives (1) to quantify the upper limb motor deficits of MS people with a robot-based assessment including kinematics and muscle synergies analysis, and (2) to verify the feasibility of using muscle synergies in the design of myocontrolled body-machine interfaces suitable for individuals with MS.

We developed a method to perform a quantitative

and repeatable assessment of upper limb kinematics, and to test which task features might impact muscle activity and coordination, as described by muscle synergy analysis.

We aimed at identifying kinematics and muscular features sensitive to extrinsic constraints (such as different environmental conditions), to intrinsic motor control constraints and, most importantly, to the disease.

RESULTS

We enrolled 11 MS subjects (9 Female; 50 ± 10 years) with mild to moderate impairment and 11 age and gender matched controls (9 Female; 50 ± 9 years). Subjects performed a planar reaching task by moving their hand or applying force while grasping the handle of a robot that provided four different environments: no forces, assistive force, resistive force, and rigid constraint. We recorded the activity of 15

upper body muscles. Both arms were assessed.

The upper arm trajectories of people with MS were slower, less smooth and less accurate compared to healthy subjects. The differences in kinematic performance between the two populations increased when people controlled a force trajectory compared to a movement trajectory. Therefore, the isometric force task could be more sensitive to kinematic difference due to the disease.

As for muscle activations, we found differences in the trunk and shoulder muscles (rhomboideus and anterior deltoid) between healthy and MS people during dynamic conditions. Moreover, most MS people showed an evident biceps-triceps co-contraction especially to reach distal targets.

However, no difference was observed in the structure (number) of synergies between control and MS people. Interestingly, muscle coordination, as described by muscle synergy analysis, was modified in MS people with respect to controls, both in term of organization and activation. In presence of assistive force, the two populations had a similar behavior. In free space and when an unusual resistive force was added to the environment, the MS people modulated their synergies in ways that differed significantly from the control subjects. Control subjects performed the reaching tasks by maintaining similar muscle coordination patterns across different environments, while MS people had greater changes in response to differences in the interaction forces.

This work revealed the ability of muscle synergies to capture patterns of muscle activity in MS with a stable structure similar to the healthy controls. At the same time, it highlighted important differences in muscle coordination. This observation supported our hypothesis of using muscle synergies as a tool for designing myocontrolled body-machine interfaces for individual with MS.

CONCLUSIONS

This work identifies kinematic and muscular markers of MS and highlights features sensitive to extrinsic constraints, such as environmental conditions, and features sensitive to intrinsic motor control constraints. The results can drive the design of both quantitative assessments and rehabilitative treatments for improving upper limb motor coordination in MS. This analysis could be an appropriate tool to investigate and monitor motor impairments. The proposed protocol provides accurate, stable and repeatable measures of the upper limb motor deficits and of their electromyographic correlates. Moreover it is easy to apply, not invasive and well tolerated. Our results suggest that people with MS present altered kinematics, but preserve a mostly intact structure of muscle synergies. This ability of detecting stable patterns of muscle activity in MS confirms that muscle synergies have the potential to be used as tool for defining myocontrolled body machine interfaces suitable for individual suffering for MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Pellegrino L, Coscia M, Muller M, Solaro C, Casadio M. Muscle synergies and kinematics in subjects with Multiple Sclerosis. 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society in Milan (Italy) on August 25th-29th, 2015

Solaro C, Pellegrino L, Muller M, Coscia M, Casadio M. Muscle synergies and kinematic analysis of upper limbs in Multiple Sclerosis subjects. SIN - Società italiana di neurologia in Genoa (Italy) on October 10th -13th, 2015

Pellegrino L, Coscia M, Muller M, Solaro C, Casadio M. Muscle synergies and kinematic measures in subjects with Multiple Sclerosis during reaching and manipulation tasks. Neuroscience 2015 - Society for Neuroscience in Chicago on October 17th -21th, 2015

Solaro C, Pellegrino L, Muller M, Coscia M, Casadio M. Muscle synergies and kinematic analysis of upper limbs in Multiple Sclerosis subjects. 3rd European Congress of NeuroRehabilitation in Vienna (Austria) on December 1st-4th, 2015

Solaro C, Pellegrino L, Muller M, Coscia M, Casadio M. Kinematic and muscles activation patterns of the upper limbs in subjects with Multiple Sclerosis during planar movement and isometric force tasks. European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) in London (United Kingdom) on the September 14th -17th, 2016

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 1 anno (prorogato di 8 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 1 year (extended by 8 months) and the amount of € 30,000

Ugo Della Croce

Dipartimento di Scienze Politiche, Scienze della Comunicazione e Ingegneria dell'Informazione, Università degli Studi di Sassari, Sassari

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Agnese Peruzzi, Ignazio Roberto Zarbo, Mariagrazia Corrias, Letizia Masala, Claudia Paone, Andrea Cereatti

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Anat Mirelman, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israel

Un intervento riabilitativo basato sull'uso di realtà virtuale e treadmill per migliorare il cammino in individui affetti da sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

I sintomi motori come la debolezza muscolare, instabilità posturale e la fatica sono spesso responsabili di problemi nel cammino in persone con sclerosi multipla, e recenti studi hanno dimostrato che l'abilità di camminata subisce ulteriori riduzioni quando eseguita insieme ad un compito cognitivo concomitante (doppio compito).

Il training sul tapis roulant (TT) ha dimostrato di migliorare la deambulazione di persone con SM, ma, dal momento che la vita quotidiana richiede spesso un doppio compito, è stato recentemente potenziato con l'uso simultaneo della realtà virtuale (VR) per stimolare entrambi gli aspetti motori e cognitivi (VR-TT). La VR stimola, e migliora le capacità cognitive, consentendo l'esecuzione sicura di molte attività della vita quotidiana. Nel progetto abbiamo condotto uno studio clinico randomizzato e controllato in singolo cieco per confrontare gli effetti sulla camminata dell'intervento combinato VR-TT con un programma di TT di sei settimane, in persone con SM. Abbiamo ipotizzato che entrambi i trattamenti avrebbero migliorato la funzione motoria, ma che VR-TT avrebbe potenziato le abilità motorie-cognitive, migliorando di conseguenza le prestazioni di doppio compito.

RISULTATI

Sono state reclutate quarantaquattro persone con SM presso l'Ospedale Universitario di Sassari e sono stati assegnati in modo casuale al gruppo di controllo o al gruppo sperimentale. I soggetti del gruppo di controllo hanno ricevuto 18 sessioni di TT mentre le persone del gruppo sperimentale hanno ricevuto 18

sessioni di VR-TT. Misure cliniche e di camminata sono state valutate prima e dopo i trattamenti in entrambi i gruppi. Durante il training VR-TT, la persona cammina su un tapis roulant guardando l'ambiente virtuale in un monitor LCD.

Sei soggetti hanno abbandonato il progetto a causa di motivi personali. Così, l'analisi dei dati è stata effettuata in 38 soggetti (TT: n=19, età: $44,6 \pm 10,7$ anni, EDSS: $3,9 \pm 0,8$; VR-TT: n=19, età: $44,7 \pm 10,0$ anni, EDSS: $4,1 \pm 1,0$). I gruppi erano paragonabili in quantità di training effettuato (TT: $17,8 \pm 0,4$ sessioni e VR-TT: $17,9 \pm 0,2$ sessioni).

Dopo il trattamento, entrambi i gruppi hanno migliorato in modo significativo la resistenza di camminata e la velocità, la cadenza e lunghezza del passo, il movimento e la potenza in intervalli comuni degli arti inferiori durante il cammino a singolo e doppio compito, indicando che sei settimane di entrambi i trattamenti sono utili per migliorare la deambulazione in persone con SM.

Il miglioramento complessivo può essere spiegato come conseguenza del progressivo aumento della velocità del tapis roulant negli allenamenti, che ha indotto i soggetti a regolare di conseguenza la velocità del passo. Si ipotizza che questo cambiamento sia stato attivato dal miglioramento della cinematica degli arti inferiori e della dinamica, più pronunciato nel gruppo VR-TT, probabilmente facilitato dalla necessità di superare ostacoli virtuali. Inoltre, nel doppio compito, il gruppo VR-TT ha mostrato miglioramenti maggiori (cinematica del ginocchio e dell'anca e potenza generata dall'anca per la presa di posizione del piede) rispetto al gruppo TT, sostenendo l'idea che il

training compito-specifico che combina aspetti motori e cognitivi migliorare la camminata nel doppio compito.

Tutti i partecipanti hanno migliorato la resistenza nel cammino, l'equilibrio e il superamento di ostacoli, come indicato dai cambiamenti significativi ottenuti nell'esecuzione di test funzionali motori. L'effetto di interazione significativa ottenuto con la scala dell'equilibrio di Berg, ha evidenziato il potenziale di VR-TT nel migliorare il controllo dell'equilibrio. Anche se non è significativo ($p = 0,099$), è stato osservato un effetto di VR-TT sul punteggio EDSS, il che suggerisce che il nostro trattamento sperimentale potrebbe essere utile per ridurre la disabilità in persone con SM in ambito riabilitativo.

Per quanto riguarda le attività cognitive e la salute connesse alle misure di qualità della vita, entrambi i gruppi sono migliorati dopo i trattamenti senza differenze significative tra i gruppi, ad eccezione per la funzione cognitiva auto-percepita e il cambiamento nella salute. I nostri risultati supportano i benefici percepiti di programmi di training che includono la VR per migliorare le misure di deambulazione in persone con SM e di conseguenza la loro qualità di vita.

CONCLUSIONI

Circa l'85% di persone con SM sviluppano progressivi disturbi di camminata che aumentano il rischio di caduta, influenzando fortemente l'indipendenza nella vita quotidiana e limitano la partecipazione sociale. Questo studio è preliminare, con un campione

di persone abbastanza ridotto e non ha incluso delle misure per esplorare i cambiamenti specifici nelle funzioni cognitive, che possono permettere di comprendere ulteriormente l'interferenza motoria-cognitiva. Tuttavia, nonostante queste limitazioni, questo studio ha dimostrato che la VR-TT migliora la camminata nelle persone con SM tanto quanto il TT da solo, che ha mostrato in precedenza di essere utile per questa popolazione. Da questo progetto è emerso che un periodo relativamente breve di VR-TT migliora la camminata nel singolo e doppio compito e il controllo dell'equilibrio in persone con SM con lieve o moderata disabilità. Rispetto al TT, ulteriori miglioramenti in cinematica e dinamica congiunti sono stati trovati e questi cambiamenti si sono riflessi nella diminuzione della disabilità generale del paziente e nella funzione cognitiva auto-percepita. In questo progetto, sono stati osservati miglioramenti nelle misure di cammino e cliniche dopo sei settimane di allenamento, anche durante le difficili condizioni di duplice compito. Tali cambiamenti sono i principali obiettivi della riabilitazione, che portano ad una maggiore autonomia nelle attività della vita quotidiana, e, pertanto, sono necessari ulteriori studi più grandi per studiare gli effetti di trattamenti più lunghi sulla vita di persone con SM.

In futuro, dovrebbero essere ampliati i criteri di inclusione e i training dovrebbero essere integrati in programmi di riabilitazione convenzionali di pazienti ricoverati, al fine di rendere il trattamento più accessibile per queste persone.

Virtual reality - treadmill combined intervention for improving gait in individuals affected by multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Motor symptoms such as muscle weakness, postural instability and fatigue are often responsible for gait issues in people with multiple sclerosis (PwMS) and recent reports showed that walking performance further declines when performed in conjunction with a concurrent cognitive task (dual task). Treadmill training (TT) has demonstrated to improve gait in PwMS but, since daily life requires dual task walking, recently, it has been recently augmented with virtual reality to train both motor and cognitive aspects (VR-TT). In the current project, we performed a single blind ran-

domized controlled trial to compare the effects of a six-week VR-TT and a six-week TT program on gait of PwMS. We hypothesized that both treatments would have improved motor function, but that VR-TT would have enhanced motor-cognitive abilities, consequently improving dual task performance.

RESULTS

Forty-four PwMS were recruited at Sassari University Hospital and were randomly assigned to either the control or the experimental group. Subjects in the control group received 18-session TT and subjects

in the experimental group received 18-session VR-TT. Clinical and gait measures, both in single and dual task conditions, were evaluated before and after treatments. Six subjects dropped out of the project due to personal reasons. Thus, data analysis was performed on 38 subjects (TT: $n=19$, age: 44.6 ± 10.7 yo, EDSS: 3.9 ± 0.8 ; VR-TT: $n=19$, age: 44.7 ± 10.0 yo, EDSS: 4.1 ± 1.0). Groups were comparable in amount of training performed (TT: 17.8 ± 0.4 sessions and VR-TT: 17.9 ± 0.2 sessions).

Post- intervention, both groups significantly improved walking endurance and speed, cadence and stride length, lower limb joint ranges of motion and powers, during single and dual task gait, indicating that six weeks of both treatments are beneficial for improving ambulation in PwMS.

The overall improvement can be explained as a consequence of the progressive increase of treadmill velocity over the training sessions, which prompted the subjects to adjust their gait speed accordingly. We posit that this change was enabled by the improvement of the lower limb kinematics and dynamics, more pronounced in the VR-TT group, likely facilitated by the need to negotiate the virtual obstacles. Moreover, in dual task, the VR-TT group showed greater improvements (knee and hip kinematics and hip generated power at terminal stance) than the TT group, supporting the notion that task-specific training combining motor and cognitive aspects, enhance dual task walking.

All participants improved walking endurance, balance and obstacle negotiation, as indicated by the significant changes obtained at post in the execution of functional motor tests. The significant interaction effect found for the Berg balance scale, highlighted the potential of VR-TT in improving balance control. Although not significant ($p=0.099$), an effect of VR-TT on the EDSS score was observed, suggesting that our experimental treatment could be useful for reducing disability of PwMS in rehabilitation settings. As for cognitive tasks and health-related quality of

life measures, both groups improved at post showing no significant differences between groups, except to the self-perceived cognitive function and change in health. Our results support the perceived benefits of training programs that incorporate VR to improve gait measures in PwMS and consequently their quality of life.

CONCLUSIONS

About 85% PwMS develop progressive gait impairments that increase fall risk, strongly affecting independence of everyday life and limiting social participation. This study was small with a fairly reduced sample size and did not include any measures exploring specific changes in cognitive function, which may allow for further understanding the motor-cognitive interference.

Nevertheless, despite these limitations, this study demonstrated that VR-TT improves gait of PwMS as much as the TT alone, which was previously showed to be beneficial for this population. It has emerged from this project that a relatively short period of VR-TT improves gait in single and dual task and balance control of PwMS with mild to moderate disability. Compared to TT, further improvements in joint kinematics and dynamics were found and these changes were reflected in the decline of the overall disability of the patient and in the self-perceived cognitive function.

In this project, improvements in gait and clinical measures were observed after six weeks of training, even during challenging dual task conditions. Such changes are the main goals of rehabilitation, as they result in greater autonomy in activities of daily living, and therefore, further larger studies are needed to investigate the effects of longer treatments on life of PwMS. In future, inclusion criteria should be broaden and the intervention should be integrated into conventional rehabilitation programs of inpatients in order to make treatment more and more accessible for this people.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Peruzzi A, Cereatti A, Mirelman A, Della Croce U. Effects of a virtual reality and treadmill training on gait of subjects with multiple sclerosis: a pilot study. *Mult Scler Relat Disord*. 2016 Jan;5:91-6. doi: 10.1016/j.msard.2015.11.002. Epub 2015 Nov 6

Peruzzi A, Zarbo Ir, Cereatti A, Della Croce U, Mirelman A, - An innovative training program based on virtual reality and treadmill: effects on gait of persons with multiple sclerosis. *Disabil Rehabil*. 2016 Nov 3:1-7. [Epub ahead of print]

Peruzzi A, Cereatti A, Zarbo Ir, Biancu M, Piredda R, Della Croce U, Mirelman A, - Intensive treadmill training improves gait in moderately impaired multiple sclerosis individuals. *Gait & Posture* 2016,S25/49

Peruzzi A, Cereatti A, Zarbo R, Mirelman A, Della Croce U - Virtual Reality-Treadmill Training To Improve Gait In People With Multiple Sclerosis - *Gait & Posture* 2015,S4/42

Peruzzi A, Cereatti A, Zarbo Ir, Mirelman A, Della Croce U. - Virtual Reality-Treadmill Combined Training Program To Improve Gait In Multiple Sclerosis Individuals - *Xxv Congress Of International Symposium Of Biomechanics, Glasgow, July 2015*

Peruzzi A, Cereatti A, Zarbo Ir, Mirelman A, Della Croce U. Treadmill-Virtual Reality Combined Training Program To Improve Gait In Multiple Sclerosis Individuals - *Proceedings Of 2015 Ieee International Conference On Virtual Rehabilitation (Icvr), Valencia, June 2015, Pp.18-23*

Peruzzi A, Paone C, Zarbo Ir, Vargiu V, Cereatti A, Mirelman A. Improvement Of Gait In A Moderately Disabled Individual With Multiple Sclerosis After Virtual-Reality Treadmill Training: A Case Report - *Xiv Annual Conference Of The Italian Society Of Clinical Movement Analysis, Padova, October 2015*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 85.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 85,000

Luca Prosperini

Dipartimento di Neurologia e Psichiatria, Sapienza Università, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Letizia Castelli, Laura De Giglio, Francesca De Luca, Francesca Fabiano, Fulvia Fanelli, Ilaria Ferrante, Maria Rita Marchetti, Nikolaos Petsas, Carlo Pozzilli, Serena Ruggieri, Giovanni Sellitto

Studio pilota sull'associazione tra compromissione cognitiva e disturbo dell'equilibrio in pazienti con sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

L'esecuzione simultanea di un compito cognitivo e di un compito motorio (*dual-tasking*) può compromettere la corretta esecuzione di uno dei due compiti o addirittura di entrambi. Tale fenomeno è chiamato interferenza cognitivo-motoria. Si tratta di un fenomeno comune che può essere osservato anche nella vita quotidiana, basti pensare all'uso del telefono cellulare mentre si guida l'automobile.

Coloro che sono colpiti da malattie neurologiche come la sclerosi multipla (SM) possono presentare livelli "patologici" di interferenza cognitivo-motoria. Per queste persone può essere problematico anche solo richiamare a memoria la lista della spesa mentre si cammina. Elevati livelli di interferenza cognitivo-motoria possono compromettere la mobilità e l'integrazione sociale, nonché predisporre le persone con SM ad un aumentato rischio di cadute a terra accidentali.

Il nostro studio si è focalizzato sulla misurazione dell'equilibrio statico mediante piattaforma stabilometrica computerizzata durante l'esecuzione di differenti test neuropsicologici, al fine di quantificare in maniera oggettiva il livello di interferenza cognitivo-motoria nelle persone con SM. Gli obiettivi dello studio erano molteplici: (1) capire quale *performance* fosse maggiormente compromessa durante l'esecuzione di un compito *dual-task* (quella motoria, quella cognitiva, o entrambe?); (2) verificare affidabilità e riproducibilità delle misure *dual-task* derivate dall'analisi quantitativa dell'equilibrio; (3) identificare il compito cognitivo più adatto a generare il massimo livello di interferenza cognitivo-motoria; (4) analizzare la relazione tra interferenza cognitivo-motoria e localizzazione delle lesioni demielinizzanti mediante la risonanza magnetica.

RISULTATI

Il nostro studio, a cui hanno partecipato persone con SM e volontari sani, ha dimostrato che: (1) durante un compito *dual-task* l'equilibrio è maggiormente compromesso rispetto alla *performance* cognitiva; (2) le misure derivate dall'analisi stabilometrica in corso di compito *dual-task* sono altamente riproducibili e possono essere una misura affidabile per valutare l'efficacia di un intervento riabilitativo; (3) il test di Stroop (che valuta l'attenzione selettiva e l'abilità di discriminare fra stimoli conflittuali) produce maggiori livelli di interferenza cognitivo-motoria nelle persone con SM rispetto ad altri test neuropsicologici quali il *Word Generation List* (che valuta la fluenza verbale) e il *Symbol Digit Modalities Test* (che valuta la velocità di processazione delle informazioni); (4) le lesioni demielinizzanti localizzate a livello della corona radiata anteriore sono associate ad un maggior livello di interferenza cognitivo-motoria, indipendentemente dal grado di disabilità, dal volume totale delle lesioni cerebrali e dall'atrofia cerebrale.

CONCLUSIONI

L'esecuzione di un compito *dual-task* può causare una interferenza / competizione a livello di network cerebrali che verosimilmente controllano sia la sfera cognitiva che quella motoria. Nella popolazione generale tale interferenza viene normalmente risolta mediante il reclutamento di aree cerebrali pre-frontali, ma nella SM tale reclutamento potrebbe non essere efficiente a causa del danno provocato dalla malattia a carico di specifiche connessioni cerebrali. La nostra ipotesi di lavoro è che tale danno, localizzato a livello della corona radiata anteriore, possa causare una disconnessione tra il lobo pre-frontale (sede della pianificazione dei compiti cognitivi più complessi)

e le aree che controllano la deambulazione e l'equilibrio, come i gangli basali e il cervelletto.

I nostri risultati hanno implicazioni future per lo sviluppo di strategie riabilitative e terapeutiche (farmacologiche e non farmacologiche) mirate alla riduzione del livello di interferenza cognitivo-motoria. In particolare il nostro studio può rappresentare una piattaforma di lavoro per studi basati su: esercizi *dual-task*,

somministrati mediante realtà virtuale e *video games*, per riabilitare in un colpo solo sia l'equilibrio che alcune funzioni cognitive; interventi di neuromodulazione sul lobo pre-frontale, parzialmente disconnesso causa delle lesioni demielinizzanti; farmaci dopamino-agonisti, per ripristinare l'equilibrio dei neurotrasmettitori cerebrali delle zone disconnesse che sono innervate soprattutto da fibre dopaminergiche.

Investigating the association between cognitive impairment and balance disturbance: a pilot study in patients with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Performing a motor task in conjunction with a cognitive task (the so-called dual-tasking) may have a detrimental effect on one of the tasks or even both. This phenomenon is called cognitive-motor interference. It represents a common phenomenon that can be observed in everyday life, for example walking while talking on a cell phone.

People affected by neurological diseases, such as multiple sclerosis (MS), may suffer from "pathological" levels of cognitive-motor interference. For people with MS can be problematic even recalling a shopping list while walking. Owing to high levels of cognitive-motor interference, people with MS can experience not only impaired mobility and reduced social integration, but also increased risk of accidental falls.

Our study was focused on measuring static balance by computerized force platform while performing different neuropsychological tests, to objectively quantify the level of cognitive-motor interference in people with MS. We sought to investigate different questions: (1) which performance is the more impaired in dual-task condition (the motor, the cognitive one, or both?); (2) what is the reliability of dual-task measures derived from the quantitative analysis of balance?; (3) what is the most suitable cognitive task to bring out cognitive-motor interference?; (4) is there a relationship between cognitive-motor interference and specific location of demyelinating lesions, as detected by magnetic resonance imaging?

RESULTS

People with MS and healthy volunteers participated at our study. We found that: (1) dual-task condition causes a detrimental effect on balance, but not on

the cognitive performance; (2) dual-task measures of balance are highly reproducible and therefore can represent a reliable measure to evaluate the effect of rehabilitative intervention; (3) the Stroop test (evaluating selective attention and the ability to discriminate between conflicting stimuli) produces higher levels of cognitive-motor interference in people with MS compared to other neuropsychological tests, such as Word List Generation (assessing verbal fluency) and the Symbol Digit Modalities Test (assessing information processing speed); (4) demyelinating lesions in the anterior corona radiata are associated with more pronounced cognitive-motor interference, regardless of disability level, total volume of brain lesions, and whole brain atrophy.

CONCLUSIONS

Dual-tasking may create interference / competition in specific brain network subserving both cognitive and motor domains. In general population, such interference is normally settled by recruitment of pre-frontal brain areas, but we postulate that in people with MS the recruitment of additional brain areas is hampered by the disease-related damage. Our working hypothesis mainly relies on the disconnection between pre-frontal lobe (which carries out the most complex cognitive tasks) and areas subserving walking and balance, such as the basal ganglia and cerebellum, connected through the anterior corona radiata.

Our findings represent the next step for the development of rehabilitative and therapeutic (pharmacological and non-pharmacological) strategies aimed at reducing the cognitive-motor interference. In particular, our study provides a framework for future studies based on: dual-task exercises, delivered by virtual reality and serious video games, to rehabilitate both

cognitive and motor impairments by means of a single tool; brain modulation of partially disconnected pre-frontal lobes; dopamine-agonists restoring neu-

rotransmitters imbalance, as most disconnected areas are innervated by dopaminergic fibers (striatum and pre-frontal cortex).

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Prosperini L, Fabiano F, Castelli L, De Luca F, Ferrante I, De Giglio L, Pozzilli C. The impact of different concurrent tasks on the magnitude of cognitive-motor interference phenomenon in multiple sclerosis. ECTRIMS Barcelona (Spain); 7-10 October 2015

Castelli L, De Luca F, Marchetti MR, Sellitto G, Fanelli F, Prosperini L. The dual task-cost of standing balance affects quality of life in mildly disabled MS people. *Neurol Sci*. 2016 May;37(5):673-9

Prosperini L, Castelli L, De Luca F, Fabiano F, Ferrante I, De Giglio L. Task-dependent deterioration of balance underpinning cognitive-postural interference in MS. *Neurology*. 2016 Sep 13;87(11):1085-92

Ruggieri S, Fanelli F, Castelli L, Petsas N, De Giglio L, Prosperini L. Voxel-based lesion symptom mapping to explain the cognitive-posture interference phenomenon in multiple sclerosis. ECTRIMS / RIMS (London (United Kingdom), 14-17 September 2016

Ruggieri S, Fanelli F, Castelli L, Petsas N, De Giglio L, Prosperini L. Lesion-symptom map of cognitive-postural interference in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2017 (in press) doi: 10.1177/1352458517701313.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di € 23,175

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 23,175

Massimiliano Pau

Laboratorio di Biomeccanica ed Ergonomia Industriale, Dipartimento di Ingegneria Meccanica, Chimica e dei Materiali, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Federica Corona, Bruno Leban

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Eleonora Cocco, Giancarlo Coghe, Maria Giovanna Marrosu,

Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica Università degli Studi di Cagliari, Centro regionale della Sardegna per la diagnosi e cura della sclerosi multipla, Cagliari

Manuela Galli, Dipartimento di Elettronica, Informatica e Bioingegneria, Politecnico di Milano, Milano

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

Sviluppo di una piattaforma hardware-software innovativa per la riabilitazione dell'equilibrio in individui affetti da SM basata sulla Balance Board Nintendo Wii

PREMESSE E OBIETTIVI

Tra gli strumenti a disposizione dei terapisti per la riabilitazione dell'equilibrio nei pazienti affetti da SM, negli ultimi anni ha riscosso consensi crescenti l'impiego di dispositivi originariamente progettati per scopi ludici e di intrattenimento, come la console Nintendo Wii, accessoriata con Balance Board (WBB). Tuttavia si è ancora ben lontani dall'aver chiarito tutti gli aspetti che sarebbero necessari a formulare delle linee guida dettagliate che permettano la standardizzazione dei protocolli di riabilitazione basati su tali sistemi. In particolare, il software Wii-Fit, comunemente impiegato in riabilitazione, è progettato per individui sani, e non consente modulazioni del livello di difficoltà o, tanto meno, personalizzazione delle routine di gioco in funzione delle caratteristiche del paziente. Partendo da tali considerazioni, il progetto ha avuto come obiettivo principale lo sviluppo di una nuova piattaforma hardware/software a basso costo (basta su miniPC Raspberry Pi) che consentirebbe non solo di abbattere i costi del sistema e quindi renderlo maggiormente fruibile al paziente per un training di tipo domestico, ma anche di sviluppare nuove routine di esercizio, sulla base delle competenze e delle necessità del neurologo e dello specialista della riabilitazione.

RISULTATI

Il progetto ha pienamente raggiunto gli obiettivi prefissati in termini di progetto e sviluppo della nuova piattaforma e delle routine di gioco specifiche per le esigenze riabilitative della SM. In particolare, i test preliminari effettuati su un campione di 65 individui con SM e altrettanti controlli sani, hanno messo in luce la capacità del sistema di evidenziare le alterazioni del sistema di controllo posturale originate dalla patologia nonché l'esistenza di una moderata correlazione della prestazione (espressa in termini di punteggio) con l'efficienza del sistema di controllo posturale valutate mediante posturografia statica.

CONCLUSIONI

L'impiego di tecnologia "off-the-shelf" disponibile a basso costo, e la realizzazione di routine di training specifiche per la persona con SM, potrà permettere in futuro la realizzazione di programmi riabilitativi per l'equilibrio, parzialmente o non supervisionati, gestiti a domicilio. Ciò potrebbe consentire una sensibile riduzione della spesa per il servizio sanitario nazionale e una maggiore persistenza degli effetti riabilitativi nel tempo.

Development of an innovative hardware-software platform for balance rehabilitation in people with MS based on Nintendo Wii Balance Board system

INTRODUCTION AND AIMS

Among other options, balance training performed using entertainment devices like the Nintendo Wii with Balance Board (WBB) is becoming widespread in rehabilitation programs for individuals with MS. The reason of such popularity lies, other than in the effectiveness of the system in terms of balance improvements, in its appeal and simplicity of use that makes it ideal for home-based training programs. However, the software commonly employed with the WBB (the commercial Wii-Fit) is designed for healthy people and thus in most cases it is impossible to modulate the difficulty of the game. Given that the WBB represents a low-cost device with good connectivity features we thought to investigate the feasibility of new ways to use such device in home-based balance training programs even not in conjunction with the original Wii console. On the basis of the above mentioned considerations, the project is aimed to develop a prototype of a new hardware-software platform that, while still using the Balance Board as controlling device, is equipped with new games specifically tailored for the MS needs that will be developed on the basis of the suggestions provided by neurologists and physical medicine professionals.

RESULTS

The main results of the project are summarized below:

- 1) characterization of the Nintendo Wii-Fit suite games typically employed in rehabilitation of pwMS;
- 2) design of new routines able to overcome the limitation possibly detected in the Nintendo Wii-Fit suite;
- 3) assessment of the feasibility of use for the new system by means of experimental tests performed on a sample of people with MS and healthy controls;
- 4) implementation of the new games in a low-cost miniaturized platform based on Raspberry Pi.

The most important result of the research has been the testing of the new platform. In particular, the preliminary tests performed using the new games revealed that the score system they use is able to discriminate between individuals with MS and healthy controls. Also, we found moderate correlations between the game performance and the postural control abilities assessed using posturography.

CONCLUSIONS

The use of low-cost technology and the presence on the market of games specifically developed for the MS needs, would allow individuals with MS to perform home-based balance rehabilitation programs partly (or no) supervised with a significant reduction of cost for the national health system and at the same time originating a superior persistence of the positive effects of the rehabilitative program.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Caggiari S, Leban B, Corona F, Coghe G, Marrosu MG, Cocco E, Pau M. Customizable Exergames Nintendo Wii Balance Board-based for rehabilitation in Multiple Sclerosis. 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) 14-17 September 2016, London, United Kingdom

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 20.000 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 1 year and the amount of € 20,000

La ricerca

sulla

**sclerosi
multipla**

**DIAGNOSI E MONITORAGGIO
DELLA MALATTIA**

DISEASE DIAGNOSIS AND MONITORING

Massimo Filippi

Unità di Neuroimaging Quantitativo, INSPE, Divisione di Neuroscienze,
Istituto Scientifico San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

**Maria Assunta Rocca, Paola Valsasina, Paolo Preziosa, Andrea Falini,
Giancarlo Comi**

Valutazione delle modifiche longitudinali della rete di connettività funzionale (connectome) nei pazienti con sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Si può pensare al cervello umano come a una rete complessa di regioni interconnesse fra loro. La *graph theory* è una teoria matematica che consente di studiare efficacemente le reti complesse come quella cerebrale. Capire come i neuroni e le strutture neuronali si connettono e comunicano è fondamentale per comprendere meglio come è organizzato il cervello. Nella sclerosi multipla (SM) c'è un deficit di comunicazione fra le diverse regioni del cervello, dovuto al danno strutturale dei fasci di fibre che le connettono. Il risultato di tale disconnessione è una integrazione difficoltosa delle informazioni, che è una delle principali ragioni dello sviluppo di disabilità clinica irreversibile e di deficit cognitivi nella SM. Studi di *graph theory* con risonanza magnetica (RM) funzionale in *resting state* (stato di riposo) hanno dimostrato che nella SM c'è una disgregazione della configurazione ottimale della connettività funzionale, che contribuisce a spiegare la variabilità clinica dei pazienti e la presenza di compromissione cognitiva. Un altro fattore molto importante che contribuisce a spiegare la complessa relazione tra la compromissione cognitiva e l'atrofia cerebrale è la riserva cognitiva. È noto che l'impegno in attività mentalmente stimolanti ha un effetto protettivo per la memoria e il volume ippocampale nei pazienti con SM. Tuttavia, non è ancora chiaro quanto a lungo la riserva cognitiva può proteggere dallo sviluppo di deficit, specie nelle fasi avanzate della malattia.

Date queste premesse, lo scopo principale del nostro progetto è stato quello di valutare come cambiano nel tempo la connettività funzionale e l'atrofia nei pazienti con SM rispetto ai controlli sani. Abbiamo inoltre voluto definire come i cambiamenti di connettività e di atrofia si associano alla contempo-

ranea progressione della disabilità clinica e cognitiva, e al danno strutturale. Abbiamo infine indagato il valore predittivo delle alterazioni di connettività e atrofia, e della riserva cognitiva, sul successivo peggioramento clinico e cognitivo.

RISULTATI

I pazienti con SM hanno mostrato una ridotta connettività funzionale a riposo al basale rispetto ai controlli. La riduzione era localizzata principalmente nei *network* cognitivi, sensorimotori e sottocorticali, e correlava con una maggiore disabilità clinica e cognitiva, e con un danno strutturale più elevato. Nel *network* talamico invece, una maggiore connettività talamo-frontale era correlata con performance cognitive peggiori. I pazienti mostravano anche un'atrofia diffusa di tutti i lobi cerebrali e del cervelletto. Una maggiore riserva cognitiva si associava a migliori performance in molti test cognitivi, anche correggendo per la presenza di atrofia, ed era correlata con un volume maggiore in aree visive associative. I pazienti con SM sono stati rivalutati dopo un *follow-up* di circa 4 anni con una valutazione clinica, neuropsicologica, e con RM strutturale e funzionale a riposo. Al *follow-up*, 11 pazienti sono peggiorati clinicamente in base alla valutazione della loro scala di disabilità. I pazienti peggiorati mostravano un numero maggiore di nuove lesioni e lo sviluppo di un tasso più elevato di atrofia. La connettività funzionale al *follow-up* mostrava una sostanziale stabilità (o incremento) nei pazienti clinicamente stabili (specialmente in *network* sensorimotori, attentivi e sottocorticali), mentre i pazienti peggiorati mostravano ridotta connettività nei *network* corticali, sensorimotori, cerebellare e talamico. Globalmente, i pazienti peggiorati avevano una connettività funzionale più bassa al *follow-up* dei pazienti

stabili. Il declino cognitivo nel tempo era correlato con ridotta connettività funzionale di regioni del lobo temporale, del cervelletto e dei nuclei sottocorticali, e con lo sviluppo di atrofia in regioni fronto-temporali e cerebellari. La riserva cognitiva non aveva effetti sullo sviluppo nel tempo di atrofia o di deficit cognitivi. Una iniziale ridotta connettività funzionale in *network* sensorimotori e cognitivi, insieme a una elevata atrofia cerebrale basale, predicevano il successivo sfavorevole decorso clinico.

CONCLUSIONI

Nei pazienti con SM avanzata vi è un'alta frequenza di disabilità motoria e di compromissione cognitiva, che hanno un forte impatto negativo sulla qualità di

vita e alti costi per la comunità. Abbiamo usato un approccio di RM multiparametrico per valutare l'associazione fra misure di RM (sensibili a diversi fattori patologici) e il peggioramento clinico/cognitivo. I risultati ottenuti ci indicano che l'atrofia cerebrale e l'analisi dei *network* funzionali sono misure utili per monitorare la progressione della malattia e per predire uno sfavorevole decorso clinico, mentre la riserva cognitiva sembra perdere la sua efficacia protettiva con l'avanzare della malattia. L'inclusione di misure di RM in futuri studi di monitoraggio del trattamento potrà aiutare a individuare i pazienti a rischio di peggioramento clinico e cognitivo, aumentando perciò il rapporto costo-efficacia e il potere statistico dei futuri *trial* clinici.

Longitudinal assessment of large-scale brain functional networks (connectome) in patients with multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The human brain can be thought as a complex network of connected regions interacting with each other. Graph theory is a mathematical framework that can be applied effectively to study complex networks systems like the brain. Understanding how neurons and neuronal structures connect and communicate is crucial for a better comprehension of brain organization. In multiple sclerosis (MS), there is a deficit of communication between brain areas, because structural damage occurs in white matter fibre tracts connecting regions. Disconnection between regions results in a lack of information integration, which is one of the main reasons behind the development of irreversible clinical disability and cognitive deficits in MS. Using resting state (RS) functional magnetic resonance imaging (fMRI), graph theory study showed diffuse disruption of optimal functional network organization in MS, which contributed to explain patients' clinical heterogeneity and the presence of cognitive impairment. Another important factor having a positive impact on preserved cognition and cortical atrophy is the cognitive reserve. It has been demonstrated that engagement in mentally stimulating activities has a protective effect on memory functions and hippocampal volume in MS. However, it is still not clear how long cognitive reserve can protect against cog-

nitive deficits with the progression of the disease. Against this background, the main aim of our project was to assess changes over time of functional network connectivity and grey matter atrophy in MS patients compared to healthy controls. We wished also to define correlations between connectivity and atrophy changes and the concomitant progression of clinical/cognitive disability and structural damage. Finally, we investigated the predictive value of structural/functional connectivity abnormalities and cognitive reserve on worsening of clinical disability and cognitive impairment.

RESULTS

At baseline, lower functional connectivity was found in MS patients compared to controls. Functional connectivity reduction involved the main cognitive, sensory, motor and subcortical networks and correlated with higher clinical/cognitive disability and structural damage, apart from the thalamic network, where higher thalamo-frontal connectivity correlated with worse cognitive performances. Patients showed a widespread grey matter atrophy involving all brain lobes and the cerebellum. At baseline, a higher cognitive reserve predicted better performances at several cognitive tests, even after controlling for the presence of atrophy. Cognitive reserve was also correlated with preserved grey matter vol-

ume in associative visual regions. MS patients were re-assessed with a clinical, neuropsychological and structural MRI/RS fMRI follow-up evaluations after about 4 years. According to the increase of their disability score at follow-up, eleven MS patients were clinically worsened. Worsened MS patients had a higher rate of lesion and atrophy formation than stable patients. Functional connectivity analysis detected a complex pattern of changes over time in the different networks, with a trend towards a stability (or increase) of connectivity in clinically stable MS patients (especially in cortical networks related to sensorimotor and attention functions, as well as in subcortical networks), and a decreased connectivity in clinically worsened MS patients, especially in cerebellar, thalamic, cognitive and sensorimotor networks. Overall, at follow-up worsened MS patients had lower global and regional functional network connectivity than clinically stable MS. Cognitive decline was correlated with decreased functional connectivity in temporal, cerebellar and deep grey matter regions, and with atrophy of fronto-temporal and cerebellar areas, while no effects of cognitive reserve were found on subsequent cognitive or structural changes. The prediction

analysis identified lower connectivity in sensorimotor and cognitive functional networks and baseline brain atrophy as significant predictors of disability worsening.

CONCLUSIONS

Motor disability and cognitive impairment have a high prevalence in advanced MS, with a strong impact on patients' quality of life and with high costs for the community. By using a multiparametric MRI approach, including structural and functional MRI techniques, we evaluated the association between MRI measures sensitive to different pathophysiological substrates of the disease with clinical and cognitive worsening. Our results seems to indicate that atrophy and functional network analysis are useful biomarkers to monitor disease progression and to predict an unfavourable clinical evolution, while cognitive reserve seems to lose its protective efficacy with the progression of disease. Including MRI biomarkers in studies monitoring future treatments might help to identify patients at higher risk of developing severe disability and cognitive impairment, thus increasing cost-effectiveness and power of future clinical trials.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Filippi M, Valsasina P, Vacchi L, Leavitt VM, Comi G, Falini A, Rocca MA. Abnormalities of the main cortical and subcortical functional networks in MS patients. *Mult Scler J* 2015; 23 (11 Suppl): 172-173

Rocca MA, Valsasina P, Vacchi L, Leavitt VM, Comi G, Falini A, Filippi M. Abnormalities of the main cortical and subcortical functional networks in MS patients. *Neurol Sci* 2015; 36 (suppl October): S201

Rocca MA, Valsasina P, Colombi A, Pirro F, Pagani E, De Meo E, Colombo B, Preziosa P, Rodegher M, Comi G, Falini A, Filippi M. Longitudinal assessment of large-scale brain functional networks in patients with multiple sclerosis: relationship with clinical disability and cognitive impairment. *Eur J Neurol* 2016; 23 (Suppl 1): 331

Pirro F, Rocca MA, Valsasina P, Pagani E, Meani A, Copetti M, Martinelli-Boneschi F, Rodegher M, Comi G, Falini A, Filippi M. Functional and structural MRI predictors of disability worsening in multiple sclerosis: a 4-year follow-up study. *Eur J Neurol* 2016; 23 (Suppl 1): 547

Rocca MA, Valsasina P, Colombi A, Pirro F, Pagani E, De Meo E, Colombo B, Preziosa P, Martinelli V, Comi G, Falini A, Filippi M. Longitudinal assessment of large-scale brain functional networks in patients with multiple sclerosis: relationship with clinical disability and cognitive impairment. *Mult Scler J* 2016; 22 (S3): 201-202

Rocca MA, Del Sette P, Riccitelli G, Pagani E, Preziosa P, Martinelli V, Comi G, Falini A, Filippi M. Role of cognitive reserve on cognitive function and regional brain atrophy in multiple sclerosis: a two-year longitudinal study. *Mult Scler J* 2016; 22 (S3): 529

Pirro F, Valsasina P, Pagani E, Meani A, Copetti M, Martinelli-Boneschi F, Rodegher M, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Functional and structural MRI predictors of disability worsening in multiple sclerosis: a 4-year follow-up study. *Mult Scler J* 2016; 22 (S3): 581-582

Rocca MA, Valsasina P, Colombi A, Pirro F, Pagani E, De Meo E, Colombo B, Preziosa P, Martinelli V, Comi G, Falini A, Filippi M. Longitudinal assessment of large-scale brain functional networks in patients with multiple sclerosis: relationship with clinical disability and cognitive impairment. *Neurol Sci* 2016; 37 (Suppl October 2016): S249

Pirro F, Valsasina P, Pagani E, Meani A, Copetti M, Martinelli-Boneschi F, Martinelli V, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Functional and structural MRI predictors of disability worsening in multiple sclerosis: a 4-year follow-up study. *Neurol Sci* 2016; 37 (Suppl October 2016): S249

Rocca MA, Del Sette P, Riccitelli GC, Pagani E, Preziosa P, Martinelli V, Comi G, Falini A, Filippi M. Role of cognitive reserve on cognitive function and regional brain atrophy in multiple sclerosis: a two-year longitudinal study. *Neurol Sci* 2016; 37 (Suppl October 2016): S249-S250

Pirro F, Valsasina P, Colombi A, Pagani E, De Meo E, Colombo B, Preziosa P, Martinelli V, Comi G, Falini A, Filippi M, Rocca MA. Longitudinal assessment of large-scale brain functional networks in patients with MS: relationship with clinical disability and cognitive impairment. Accepted for poster presentation at the 69th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Boston, 22-28 April 2017

Pirro F, Rocca MA, Valsasina P, Pagani E, Meani A, Copetti M, Martinelli-Boneschi F, Martinelli V, Comi G, Falini A, Filippi M. Structural and functional MRI predictors of disability and cognitive impairment accrual in patients with multiple sclerosis. Accepted for poster presentation at the 69th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Boston, 22-28 April 2017

Valsasina P, Rocca MA, Pirro F, Pagani E, Meani A, Copetti M, Martinelli-Boneschi F, Martinelli V, Comi G, Falini A, Filippi M. Structural and functional MRI predictors of disability and cognitive impairment accrual in patients with multiple sclerosis. Accepted for poster presentation at the ISMRM 2017 Annual Meeting, Honolulu, 22-27 April 2017

Valsasina P, Rocca MA, Pirro F, Colombi A, Pagani E, De Meo E, Colombo B, Preziosa P, Martinelli V, Comi G, Falini A, Filippi M. Longitudinal assessment of large-scale brain functional networks in patients with MS: relationship with clinical disability and cognitive impairment. Accepted for electronic poster presentation at the ISMRM 2017 Annual Meeting, Honolulu, 22-27 April 2017

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 100.000 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 1 year and the amount of € 100,000

Christian Cordano

Department of Neurology, University of California, San Francisco (UCSF), USA

MENTORE / MENTOR: **Ari Green**

Tomografia a coerenza ottica ad altissima risoluzione nell'encefalomielite autoimmune sperimentale: un modello per la comprensione del ruolo clinico dell'OCT nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

I modelli animali di sclerosi multipla per la valutazione dell'efficacia di nuovi potenziali trattamenti neuroprotettivi sono poco efficienti. La tomografia a coerenza ottica (OCT - Optical Coherence Tomography), un macchinario che permette di eseguire una sorta di TAC della retina, (senza sottoporre la persona esaminata a radiazioni), è stata utilizzata sia nella clinica che nella ricerca sulla sclerosi multipla (SM). Sia studi utilizzando OCT che studi su tessuti retinici hanno dimostrato un assottigliamento dello strato delle fibre nervose retiniche (RNFL) e una perdita significativa di cellule ganglionari retiniche (RGCs) in pazienti con SM. RNFL e RGCs costituiscono il tessuto nervoso, e quindi i neuroni, che ogni persona ha a livello retinico. L'encefalomielite autoimmune sperimentale (ESA) è un ben noto modello animale per la SM, e in alcuni modelli ESA è stata descritta sofferenza retinica. Tuttavia le basi patologiche dei cambiamenti OCT nella SM non sono stati esplorati né sono stati intrapresi nell'ESA studi che correlassero l'imaging-patologico (OCT soggetti con SM) con i tessuti retinici. Non esistono protocolli di scansione ottimali per l'attuazione dell'OCT in laboratorio sugli animali con ESA. Gli obiettivi dello studio proposto erano molteplici. In particolare descrivere la dinamica delle lesioni retiniche dopo neurite ottica acuta (ON) in un modello murino di encefalomielite autoimmune sperimentale e definire le condizioni sperimentali ottimali, i protocolli di scansione e i metodi di analisi per la valutazione delle terapie neuroprotettive nell'ESA (utilizzando la tomografia a coerenza ottica come misura di esito primaria). Quindi valutare le retine di animali con ESA per gliosi e infiammazione con istologia e immunoistochimica di routine oltre a valutare se periflebite e gliosi modificano la valutazione dalla retina da parte dell'OCT. L'ultimo obiettivo consisteva nel valutare se l'infiammazione coinvolgente la membrana poste-

riore del vitreo impatti sulla valutazione quantitativa dello spessore dell'RNFL.

RISULTATI

Nei miei primi sei mesi di lavoro ho lavorato alla caratterizzazione dei cambiamenti OCT in un modello murino di neurite ottica (ESA). L'esecuzione di questi esperimenti su animali ci ha permesso di descrivere *in vivo* il corso del danno neuronale che segue la demielinizzazione. Abbiamo indotto l'ESA utilizzando "myelin oligodendrocyte glycoprotein" (MOG) 35-55 in topi C57 Bl 6J / (n = 16) di sesso femminile con 8 settimane di età, utilizzando topi iniettati con sostanza inerte (n = 12) come controlli sani. Abbiamo eseguito scansioni retiniche di questi animali utilizzando un OCT (Heidelberg Spectralis) normalmente utilizzato per fare esami all'uomo. Questo è stato possibile costruendo artificialmente una base cilindrica in cui posizionare i topi, oltre che grazie all'uso di una lente ad hoc fatta pervenire dalla stessa azienda del macchinario.

Siamo riusciti ad eseguire l'OCT nel topo, calcolando in modo semiautomatico (utilizzando un programma e controllando manualmente ogni esame) lo spessore dei vari strati retinici, al momento dell'immunizzazione e 1, 2, 5, 7 e 9 mesi dopo. Alla fine dell'esperimento gli occhi degli animali che avevano partecipato all'esperimento sono stati raccolti e abbiamo eseguito un conteggio delle cellule ganglionari retiniche (le cellule nervose che con il loro assone costituiscono il nervo ottico) sempre in modo semi-automatico, attraverso una metodica chiamata immunoistochimica per Brn3a. Abbiamo scoperto che nella retina il danno assonale e neuronale si sviluppa rapidamente dopo l'insorgenza dell'ESA e che i cambiamenti nella retina rispecchiano la gravità clinica della malattia. Variazioni di spessore della retina nel tempo sono stati localizzati negli strati retinici interni, cioè uno strato che rap-

presenta sia le fibre nervose retiniche (RNFL) che le cellule gangliari (GCC). Un progressivo assottigliamento di questi strati inizia rapidamente dopo l'insorgenza della malattia, con 1/3 di perdita totale durante i primi 2 mesi.

Più di recente il mio lavoro si è concentrato su misure elettrofisiologiche visive (potenziale evocato visivo, PEV) nell'ESA, con l'ipotesi che esse siano in grado di rilevare alterazioni della via visiva prima dell'OCT. Ho eseguito più di 1600 esami sia su topi sani che presentanti ESA sviluppando un protocollo che mi ha permesso di testare lo stesso animale sano con una deviazione standard di latenza di ~ 2 ms. Questa ottima riproducibilità mi ha permesso di eseguire valutazioni PEV frequenti negli stessi topi con ESA, dimostrando diversi gradi di ritardo del potenziale in diversi *time points* dopo aver indotto la malattia. Ho poi avuto l'opportunità di testare l'effetto di diversi farmaci neuroprotettivi, in particolare farmaci che agiscono promuovendo la rimielinizzazione. Ho dimostrato, sia descrivendo il miglioramento del ritardo del PEV che il miglioramento della IHC per CASPR (una proteina di membrana che aiuta a descrivere lo stato della mielina), l'effetto rimielinizzante di questi farmaci. Inoltre ho partecipato alla raccolta di dati per studi di ricerca clinica incentrata sulle dinamiche di atrofia della retina nelle persone con SM. La gran parte degli obiettivi iniziali sono stati raggiunti, non la totalità degli stessi in quanto dopo

1 anno di ricerca sull'OCT si è deciso di avviare un nuovo progetto per quanto riguarda la ricerca sulla via visiva (elettrofisiologia visiva) nella ESA, essendo cambiato l'obiettivo principale del mio laboratorio.

CONCLUSIONI

Gli esperimenti sull'OCT propongono l'esecuzione longitudinale di OCT nel topo con ESA come modello utilizzabile per valutare l'efficacia di farmaci neuroprotettivi. Si può evidenziare come nell'ESA sia presente, fino dalle fasi precoci della patologia, neurodegenerazione a livello retinico. Abbiamo riscontrato riduzione di RNFL e del numero di cellule ganglionari retiniche in tutti gli animali immunizzati, corrispondente a ridotto numero di RGCs all'immunostochimica, risultato che testimonia come l'OCT abbia elevata sensibilità per la rarefazione neuronale retinica. Questi esperimenti hanno permesso di descrivere un modello efficiente e facilmente riproducibile per farmaci che agiscano sulla neuroprotezione. Gli esperimenti con VEP ci hanno permesso di descrivere un nuovo modello per testare farmaci remielinizzanti. I miei esperimenti hanno permesso e stanno continuando a permettere di testare l'efficacia di farmaci appartenenti a questa categoria, oltre a dare un contributo per la sperimentazione sull'uomo con Clemastine (iniziata circa un anno fa con un primo clinical trial, a cui sta per succederne un secondo).

Ultra-high resolution Optical Coherence Tomography in experimental autoimmune encephalomyelitis: a model for understanding the clinical role for OCT in MS

INTRODUCTION AND AIMS

Preclinical models for rapidly assessing potential neuroprotective and restorative treatments in MS are lacking. Retinal spectral-domain (SD)-OCT has been explored as a clinical and research tool in MS. Both OCT and postmortem studies have shown significant retinal nerve fiber layer (RNFL) thinning and retinal ganglion cell (GC) loss in MS patients. EAE is a well-known animal model for MS and retinal pathology in some EAE models has been described. However the pathological underpinnings of OCT changes in MS have not been explored and robust imaging-pathological correlates in EAE have not been undertaken. The optimal experimental and

scan protocols for the implementation of OCT in the EAE lab has not been performed. To describe the dynamics of retinal injury after acute optic neuritis (ON) in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and to define the optimal experimental conditions, scan protocols and analysis methods for the assessment of neuroprotective therapies in EAE using optical coherence tomography (OCT) as a primary outcome measure. To evaluate MOG-peptide induced EAE mouse retinas for gliosis and inflammation using routine histology and immunohistochemistry and assess whether periphlebitis and gliosis impact OCT backscatter from the inner retina. To evaluate whether inflammation

involving the posterior vitreous membrane leads to signal change that complicates evaluation of the inner boundary of the retinal nerve fiber layer and impacts quantitative assessment of RNFL thickness.

RESULTS

In my first six months of work I worked on the characterization of OCT changes in a mouse model of retrobulbar ON and characterized the histopathological correlates. Performing these experiments in living animals allowed us to describe the course of neuronal injury following demyelination. We induced EAE with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 in female 8-week-old C57 BI/6J mice (n=16), using adjuvant-injected mice (n=12) as controls. We performed retinal raster-based volume scans using SD-OCT (Heidelberg Spectralis), with semiautomated segmentation of retinal layers, at the time of immunization and 1, 2, 5, 7 and 9 months later. Retinal Ganglion Cell (RGC) count was calculated by semi-automated count of Brn3a positive cells on retinal flatmounts after transcardial perfusion fixation of the eyes. We found that retinal axonal and neuronal damage develops quickly after EAE onset and that longitudinal changes in retinal thickness mirror neuronal loss and clinical severity in EAE. Changes in retinal thickness over time were localized in the inner retinal layers (IRL), i.e. retinal nerve fiber layer (RNFL) and ganglion cell complex (GCC). Progressive thinning of IRL started rapidly after the disease onset, with 1/3 of total loss happening during the initial 2 months.

More recently my work has focused on visual electrophysiological measures, with the hypothesis that they are able to detect visual pathway alterations before OCT in MOG-peptide induced EAE-related ON. I performed more than 1100 exams both in healthy and EAE mice designing a protocol that is allowing me to test the same healthy animal with a latency standard deviation of ~ 2 ms. This very good repro-

ducibility allowed me to perform longitudinal VEP evaluations in EAE mice, showing different degrees of delay in various time points, testing in four different experiments (induced EAE with MOG 35-55 in 8-week-old female C57 BI/6J mice (n=20), using adjuvant-injected mice (n=5) as controls) different time points. After showing the VEP alterations in EAE, I have had the opportunity to test the effect of different neuroprotective drugs, in particular drugs acting promoting remyelination. I've showed, both demonstrating the improvement of VEP delay and improvement of IHC for CASPR (a membrane protein found in the neuronal membrane in the paranodal section of the axon in myelinated neurons, between the Nodes of Ranvier containing Na⁺ channels, and juxtaparanode, which contains K⁺ channels), the remyelinating effect of these drugs. Furthermore I have participated in data collection for exciting clinical research study focused on the dynamics of retinal atrophy in MS and OCT ability in predicting disability worsening in MS. The great part of the initial objectives were achieved, but after 1 year on OCT research it was decided to start a new project regarding the visual pathway (visual electrophysiology) in EAE, being changed the main goal of my lab.

CONCLUSIONS

We showed that 1) retinal axonal and neuronal damage develops quickly after EAE onset. 2) Longitudinal changes in retinal thickness mirror neuronal loss and clinical severity in EAE. 3) Studies assessing thickness by OCT after EAE onset as an imaging marker for the preclinical screening of neuroprotective therapies should last two months and measure changes in the IRL as their primary outcome parameter. This model will be useful to evaluate the efficacy of new neuroprotective drugs. The VEP experiments showed a new model for testing remyelinating drugs. This ongoing process already brought to a clinical trial to assess Clemastine effect on MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Cordano C, Petracca M, Rubin P, Farrell C, Miller A, Lublin F and Inglese M. Relationship between RNFL thickness and Brain Cortical Lesions in Primary-Progressive MS. AAN (American Academy of Neurology) congress, Washington, 18-25 April 2015

Cordano C, Petracca M, Rubin P, Farrell C, Miller A, Lublin F and Inglese M. Relationship between RNFL thickness and Brain Cortical Lesions in Primary-Progressive MS. ECTRIMS 2015, Barcelona 6-10 October 2015

Cordano C, Petracca M, Rubin P, Farrell C, Miller A, Lublin F and Inglese M. Relationship between RNFL thickness and Brain Cortical Lesions in Primary-Progressive MS. XLVI Congresso Società Italiana di Neurologia, Genova, 10-13 Ottobre 2015

Cruz-Herranz A, Albrecht P, Yiu HH, Cordano C, Levin MH, Lehmann-Horn K, Green A. Dynamics of retinal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. Tykeson Conference 2015. November 5-7, 2015. Fort Worth

Cruz-Herranz A, Yiu HH, Cordano C, Lehmann-Horn K, Mei F, Chan JR, Green A. Longitudinal screening of clemastine as a neuroprotective compound in experimental autoimmune encephalomyelitis using optical coherence tomography. Tykeson Conference 2015. November 5-7, 2015. Fort Worth

Cordano C*, Caverzasi E*, Zhu A, Bischof A, Kirkish G, Papinutto N, Devereux M, Baker N, Arnow S, Inman J, Yiu H, Bevan C, Gelfand JM, Cree BA, Hauser SL, Henry RG, and Green AJ. Predicting visual function clinical outcome in Multiple Sclerosis: a MRI and OCT metrics study. ACTRIMS congress 2017, Orlando 23-25 February 2017

Cordano C, Gelfand JM, Damotte V, Devereux M, Baker N, Bove R, Bevan C, Crabtree-Hartman L, Cree BA, Goodin D, Graves J, Hauser SL, Henry RG, Gourraud PA, Green AJ. pRNFL as a marker of disability worsening in the medium/long term in MS patients. AAN congress 2017, 22-28 April, Boston

Caverzasi E*, Cordano C*, Zhu A, Bischof A, Kirkish G, Papinutto N, Devereux M, Baker N, Arnow S, Inman J, Yiu H, Bevan C, Gelfand JM, Cree BA, Hauser SL, Henry RG, and Green AJ. Predicting visual function clinical outcome in MS: a MRI and OCT metrics study. Annals of Neurology, in submission

Martinez-Lapiscina EH, Yiu H, Andorra M, Cruz-Herranz A, Cordano C, Cree BA, Gelfand JM, Gomez R, Arnow S, Pulido-Valdeolivas I, Bevan C, Crabtree E, Goodin D, Graves J, Zamvil S, Hauser SL, Sanchez-Dalmau B, Saiz A, Villoslada P, Green AJ. Retinal atrophy is more prominent in the early phases of multiple sclerosis and is associated with clinical disease activity: a cohort study. Lancet Neurology, in submission

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 65.000 €

Research Fellowship funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 65,000

Maria Petracca

Department of Neurology-Icahn School of Medicine at Mount Sinai, NY, USA
Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche,
Università di Napoli 'Federico II', Napoli

MENTORE / MENTOR: **Matilde Inglese**

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

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM), pur non determinando una riduzione significativa dell'aspettativa di vita, è la più comune causa di disabilità in giovani adulti, e comporta perciò costi sociali molto elevati. Recenti studi hanno dimostrato che l'accumulo di sodio a livello cerebrale è un fattore chiave nel processo di neuro degenerazione - che a sua volta sembra causare lo sviluppo della disabilità e la sua progressione - tanto che il blocco dei canali del sodio è in grado di arrestare la neuro-degenerazione nel modello animale di SM. Grazie ad una tecnica innovativa e non-invasiva di Risonanza Magnetica (RM) di recente sviluppo, e con un macchinario di RM ad elevato campo magnetico (7 Tesla), ci siamo proposti di analizzare la distribuzione del sodio all'interno e all'esterno delle cellule cerebrali allo scopo di evidenziare la presenza di accumulo di sodio nelle cellule cerebrali, investigare le basi fisiopatologiche di tale accumulo ed, infine, valutare l'associazione tra concentrazione di sodio, riduzione del volume cerebrale e disabilità clinica.

RISULTATI

I risultati hanno mostrato che nelle persone con SM le concentrazioni di sodio intra- ed extracellulare erano maggiori rispetto ai controlli. Inoltre, misure della concentrazione totale di sodio e della frazione di volume intracellulare di sodio (misura indiretta della concentrazione extracellulare di sodio), erano correlate con il volume delle lesioni pesate in T2 e

con il punteggio della scala di disabilità EDSS. Questi risultati suggeriscono che la diminuzione della frazione di sodio intracellulare rappresenti la perdita di tessuto, mentre l'aumento della concentrazione di sodio possa riflettere disfunzioni metaboliche neuro-assonali.

Sebbene il progetto prevedesse inizialmente l'inclusione di persone con SM progressiva, l'insorgenza di problemi di natura tecnica con il macchinario di Risonanza Magnetica (RM) hanno determinato l'interruzione del progetto e l'impossibilità di valutare eventuali differenze in termini di accumulo cerebrale di sodio tra diverse forme cliniche di SM. Parte della borsa di studio riconosciutami dalla FISM è stata pertanto investita nella mia partecipazione ad un secondo progetto di ricerca, volto all'analisi delle alterazioni funzionali associate ai problemi cognitivi presenti nelle persone con SM progressiva.

CONCLUSIONI

La possibilità di quantificare l'accumulo di sodio a livello encefalico rappresenta un promettente strumento per identificare la degenerazione cellulare, e si propone come chiave per comprendere meglio i meccanismi che portano all'atrofia cerebrale. Inoltre, il metodo che abbiamo utilizzato fornirà un mezzo per chiarire anche il meccanismo d'azione di farmaci bloccanti i canali del sodio, un'applicazione che avrà un'importante ricaduta sul monitoraggio, *in vivo*, degli effetti cellulari di farmaci esistenti e di nuove molecole in corso di sviluppo.

Quantification of extra-and intracellular brain sodium concentration in MS using 7.0 Tesla MRI

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is the most common cause of neurological disability in young adults and has a high socio-economic impact which increases as disability progresses. There is increasing evidence that neuro-axonal degeneration occurs progressively from disease onset and it is a relevant cause of accumulating disability. Recent studies have demonstrated that the intracellular sodium accumulation represents a key factor in the degenerative process and that partial blockade of sodium channels protects cells from degeneration in experimental models of MS. Thanks to the application of a newly-developed non-invasive sodium Magnetic Resonance Imaging (MRI) method at 7 Tesla, we analysed sodium distribution inside and outside cerebral cells, in order to quantify sodium accumulation, investigate the mechanisms underlying sodium concentration increase and the association between such increase, brain volume loss and clinical disability.

RESULTS

People with MS showed a higher intra- and extracellular sodium concentration in comparison with healthy controls. Total sodium concentration and intracellular sodium volume fraction (indirect measure

of extracellular sodium concentration) were correlated with T2 lesion volume and with clinical disability as measured by the Expanded Disability Status Scale (EDSS). Our results suggest that intracellular sodium volume fraction reduction reflects cellular loss while intracellular sodium concentration increase reflects neuroaxonal metabolic dysfunction. Although the initial research plan included the analysis of people with progressive MS, the occurrence of technical problems with the MR scanner has prevented their enrollment and the evaluation of differences in brain sodium concentration across MS clinical types. As a consequence of this technical issue, my fellowship has been redirected to a second project, focused on the analysis of the functional correlates of cognitive impairment in people with progressive MS.

CONCLUSIONS

Brain sodium quantification is a promising tool to identify cellular degeneration and clarify the mechanisms responsible for brain atrophy. The application of our technique might lead to a better understanding of the sodium channel blockers mechanism of action and offers the possibility to monitor, *in vivo*, the cellular effect of potential neuroprotective drugs.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Petracca M, Saiote C, Bender H, Arias F, Farrell C, Magioncalda P, Martino M, Miller A, Northoff G, Lublin F, Inglese M. Cognitive impairment in PP-MS: A role for functional connectivity and neuronal variability changes of resting-state activity? 141st annual meeting of the American Neurological Association-ANA 2016, Baltimore, MD, USA, October 16-18 2016

Petracca M, Vancea RO, Fleysler L, Jonkman LE, Oesingmann N, Inglese M. Brain intra- and extracellular sodium concentration in multiple sclerosis: a 7 T MRI study. *Brain*. 2016 Mar;139(Pt 3):795-806

Petracca M, Cordano C, Cellerino M, Button J, Krieger S, Vancea R, Ghassemi R, Farrell C, Miller A, Calabresi PA, Lublin F, Inglese M. Retinal degeneration in primary-progressive multiple sclerosis: A role for cortical lesions? *Mult Scler*. 2016 Mar 18. pii: 1352458516637679

Carotenuto A, Iodice R, Petracca M, Inglese M, Cerillo I, Cocozza S, Saiote C, Brunetti A, Tedeschi E, Manganeli F, Orefice G. Upper motor neuron evaluation in multiple sclerosis patients treated with Sativex®. *Acta Neurol Scand*. 2016 Aug 8. doi: 10.1111/ane.12660

Ruggieri S, Petracca M, Miller A, Krieger S, Ghassemi R, Bencosme Y, Riley C, Howard J, Lublin F, Inglese M. Association of Deep Gray Matter Damage With Cortical and Spinal Cord Degeneration in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2015 Dec 1;72(12):1466-74

Petracca M, Fleysler L, Oesingmann N, Inglese M. Sodium MRI of multiple sclerosis. *NMR Biomed*. 2015 Apr 6

Inglese M, Petracca M. Therapeutic strategies in multiple sclerosis: a focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia. *Schizophr Res*. 2015 Jan;161(1):94-101

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 80.000 €

Research Fellowship funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 80,000

Marcello Pinti

Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

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

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

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

Giuseppe Matarese, Università degli Studi di Napoli 'Federico II', Napoli

Paolo Pinton, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara

Respirazione e glicolisi nei linfociti di pazienti con diverse forme di sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

La sclerosi multipla (SM) è una malattia mediata dal sistema immunitario e i linfociti T autoreattivi sono cruciali per la sua patogenesi. Durante una risposta immunitaria, le cellule T si attivano, proliferano e acquisiscono funzioni effettrici, processi che richiedono energia, strettamente associati a cambiamenti nell'assunzione di nutrienti e nel metabolismo cellulare. Mentre le cellule T Naïve (T_N) si basano sulla fosforilazione ossidativa e sull'ossidazione degli acidi grassi, le cellule T attivate aumentano la glicolisi aerobia, la quale distingue le cellule effettrici T helper (Th) 1, Th2 e Th17 dalle cellule T regolatorie, che usano l'ossidazione degli acidi grassi. Eliminato l'antigene, la maggior parte delle cellule effettrici muore, ma persiste un piccolo gruppo di cellule di memoria, che riprogrammano le vie metaboliche per sostenere il proprio sviluppo, longevità e capacità di rispondere rapidamente a un successivo incontro con l'antigene, usando soprattutto l'ossidazione degli acidi grassi per supportare la fosforilazione ossidativa.

Alla base di molte risposte immunitarie aberranti vi è un inappropriato rimodellamento metabolico e le cellule T di modelli autoimmuni hanno un profilo metabolico alterato rispetto ai linfociti sani. Si può ipotizzare che le cellule T di persone con SM abbiano una capacità diversa di attivare vie che portano al passaggio dalla fosforilazione ossidativa alla gli-

colisi, che questa diversa capacità abbia un impatto sul differenziamento in cellule di memoria o effettrici e che esistano differenze metaboliche nel decorso recidivante o progressivo della SM. Pochi studi hanno analizzato i profili metabolici e la funzionalità mitocondriale delle cellule T in persone con SM e le cellule T CD8+ e le forme progressive non sono mai state studiate. Perciò, per la prima volta abbiamo indagato le caratteristiche fenotipiche, funzionali e metaboliche dei linfociti T CD4+ e CD8+ di persone con diverse forme di SM, analizzando i parametri metabolici nei diversi sottotipi cellulari.

RISULTATI

Sono state arruolate 36 persone con SM progressiva senza attività di malattia e non trattati di cui 23 con forma secondariamente progressiva (SP) e 13 primariamente progressiva (PP), e 11 controlli. I pazienti con SMPP avevano una percentuale minore di cellule T CD8+, ma capaci di produrre più interferone- γ e Interleuchina (IL)-17 rispetto ai controlli, oltre a livelli più bassi di cellule T_N CD8+ e livelli più alti di cellule T CD8+ terminalmente differenziate rispetto ai pazienti con SMSP e ai controlli.

Una spiegazione di questo fenotipo più pro-infiammatorio, differenziato e probabilmente senescente nelle persone con SMPP potrebbe essere dovuto ad una diversa capacità delle cellule T di riprogrammare il loro metabolismo in presenza dello stesso

stimolo. Infatti, i pazienti con SMPP avevano una diversa modulazione delle molecole che regolano il cambiamento metabolico, una sovraregolazione del trasportatore 1 del glucosio nelle cellule T CD4+ e più cellule T CD4+ e CD8+ di memoria effettrici con la proteina ribosomiale S6 fosforilata, un marcatore di attivazione della proteina *mammalian target of rapamycin* (mTOR), suggerendo una propensione delle cellule T a sottoregolare la respirazione e adottare un metabolismo glicolitico. In accordo, i mitocondri delle persone con SMPP avevano una massa inferiore e una tendenza più marcata a ridurre il potenziale di membrana mitocondriale, indicando una minore attività rispetto agli altri gruppi. Non sono state trovate differenze nella produzione di O_2^- , secondo messaggero necessario per la sintesi di IL-2 e la proliferazione delle cellule T, confermando l'ipotesi che le differenze nel fenotipo delle cellule T di pazienti con SMPP sono dovute interamente a differenze nelle vie metaboliche. Inoltre, la respirazione (sia basale che massima) è risultata maggiore nelle persone con SMPP, ma la quantità o la composizio-

ne relativa dei complessi della fosforilazione ossidativa potrebbero essere diverse nei linfociti di pazienti SMPP e SMSP o controlli. Sono in corso studi per confrontare questi risultati con persone con SM recidivante-remittente.

CONCLUSIONI

I nostri dati evidenziano una disregolazione del metabolismo delle cellule T nelle persone con SMPP, più inclini ad attivare la glicolisi e a sotto-regolare la respirazione, favorendo così un passaggio più rapido a cellule effettrici e mediando una progressione di malattia più veloce. Le vie metaboliche possono essere manipolate per il trattamento delle malattie umane e si possono direzionare il differenziamento e la funzione delle cellule T verso fenotipi non patogenici nell'ambito dell'autoimmunità. Quindi, una prospettiva promettente di questi risultati è la possibilità di manipolare il metabolismo delle cellule T per il trattamento della SMPP, aprendo la strada a nuovi possibili bersagli e strategie terapeutiche, come gli inibitori di mTOR.

Respiration and glycolysis in lymphocytes from patients with different forms of multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disease, and autoreactive T lymphocytes mounting aberrant responses against central nervous system autoantigens are critical for its pathogenesis. During the course of an immune response, T cells become activated, rapidly and extensively proliferate, and acquire effector functions, all energetically demanding processes, tightly coupled with marked changes in nutrient uptake and cellular metabolism. Indeed, whereas quiescent naïve T (T_N) cells primarily rely on mitochondrial (mt) oxidative phosphorylation (OXPHOS) and fatty acid β -oxidation (FAO), activated T cells enhance cytosolic aerobic glycolysis, which discriminate polarized CD4+ T helper (Th) 1, Th2 and Th17 effector T cells from regulatory T cells, that depend on FAO. Following antigen clearance, most effector T cells die, but a small pool of long-lived memory T cells persists, which in turn reprogram their metabolic pathways to support their development, longevity and rapid recall ability, pri-

marily engaging FAO to fuel OXPHOS. Inappropriate metabolic remodeling underlies many aberrant immune responses, and T cells from autoimmune models exhibit an altered metabolic profile compared with healthy lymphocytes. It could be hypothesized that T cells from MS patients display different capability to activate pathways that lead to the switch from OXPHOS to aerobic glycolysis, that this different capability impact on the differentiation into memory *versus* effector cells, and that potential metabolic differences exist related to relapsing or progressive MS course. However, only very few studies have analyzed metabolic profiles and mt functionality of T cells in MS patients, and neither CD8+ T cells nor progressive forms have been previously investigated. Accordingly, we performed for the first time a comprehensive characterization of phenotypic, functional and metabolic features of CD4+ and CD8+ T lymphocytes from patients with different forms of MS, analyzing metabolic parameters in different CD4+ and CD8+ T cell subsets.

RESULTS

Thirty-six not active, untreated progressive MS patients – 23 with secondary progressive (SP) form and 13 with primary progressive (PP) form – and 11 healthy controls (CTR) were enrolled in this study. Concerning the phenotypic and functional features of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, PP patients displayed a decreased percentage of CD8+ T cells, but able to produce more interferon- and interleukin (IL)-17 compared to CTR, along with lower levels of CD8+ T_N cells and higher levels of terminally differentiated CD8+ effector memory T cells re-expressing CD45RA in comparison to SP patients and CTR. A possible explanation of this shift toward a more pro-inflammatory, differentiated, and likely senescent phenotype in PP patients could be a different capability of T cells to reprogram their metabolism in the presence of the same stimulus. Indeed, from a metabolic point of view, PP patients were characterized by a different modulation of the molecules regulating metabolic switch and reprogramming, an upregulation of glucose transporter 1 in CD4+ T cells, and increased CD4+ and CD8+ effector memory T cells with phosphorylated ribosomal protein S6, a marker of mammalian target of rapamycin (mTOR) activation, collectively suggesting a higher proneness of T cells to downregulate respiration and move toward a glycolytic metabolism. In agreement, mitochondria of PP patients had lower mass, and a more marked tendency to reduce mt membrane potential, indicating that they are less active

than those from the other groups. No differences were found in the production of mt O₂⁻, a second messenger needed for IL-2 synthesis and T cell proliferation, corroborating the hypothesis that the differences we observed in T cell phenotype of PP patients rely entirely on differences in fueling distinct metabolic pathways. Furthermore, respiration appeared higher in PP patients, both in the case of basal and maximal respiration rate, but the amount or the relative composition of OXPHOS complexes in mitochondria could be different in lymphocytes from PP patients and SP patients or CTR. Studies are ongoing to compare these findings also to MS patients with relapsing-remitting form.

CONCLUSIONS

Overall, our data suggest a clear dysregulation of T cell metabolism in PP patients, who appear more prone to activate glycolysis and downregulate mt respiration, so favoring a more rapid shift toward effector cells, and mediating a faster disease progression. Metabolic pathways might be manipulated for the treatment of human diseases, and metabolism may be targeted to direct T cell differentiation and function toward non-pathogenic phenotypes in settings of autoimmunity. Hence, an appealing long-term consequence of these findings is the possibility of manipulating T cell metabolism for PPMS treatment, paving the way for new possible therapeutic targets and strategies, such as mTOR inhibitors.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

De Biasi S, Bianchini E, Nasi M, Gibellini L, Pecorini S, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A, Pinti M. T cells from patients with progressive forms of multiple sclerosis display high level of activation and altered mitochondrial functionality. XXV AINI Congress (Associazione Italiana Neuroimmunologia), Lecce, 11-14 Maggio 2016

De Biasi S, Bianchini E, Nasi M, Pecorini S, Gibellini L, Simone AM, Ferraro D, Sola P, Cossarizza A, Pinti M. Respiration and glycolysis in lymphocytes from patients with different forms of multiple sclerosis. Italian Multiple Sclerosis Conference (AISM-FISM), Rome, 25-27/05/2016

De Biasi S, Bianchini E, Nasi M, Gibellini L, Pecorini S, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A, Pinti M. High level of activation and altered mitochondrial functionality in T cells from patients with progressive forms of multiple sclerosis. XXXI Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (CYTO), Seattle, 11-15 Giugno 2016

De Biasi S, Bianchini E, Nasi M, Gibellini L, Pecorini S, Simone AM, Ferraro D, Vitetta F, Sola P, Cossarizza A, Pinti M. High level of activation and altered mitochondrial functionality in T cells from patients with progressive forms of multiple sclerosis. XIX European Bioenergetics Conference (EBEC 2016), Riva del Garda (Trento), 02-07 Luglio 2016

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 1 year and the amount of € 30,000

Dario Seppi

Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Padova, Padova

MENTORE / MENTOR: **Francesca Aloisi**

Tecniche avanzate di analisi molecolare volte all'identificazione di biomarker predittori di progressione di malattia nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Negli ultimi 15 anni è diventato sempre più evidente che i danni a carico della sostanza grigia cerebrale nella sclerosi multipla (SM) sono evidenti fin dalle prime fasi di malattia e ben correlano col tasso di progressione clinica.

La mancanza di sostanziali infiltrati infiammatori, di fattori del complemento e di danni a carico della barriera ematoencefalica nelle lesioni corticali nella SM hanno portato a pensare che i meccanismi patogenetici nella sostanza grigia differiscano in modo sostanziale da quelli nella sostanza bianca e che la microglia attivata costituisca la popolazione di cellule effettrici dominante responsabile dei danni a carico della sostanza grigia. Solo negli ultimi dieci anni, studi post-mortem hanno descritto una associazione tra l'entità dell'infiammazione meningeale e la demielinizzazione corticale e la progressione della malattia, suggerendo che l'attività infiammatoria cronica nello spazio subaracnoideo svolga un ruolo chiave nella mediazione dei danni nell'adiacente corteccia cerebrale di persone con SM secondariamente progressiva (SMSP) e primariamente progressiva (SMPP).

Fattori rilasciati dalle cellule immunitarie circolanti nel liquor e/o colonizzanti lo spazio subaracnoideo potrebbero infatti diffondere attraverso la membrana piaie, inducendo un gradiente di alterazioni patologiche gliali e neuronali, direttamente e/o indirettamente tramite la microglia attivata. Questa ipotesi è sostenuta dall'osservazione che alti livelli di infiltrati infiammatori meningei ed un elevato carico lesionale corticale siano associati ad un aumento dell'espressione genica di molecole infiammatorie (citochine come TNF e IFN gamma), nelle meningi di tessuti post-mortem di pazienti SMSP, e a livelli elevati delle stesse proteine nel corrispondente liquor, rispetto ai controlli sani.

È quindi possibile che l'analisi molecolare del liquor combinata con lo studio mediante tecniche avan-

zate di risonanza magnetica (RM) in grado di rivelare meglio la demielinizzazione corticale della sostanza grigia sin dalle prime fasi di SM, potrebbe rappresentare il miglior approccio al fine di identificare potenziali biomarcatori della patologia della sostanza grigia e di progressione della malattia. Questo approccio combinato potrebbe identificare meglio i pazienti con una prognosi più grave che potrebbero trarre beneficio da una strategia terapeutica tempestiva, e più efficace a lungo termine, volta a migliorare la loro qualità della vita e ridurre i costi indiretti legati alla malattia.

L'obiettivo principale di questa Borsa di addestramento è stato quello di consentire al candidato di raggiungere la piena autonomia nell'uso delle tecniche di laboratorio e di migliorare la sua comprensione delle alterazioni patologiche nel sistema nervoso di persone affette da SM al fine di essere in grado di elaborare queste informazioni insieme ai dati ottenuti da studi di risonanza magnetica (RM). L'obiettivo principale dello studio è stato quello di effettuare una analisi delle proteine e un'analisi di espressione genica dei campioni di liquor di pazienti SM e controlli che sono stati sottoposti, nel Centro SM di Padova, ad un controllo diagnostico completo, comprensivo di analisi di RM non convenzionale, al fine di individuare possibili biomarcatori di malattia con valore prognostico e predittivo.

RISULTATI

Il ricercatore, attraverso il programma della Borsa di studio, ha acquisito esperienza in tecniche di biologia molecolare per l'identificazione di biomarcatori della patologia della sostanza grigia, raggiungendo i principali obiettivi programmati. In particolare, questo studio ha confermato la presenza di livelli più elevati di CXCL13 (sia proteina che RNA) nel liquor di pazienti con SM rispetto ai soggetti di controllo. CXCL13 è un fattore chemiotattico delle cellule B ed è stato identificato come un biomarca-

tore promettente di infiammazione intratecale. Ulteriori dati ottenuti in questo studio confermano il coinvolgimento dell'immunità di tipo 1 e delle cellule T regolatorie nella patologia della SM.

Dopo la stratificazione dei pazienti con SM in base al volume delle lesioni della sostanza grigia (valutazione con RM), sono stati trovati livelli più elevati della proteina CXCL13, non associati ad un aumento dell'espressione genica a livello delle cellule liquorali, suggerendo che la fonte principale di questa chemochina debba essere ricercata negli infiltrati infiammatori meningei e/o nel tessuto cerebrale. Inoltre, un danno maggiore della sostanza grigia è associato a livelli più alti di molecole infiammatorie liquorali indicative del reclutamento/differenziazione di cellule B e della stimolazione della maturazione delle cellule mieloidi.

CONCLUSIONI

In conclusione, lo studio combinato del liquor e di RM

suggerisce che la risposta immunitaria mediata dai linfociti B può giocare un ruolo importante nella SM fin dall'esordio della malattia e correla con il livello di infiammazione intratecale e la patologia corticale.

L'analisi dettagliata dei biomarcatori liquorali suggerita in questo studio potrebbe portare, oltre che ad un'ottimizzazione di alcune tecniche non convenzionali di RM, ad una maggiore conoscenza del processo che determina il livello di gravità di malattia e che caratterizza la patologia a livello della sostanza grigia; inoltre, potrebbe fornire strumenti importanti per predire e monitorare la progressione di disabilità. Per tale motivo i biomarcatori associati alla patologia della sostanza grigia individuati in questo studio potrebbero essere utilizzati per identificare sottogruppi di persone con sclerosi multipla caratterizzati da una grave compromissione della sostanza grigia. Queste persone potrebbero beneficiare di un trattamento precoce con farmaci più aggressivi di seconda linea, come gli anticorpi monoclonali.

Advanced molecular analyses for the identification of biomarkers of disease progression in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

In the last 15 years, it has become increasingly accepted that cerebral grey matter (GM) damage in multiple sclerosis (MS) is evident since early MS stages and provides the best correlate of the rate of clinical progression. The lack of substantial inflammatory infiltrates, complement deposition and blood brain barrier damage in MS cortical lesions led to the initial suggestion that the mechanisms underlying GM and WM pathology differ substantially and that activated microglia are the dominant effector cell population causing GM damage. Only in the last decade, post-mortem studies have revealed that the extent of meningeal inflammation associates positively with cortical demyelination and disease progression, suggesting that chronic immune activity in the subarachnoid compartment plays a key role in mediating damage in the adjacent cerebral cortex of secondary progressive MS (SPMS) and primary progressive MS (PPMS) patients.

Factors released by immune cells circulating in the cerebrospinal fluid (CSF) and/or colonizing the sub-

arachnoid space may diffuse across the pial membrane, inducing a gradient of glia and neuronal pathological alterations, directly and/or indirectly through activated microglia.

This is supported by the observation that high level of meningeal inflammation and cortical pathology is accompanied by increased gene expression of inflammatory molecules (cytokines such as TNF and IFN γ), in the meninges of post-mortem SPMS cases and elevated levels of the same proteins in the corresponding CSF, compared to healthy controls. It is therefore possible that combining CSF molecular analyses with advanced MRI imaging techniques, able to better identify from the early stages cortical grey matter demyelination, could represent an appropriate approach in order to identify potential biomarkers of GM pathology and disease progression. This combined approach may better identify patients with a more severe prognosis who could benefit from an earlier and more effective long-term therapeutic strategy aimed at improving their quality of life and reducing the disease-related indirect costs.

The primary aim of the training program was to enable the candidate to achieve full autonomy in the use of laboratory techniques and to improve his understanding of pathological changes in the MS brain in order to be able to match this information with the data from MRI studies.

The principal aim of the study was to perform a protein analysis and a gene expression analysis of CSF samples from MS patients and controls who underwent, in the MS Center in Padova, a complete diagnostic work up comprehensive of non-conventional Magnetic Resonance Imaging (MRI) sequences in order to identify possible disease biomarkers with prognostic and predictive value.

RESULTS

The applicant, through the fellowship program, has acquired expertise in molecular biology techniques for the identification of biomarkers of early grey matter pathology. On this basis, the main principal objectives were achieved.

In particular this study confirms presence of higher CSF levels of the chemokine CXCL13, a B-cell chemoattractant and promising biomarker of intrathecal inflammation, in MS patients than in control subjects. It also confirms the involvement of type-1 immunity, and regulatory T-cells in MS pathology. After stratification of MS patients ac-

ording to GM damage (MRI evaluation), higher levels of CXCL13 protein, but not RNA from CSF-cells, were found in patients with higher GM involvement, suggesting that the main source of this chemokine should be sought in the meningeal inflammatory infiltrates and/or cerebral tissue. Moreover higher GM damage is associated with higher levels of CSF inflammatory molecules suggestive of B-cell recruitment /differentiation and stimulation of myeloid cell maturation.

CONCLUSIONS

In conclusion combined CSF analysis and MRI analysis suggests that B cell immune response may play an important role in MS since the disease onset and correlates with the level of intrathecal inflammation and cortical pathology. A more detailed analysis of the CSF biomarkers suggested in the current study might provide, in addition to MRI optimization, a better indication of severity of disease process that characterized GM pathology as well as important tools for predicting/monitoring disability progression.

Biomarkers of early GM pathology could be used to identify subgroups of MS patients with more severe grey matter degeneration. These patients could benefit from early treatment with second line, more aggressive drugs, like monoclonal antibodies.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Seppi D, Favaretto A, Pravato S, Poggiali D, Rossi S, Facchiano F, Veroni C, Rinaldi F, Perini P, Ruggero S, Toffanin E, Gallo P1, Aloisi F, Magliozzi R. Gene expression and cytokine protein analysis of the cerebrospinal fluid in early multiple sclerosis: association with grey matter damage assessed by MR imaging. 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS)

Seppi D, Favaretto A, Pravato S, Poggiali D., Rossi S, Facchiano F, Veroni C, Rinaldi F, Perini P, Ruggero S, Toffanin E, Gallo P1, Aloisi F, Magliozzi R. Integration of advanced molecular analyses for the identification of biomarkers of disease progression in multiple sclerosis. XXV AINI Congress, Lecce, may 11-14, 2016

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2013 per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 41.000 €

Research Fellowship funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 41,000

La ricerca

sulla

**sclerosi
multipla**

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO

PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

Barbara Serafini

Dipartimento di Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Caterina Veroni, Barbara Rosicarelli, Corrado Fagnani, Francesca Aloisi

Studio dell'espressione genica degli infiltrati immunitari isolati mediante microdissezione laser da tessuto cerebrale di persone con sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Il reclutamento e l'attivazione delle cellule del sistema immunitario nel sistema nervoso centrale (SNC) sono i processi patologici che determinano la formazione delle lesioni infiammatorie multiple e le alterazioni cellulari diffuse nel cervello e nel midollo spinale dei pazienti con sclerosi multipla (SM). La nostra ipotesi di lavoro è che la perdita di mielina e il danno cellulare nella SM possano essere causati dalla risposta del sistema immunitario volta a eliminare una infezione attiva da parte del virus di Epstein-Barr (EBV) a livello del SNC. Sebbene sia oggi largamente accettato che questo herpesvirus molto comune rappresenti uno dei maggiori fattori di rischio per la SM, i meccanismi patogenetici che legano l'infezione da EBV alla patologia cerebrale della SM sono ancora dibattuti e oggetto di ricerche sempre più approfondite. Il nostro modello propone che il virus sia trasportato nel SNC dai linfociti B, il serbatoio principale di infezione nell'organismo, e attivi una risposta immunitaria persistente e dannosa, altrimenti detta 'immunopatologica'. L'obiettivo principale di questo progetto è stato esplorare ulteriormente l'ipotesi di una associazione tra infezione attiva da EBV e attivazione immunitaria persistente nel SNC nella SM, studiando il profilo trascrizionale di cellule immunitarie infiltranti il tessuto cerebrale. Abbiamo quindi isolato infiltrati immunitari, composti principalmente da linfociti T e B, da tessuto cerebrale post-mortem donato da pazienti con SM secondariamente progressiva (tutti i campioni di tessuto sono stati ottenuti dalla Banca Inglese di Tessuti SM) e abbiamo analizzato l'espressione di 75 geni cellulari coinvolti nella funzione del sistema immunitario e di 6 geni virali associati con differenti fasi dell'infezione con EBV.

RISULTATI

Abbiamo unito le competenze in ambito neuropatologico e molecolare sviluppate negli anni nel nostro

laboratorio per mettere a punto una procedura sperimentale avanzata che ha permesso di 'catturare' le cellule immunitarie infiltranti il SNC da sezioni cerebrali mediante la tecnica della microdissezione laser e di studiare l'espressione genica degli infiltrati utilizzando una versione potenziata del metodo di *real time reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Abbiamo analizzato separatamente gli infiltrati immunitari isolati dalle meningi (compresi gli aggregati arricchiti in linfociti B con caratteristiche simili ai follicoli B degli organi linfatici) e dalla sostanza bianca di 11 pazienti con SM secondariamente progressiva. Sono stati applicati metodi di analisi statistica univariata e multivariata per confrontare i dati ottenuti dai campioni prelevati da differenti pazienti, compartimenti cerebrali e aree lesionali, e per rilevare possibili associazioni con profili genici immunitari e/o virali. I risultati ottenuti possono essere così riassunti: I) geni implicati nelle risposte immunitarie citotossiche mediate da linfociti T CD8+ e da cellule natural killer, e nelle vie di segnalazione dell'interferone (IFN) di tipo I, ovvero nell'immunità antivirale, erano predominanti negli infiltrati immunitari cerebrali ed espressi in modo coordinato; II) geni espressi da EBV sono stati rilevati nel 56% e nel 28% degli infiltrati immunitari isolati, rispettivamente, dalle meningi e dalla sostanza bianca; III) i profili di espressione genica virale erano compatibili con l'attivazione dell'infezione latente, implicata nella promozione della proliferazione dei linfociti B, e, meno frequentemente, con l'entrata nel ciclo litico, che può portare alla formazione di nuove particelle virali e a nuovi eventi infettivi *in loco*; IV) geni coinvolti nel riconoscimento di acidi nucleici virali e nell'immunità antivirale erano espressi a differenti livelli negli infiltrati immunitari provenienti da pazienti diversi, in relazione alla presenza o assenza di trascritti virali, allo stato dell'infezione (latente o litica) e al compartimento cerebrale

analizzato (meningi o sostanza bianca); V) differenze nell'espressione genica tra cellule immunitarie infiltranti le meningi e le lesioni della sostanza bianca erano compatibili con la formazione di follicoli B, una maggiore attivazione di linfociti T citotossici, in particolare la produzione di IFN- γ , e maggiore diffusione dell'infezione da EBV nelle meningi. Questi tre aspetti potrebbero essere interconnessi dal momento che EBV infetta preferenzialmente i linfociti B, i follicoli B meningei sono arricchiti in linfociti B, e l'immunità citotossica svolge un ruolo centrale nell'eliminazione delle cellule infettate da virus.

CONCLUSIONI

I risultati dell'analisi dell'espressione genica delle cellule immunitarie che invadono il SNC nella SM confermano la profonda deregolazione dell'infezione

da EBV *in situ* ed evidenziano l'orchestrazione della funzione antivirale locale. Questi risultati sostengono un modello di patogenesi della SM che identifica in EBV il principale stimolo antigenico dell'attivazione immunitaria cronica nel SNC. Questi risultati potrebbero contribuire a promuovere la ricerca sull'immunità EBV-specifica nella SM quale possibile utile predittore dell'evoluzione della malattia e della risposta alle terapie, e fornisce un razionale per l'impiego di farmaci che, agendo direttamente sul virus o sul serbatoio cellulare del virus, potrebbero mostrarsi più efficaci nel normalizzare l'interazione tra virus e risposta immunitaria. Per esempio, la terapia con anticorpi monoclonali depletanti i linfociti B potrebbe ridurre il carico virale e quindi i processi immunopatologici stimolati da EBV in maniera più efficace di altri tipi di trattamenti.

Gene expression analysis of laser microdissected immune infiltrates in the multiple sclerosis brain

INTRODUCTION AND AIMS

Immune cell recruitment and activation in the central nervous system (CNS) are the key pathogenic processes leading to development of multiple inflammatory lesions and diffuse abnormalities in the brain and spinal cord of patients with multiple sclerosis (MS). Our working hypothesis is that neural cell damage in MS might be caused by the host's immune system attempt to eradicate a deregulated infection with Epstein-Barr virus (EBV) in the CNS. Although it is now widely accepted that this ubiquitous herpesvirus is strongly associated with MS, the mechanisms linking EBV infection to MS pathology are debated and under increasing scrutiny. Our model proposes that EBV can gain access to the CNS through B cells, the preferred viral reservoir, and promote a detrimental immunopathological response. This project aimed to explore further the hypothesized association between an abnormal EBV infection and persistent immune activation within the CNS in MS by investigating the transcriptional profile of immune cells infiltrating the MS brain. For this purpose, we isolated immune cell infiltrates, mainly composed of T cells and B cells, from post-mortem brain tissue donated by patients with secondary progressive MS (all brain specimens

were provided by the UK MS Tissue Bank in London) and analyzed expression of 75 cellular genes involved in immune system function and 6 viral genes associated with different phases of the EBV life cycle.

RESULTS

We combined the neuropathological and molecular biology expertise developed in our laboratory to set up an advanced procedure that allows to 'capture' CNS-infiltrating immune cells from brain sections using a laser beam (laser capture microdissection) and to investigate their gene expression profile using an enhanced real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. We analyzed separately immune infiltrates isolated from the meninges (including B-cell enriched aggregates showing similarities with B-cell follicles of lymphoid organs) and the lesioned white matter of 11 patients with secondary progressive MS. Univariate and multivariate statistical methods were used to compare data obtained in samples from different MS patients, brain compartments and lesional areas, and to search for possible associations with immune and/or viral signatures. The results obtained can be summarized as follows: 1) genes related to

cytotoxic immune responses mediated by CD8+ T cells and NK cells and to the type-1 interferon (IFN) pathway, namely to immunity involved in anti-viral defense, predominated in brain immune infiltrates and displayed a coordinated pattern of expression; II) EBV genes were detected in 56% and 28% of immune infiltrates isolated from the meninges and white matter, respectively; III) EBV gene expression patterns were characteristic of activation of latent infection, which can promote B-cell growth, and, less frequently, of entry into the lytic cycle, which can lead to production of new viral particles and new local infection events; IV) genes involved in viral nucleic acid recognition and antiviral immunity were differentially expressed in immune infiltrates depending on MS brain sample, EBV detectability, status of EBV infection (latent versus lytic infection) and brain compartment analyzed; V) gene expression differences between immune cells infiltrating the meninges and white matter lesions are consistent with formation of B-cell follicles, stronger activation of cytotoxic T cells, in particular IFN- γ production, and wider spread of EBV infection in the

meninges. These three aspects could be interconnected, since EBV infects preferentially B cells, meningeal B-cell follicles are enriched in EBV infected cells, and cytotoxic immunity is essential for the elimination of virus-infected cells.

CONCLUSIONS

Gene expression analysis of immune cells invading the MS brain confirms profound *in situ* EBV deregulation and highlights orchestration of local antiviral function. These results support a model of MS pathogenesis involving EBV as main antigenic stimulus of chronic immune activation in the CNS. These findings will foster research on EBV-specific immunity as a potentially useful predictor of disease evolution and response to therapy and provide a rationale for the use of drugs that, by directly targeting the virus and its cellular reservoir, could be more effective in normalizing an altered EBV-host interaction. For example, B-cell depleting therapies could lower EBV load and hence EBV-induced immunopathology in MS more efficiently than other drugs.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Serafini B, Rosicarelli B, Veroni C, Zhou L, Reali C, Aloisi F. ROR t expression and lymphoid neogenesis in the brain of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016;75(9):877-888. doi: 10.1093/jnen/nlw063

Veroni C*, Serafini B*, Rosicarelli B, Fagnani C, Aloisi F. Transcriptional profile and Epstein-Barr infection status of immune cells infiltrating the multiple sclerosis brain. *Manoscritto in preparazione.* * Equal contribution

Veroni C, Rosicarelli B, Serafini B, Aloisi F. Gene expression analysis of immune infiltrates isolated by laser microdissection from the multiple sclerosis brain. 31st Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Barcellona, Spagna, 7-10 Ottobre 2015

Veroni C, Serafini B, Rosicarelli B, Fagnani C, Aloisi F. Epstein-Barr virus and immune gene expression analysis of laser microdissected immune infiltrates from the multiple sclerosis brain. 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Londra, Gran Bretagna, 14-17 settembre 2016

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 115.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 115,000

Silvia Romano

Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso (NESMOS), Sapienza Università di Roma, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Rosella Mechelli, Giovanni Ristori, Marco Salvetti

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Chris Holmes, Department of Statistics, University of Oxford, Oxford, UK

Quin Wills, Department of Statistics and Wellcome Trust Centre for Human Genetics (WTCHG), University of Oxford, Oxford, UK; Weatherall Institute of Molecular Medicine (WIMM), University of Oxford, Oxford, UK

Studio della *noise* di espressione genica di singola cellula in linee cellulari linfoblastoidi (LCLs) di gemelli monozigoti discordanti per sclerosi multipla, pazienti sporadici e controlli

PREMESSE E OBIETTIVI

L'espressione delle informazioni contenute nel materiale genetico non è un fenomeno statico, ma cambia nel tempo a seconda di processi intrinseci alla cellula e di stimoli ambientali. Accade, così, che anche cellule di una stessa popolazione mostrino una grande eterogeneità di espressione dei vari geni se studiate singolarmente. Cruciale in questo è il ruolo della *noise* di espressione genica, connessa alla stocastica attivazione, in momenti diversi ed in cellule diverse di una popolazione apparentemente omogenea, dell'informazione contenuta nei geni. Nei disordini complessi come la sclerosi multipla (SM), questa *noise* potrebbe amplificare l'effetto di fattori di rischio genetici ed ambientali deboli. Scopo del progetto presentato era di valutare il possibile coinvolgimento della *noise* nell'eziologia della sclerosi multipla (SM). Dal momento che gli studi *single-cell* sono il modo migliore per misurare l'eterogeneità di espressione genica in linee cellulari in apparenza omogenee, al fine di fornire una prova sperimentale della nostra ipotesi abbiamo indagato le fluttuazioni di singola cellula mediante l'analisi dei profili di espressione in cellule linfoblastoidi (LCLs, portatrici del virus di Epstein-Barr, EBV) derivanti da 3 coppie di gemelli monozigoti discordanti per SM, un paziente sporadico e un controllo. Abbiamo misurato geni umani e virali mediante il metodo *single-cell RNA sequencing* seguito da validazione con *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR).

RISULTATI

I profili di espressione *single-cell* ci hanno permesso di definire multiple fonti di eterogeneità cellula-cellula. Innanzitutto, abbiamo identificato i geni più *noisy* (cioè con espressione intercellulare più variabile) tra diverse cellule della stessa linea, indipendentemente dallo stato SM/benessere. Questi geni intrinsecamente rumorosi sono stati definiti '*universally noisy*', e tra di essi ci sono alcuni prodotti di EBV (come *LMP1* e *LMP2*).

Abbiamo, inoltre, misurato i cambiamenti nell'espressione media dei trascritti tra gemelli affetti e non affetti, così da identificare *pathways*/gruppi di geni con diversa espressione nella SM rispetto ai controlli: ad esempio, i *pathways* di *CD40* e *LMP1* hanno mostrato una ridotta espressione nei gemelli con SM.

Ci siamo poi domandati quali geni fossero inaspettatamente *noisy* tra i gemelli con e quelli senza SM (geni con una espressione cellula-cellula più eterogenea nello stato di malattia rispetto a quello di benessere o viceversa) e li abbiamo denominati '*differentially noisy*'. Siamo così riusciti a identificare gruppi di geni più *noisy* nei pazienti con SM o nei controlli. *CCL22*, ad esempio, è apparso essere molto più *noisy* nei non affetti.

Infine, ci siamo concentrati sui geni con espressione correlata (o con modifiche della correlazione) rispetto ad un dato gene di interesse, per creare mappe di co-regolazione genica nella SM e nei controlli. In tal modo abbiamo identificato i geni che cambiano la loro correlazione sulla base dello stato SM/benessere.

CONCLUSIONI

Per lungo tempo l'eterogeneità cellula-cellula è rimasta inesplorata negli esperimenti condotti su tessuto o su linee cellulari, dato che i profili di espressione genica venivano misurati come valor medio su tutte le cellule componenti il dato tessuto/linea; questo potrebbe aver mascherato il contributo patogenetico della variabilità intercellulare in popolazioni solo in apparenza omogenee. Nel nostro studio, abbiamo identificato quali geni umani o virali sono più *noisy* (cioè con più alte fluttuazioni intercellulari) nelle persone con SM o nei controlli, a quali *pathways* essi appartengono e qual è la loro regolazione. Abbiamo inoltre ottenuto informazioni sul grado di *noise* di geni notoriamente SM-associati e di prodotti di EBV, come *LMP1/2*.

Il contributo delle indagini *single cell* per la comprensione più precisa dell'eziologia della SM risulta evidente. L'effetto amplificatore dei circuiti/*pathways* più *noisy* può aiutare a spiegare come mai

alcune persone, benché portatrici di deboli fattori predisponenti genetici, sviluppino la SM. Sia la vitamina D che EBV potrebbero svolgere un ruolo principe in tal senso: la prima mediante il legame del suo recettore ad elementi regolatori, *promoters* o *enhancers*; il secondo per mezzo di perturbazioni virali sui circuiti *noisy* della cellula.

Nel lungo termine, l'identificazione delle alterazioni indotte dalla *noise* come amplificatore di fattori di rischio deboli potrebbe aprire la strada ad approcci volti ad influenzare tale processo. Interventi minimi come l'aumento dei livelli di vitamina D o altre vitamine liposolubili, la vaccinazione col Bacille Calmette-Guerin (BCG), e la modulazione del sistema endocannabinoide potrebbero agire stabilizzando la *noise*. In merito alle interazioni virus-ospite, i nostri risultati hanno mostrato il carattere *noisy* di alcuni geni di EBV, pertanto i prodotti virali potrebbero fungere da bersaglio per strategie antivirali future.

Analysis of gene expression noise at the single cell level in lymphoblastoid cell lines obtained from identical twins discordant for multiple sclerosis, unrelated MS patients and controls

INTRODUCTION AND AIMS

Expression of genetic information is not a static and unchanging phenomenon, but it varies over time due to multiple mechanisms intrinsic to cell biology or to environmental stimuli. This may explain why cells belonging to an apparently homogeneous population show a wide heterogeneity of gene expression and phenotypes when considered one by one. A crucial element in producing such intercellular variety is the so-called gene expression 'noise', due to the stochastic activation - over space and time - of genetic information in different cells within the same population. In complex disorders like multiple sclerosis (MS), where heritable and non-heritable factors identified so far are not able to completely explain disease development, such noise might boost the effects of "soft" risk factors in order to reach disease threshold. The aim of this project was to evaluate the possible involvement of gene expression noise in multiple sclerosis (MS) etiology, taking advantage of the study of twins. As single-cell strategies represent the best way to measure gene expression heterogeneity within

seemingly homogeneous lines, to provide direct experimental evidence for our hypothesis we investigated cell-to-cell fluctuations by analysing expression profiles of lymphoblastoid cell lines (LCLs, carrying Epstein-Barr virus, EBV) obtained from 3 MS-discordant monozygotic twins, one unrelated patient and one healthy control. We measured both human and viral genes using single-cell RNA sequencing followed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) validation.

RESULTS

Single-cell expression profiles allowed us to define multiple sources of heterogeneity in apparently homogeneous lines. First, we identified genes more 'noisy'/overdispersed than expected among different cells isolated from the same individual, irrespective of MS/healthy status. These intrinsically noisy genes were defined as 'universally noisy', and some EBV products (e.g., *LMP1* and *LMP2*) were found to belong to this group.

We also measured changes in mean expression of transcripts between affected and unaffected twins

and found pathways/gene sets with increased expression in MS *versus* healthy twins: e.g., *CD40* and *LMP1* gene sets exhibited decreased expression in MS samples.

We then asked which genes were unexpectedly 'noisy' between the twins, based on disease status (noisier behavior in MS *versus* healthy twins or *vice versa*), and we called them 'differentially noisy' genes. Our results identified gene sets 'noiser' in MS samples or in controls. As an example, *CCL22* showed an unusually high level of noise in the healthy twins. Eventually, we focused on genes that had a correlated expression (or changed their correlation) with a gene of interest to create maps of gene co-regulation in MS and controls. In this way we discovered genes that change their correlation depending on disease/healthy status.

CONCLUSIONS

Until very recently, single-cell heterogeneity went undetected in whole tissue or cell line experiments because expression profiles were averaged over many cells (and only a 'mean expression' for a specific cell line could be measured); this might have masked the potential pathogenic contribution of cell-to-cell variability within the same cell population of a single individual.

We identified which cellular or EBV genes show a noisier behavior (e.g. those exhibiting higher inter-cellular fluctuations) in MS individuals or in controls,

which pathways they belong to and how these genes are regulated. We also gained some information on the degree of noise of known MS-related genes and crucial EBV products, such as *LMP1/2*. The contribution of our single-cell-based perspective in better understanding the etiology of MS is straightforward. Indeed, analysis of noise based on cell-to-cell differences in transcript production helped us to define genes/pathways noisier in MS, therefore with a putative pathogenic role in disease. The boosting effect of such noisy circuits may help explain why some individuals, despite carrying weak genetic predisposing factors, develop MS. Both Vitamin D and EBV could play a major role in this process: the former through the binding of its receptor to regulatory elements, promoters or enhancers; the latter by means of virus-specific perturbations of the noisy circuits of the cell.

In the long term, the precise identification of perturbations driven by noise as multiplier of soft risk factors could pave the way for highly selected approaches to influence this process. Mild interventions such as increase of vitamin D or other fat-soluble vitamin levels, Bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination, and modulation of the endocannabinoid system may reflect the possibility of stabilizing noise and decreasing its effects. As for host-viral interactions, our results showed the noisy behavior of some EBV genes, therefore viral products might represent precious target for future antiviral strategies.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 1 year (extended by 6 months) and the amount of € 30,000

Luca Battistini

Unità di Neuroimmunologia, Fondazione Santa Lucia, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Daniela Angelini, Gabriella Ruocco, Eleonora Piras, Francesca Gargano, Gisella Guerrera, Giovanna Borsellino, Marco De Bardi, Roberta Placido

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Marco Salvetti, Viviana Annibali, Rosella Mechelli, Giovanni Ristori,
Sapienza Università di Roma, Roma

Carlotta De Filippo, Fondazione Edmund Mach, Trento e Istituto di Biologia
e Biotecnologia Agraria, CNR Pisa

Duccio Cavalieri, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Barbara Serafini, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Cellule MAIT e sclerosi multipla: come la flora intestinale influenza le risposte autoimmuni

PREMESSE E OBIETTIVI

Il ruolo dei linfociti CD8+CD161++ nella sclerosi multipla (SM) è stato definito negli ultimi anni, in cui si è visto che questa popolazione cellulare corrisponde alle cellule MAIT (mucosal-associated invariant T cells), che hanno funzioni antibatteriche e che si trovano a livello della mucosa intestinale. Queste cellule sono state trovate all'interno degli infiltrati cellulari delle lesioni demielinizzanti nei cervelli autotici, e sono notevolmente espanse nel sangue periferico di persone con SM. La presenza intracerebrale di linfociti che in condizioni fisiologiche hanno un netto tropismo intestinale può sembrare sorprendente, ma le cellule MAIT esprimono alti livelli del recettore per le chemiochine CCR6, necessario per la migrazione all'interno del parenchima cerebrale attraverso il plesso corioideo, le cui cellule secernono costitutivamente la chemochina CCL20, il ligando di CCR6. Le cellule MAIT dunque rappresentano un nesso tra la composizione del microbiota intestinale e un sistema immunitario bilanciato. Il miglioramento delle condizioni igieniche, una dieta povera di fibre, e l'uso diffuso di antibiotici hanno determinato l'alterazione della composizione della flora intestinale nei paesi industrializzati, con un concomitante aumento vertiginoso dell'incidenza di malattie autoimmuni.

La nostra ipotesi è che le cellule MAIT siano attivate

ed espanse nella mucosa intestinale disbiotica, e che possano penetrare nel sistema nervoso centrale rilasciando poi il loro potenziale proinfiammatorio, partecipando così alla neuroinfiammazione alla base della SM. Abbiamo studiato la composizione delle comunità batteriche e fungine nelle feci ottenute da persone con SM e da soggetti sani, e abbiamo poi misurato l'attivazione delle cellule MAIT *in vitro* in risposta ai funghi isolati dalle feci. Questi risultati suggeriscono nuove strategie terapeutiche volte a modificare un ambiente intestinale proinfiammatorio e a prevenire quindi l'attivazione di cellule patogeniche.

RISULTATI

Abbiamo effettuato analisi di metagenomica e di culturomica su 48 individui. La metagenomica della componente batterica del microbiota intestinale ha rivelato che i Phyla più abbondanti sono i Firmicutes e Bacteroidetes.

Le famiglie più abbondanti erano Bacteroidaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Prevotellaceae, Bifidobacteriaceae. L'analisi dei biomarcatori (LEfSe) ha identificato due taxa che presentavano abbondanze relative significativamente diverse tra i soggetti sani e le persone con SM. I campioni fecali dei pazienti sono risultati sempre più arricchiti in Bifidobacteriaceae e Peptostreptococcaceae, che sono quindi biomarcatori batterici promettenti.

Per quanto riguarda il Microbiota, l'analisi dell'abbondanza relativa dei gruppi tassonomici fungini ha mostrato che le famiglie più abbondanti sono Trichocomaceae, Ascomycota, Ascomycota Incertae sedis, e Malasseziaceae. Inoltre, le feci dei pazienti hanno mostrato di contenere una maggiore abbondanza e ricchezza di funghi rispetto ai soggetti sani. Abbiamo anche trovato differenze significative nei campioni ottenuti da coppie di gemelli omozigoti discordanti per la malattia: nei campioni dei gemelli affetti da SM era sempre presente *S. Cerevisiae*, a differenza che nei gemelli sani, sottolineando l'importanza di funghi presenti negli alimenti. I nostri dati, nel complesso, confermano che nei pazienti con SM esiste disbiosi, sia a livello batterico che fungino.

Sia le cellule dell'immunità innata che i linfociti MAIT dei pazienti con SM mostrano una produzione significativamente maggiore di citochine e chemochine proinfiammatorie in risposta ad estratti fungini isolati dalle feci dei pazienti con SM. Abbiamo dimostrato per la prima volta che le cellule MAIT producono elevati livelli di CCL20 in seguito all'esposizione a estratti fungini, e che questa che-

miocina è anche presente a livello delle cellule MAIT che infiltrano le lesioni demielinizzanti. Il CCL20 attrae le cellule che esprimono il recettore CCR6, che sono le cellule con maggior potenziale proinfiammatorio (Th17, monociti, linfociti B). Inoltre le cellule dell'immunità innata isolate dai pazienti con SM producono livelli più elevati di IL-21 e IL-23 rispetto alle stesse cellule isolate dai donatori sani.

CONCLUSIONI

Abbiamo dimostrato che in persone con SM è presente disbiosi a livello intestinale, con una particolare ricchezza ed abbondanza di lieviti come *Candida* e *S. Cerevisiae*. I lieviti isolati dalle feci dei pazienti con SM inducono risposte infiammatorie più vigorose in diverse popolazioni cellulari ottenute dai pazienti, rispetto ai donatori sani. Le cellule MAIT che rispondono a questi lieviti sono in grado di migrare all'interno del cervello e di contribuire alla patologia. Questi risultati suggeriscono che modificazioni nella dieta mirate a normalizzare la composizione della flora intestinale potrebbero rappresentare un'efficace strategia per ridurre l'attivazione di cellule proinfiammatorie neurotropiche.

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

INTRODUCTION AND AIMS

The pathogenic relevance of proinflammatory CD161highCD8+ T cells has been recently reported in multiple sclerosis (MS). We have shown that these cells correspond to mucosal-associated invariant T (MAIT) antibacterial and gut-homing cells. MAIT cells have been detected within the cellular infiltrates in MS lesions, in autaptic brains, in close proximity of ectopic B cell follicles, and are significantly expanded in the peripheral blood of MS patients. The presence of gut-homing lymphocytes in the brain may appear surprising, but MAIT lymphocytes express very high levels of the chemokine receptor CCR6, which directs cells not only to gut mucosal lymphoid tissue but also to the brain tissue, through the choroid plexus, whose cells constitutively secrete CCL20. MAIT cells may thus represent an important link between the composition of the microbiota and a balanced immune system. The improved hygienic conditions, a diet poor

in fibers, and the wide-spread use of antibiotic have determined alterations in the composition of the micro- and mycobiota in industrialized countries, where an increase in the incidence of autoimmune diseases has been described. Thus, we propose that MAIT cells are activated and unduly expanded in a dysbiotic intestinal mucosa; they may then penetrate in the CNS, and come in contact with resident brain cells or with other lymphocytes which have previously entered the brain and through this interaction they may release the pro-inflammatory cytokines they harbor, thus setting the stage for neural inflammation. We have studied the composition of bacterial and fungal communities in fecal samples from MS patients and healthy individuals, and tested the fungi in *in vitro* assays measuring MAIT T cell activation and responses. The results may provide therapeutic strategies aimed at switching a pro-inflammatory intestinal environment to an anti-inflammatory one.

RESULTS

We have successfully performed metagenomic and culturomics analyses of 48 individuals. Metagenomics of the bacterial component of the intestinal microbiota revealed that the most represented and abundant Phyla are Firmicutes and Bacteroidetes. At the family level the most abundant families were Bacteroidaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Prevotellaceae, Bifidobacteriaceae. Biomarker analysis (LEfSe) identified 2 taxa presenting significant differential relative abundance between healthy subjects and MS patients.

Faecal samples from MS patients resulted consistently enriched in Bifidobacteriaceae, and Peptostreptococcaceae, that thus are promising bacterial biomarkers for MS.

Regarding the Mycobiota, analysis of the relative abundance of fungal taxonomic groups at the family level showed that the four most abundant families were Trichocomaceae, unidentified family of Ascomycota, Ascomycota Incertae sedis, and Malasseziaceae. The isolated fungi showed a significant increase in abundance and richness in MS patients compared to healthy subjects. We also found significant differences between twins discordant for disease: amongst the isolates in MS twins, we observed the presence of *S. Cerevisiae*, underlining the importance of food-borne fungi. This data suggests that both at the fungal and at the bacterial level MS patients show intestinal dysbiosis.

Both innate immune cells and MAIT cells from MS patients show a significantly higher production of

proinflammatory cytokines and chemokines in response to yeast extracts (isolated from MS patients) compared to their counterparts from healthy individuals. Interestingly, we show for the first time the production of CCL20 by MAIT cells following exposure to *Candida* extracts; this chemokine was also present in MAIT cells infiltrating the active lesions in post mortem MS brains. Importantly, the ligand for CCL20, CCR6, is expressed by proinflammatory and pathogenic cells (including CD4+ Th17 cells, B cells, and innate immune cells) which infiltrate the brain, and its expression has been shown to be required for transmigration into the CNS. Also, innate immune cells isolated from MS patients produced higher levels of IL-12 and IL-23 in response to yeasts extracts compared to those obtained from healthy donors.

CONCLUSIONS

In conclusion, our data shows dysbiosis in MS patients with a peculiar abundance and richness of yeasts such as *Candida* and *Saccharomyces Cerevisiae* (food-borne fungi). Yeast isolated from MS feces induce stronger inflammatory responses in MS patients compared to healthy controls thus confirming the pathogenic role of these dysbiotic strains. MAIT cells reacting to these yeasts produce proinflammatory cytokines and are able to migrate to the CNS contributing to disease pathology. These results suggest that diet modifications aimed at normalizing the composition of the gut flora may be an effective strategy to reduce activation of proinflammatory cells bearing encephalitogenic potential.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Cencioni MT, Santini S, Ruocco G, Borsellino G, De Bardi M, Grasso MG, Ruggieri S, Gasperini C, Centonze D, Barilá D, Battistini L, Volpe E. FAS-ligand regulates differential activation induced cell death of human T helper 1 and 17 cells in healthy donors and multiple sclerosis patients. *Cell Death Dis.* 2015 Jun 11;6:e1785

Ruocco G, Rossi S, Motta C, Macchiarulo G, Barbieri F, De Bardi M, Borsellino G, Finardi A, Grasso MG, Ruggieri S, Gasperini C, Furlan R, Centonze D, Battistini L, Volpe E. T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis. *Clin Sci (Lond).* 2015 Feb 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25700150

Volpe E, Battistini L, Borsellino G. Advances in T Helper 17 Cell Biology: Pathogenic Role and Potential Therapy in Multiple Sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:475158

Pavarini L, Strati F, Rizzetto L, Borsellino G, Angelini DF, Annibali V, Buscarinu CM, Salvetti M, Battistini L, Cavalieri D, De Filippo C. Role of the Mycobiota in Multiple Sclerosis. *YEAST.* 2015, 32: S216-S216

Battistini L. EBV and MS: adding pieces to the puzzle. *Multiple Sclerosis Journal*, Volume: 21;Volume 14; DEC 2015: NP7-NP8

Annibali V, Policano C, Buscarinu MC et al. Intestinal permeability in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, Volume: 275 Issue: 1-2 Special Issue: SI; OCT 15 2014: 54-54

Piras E, Annibali V, Borsellino G, Guerrero G, De Bardi M, Gasperini C, Centonze D, Ristori G, Salvetti M, Rizzetto L, Cavalieri D, De Filippo C, Angelini D.F. and Battistini L.-Gut flora specific immune responses in multiple sclerosis. XXIV AINI Congress, Sorrento (Naples) 1-4th October 2014 *Oral presentation*

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 110.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 110,000

Giuseppe Matarese

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II e Istituto per l'Endocrinologia e l'Oncologia Sperimentale del CNR, Napoli

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Claudio Procaccini, Fortunata Carbone, Claudia La Rocca, Maria Teresa Lepore, Silvana Cassano, Salvatore De Simone

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Tamas Horvath, Department of Comparative Medicine, Program in Neurobiology of Metabolism, Yale University, New Haven, USA

Antonio La Cava, Department of Medicine, UCLA, Los Angeles, USA

Christos Mantzoros, Department of Endocrinology, Harvard Medical School, Boston, USA

Antonio Porcellini, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

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

PREMESSE E OBIETTIVI

Il tema di base del nostro progetto è stato lo studio di come il metabolismo influenza l'immunità, attraverso l'analisi di una molecola detta mTOR (mammalian Target of Rapamycin) presente nelle cellule e responsabile del “sensing” intracellulare della disponibilità di alimenti quali zuccheri, lipidi e proteine. La proteina mTOR percepisce infatti nelle cellule la quantità di amminoacidi, glucosio e lipidi, e più questa è alta nella cellula più si attiva e funziona; se invece abbassiamo i nutrienti la sua attività si riduce. È insomma una sorta di cartina al tornasole delle quantità di nutrienti nel mezzo cellulare. Questa proteina è stata studiata in soggetti con sclerosi multipla (SM) e controlli sani.

RISULTATI

Nel progetto in corso abbiamo incentrato la nostra attenzione sul modo in cui il complesso mTOR controlla la funzione di cellule T regolatorie (Treg), che a loro volta controllano i processi infiammatori tipici delle malattie immunologiche e autoimmunitarie come la SM. Nel corso di questi anni, abbiamo compreso come il metabolismo riesca a influenzare la genesi delle cellule Treg e, quindi, la suscettibilità

alla SM. I nostri studi mirano a comprendere perché le malattie immunologiche sono sempre più frequenti nei Paesi ricchi e opulenti, mentre sono quasi assenti in quelli poveri e in cui vi è uno scarso apporto nutrizionale.

La nostra ricerca ha scoperto nelle cellule Treg dei pazienti con SM un'eccessiva stimolazione del metabolismo energetico intracellulare, che determina un 'esaurimento funzionale' e un'alterazione della capacità di queste cellule di crescere e controllare l'infiammazione che distrugge la guaina mielinica. Inoltre, è stato evidenziato che la crescita delle cellule Treg diminuisce con l'aggravamento della malattia, svelando uno stretto legame fra metabolismo, ridotta funzione delle cellule sentinella e progressione della sclerosi multipla.

CONCLUSIONI

Il metabolismo nelle cellule Treg, potrebbe essere quindi utilizzato come indice prognostico per l'identificazione precoce dell'andamento clinico della malattia, la cui evoluzione è spesso imprevedibile alla diagnosi. Non solo, questi risultati sarebbero di rilevanza per applicare nuove strategie terapeutiche volte a ridurre la pressione metabolica esercitata

dagli alimenti in corso di malattia. Infatti, la possibilità di ridurre l'attività di mTOR attraverso cambiamenti dello stato nutrizionale e metabolico associati

a classiche terapie attualmente disponibili, potrebbero rappresentare un nuovo baluardo per la terapia della SM.

Unravelling paradoxes in regulatory T cell biology: the molecular basis for an mTOR-dependent oscillatory metabolic switch controlling immune tolerance in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

The basic aim of our project was to investigate the way in which metabolism controls immunity; we focused our attention on a molecule named mTOR (mammalian Target of Rapamycin) present in cells and responsible for the "sensing" intracellular availability of foods such as sugars, lipids and proteins. The mTOR protein perceives the amount of amino acids, glucose and lipids; when these nutrients are high, the cell is activated and generally proliferates; but if we lower the nutrients cellular activities are reduced. We investigated the amount and activity of mTOR in patients with multiple sclerosis (MS) and controls.

RESULTS

In the current project we focused our attention on the way in which mTOR complex controls the function of regulatory T cells (Treg), which in turn control the typical inflammatory processes of immunological and autoimmune diseases such as MS. During these years, we dissected how the metabolism is able to influence the genesis of Treg cells and, therefore, susceptibility to MS. Our studies aimed at understanding why the immunological diseases are increasingly

common in rich and affluent countries, and why they are almost unknown in poor countries and where there is little nutritional intake.

Our research found in Treg cells of MS patients excessive stimulation of intracellular energy metabolism, resulting in a 'functional exhaustion' and an alteration of the ability of these cells to grow and control the inflammation that destroys the myelin sheath. In addition, it was shown that growth of Treg cells decreases with the aggravation of the disease, revealing a close link between metabolism, reduced function of Treg cells and progression of multiple sclerosis.

CONCLUSIONS

Metabolism in Treg cells could then be used as a prognostic indicator for early detection of the trend of clinical disease, the evolution of which is often unpredictable at diagnosis. In addition, these results would be relevant to apply new therapeutic strategies aimed at reducing the metabolic pressure derived from strong nutritional overload. In fact, the ability to reduce the activity of mTOR through changes in the nutritional status and associated with classic therapies, may represent a new frontier for the treatment of MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Carbone F, La Rocca C, De Candia P, Procaccini C, Colamatteo A, Micillo T, De Rosa V, Matarese G. Metabolic control of immune tolerance in health and autoimmunity. *Semin Immunol.* 2016 Oct;28(5):491-504

Vigo T, Procaccini C, Ferrara G, Baranzini S, Oksenberg JR, Matarese G, Diaspro A, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. IFN- γ orchestrates mesenchymal stem cell plasticity through the signal transducer and activator of transcription 1 and 3 and mammalian target of rapamycin pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Sep 23. pii: S0091-6749(16)31021-1

Galgani M, De Rosa V, La Cava A, Matarese G. Role of Metabolism in the Immunobiology of Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2016 Oct 1;197(7):2567-257
Procaccini C, Santopaolo M, Faicchia D, Colamatteo A, Formisano L, de Candia P, Galgani M, De Rosa V, Matarese G. Role of metabolism in neurodegenerative disorders. *Metabolism.* 2016 Sep;65(9):1376-1390

Procaccini C, La Rocca C, Carbone F, De Rosa V, Galgani M, Matarese G. Leptin as immune mediator: Interaction between neuroendocrine and immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 2017 Jan;66:120-129

Matassa DS, Amoroso MR, Lu H, Avolio R, Arzeni D, Procaccini C, Faicchia D, Maddalena F, Simeon V, Agliarulo I, Zanini E, Mazzoccoli C, Recchi C, Stronach E, Marone G, Gabra H, Matarese G, Landriscina M, Esposito F. Oxidative metabolism drives inflammation induced platinum resistance in human ovarian cancer. *Cell Death Differ.* 2016 Sep 1;23(9):1542-1554

- Conte A, Procaccini C, Iannelli P, Kisslinger A, De Amicis F, Pierantoni GM, Mancini FP, Matarese G, Tramontano D. Effects of Resveratrol on p66Shc phosphorylation in cultured prostate cells. *Transl Med UniSa*. 2016 Jan 31;13:47-58
- Colangelo T, Polcaro G, Ziccardi P, Pucci B, Muccillo L, Galgani M, Fucci A, Milone MR, Budillon A, Santopaolo M, Votino C, Pancione M, Piepoli A, Mazzoccoli G, Binaschi M, Bigioni M, Maggi CA, Fassan M, Laudanna C, Matarese G, Sabatino L, Colantuoni V. Proteomic screening identifies calreticulin as a miR-27a direct target repressing MHC class I cell surface exposure in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2016 Feb 25;7:e2120
- Colangelo T, Polcaro G, Ziccardi P, Muccillo L, Galgani M, Pucci B, Milone MR, Budillon A, Santopaolo M, Mazzoccoli G, Matarese G, Sabatino L, Colantuoni V. The miR-27a-calreticulin axis affects drug-induced immunogenic cell death in human colorectal cancer cells. *Cell Death Dis*. 2016 Feb 25;7:e2108
- Procaccini C, Carbone F, Di Silvestre D, Brambilla F, De Rosa V, Galgani M, Faicchia D, Marone G, Tramontano D, Corona M, Alviggi C, Porcellini A, La Cava A, Mauri P, Matarese G. The Proteomic Landscape of Human Ex Vivo Regulatory and Conventional T Cells Reveals Specific Metabolic Requirements. *Immunity*. 2016 Feb 16;44(2):406-421
- Criscuolo C, Procaccini C, Meschini MC, Cianflone A, Carbone R, Doccini S, Devos D, Nesti C, Vuillaume I, Pellegrino M, Filla A, De Michele G, Matarese G, Santorelli FM. Powerhouse failure and oxidative damage in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *J. Neurol*. 2015. Dec; 262(12):2755-2763
- De Rosa V, Galgani M, Santopaolo M, Colamatteo A, Laccetti R, Matarese G. Nutritional control of immunity: Balancing the metabolic requirements with an appropriate immune function. *Semin Immunol*. 2015 Sep;27(5):300-309
- De Rosa V, Galgani M, Porcellini A, Colamatteo A, Santopaolo M, Zuchegna C, Romano A, De Simone S, Procaccini C, La Rocca C, Carrieri PB, Maniscalco GT, Salvetti M, Buscarinu MC, Franzese A, Mozzillo E, La Cava A, Matarese G. Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nat Immunol*. 2015. Nov;16(11):1174-1184
- Norata GD, Caligiuri G, Chavakis T, Matarese G, Netea MG, Nicoletti A, O'Neill LA, Marelli-Berg FM. The Cellular and Molecular Basis of Translational Immunometabolism. *Immunity*. 2015 Sep 15;43(3):421-434
- Galgani M, De Rosa V, Matarese G. T cell metabolism and susceptibility to autoimmune diseases. *Mol Immunol*. 2015 Dec;68(2 Pt C):558-563
- Cocco S, Secondo A, Del Viscovo A, Procaccini C, Formisano L, Franco C, Esposito A, Scorziello A, Matarese G, Di Renzo G, Canzoniero LM. Polychlorinated Biphenyls Induce Mitochondrial Dysfunction in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *PLoS One*. 2015 Jun 23;10(6):e0129481
- Sabbatini M, Ruggiero G, Palatucci AT, Rubino V, Federico S, Giovazzino A, Apicella L, Santopaolo M, Matarese G, Galgani M, Terrazzano G. Oscillatory mTOR inhibition and Treg increase in kidney transplantation. *Clin. Exp. Immunol*. 2015 Nov;182(2):230-240.
- Carrieri PB, Carbone F, Perna F, Bruzzese D, La Rocca C, Galgani M, Montella S, Petracca M, Florio C, Maniscalco GT, Spitaleri DL, Iuliano G, Tedeschi G, Della Corte M, Bonavita S, Matarese G. Longitudinal assessment of immuno-metabolic parameters in multiple sclerosis patients during treatment with glatiramer acetate. *Metabolism*. 2015 Sep;64(9):1112-1121
- Galgani M, Insabato L, Cali G, Della Gatta AN, Mirra P, Papaccio F, Santopaolo M, Alviggi C, Mollo A, Strina I, Matarese G, Beguinot F, De Placido G, Ulianich L. Regulatory T cells, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in women with defective endometrial receptivity. *Fertil. Steril*. 2015 Jun;103(6):1579-1586.e1.
- Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2015 Jul 15;759:182-91
- Carrizzo A, Lenzi P, Procaccini C, Damato A, Biagioni F, Ambrosio M, Amodio G, Remondelli P, Del Giudice C, Izzo R, Malovini A, Formisano L, Gigantino V, Madonna M, Puca AA, Trimarco B, Matarese G, Fornai F, Vecchione C. Pentraxin 3 Induces Vascular Endothelial Dysfunction Through a P-selectin/Matrix Metalloproteinase-1 Pathway. *Circulation*. 2015 Apr 28;131(17):1495-505; discussion 1505
- Omodei D, Pucino V, Labruna G, Procaccini C, Galgani M, Perna F, Pirozzi D, De Caprio C, Marone G, Fontana L, Contaldo F, Pasanisi F, Matarese G, Sacchetti L. Immune-metabolic profiling of anorexic patients reveals an anti-oxidant and anti-inflammatory phenotype. *Metabolism*. 2015 Mar;64(3):396-405
- Ali TH, Pisanti S, Ciaglia E, Mortarini R, Anichini A, Garofalo C, Tallerico R, Santinami M, Gulletta E, Ietto C, Galgani M, Matarese G, Bifulco M, Ferrone S, Colucci F, Moretta A, Kärre K, Carbone E. Enrichment of CD56(dim)KIR + CD57 + highly cytotoxic NK cells in tumour-infiltrated lymph nodes of melanoma patients. *Nat. Commun*. 2014 Dec 4;5:5639
- Procaccini C, Pucino V, Mantzoros CS, Matarese G. Leptin in autoimmune diseases. *Metabolism*. 2015 Jan;64(1):92-104
- Cassano S, Pucino V, La Rocca C, Procaccini C, De Rosa V, Marone G, Matarese G. Leptin modulates autophagy in human CD4+CD25- conventional T cells. *Metabolism*. 2014 Oct;63(10):1272-1279
- La Rocca C, Carbone F, Longobardi S, Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol Lett*. 2014 Nov;162(1 Pt A):41-48
- Procaccini C, Pucino V, De Rosa V, Marone G, Matarese G. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front Immunol*. 2014 Apr 7;5:143
- Matarese G, Colamatteo A, De Rosa V. Metabolic fuelling of proper T cell functions. *Immunol Lett*. 2014 Oct;161(2):174-178
- Carbone F, De Rosa V, Carrieri PB, Montella S, Bruzzese D, Porcellini A, Procaccini C, La Cava A, Matarese G. Regulatory T cell proliferative potential is impaired in human autoimmune disease. *Nat Med*. 2014 Jan;20(1):69-74.
- Vitale N, Kisslinger A, Paladino S, Procaccini C, Matarese G, Pierantoni GM, Mancini FP, Tramontano D. Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells. *PLoS One*. 2013 Nov 19;8(11):e80728.
- Pucino V, De Rosa V, Procaccini C, Matarese G. Regulatory T cells, leptin and angiogenesis. *Chem Immunol Allergy*. 2014;99:155-169. Book Chapter

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2012 per il periodo di 3 anni (prorogato di 9 mesi) e l'ammontare totale di 300.000 €

Research project funded by FISM Grant 2012 for the period of 3 years (extended by 9 months) and the amount of € 300,000

Fabia Filipello

Laboratorio di Farmacologia e Patologia del Sistema Nervoso, IRCCS Humanitas, Milano

MENTORE / MENTOR: **Michela Matteoli**

Interazione tra astrociti e cellule T nel corso della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Gli astrociti, tramite rilascio di fattori solubili e attraverso meccanismi mediati da contatto, controllano l'ingresso delle cellule immunitarie nel sistema nervoso centrale (SNC). Il nostro progetto ha lo scopo di chiarire alcuni degli aspetti fondamentali alla base dell'interazione tra astrociti e linfociti T CD4+ e che possono costituire un possibile bersaglio terapeutico in corso di sclerosi multipla (SM). Come primo obiettivo, ci siamo focalizzati sullo studio delle molecole implicate nella formazione di contatti adesivi stabili tra astrociti e linfociti T. Dal momento che i nostri risultati preliminari rivelavano un aumento dell'espressione delle ectonucleotidasi CD39/CD73 sulla superficie dei linfociti T in seguito a contatto con gli astrociti, l'obiettivo principale del progetto è stato quello di individuare e comprendere i meccanismi molecolari responsabili dell'aumento dei suddetti ectoenzimi rivolgendo una particolare attenzione al ruolo svolto dalla segnalazione ATP-mediata. Ci siamo inoltre prefissi di caratterizzare il fenotipo acquisito dalle cellule T in seguito all'interazione con gli astrociti con l'obiettivo di definire se venissero polarizzate verso un fenotipo immunosoppressivo o regolatorio. Infine, abbiamo voluto dimostrare se gli ectoenzimi CD39/CD73 fossero modulati dal contatto con astrociti *in vivo* nel modello di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE).

RISULTATI

I risultati ottenuti in questo progetto mostrano come il contatto tra linfociti T CD4+ e astrociti induca l'espressione nei linfociti di due ectoenzimi coinvolti nel catabolismo delle purine: l'ectonucleoside trifosfato difosfoidrolasi CD39 e l'ecto-5'-nucleotidasi CD73. Il CD73, che determina la produzione finale di adenosina, è noto per essere indotto nelle cellule T CD4+ dal fattore di crescita trasformante- β (TGF- β).

Abbiamo dunque dimostrato che nella co-cultura di astrociti e linfociti T i livelli di TGF- β sono aumentati significativamente e che l'inibizione del recettore del TGF- β previene completamente l'aumento degli ectoenzimi CD39 e CD73 osservato nelle cellule T in contatto con gli astrociti. I risultati ottenuti hanno portato quindi ad escludere la possibilità che l'ATP sia la molecola chiave nell'induzione delle ectonucleotidasi, ipotesi proposta inizialmente nel progetto. Abbiamo dimostrato che l'adesione delle cellule T agli astrociti è mediata dalle molecole VCAM-1/ICAM-1 e dall'integrina $\alpha 4$. Questo risultato suggerisce che il natalizumab, l'anticorpo anti-integrina $\alpha 4$ utilizzato nel trattamento della SM, possa limitare l'interazione degli astrociti e dei linfociti T anche nelle nostre condizioni sperimentali. Abbiamo dimostrato che l'adesione agli astrociti polarizza i linfociti T verso un fenotipo immunosoppressivo caratterizzato dall'espressione del fattore di trascrizione Ror γ T, caratteristico dei linfociti CD4+ helper17. Inoltre, l'attività del CD39 espresso dai linfociti e la conseguente degradazione di ATP, sono responsabili dell'inibizione delle oscillazioni di calcio spontanee negli astrociti. I nostri risultati *in vitro* sono stati confermati *ex vivo* tramite analisi di cervello e midollo spinale derivanti da topi affetti da EAE (encefalomielite autoimmune sperimentale). In questi ultimi abbiamo identificato una popolazione di cellule T CD39 /CD73 positive che era assente negli animali sani. L'analisi confocale ha mostrato come le cellule T CD39/CD73 positive fossero in contatto diretto con gli astrociti.

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti nel corso del progetto, ipotizziamo che l'interazione con gli astrociti unitamente alla segnalazione TGF- β -mediata possa promuovere un programma immunoregolatorio nelle cellule T volto a controllare i fenomeni neuroin-

fiammatori che si verificano durante la SM. Inoltre, il passaggio dei linfociti T CD4+ alla barriera emato-encefalica (BEE) e la loro infiltrazione nel cervello rappresentano un aspetto cruciale nella patogenesi della SM. Dato che l'adenosina e il CD73 regolano la permeabilità alla BEE, l'aumento dell'espressione di CD73 nei linfociti T helper 17 individuati nel nostro studio potrebbe costituire una via alternativa attraverso cui i linfociti avrebbero accesso al cervello. Per indagare questo aspetto, stiamo attualmente sviluppando un modello umanizzato di BEE utilizzando linfociti T CD4+ derivanti da persone con

SM al fine di studiare il ruolo svolto dal CD73 e dall'adenosina in corso di neuroinfiammazione. I risultati ottenuti in questo progetto mettono in luce come la modulazione dell'espressione del CD73 o della produzione di adenosina possano rappresentare una strategia efficace nel regolare l'infiltrazione di cellule T nel cervello con un impatto positivo sul decorso della patologia. Infine, una possibilità ancora inesplorata, è che i farmaci attualmente in uso agiscano sull'infiltrazione dei linfociti T nel cervello modulando l'espressione del CD73 e la produzione di adenosina.

Astrocyte-T cell interaction in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

By releasing soluble factors and through contact-dependent mechanisms, astrocytes regulate immune cells entry into the central nervous system (CNS). The signalling pathways and molecular events, which result from the interaction of activated CD4+ T cells with astrocytes are poorly defined. We aimed at investigating key aspects of astrocyte-T cell interaction possibly involved in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) and representing potential novel target for the treatment of the disease. Firstly, we aimed at understanding through which molecules astrocyte and T cell establish adhesive contacts *in vitro*. On the basis of our preliminary results showing a strong upregulation of the ectonucleotidases CD39 and CD73 in T cells cocultured with astrocytes, we aimed at exploring the mechanisms underlying ectonucleotidase upregulation by focusing our attention on ATP-mediated signalling in particular. We then propose to characterize CD4+T cells adhering to astrocytes in terms of phenotype and function. Altogether these experiments are informative on so far unexplored aspects of T cell-astrocyte reciprocal influence. Finally, we aimed at understanding whether ectonucleotidase expression on T lymphocytes was modulated by astrocytes proximity also *in vivo* during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

RESULTS

Our results showed that astrocytes promote the ex-

pression and enzymatic activity of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase CD39 and the plasma membrane ecto-5'-nucleotidase CD73 in recently activated CD4+ cells by a contact dependent mechanism. The plasma membrane ecto-5'-nucleotidase, an enzyme of the purine catabolic pathway that catalyzes the breakdown of AMP to adenosine, is known to be induced in activated CD4+ cells by Transforming Growth Factor- β (TGF- β). In line, we detected that TGF- β is robustly upregulated by astrocyte and T cell in coculture and it is sufficient to promote ectonucleotidase expression. Blockade of TGF- β receptor I indeed, completely prevented CD39 and CD73 upregulation on T cells contacting astrocytes. These results led us to definitely exclude ATP as the possible key molecule triggering CD39 CD73 expression on adherent T cells, hypothesis firstly proposed in the original project. We next observed that astrocyte-T cell adhesion was mediated by VCAM-1 and α 4 integrin expressed on astrocyte and T cell respectively. This result suggests that natalizumab, the humanized anti- α 4 integrin antibody, might limit astrocyte/T cell interaction also in our condition. Moreover, T cell adhesion to astrocyte results in T cells differentiation to an immunosuppressive phenotype defined by the expression of the transcription factor Ror γ T, which characterizes the CD4+ T helper17 subset. CD39 activity in T cells in turn inhibits spontaneous calcium oscillations in astrocytes that correlate with enhanced and reduced transcription of CCL2

chemokine and Sonic hedgehog (Shh), respectively. The increased secretion of CCL2 with concomitant reduction of Shh might promote leukocytes extravasation into the brain parenchyma.

Our *in vitro* findings were confirmed by confocal and flow cytometric analysis of brain and spinal cord from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice. We indeed identified a population of infiltrating CD39⁺CD73⁺ T cells in EAE mice that was absent in healthy animals. CD39/CD73 positive CD4⁺T cells have been found in direct contact with astrocytes.

CONCLUSIONS

On the basis of our results, we hypothesized that astrocytes interaction and TGF- β signaling promote an immunoregulatory program in CD4⁺T cells to control possible injury to brain parenchyma during neuroinflammation. Moreover, degradation of ATP to adenosine by CD73 regulates blood brain barrier (BBB) permeability, therefore CD73 overexpression

might be another possible route of CD4⁺ T cells entering the brain. To investigate this aspect, we are currently developing a humanized BBB model taking advantage of lymphocytes derived from MS patients with the intent to deepen understand the role played by CD73 and adenosine during leukocyte entry into the brain. Interestingly, a previous study observed that human CD4⁺CD25^{high} CD39⁺ Treg cells able to suppress pathogenic Th17 cells, are impaired in patients with MS. The mechanism of suppression by CD39⁺ Treg cells requires cell contact and can be duplicated by adenosine, produced by CD73. These observations together with the findings obtained in my project open the possibility that targeting CD73 expression may represent a suitable strategy for regulating T cell infiltration into the brain with a positive impact on the pathology course. Also, the possibility has never been explored that drugs currently in use may impact on T cell infiltration by modulating CD73 expression.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Filipello F, Pozzi D, Proietti M, Romagnani A, Mazzitelli S, Matteoli M, Verderio C and Grassi F "Ectonucleotidase activity and immunosuppression in astrocyte-CD4 T cell bidirectional signaling", *Oncotarget*. 2016 Feb 2;7(5):5143-56

Lauranzano E, Filipello F, Molteni R, Pardi R, Matteoli M "A model of the blood brain barrier to investigate immune trafficking during multiple sclerosis". In preparation

Lauranzano E, Molteni R, Filipello F, Pardi R, Matteoli M "A model of the blood brain barrier to investigate immune trafficking in neurological disorders", poster EMBL Heidelberg, Germany 24 - 26 Jul 2016

Filipello F, Pozzi D, Proietti M, Lauranzano E, Matteoli M, Verderio C, Grassi F Astrocyte-T cell interaction in multiple sclerosis, poster FISM AISM meeting, May 2016, Rome

Filipello F, Pozzi D, Proietti M, Lauranzano E, Matteoli M, Verderio C, Grassi F Astrocyte-T cell interaction in multiple sclerosis, poster FISM AISM meeting, 28 May 2015, Rome

Filipello F, Pozzi D, Proietti M, Matteoli M, Verderio C, Grassi F Molecular and cellular mechanisms in astrocyte-T cell cross-talk, poster 9th Fens Forum of Neuroscience 5-9 July 2014, Milan

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 38.000 €

Research Fellowship funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 38,000

Bruno Gran

Division of Clinical Neuroscience, University of Nottingham, Nottingham, UK

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Clett Erridge, University of Leicester, Leicester, UK and from Jan 2017 Anglia Ruskin University, Cambridge, UK

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Leonardo Sechi, Università degli Studi di Sassari, Sassari

Ruolo dei recettori TLR2 nell'attivazione dell'infiammazione da parte di infezioni nella SM

PREMESSE E OBIETTIVI

Le infezioni sono considerate un importante fattore ambientale coinvolto nella patogenesi della sclerosi multipla (SM). I meccanismi alla base di questo coinvolgimento sono poco conosciuti, ma comprendono probabilmente il danno diretto al tessuto, il mimetismo molecolare, l'attivazione indotta da superantigeni e l'attivazione non specifica del sistema immunitario.

In studi precedenti e in un progetto pilota abbiamo identificato un potenziale nuovo meccanismo con il quale le infezioni potrebbero influenzare la SM, che abbiamo caratterizzato ulteriormente nel progetto finale. Abbiamo precedentemente dimostrato che i recettori Toll-like (TLR), componenti importanti del sistema immunitario innato, sono espressi dalle cellule T regolatrici (Tregs). In particolare, quando il recettore TLR2 viene stimolato sulle cellule Treg, le loro funzioni soppressive sono ridotte e viene indotto un fenotipo proinfiammatorio di tipo T helper 17 (Th17). Abbiamo anche dimostrato che l'espressione di TLR2 e le risposte funzionali delle cellule Treg alla stimolazione di TLR2 inizialmente caratterizzati in soggetti di controllo, sono più marcate in soggetti con sclerosi multipla recidivante remittente.

In questo studio abbiamo ipotizzato che l'attivazione di TLR2 *in vivo* contribuisca all'attivazione dell'infiammazione nella SM "liberando" le cellule Th17 dalla soppressione mediata dalle Tregs.

Il nostro primo obiettivo è stato quello di identificare nuovi agonisti di TLR2 che potrebbero avere rilevanza nella SM in vivo. Questi potrebbero derivare da una varietà di agenti infettivi, ma anche da strutture endogene che potrebbero sia stimolare direttamente TLR2 che modificare il legame dei classici ligandi al

recettore. Inoltre, abbiamo studiato la capacità di campioni di siero e urina isolati da soggetti sani e da persone con la SM (in fase di ricaduta e in remissione) di stimolare TLR2.

Il secondo obiettivo è stato quello di caratterizzare le variazioni immunologiche indotte da TLR2 che abbiamo identificato come critiche nel rapporto Treg/Th17. L'ipotesi in studio era che questi parametri potessero variare in fasi diverse della malattia. Abbiamo misurato nelle persone con SM le percentuali di cellule Treg e Th17, l'espressione di TLR2 nelle cellule CD4+ e nelle Treg, i livelli di TLR2 e TLR4 solubili nel siero e nell'urina, e i livelli di espressione genica di TLR1/2/6 nel sangue, in fase di ricaduta e di remissione della SM.

RISULTATI

Utilizzando un sistema di transfezione di cellule con TLR abbiamo identificato come potenti stimoli di TLR2 alcuni batteri gram-positivi (*S. aureus*, *S. Epidermidis*) e gram-negativi (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *P. vulgaris*). Anche *H. pylori* si è rivelato un forte agonista di TLR2. Alcuni antigeni derivanti da micobatteri hanno un moderato effetto stimolante su TLR2, ma non su TLR4.

Campioni di urine derivanti da persone con SM, sia durante la ricaduta che nella remissione della malattia, contenevano stimoli per TLR2 significativamente più potenti che nei controlli sani.

Nonostante i livelli di TLR2 e TLR4 solubili (sTLR2 e sTLR4) fossero simili nei campioni di urina di persone con SM e di soggetti sani, abbiamo rilevato un aumento di sTLR2, ma non sTLR4, nei campioni di siero dei pazienti rispetto ai controlli.

Inoltre, abbiamo osservato, utilizzando una tecnica ad alta sensibilità, che i livelli della proteina C-reat-

tiva (CRP), un marker di infiammazione molto utilizzato nella pratica clinica, sono significativamente più elevati in persone con SM in ricaduta che nei controlli. Non c'era però correlazione significativa tra i livelli di sTLR2 o sTLR4 e CRP.

Nello studio longitudinale, non abbiamo rilevato alcuna differenza tra la fase di ricaduta e di remissione di malattia nell'espressione di TLR2 da parte di linfociti CD4+ e di cellule Treg, nella percentuale di cellule T producenti IFN-gamma e all'espressione genica di TLR1/2/6.

CONCLUSIONI

Da alcuni decenni sappiamo che le infezioni sono coinvolte nella suscettibilità alla SM e possono influenzare alcuni parametri dell'attività della malattia, per esempio inducendo una ricaduta. Tuttavia, i meccanismi alla base di questi effetti restano da chiarire. In base ai nostri risultati, pensiamo che i livelli più elevati di sTLR2 nel siero di persone con SM potrebbero essere una conseguenza di un'infezione

urinaria subclinica. Anche nell'urina infatti, il livello di molecole che attivano TLR2 erano più alti nei pazienti che nei controlli. Alcuni dei batteri e antigeni batterici che abbiamo identificati come forti stimoli per l'attivazione di TLR2, sono agenti eziologici di infezioni urinarie e sono stati associati a ricadute cliniche in pazienti con la SM.

Per quanto riguarda i meccanismi biologici, è probabile che quando TLR2 è attivato da batteri associati a infezioni urinarie, o da altre strutture microbiche che inducono infiammazione, vengano attivati meccanismi di regolazione endogena che inducono il rilascio della forma solubile di TLR nelle urine, e forse nel siero, per ridurre l'infiammazione. In questo studio riportiamo la prima osservazione di alterazioni nei livelli di TLR solubili nella SM. Questi risultati suggeriscono potenziali nuovi meccanismi attraverso cui le infezioni sistemiche possono influenzare l'attivazione del sistema immunitario nella SM, favorendo l'infiammazione del sistema nervoso centrale, l'attività di malattia, e potenzialmente la sua progressione.

How do infections activate inflammation in MS? Role of TLR2

INTRODUCTION AND AIMS

Infections as an environmental factor are thought to be involved in MS susceptibility and pathogenesis; however the mechanisms for such involvement are poorly understood. Possible mechanisms include direct tissue damage, molecular mimicry, superantigen-induced activation, and bystander activation of the immune system. In previous studies and in a pilot project, we identified a potential new mechanism for the effects of infections on MS, which we wanted to further characterise in this project. We demonstrated that Toll-like receptors (TLR), key components of the innate immune system, are expressed on regulatory T cells (Tregs). When TLR2 stimuli activate Tregs, the suppressive function of such T cells is reduced and they become Th17-like cells, with proinflammatory features. We then showed that the expression of TLR2 and such impaired response of Tregs to TLR2 stimulation are more pronounced in people with RRMS than in healthy controls (HC).

Are these mechanisms relevant in vivo? This was the key question driving continuation of the study. Our general hypothesis is that TLR2 activation in vivo could contribute to triggering inflammation in MS

by releasing Th17 effector cells from Treg-mediated suppression.

Our first specific aim was to identify new agonists of TLR2 which could have relevance to MS in vivo. These could be derived from a variety of infectious agents, but also from self-structures which could either directly stimulate TLR2 or modify the binding of 'canonical' ligands to the receptor. We further tested whether the urine and serum samples from MS patients during relapse and remission could stimulate TLR2 and compared them with those from HC.

Our second specific aim was to characterise immunological fluctuations of the parameters we have defined as critical to the effect of TLR2 stimuli on Treg/Th17 balance. We tested the hypothesis that immunological parameters of interest would fluctuate in relation to relapses and remissions. We measured the percentage of Tregs and Th17 cells, the expression of TLR2 on CD4+ T cells and Tregs, the level of soluble TLR2 (sTLR2) and sTLR4 in the serum and urine from MS patients, and the level of TLR1/2/6 gene expression in blood samples from MS patients during relapse and remission.

RESULTS

We used a well-established TLR transfectant-based reporter assay to identify heat-inactivated Gram-positive (*S. aureus*, *S. Epidermidis*) and Gram-negative (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *P. vulgaris*) bacteria as potent TLR2 stimulants. *H. pylori* lysate was also a strong TLR2 agonist. Selected mycobacterial antigens had moderate TLR2 stimulating potentials. The same stimuli failed to activate TLR4. Interesting, urine samples from MS patients contained significantly higher TLR2 stimulants than HC, during both relapse and remission.

Although sTLR2 and sTLR4 levels were similar in urine samples from MS patients and HC, we found an increase detection of sTLR2, but not sTLR4, in the serum samples from MS patients both during relapse and remission compared to those from HC. We also found that the serum level of C-reactive protein (CRP), detected with a high-sensitivity technique, was significantly higher in MS patients during relapse than in HC; however, there was no significant correlation between sTLR2 / sTLR4 and CRP levels.

In the longitudinal studies, there was no significant difference in the expression of TLR2 in CD4+ T cells and Tregs, between relapse and remission. Moreover, there were no significant differences in the percentage of IFN-gamma producing T cells between relapse and remission. As well, we found no significant difference between the gene expression

of TLR1/2/6 between relapse and remission blood samples from MS patients.

CONCLUSIONS

These studies are relevant to MS as for decades we have known that infections are involved in susceptibility to disease and can influence parameters of disease activity, for example they can trigger relapses. The mechanisms underlying such effects are incompletely understood. Based on our results, we believe that the higher levels of sTLR2 in MS patients could be a consequence of subclinical UTI. This is consistent with the observed higher levels of TLR2 stimulants observed in urine samples from MS patients. Some of the bacteria and bacterial antigens identified as strong stimulants for TLR2 are also associated with triggering MS relapses and contribute to UTI in MS patients. Mechanistically, when TLR2 is activated by UTI-related bacteria (or other microbial structures leading to inflammation), spontaneous endogenous regulatory mechanisms are activated that induce the release of soluble form of TLRs in urine, and possibly serum, to dampen the inflammation. This is the first report showing soluble TLRs changes in MS. Together, these results identify potential novel mechanisms by which systemic infections can influence activation of the immune system in MS and therefore, CNS inflammation, disease activity, and potentially progression.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Hossain MJ, Morandi E, Tanasescu R, Erridge C, Gran B. Soluble Toll-like receptor 2 (sTLR2) is elevated in the serum of patients with relapsing remitting multiple sclerosis (Manuscript in preparation)

Hossain MJ, Tanasescu R, Gran B. Innate immune regulation of autoimmunity in multiple sclerosis: Focus on the role of Toll-like receptor 2. *J Neuroimmunol*. 2016. pii: S0165-5728(16)30448-9

Fallarino F, Gargaro M, Mondanelli G, Downer EJ, Hossain MJ, Gran B. Delineating the Role of Toll-Like Receptors in the Neuro-inflammation Model EAE. *Methods Mol Biol*. 2016;1390:383-411

Hossain MJ, Tanasescu R, Gran B. TLR2: an innate immune checkpoint in multiple sclerosis. *Oncotarget*. 2015;6(34):35131-2

Nyirenda MH, Morandi E, Vinkemeier U, Constantin-Teodosiu D, Drinkwater S, Mee M, King L, Podda G, Zhang GX, Ghaemmaghami A, Constantinescu CS, Bar-Or A, Gran B. Toll-like receptor 2 stimulation regulates the balance between Treg and Th17 function: a novel mechanism of reduced Treg function in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2015; 194(12):5761-74

Hossain MJ, Morandi E, Tanasescu R, Sechi LA, Faraj TA, Erridge C, Gran B. Characterization of new infectious ligands for Toll-like receptor 2 : Relevance for multiple sclerosis. Joint British Society for Immunology and Dutch Society for Immunology (BSI and NVVI) Annual Congress. Liverpool, UK; 6-9 Dec, 2016

Hossain MJ, Morandi E, Tanasescu R, Sechi LA, Faraj TA, Erridge C, Gran B. Role of Toll-like receptor 2 in mediating infection and inflammation in multiple sclerosis. 32nd Congress of the European Committee on Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), London, 14-17 Sept, 2016. *Mult Scler*. 2016. vol. 22 no. 3 suppl 88-399 (p.183)

Hossain MJ, Morandi E, Tanasescu R, Sechi LA, Faraj TA, Erridge C, Gran B. Role of Toll-like receptor 2 in mediating infection and inflammation in multiple sclerosis. 13th International Congress of Neuroimmunology (ISNI), Jerusalem, Israel, 26-29 Sept, 2016

Hossain MJ, Morandi E, Tanasescu R, Faraj TA, Erridge C, Gran B. Role of Toll-like Receptor 2 in Mediating Infection and Inflammation in Multiple Sclerosis. 5th Tykeson Fellows Conference on Multiple Sclerosis. Fort Worth, Texas, USA; 4-7 Nov, 2015

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 10 mesi) e l'ammontare di 126.550 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 10 months) and the amount of € 126,550

Ada Maria Tata

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin, Sapienza Università di Roma, Centro di Ricerca in Neurobiologia Daniel Bovet, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Maria Di Bari, Giovanni Di Pinto, Viviana Orlando, Sabrina Galizia

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Marcella Reale, Valentina Gatta, Marta Di Nicola, Università degli Studi di Chieti-Pescara “G. D’Annunzio”, Chieti

Guadalupe Mengod, Rocio Martin-Alvarez, IIBB-CSIC, IDIBAPS, CIBERNED, Barcelona, Spain

Claudio Gasperini, Serena Ruggieri, Ospedale S. Camillo-Forlanini, Roma

Relazione tra alterazione del sistema colinergico e l’infiammazione nella sclerosi multipla: studi in topi ESA e in pazienti in fase recidivante/remittente

PREMESSE E OBIETTIVI

L’Acetilcolina (ACh) è un neuromodulatore in grado di modulare la neuroinfiammazione. L’ACh può modulare anche il sistema immunitario grazie ad un meccanismo denominato “pathway colinergico anti-infiammatorio”. È stato infatti dimostrato che linfociti e macrofagi sintetizzano e degradano ACh mediante gli enzimi colinacetiltransferasi (ChAT) e acetilcolinesterasi (AChE) e butirrilcolinesterasi (BuChE), rispettivamente. I recettori colinergici muscarinici e nicotinici modulano in modo differente i processi immunitari e infiammatori stimolando la produzione di citochine pro- e anti- infiammatorie. Considerando le proprietà immuno-modulatorie dell’ACh, è apparso interessante valutare il ruolo del sistema colinergico nella sclerosi multipla (SM). Nostri precedenti studi avevano dimostrato che i livelli di ACh nel siero e nel *liquor* di pazienti con SM recidivante remittente (RR-SM) risultavano significativamente più bassi rispetto ai donatori sani (HD). Allo scopo di chiarire le cause determinanti i ridotti livelli di ACh in persone SM, il nostro primo scopo è stato quello di analizzare in una ampia coorte di pazienti, l’espressione dei marcatori colinergici nelle cellule polimorfonucleate (PBMC) e l’attività enzimatica degli enzimi degradativi nel siero di pazienti RR-SM e HD. Abbiamo poi analizzato la relazione tra i livelli di ACh e dei suoi enzimi idrolitici e le citochine pro-infiammatorie. Inoltre abbiamo anche analizzato l’espressione e l’attività dei recettori ni-

cotinici. Il secondo obiettivo è stato quello di studiare i polimorfismi per i geni degli enzimi AChE e BuChE. Infine, abbiamo studiato l’espressione e la distribuzione di marcatori colinergici nel cervello di topi ESA comparando i livelli di espressione nei topi in fase recidivante e remittente.

RISULTATI

Il primo obiettivo della nostra ricerca è stato studiare l’espressione di marcatori colinergici nel siero e nelle PBMC di pazienti SM in fase recidivante-remittente che non avevano ricevuto nessun trattamento farmacologico e che fossero non fumatori. Nel siero di questi pazienti noi abbiamo confermato la presenza di bassi livelli di ACh rispetto a soggetti HD e che questi livelli erano inversamente correlati con alti livelli di attività enzimatica per gli enzimi AChE e BuChE. Inoltre abbiamo evidenziato che gli alti livelli di attività enzimatica si correlavano con alti livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-17, IL-18, IL-12/IL-23p40 e TNF- α). L’analisi di espressione dei livelli di trascritto per l’enzima biosintetico ChAT e per i due trasportatori di membrana coinvolti nel rilascio di ACh (mediatofofo e OCTN-1) non sembrano alterati. Questi risultati ci fanno ipotizzare che: 1. i bassi livelli di ACh potrebbero influenzare la risposta anti-infiammatoria nei pazienti SM, 2. che l’alterata risposta immunitaria e infiammatoria non sarebbero dovuti ad un difetto di sintesi o rilascio di ACh, ma bensì ad una alterata idrolisi. Inol-

tre, come da noi dimostrato, anche l'attività dei recettori nicotinici non sembra alterata; infatti quando le PBMC ottenute da persone SM e HD vengono stimulate con agonisti nicotinici, si osserva una ridotta espressione e produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β e IL-17). Ciò che rimane da capire è come mai l'attività degli enzimi degradativi dell'ACh risultino aumentati nella SM.

Abbiamo genotipizzato 102 pazienti SM e 117 HD per due varianti degli enzimi AChE e BuChE. L'analisi genetica per il polimorfismo AChE rs2571598 ha rilevato che sebbene il polimorfismo T>C non sembra direttamente correlato con gli aumentati livelli di attività enzimatica, tuttavia esso risulta associato a un maggior rischio per la SM (OR=2). Analogamente anche il polimorfismo BuChE rs1803274 risulta diversamente espresso nei pazienti SM rispetto agli HD. Questi studi suggeriscono che i due polimorfismi studiati potrebbero essere due nuovi geni di suscettibilità per la SM. Infine gli studi sul modello ESA ha permesso di dimostrare una ridotta espressione

di tutti i marcatori colinergici in diverse aree cerebrali di topi in fase recidivante rispetto a quelli in fase remittente. Inoltre abbiamo osservato che gli enzimi idrolizzanti l'ACh sono espressi in cellule gliali (astrociti e microglia), suggerendo che queste cellule possono contribuire ai ridotti livelli di ACh.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano per la prima volta una correlazione inversa tra l'attività enzimatica degli enzimi degradativi e i livelli di ACh nel siero e nelle PBMC di pazienti SM, suggerendo che i ridotti livelli di ACh potrebbero mantenere lo stato infiammatorio e così contribuire alla patogenesi della SM. Inoltre, gli studi genetici hanno per la prima volta individuato due nuovi possibili geni di suscettibilità per la SM. Pertanto tutto questo suggerisce che il ripristino della corretta omeostasi dell'ACh, sia nel sistema immunitario che nel sistema nervoso centrale, potrebbe rappresentare una nuova prospettiva terapeutica per la SM.

Relationship between cholinergic dysfunction and inflammation in multiple sclerosis: studies in EAE mice and RRMS patients

INTRODUCTION AND AIMS

Acetylcholine (ACh) is one of the endogenous molecules with neuroprotective effects; its ability in the neuroinflammation modulation has been described. ACh can modulate the immune system by a mechanism identified as "non-neuronal cholinergic anti-inflammatory pathway". In fact, it has been demonstrated that lymphocytes and macrophages synthesize and degrade ACh by cholinergic enzymes cholineacetyltransferase (ChAT), acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). Muscarinic and nicotinic receptors differently modulate immunological and inflammatory processes stimulating pro- and anti-inflammatory cytokines, respectively. Considering the immunoregulatory property of ACh, it appears interesting to evaluate the role of cholinergic system in multiple sclerosis (MS). Our previous studies demonstrated that ACh levels in sera and cerebrospinal fluid (CSF) of RR-MS patients was lower than in control subjects (HD). In order to explain the reasons of altered levels of ACh in MS patients, the first goal was to

investigate in a large cohort of MS patients, the expression of cholinergic markers in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and the activity of hydrolyzing enzymes in serum. Then we have analyzed the relationship between levels of ACh and its hydrolyzing enzymes and pro-inflammatory cytokines. Moreover, we have also analyzed the expression and activity of nicotinic receptors in PBMC of MS patients and HD. The second goal has been to study the possible genetic polymorphisms of the genes coding the hydrolyzing enzymes AChE and BuChE. Finally we have studied the expression and distribution of cholinergic markers in the brain of EAE mice comparing their levels of expression during the relapse and remitting phase.

RESULTS

The first objectives of our research has been studied the expression of cholinergic markers in serum and PBMC of a cohort of RRMS patients that have not received any pharmacological treatment and that were non-smoking. In the serum of these patients

we have observed that the low levels of ACh was accompanied by higher levels of the AChE and BuChE activity compared to HD. Interestingly increased BuChE and AChE activity matches with higher levels of pro-inflammatory cytokines (i.e. IL17, IL-18, IL-12/IL-23p40 and TNF α). The analysis of expression of the transcript levels of ACh biosynthetic enzyme ChAT and of two cholinergic membrane transporters involved in ACh release (i.e. mediatophore and OCTN-1) did not appear defective. These data allow us to hypothesize that the low ACh levels may influence the inability of MS patients to promptly counteract the inflammation. The altered immune response not seems dependent neither on a defect of ACh synthesis and release, or on the lack of activity and expression of nicotinic receptors. In fact, we have demonstrated that the nicotinic receptors are expressed in PBMC of RR-MS patients and their stimulation negatively modulates pro-inflammatory cytokines. The important question that remains to explain is why the expression and activity of ACh hydrolyzing enzyme is increased in MS patients. The genetic analysis for AChE rs2571598 polymorphism was assessed to determine whether AChE allelic variations might represent a factor of risk for MS. We genotyped 102 MS patients and 117 HD. The AChE genotype frequencies were consistent with Hardy Weinberg equilibrium (Chi-squared test P value>0.05) and demonstrate that the T>C polymorphism was associated with the increased

risk for SM and with increased AChE serum levels. Interestingly we also found that BuChE rs1803274 polymorphism (A>G) is differently expressed in MS patients compared to HD. These results suggest that these polymorphisms might confer a susceptibility to inflammation in the MS patients. The study in the EAE model has allowed to demonstrate a more decreased expression of cholinergic markers in brain of relapse mice compared to remitting ones. Moreover we found a good co-localization of ACh hydrolyzing enzymes with glial markers, suggesting that glial cells (astrocytes and microglia) are able to produce AChE and BuChE, contributing to the decreased levels of ACh in the brain.

CONCLUSIONS

The results obtained demonstrate for the first time an inverse correlation between cholinergic hydrolyzing enzyme activity and ACh levels in serum of RR-MS patients suggesting that the dysregulation of ACh levels may contribute to the pathogenesis of MS, maintaining the pro-inflammatory state both in immune cells and in central nervous system. Moreover, our genetic studies have highlight two new genes of susceptibility that may play a relevant role in the MS pathogenesis. The reestablishment of the correct ACh homeostasis inhibiting of ACh hydrolysis or stimulating nicotinic receptors both in the immune system and in the brain, might represent a new interesting therapeutic perspective for MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Reale M, Di Bari M, Di Nicola M, D'Angelo C, De Angelis F, Velluto L, Tata AM. Nicotinic receptor activation negatively modulates pro-inflammatory cytokine production in multiple sclerosis patients. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(1):152-157

Di Bari M, Reale M, Di Nicola M, Orlando V, Galizia S, Porfilio I, Costantini E, D'Angelo C, Ruggieri S, Biagioni S, Gasperini C, Tata AM. Dysregulated Homeostasis of Acetylcholine Levels in Immune Cells of RR-Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12). pii: E2009

Di Bari M, Di Pinto G, Reale M, Mengod G, Tata AM. Cholinergic system and neuroinflammation: implication in multiple sclerosis. (Review) *CNS Agents in Med Chem*, 2017, 17: 1-7

Di Pinto G, Di Bari M, Martin-Alvarez R, Sperduti S, Gatta V, Tata AM and Mengod G. Comparative study of the cholinergic system in the CNS of experimental autoimmune encephalomyelitis mice: relapsing vs remitting phase. 2017 (submitted)

Gatta V, D'Aurora M, Franchi S, Di Nicola M, Orlando V, Ruggieri S, Gasperini C, Reale M, Tata AM. Association between AChE/BuChE Gene Polymorphisms and Susceptibility to MS in central Italy population. 2017 (manuscript in preparation)

Reale M, Di Bari M, D'Angelo C., Costantini E., De Angelis F, Orlando V, Di Nicola M, Biagioni S, Tata AM. Inflammatory cytokines and cholinergic system dysfunction in multiple sclerosis patients. *Neurodegen Dis*. 2015, 15 (suppl 1): 1732

Di Pinto G, Sperduti S, Martin Alvarez R, Gatta V, Tata AM and Mengod G. Analysis of the cellular expression of cholinergic markers in the central nervous system of EAE mice by in situ hybridization and enzymatic histochemistry " *Europ. J. Histochem*. 2015, vol 59 suppl I: 7

Di Bari M, Di Pinto G, Sperduti S, Galizia S, Martin-Alvarez R, Di Nicola M, D'Angelo C, Orlando V, Mengod G, Gatta V, Reale M, Tata AM. Cholinergic system alterations in multiple sclerosis: studi in RR-MS patients and in EAE mouse. *Neuroimmunopharmacol* 2015; DOI 10.1007/s11481-015-9649-2: P08

Reale M, Di Bari M, De Angelis F, Orlando V, Velluto L, Di Nicola M, Biagioni S, Tata AM. Cholinergic system dysfunction in multiple sclerosis patients: implication in the modulation of the inflammatory response. 3rd Annual meeting of non –neuronal cholinergic system. 28-30 August, 2014, Giessen (Germany)

Di Pinto G, Sperduti S, Martin-Alvarez R, Gatta V, Tata AM, Mengod G. Analysis of the expression of cholinergic markers in the central nervous system of EAE mice by in situ hybridization and enzymatic histochemistry. 36° Meeting of Italian Society of Histochemistry. 7-10 Giugno, 2015. Pisa (Italy)

Reale M, Di Bari M, Galizia S, D'Angelo C, Costantini E, Di Nicola M, Tata AM. Effects of nicotine on IL-1b and IL-17 production inPBMC of multiple sclerosis patients. 4th european Congress of Immunology. 6-9 September, 2015, Vienna (Austria)

Di Bari M; Di Pinto G, Sperduti S, Galizia S, Martin-Alvarez R, Di Nicola M, D'Angelo C, Orlando V, Mengod G, Gatta V, Reale M, Tata AM. Cholinergic system alterations in multiple sclerosis: studies in RR-MS patients and in EAE model. Italian Society of Neuroscience (SINS), 8-11 October, 2015, Cagliari (Italy)

Costantini E, Reale M, D'Angelo C, Di Nicola M, Tata AM, Di Bari M. Reduction of IL-1b and IL-17 in nicotine-treated PBMC of multiple sclerosis patients. X Meeting of Autoimmunity. 6-10 April, 2016, Lipsia (Germany)

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 133.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 133,000

Claudio Sette

Laboratorio di Neuroembriologia, Fondazione Santa Lucia, Roma
Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Università Tor Vergata, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Chiara Naro, Alessia Capone, Manuela Bianco, Gabriella Ruocco

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Elisabetta Volpe, Luca Battistini, Laboratorio di Neuroimmunologia,
Fondazione Santa Lucia, Roma

Diego Centonze, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università Tor Vergata, Roma

Coinvolgimento della via di segnale IL-1 β /MyD88 nel differenziamento delle cellule umane Th17 patogene nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Il nostro progetto di ricerca consisteva nello studiare il ruolo di una molecola coinvolta nell'infiammazione, chiamata interleuchina (IL)-1 β , nella generazione di un sottotipo di linfociti, cosiddetti T helper (Th)17, noti per il loro ruolo patogenico nella sclerosi multipla (SM). Infatti, è stato già dimostrato che le cellule Th17 sono in grado di sviluppare la encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA) nei topi, considerato il modello della patologia della SM, e che l'assenza della molecola IL-1 β impedisce lo sviluppo della patologia ESA. Sebbene la molecola IL-1 β sia importante anche per la generazione delle cellule Th17 umane, non sono mai stati fatti degli studi dettagliati per evidenziare il ruolo patogenico della IL-1 β e delle cellule Th17 umane nel contesto della SM. Quindi gli obiettivi del nostro progetto di studio erano:

- 1) Identificare i geni e le famiglie di geni espressi durante la generazione delle cellule Th17 umane, e identificare quali di questi sono regolati dalla molecola IL-1 β .
- 2) Studiare la funzione dei geni selezionati nel primo obiettivo di studio.
- 3) Analizzare l'espressione dei geni selezionati nel primo obiettivo di studio nelle cellule Th17 derivate dai pazienti con SM.

RISULTATI

Il nostro studio ha portato al raggiungimento dei tre obiettivi di partenza. In particolare, abbiamo generato cellule Th17 umane da linfociti del sangue di donatori sani attraverso la stimolazione con un

cocktail infiammatorio (IL-1 β , IL-6, IL-23 e TGF- β). In questo modo abbiamo simulato quello che avviene in un paziente con SM i cui linfociti vengono in contatto con un ambiente altamente infiammatorio. Per studiare il ruolo della molecola IL-1 β abbiamo paragonato le cellule stimulate con il cocktail infiammatorio completo a quelle stimulate con il cocktail mancante della IL-1 β . Quindi abbiamo studiato l'espressione di tutti i geni presenti nel genoma umano di queste cellule e abbiamo evidenziato molti nuovi geni e famiglie di geni che sono importanti per la generazione delle cellule Th17 umane e che sono regolati da IL-1 β .

Per motivi di tempo e di fondi a disposizione abbiamo dovuto focalizzare, al momento, la nostra attenzione su alcuni geni specifici. Per restringere la scelta, abbiamo effettuato delle dettagliate analisi bioinformatiche per selezionare i geni regolati nel tempo e in ampiezza durante il differenziamento delle cellule Th17, e per i quali IL-1 β svolgesse un ruolo regolatorio. È stato interessante notare che alcuni di questi geni appartengono a famiglie di fattori e cofattori della trascrizione, che codificano per proteine che a loro volta regolano l'espressione di altri geni. La loro espressione, quindi, potrebbe essere cruciale per la regolazione di altre proteine coinvolte nella patogenesi della SM mediata dalle cellule Th17. Di questi geni abbiamo studiato la funzione mediante esperimenti di "silenzamento" inibendo la loro espressione nelle cellule Th17. Abbiamo osservato che le cellule Th17 che si generano in queste condizioni hanno caratteristiche alterate rispetto alle cel-

lule Th17 con i geni funzionanti, ad esempio esse producono minori quantità della molecola IL-17. Inoltre, abbiamo analizzato l'espressione di questi geni nelle cellule Th17 dei pazienti con SM e abbiamo trovato che anch'esse esprimono alti livelli di questi geni. Questo indica che i nuovi geni identificati in questo progetto sono importanti per l'attività infiammatoria delle cellule Th17 nella SM.

CONCLUSIONI

In conclusione abbiamo identificato nuovi meccanismi che portano alla generazione dei linfociti Th17. Poiché la loro caratterizzazione e i meccani-

smi che portano alla loro generazione non sono ancora del tutto noti, questi risultati hanno importanti ricadute nell'ambito scientifico perché contribuiscono a migliorare la conoscenza di queste cellule, e del loro ruolo patogenico nella SM.

Tali risultati possono anche avere importanti ricadute a medio termine in ambito clinico perché i livelli di espressione di questi geni potrebbero essere associati al grado di malattia e, qualora ci fosse una correlazione, potrebbero essere usati come biomarcatori. Inoltre, l'inibizione farmacologica dei geni identificati in questo progetto potrebbe aiutare a combattere l'infiammazione dei pazienti con SM.

Implication of the IL-1 β /MyD88 pathway in the differentiation of human Th17 pathogenic cells in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

In this project we have investigated the role of interleukin (IL)-1 β , a molecule involved in inflammation, during the generation process of T helper (Th) 17, a subset of lymphocytes that are known for their pathogenic role in multiple sclerosis (MS). Indeed, it was already shown that Th17 cells are able to develop experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the mouse model for MS pathology, and that the absence of IL-1 β molecule prevents the development of EAE. Although the IL-1 β molecule is also important for the generation of human Th17 cells, its pathogenic role in the context of Th17 cells and MS has never been studied in detail. Therefore, the objectives of our study project were as follows:

- 1) to identify all the genes and gene families that are expressed during generation of human Th17 cells, and regulated by IL-1 β molecule.
- 2) to study the function of selected genes identified in Aim one and their role in MS pathology.
- 3) to analyze the expression of these selected genes in Th17 cells of MS patients.

RESULTS

Our study has covered the main aspects of the three initial objectives. Specifically, we have generated human Th17 cells from blood lymphocytes of healthy donors by stimulation with an inflammatory cocktail (IL-1, IL-6, IL-23 and TGF- β), mimicking what happens in MS patients whose lymphocytes

interact with a highly inflammatory environment. In order to investigate the role of IL-1 β molecule, we compared the cells stimulated with the full inflammatory cocktail with those stimulated with the cocktail lacking IL-1 β . Next, we measured which genes are expressed by these cells and their levels, allowing us to identify many new genes and gene families that are important for the generation of human Th17 cells and that are regulated by IL-1 β . Our genome-wide analysis has confirmed the expression of genes previously known for their role in Th17 differentiation, thus validating the reliability of our approach, but it has also identified many genes and pathways that had not been implicated in this process so far, thus opening new paths for future studies on Th17 cell physiology and pathological implications.

Due to time and funds limitations we had to focus on only few of the novel genes identified in our analyses. To restrict the choice, we performed detailed bioinformatics analyses to select genes regulated in time and potency during Th17 differentiation, for which IL-1 β played a regulatory role. Notably, some of these genes belong to families of transcription factors and cofactors, which code for proteins that regulate the expression of other genes. We have confirmed their expression by quantitative PCR on additional samples. Moreover, "silencing experiments" in which their expression was reduced during Th17 differentiation indicated that they play a role in this process. For ex-

ample they produce smaller amounts of IL-17 molecule when these transcription factors are inhibited. We additionally analyzed their expression levels in Th17 cells of MS patients and found that they are expressed, indicating that the new genes we identified in this project are important for the inflammatory activity of Th17 cells in MS *in vivo*.

CONCLUSIONS

In conclusion, we have identified new mechanisms involved in the generation of Th17 cells. Since their characterization and the mechanisms leading to

their generation are not fully understood yet, these findings have important implications in facilitating our understanding of the function of Th17 and their pathogenic role in MS.

These results also have important medium-term effects in the clinical setting because the expression levels of these genes could be associated with the degree of illness and, if there is such a correlation, they may become valuable bio-markers of the disease. Moreover, pharmacological inhibition of the genes we identified in this project could help limiting the inflammatory status of MS patients.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Bianco M, De Bardi M, Battistini L, Centonze D, Volpe E, Sette C. Crucial role of IL-1 β /IL-1R in the fine-tune modulation of Th17 features in Multiple Sclerosis. ISNI Neuroimmunology Meeting, 11-14 June 2015, Crete, Greece

Volpe E, Bianco M, Naro C, De Bardi M, Battistini L, Sette C. AINI 2016 Genome-wide analysis reveals a unique transcriptional signature regulated by interleukin-1 β during differentiation of T helper 17 cells. XXV AINI Congress, 11-14 May 2016, Lecce

Bianco M, Ruocco G, De Bardi M, Battistini L, Ruggieri S, Gasperini C, Centonze D, Salvetti M, Sette C, Volpe E. Crucial role of Interleukin-1 β /Interleukin-1 receptor axis in modulation of T helper 17 features in Multiple Sclerosis. XXV AINI Congress, 11-14 May 2016, Lecce

Volpe E, Bianco M, Naro C, Ruocco G, Capone A, De Bardi M, Ruggieri S, Gasperini C, Centonze D, Salvetti M, Battistini L, Sette C. Implication of the IL-1 β /MyD88 pathway in the differentiation of human Th17 pathogenic cells in multiple sclerosis. Congresso Scientifico Annuale FISM 25-27 May 2016, Roma

Volpe E, Bianco M, Naro C, Capone A, De Bardi M, Battistini L, Sette C. Genome-wide analysis reveals a unique transcriptional signature regulated by interleukin-1 β during differentiation of T helper 17 cells. 13th International Congress of Neuroimmunology 26-29 September 2016 Jerusalem, Israel

Di Mitri D, Sambucci M, Loiarro M, De Bardi M, Volpe E, Cencioni MT, Gasperini C, Centonze D, Sette C, Akbar AN, Borsellino G, Battistini L. The p38 mitogen-activated protein kinase cascade modulates T helper type 17 differentiation and functionality in multiple sclerosis. *Immunology*. 2015 Oct;146(2):251-63

Ruocco G, Rossi S, Motta C, Macchiarulo G, Barbieri F, De Bardi M, Borsellino G, Finardi A, Grasso MG, Ruggieri S, Gasperini C, Furlan R, Centonze D, Battistini L, Volpe E. T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis. *Clin Sci (Lond)*. 2015 Aug;129(4):291-303

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di € 95.000

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 3 months) and the amount of € 95,000

La ricerca

sulla

**sclerosi
multipla**

**VERSO NUOVI
TRATTAMENTI**

TOWARDS NEW TREATMENTS

Federica Eva Esposito

Laboratorio di Genetica Umana delle Malattie Neurologiche, Istituto di Neurologia Sperimentale e Divisione di Neurologia, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Laura Ferrè, Maria Assunta Rocca, Ferdinando Clarelli, Giorgio Valentini, Vittorio Martinelli, Massimo Filippi, Giancarlo Comi, Filippo Martinelli Boneschi

Un modello predittivo di risposta a fingolimod: integrazione di clinica, neuroradiologia e genetica

PREMESSE E OBIETTIVI

Negli ultimi anni, notevoli progressi sono stati effettuati nel trattamento della sclerosi multipla (SM), con un significativo aumento dei farmaci disponibili. Tuttavia, la risposta alle terapie è altamente variabile tra i pazienti e si rende sempre più necessario un trattamento personalizzato, che possa ottimizzare i benefici, migliorando i risultati a lungo termine.

Fingolimod è il primo farmaco orale approvato per il trattamento dell'SM ed agisce sequestrando le cellule infiammatorie nei linfonodi, riducendone il passaggio in circolo.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare in modo integrato il contributo di dati clinici, neuroradiologici e genetici nel determinare la risposta a fingolimod.

RISULTATI

Sono stati inclusi nello studio 367 persone con SM che hanno iniziato la terapia con fingolimod presso il centro SM dell'Ospedale San Raffaele di Milano, e che sono stati seguiti per due anni dall'inizio del trattamento. Durante la terapia vi è stata una significativa riduzione del numero di ricadute e di lesioni attive alla risonanza magnetica (RM) dell'encefalo; in particolare la metà dei pazienti non ha presentato attività di malattia a due anni dall'inizio del trattamento (non ricadute, né lesioni attive o progressione di disabilità).

Abbiamo cercato di individuare i predittori di risposta alla terapia e abbiamo osservato che un maggior numero di lesioni captanti il gadolinio alla RM basale, un'età di esordio più precoce ed un elevato tasso di ricadute (ARR) nei due anni precedenti l'ini-

zio di fingolimod sono risultati associati ad un aumentato rischio di riattivazione di malattia in corso di terapia. Al contrario, i pazienti con valori elevati di vitamina D (>100 nmol/l) hanno presentato un ridotto numero di lesioni attive agli esami di RM encefalo effettuate al basale e durante il periodo di osservazione.

Al fine di individuare i fattori genetici associati alla risposta a fingolimod, è stato studiato un sottogruppo di 255 pazienti non precedentemente trattati con natalizumab, così da considerare una popolazione il più possibile omogenea. È stato inizialmente applicato un approccio gene candidato, testando geni inclusi nella "via metabolica" della sfingosina, secondo il database KEGG. Successivamente è stato effettuato uno studio di associazione su tutto il genoma, ricercando varianti genetiche associate con il tasso di ricadute, il tempo alla prima ricaduta o lo stato di risposta definito in modo dicotomico (pazienti Responsivi vs Non-Responsivi). Analizzando il tasso di ricadute, è stato osservato che un marcatore che mappa nelle vicinanze del gene MEX3B, implicato nella regolazione dei meccanismi cellulari nel sangue e nelle cellule nervose, è risultato significativamente associato alla risposta. Analogamente, altri segnali suggestivi di associazione sono stati ottenuti analizzando il tempo alla prima ricaduta e lo stato dicotomico di risposta.

Nell'ambito dello studio sono stati inoltre reclutati 48 pazienti sottoposti a prelievo prima dell'inizio della terapia e dopo sei mesi, allo scopo di individuare i cambiamenti di espressione genica indotti dal farmaco: l'espressione di molti geni coinvolti in meccanismi infiammatori è risultata essere modulata in

corso di terapia, fornendo ulteriori informazioni sulla modalità d'azione del farmaco.

Infine, al fine di definire un algoritmo predittivo di risposta a fingolimod, sono stati applicati metodi di "machine-learning"; questo approccio ha consentito di individuare un piccolo numero di varianti genetiche (da 20 a 50) in grado di predire la risposta alla terapia con elevata accuratezza. Stiamo attualmente cercando di confermare questi risultati in una casistica indipendente di pazienti.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha confermato l'efficacia di fingolimod in una numerosa coorte di persone con SM valutate nell'ambito della normale pratica clinica, mostrando come la metà dei pazienti sia libero da attività di malattia dopo due anni dall'inizio del trattamento. Lo studio ha, inoltre, permesso di identificare dei parametri clinici e neuroradiologici in grado

di predire una buona risposta al trattamento.

Le analisi condotte a livello genetico hanno consentito di identificare dei marcatori associati alla risposta al farmaco; questi dati contribuiscono ad approfondire i meccanismi molecolari coinvolti nella risposta a terapie immunomodulanti come il fingolimod e dovranno essere validati in casistiche indipendenti.

Infine, grazie all'applicazione di metodi di "machine learning", è stato identificato un sottogruppo di marcatori genetici che sembra essere in grado di predire con elevata accuratezza la risposta al trattamento. Tale "signature" necessita anch'essa di essere validata in una casistica indipendente di pazienti con SM ma, se confermata, rappresenterebbe uno strumento utilizzabile nella pratica clinica per ottimizzare la selezione dei pazienti candidati alla terapia con fingolimod, limitando l'esposizione a trattamenti inefficaci.

A predictive model of response to fingolimod: integration of clinics, neuroradiology and genetics

INTRODUCTION AND AIMS

The multiple sclerosis (MS) field has recently experienced considerable progress, with a dramatic increase in the range of treatment options; however, a substantial heterogeneity in drug response is observed in the clinical practice across MS patients. Given the potential irreversible consequences of partially effective treatments and the presence of several alternative therapeutic options, MS is a typical condition where a more personalized intervention would be highly beneficial, favorably impacting long-term clinical outcomes.

Fingolimod is the first oral drug approved for the treatment of MS and acts by causing a reversible sequestration of inflammatory cells into lymph nodes, thus reducing their circulation in the blood. The present project was aimed to assess the contribution of clinical characteristics, magnetic resonance imaging (MRI) measurements and genetic data in the response to fingolimod, integrating different levels of information in a cohort of MS patients followed at San Raffaele Hospital, Milan.

RESULTS

We enrolled 367 MS patients, who started fingolimod at San Raffaele Hospital MS center and who were followed for two years. As expected, during fingolimod treatment we observed a significant reduction in the number of relapses and active lesions at brain MRI scans; specifically, half of our patients were completely free from disease activity (they had no relapses, no active lesions nor disability progression).

When searching for baseline clinical predictors of response, we found that a higher number of enhancing lesions, a younger age at disease onset and a higher annualized relapse rate (ARR) in the two years before fingolimod were associated to an increased risk of disease reactivation under treatment. On the other hand, we observed that patients with higher vitamin D levels (>100 nmol/l) at baseline showed a lower number of active lesions at brain MRI scans performed at treatment start and during the follow-up.

In the search of genetic variants associated to response to fingolimod, we focused to the subgroup of 255 patients not previously treated with Natal-

izumab, in order to have a more homogeneous cohort. We initially adopted a candidate-gene strategy, mainly testing genes that are known to be involved in the sphingosin pathway according to the KEGG database. Then we performed a genome-wide association study, searching for genetic variants associated to ARR, time to first relapse or to a dichotomous trait (responders vs non-responders). When considering the ARR as response outcome, we found a genetic marker strongly associated with the relapse rate occurring during fingolimod treatment; this marker is close to a gene, *MEX3B*, that is involved in the regulation of cellular functions in either blood and nervous cells. Similarly, when testing the time to first relapse and the Responder/Non responder status as outcomes, we found other SNPs suggestive for association with response to fingolimod.

Within the present study, we also enrolled 48 additional subjects, who were sampled before fingolimod start and after six months, in order to assess transcriptional changes induced by the treatment; we observed that the expression of several genes involved in inflammatory activity and immune function is modulated after fingolimod start, thus providing additional information on its mechanism of action.

Finally, we applied machine-learning methods to clinical and genomic data, in order to develop a predictive algorithm of response to FTY. Using a small

number of markers (ranging from 20 to 50), we built an “algorithm” that was able to predict the response to fingolimod treatment with high accuracy. We are currently trying to confirm these findings in an independent cohort of MS patients.

CONCLUSIONS

The present study confirmed fingolimod efficacy in a large monocentric cohort, within a real-life clinical setting, with half of the patients being completely free from disease activity after two years of treatment. It also allowed identifying baseline clinical and MRI predictors of a better response under this treatment.

The genetic analyses identified some markers that seem to have a significant association with response to fingolimod; these data may contribute to provide further insight into the molecular mechanisms underlying the response to immunomodulant therapies like fingolimod and need to be validated in additional cohorts.

Finally, thanks to the application of machine-learning methods we identified a subset of genetic markers that appear to be able to predict patients’ response with a very good accuracy. The obtained signature needs to be validated in an independent cohort of patients treated with fingolimod; nevertheless, if confirmed, it could represent a useful tool to optimize the selection of patients to be treated with fingolimod, limiting the exposure to ineffective treatment.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Esposito F, Guaschino C, Sorosina M, Clarelli F, Ferrè L, Mascia E, Santoro S, Pagnesi M, Radaelli M, Colombo B, Moiola L, Rodegher M, Stupka E, Martinelli V, Comi G, Martinelli Boneschi F. Impact of MS genetic loci on familial aggregation, clinical phenotype, and disease prediction. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015 Jul 9;2(4):e129

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

Ferrè L, Clarelli F, Sferruzza G, Rocca MA, Mascia E, Radaelli M, Sangalli F, Dalla Costa G, Moiola L, Aboulwafa M, Martinelli Boneschi F, Comi G, Filippi M, Martinelli V, Esposito F. Vitamin D levels and disease activity in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis patients treated with fingolimod. Under review in *Multiple Sclerosis Journal*

Abstracts

Esposito F, Clarelli F, Ferrè L, Sferruzza G, Radaelli M, Sangalli F, Rodegher M, Romeo M, Moiola L, Colombo B, Rocca MA, Filippi M, Martinelli Boneschi F, Comi G, Martinelli V. Clinical predictors of fingolimod response over 2-year follow-up in an Italian cohort of multiple sclerosis relapsing remitting patients. ECTRIMS 2016, 14-17 September 2016, London, UK

Mascia E, Esposito F, Provero P, Ferrè L, Clarelli F, Sferruzza G, Guaschino C, Radaelli M, Moiola L, Colombo B, Martinelli V, Comi G, Martinelli Boneschi F. Gene expression modulation induced by fingolimod in relapsing remitting multiple sclerosis. ECTRIMS 2016, 14-17 September 2016, London, UK

Esposito F, Clarelli F, Ferrè L, Mascia E, Sferruzza G, Radaelli M, Sangalli F, Rodegher M, Moiola L, Colombo B, Martinelli V, Rocca MA, Filippi M, Comi G, Martinelli Boneschi F. A candidate gene study testing the role of sphingosine pathway genes on response to fingolimod in a cohort of Italian relapsing-remitting multiple sclerosis patients. ECTRIMS 2016, 14-17 September 2016, London, UK

Ferrè L, Sferruzza G, Mascia E, Clarelli F, Dalla Costa G, Radaelli M, Sangalli F, Nuara A, Guaschino C, Rocca MA, Filippi M, Martinelli Boneschi F, Comi G, Martinelli V, Esposito F. Baseline vitamin D levels and multiple sclerosis activity in relapsing-remitting patients treated with fingolimod. ECTRIMS 2016, 14-17 September 2016, London, UK

Esposito F, Ferrè F, Keller Sarmiento I, Messina MJ, Radaelli M, Rodegher M, Rocca MA, Moiola L, Colombo B, Sangalli F, Martinelli V, Filippi M, Martinelli Boneschi F, Comi G. Predictors of response to fingolimod treatment in an Italian monocentric cohort of multiple sclerosis patients. ECTRIMS 2015, 7-10 October 2015, Barcelona, Spain

Esposito F, Clarelli F, Ferrè L, Sferruzza G, Radaelli M, Sangalli F, Rodegher M, Romeo M, Moiola L, Colombo B, Rocca MA, Filippi M, Martinelli Boneschi F, Comi G, Martinelli V. Clinical predictors of fingolimod response over 2-year follow-up in an Italian cohort of multiple sclerosis relapsing remitting patients. SIN 2016, Venezia 22-25 Ottobre 2016

Mascia E, Esposito F, Provero P, Ferrè L, Clarelli F, Sferruzza G, Guaschino C, Radaelli M, Moiola L, Colombo B, Martinelli V, Comi G, Martinelli Boneschi F. Gene expression modulation induced by fingolimod in relapsing remitting multiple sclerosis. SIN 2016, Venezia 22-25 Ottobre 2016

Esposito F, Clarelli F, Ferrè L, Mascia E, Sferruzza G, Radaelli M, Sangalli F, Rodegher M, Moiola L, Colombo B, Martinelli V, Rocca MA, Filippi M, Comi G, Martinelli Boneschi F. A candidate gene study testing the role of sphingosine pathway genes on response to fingolimod in a cohort of Italian relapsing-remitting multiple sclerosis patients. SIN 2016, Venezia 22-25 Ottobre 2016

Ferrè L, Sferruzza G, Mascia E, Clarelli F, Dalla Costa G, Radaelli M, Sangalli F, Nuara A, Guaschino C, Rocca MA, Filippi M, Martinelli Boneschi F, Comi G, Martinelli V, Esposito F. Baseline vitamin D levels and multiple sclerosis activity in relapsing-remitting patients treated with fingolimod. SIN 2016, Venezia 22-25 Ottobre 2016

Esposito F, Ferrè L, Keller Sarmiento I, Rodegher M, Messina MJ, Rocca MA, Moiola L, Colombo B, Sangalli F, Filippi M, Martinelli Boneschi F, Martinelli V, Comi G. Predictors of response to fingolimod treatment in an Italian monocentric cohort of multiple sclerosis patients. SIN 2015, Genova 10-13 Ottobre 2015

Esposito F, Ferrè L, Radaelli M, Clarelli F, Sferruzza G, Sangalli F, Rodegher M, Messina MJ, Moiola L, Colombo B, Rocca MA, Filippi M, Martinelli Boneschi F, Comi G, Martinelli V. Clinical efficacy of fingolimod and identification of predictors of relapses in an Italian cohort of multiple sclerosis patients. EAN 2016, 28-31 May 2016, Copenhagen, Denmark

Esposito F, Clarelli F, Ferrè L, Mascia E, F, Sferruzza G, Keller Sarmiento I, Radaelli M, Sangalli F, Rodegher M, Messina MJ, Moiola L, Colombo B, Martinelli V, Rocca MA, Filippi M, Comi G, Martinelli Boneschi F. Investigation of the role of sphingosine pathway genes on response to fingolimod in a cohort of relapsing remitting multiple sclerosis patients. . EAN 2016, 28-31 May 2016, Copenhagen, Denmark

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 10 mesi) e l'ammontare di 175.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 10 months) and the amount of € 175,000

Maria Pia Abbraccio

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DisFeB), Università degli Studi di Milano, Milano

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

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

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Claudia Martini, Maria Letizia Trincavelli, Simona Daniele, Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Pisa, Pisa

Nico Mitro e Donatella Caruso, DiSFeB, Università degli Studi di Milano, Milano

Roberto Furlan, Neuroimmunologia Clinica, Ospedale San Raffaele, Milano

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

PREMESSE E OBIETTIVI

Il nostro progetto risponde alla necessità di sviluppare terapie rimielinizzanti per la sclerosi multipla (SM) partendo da dati precedenti sull'importanza di GPR17, recettore presente sulla membrana dei precursori oligodendrogliali (OPC), nella loro maturazione a cellule mielinizzanti. Ligandi per GPR17 potrebbero favorire la rimielinizzazione, rappresentando una nuova importante opportunità terapeutica.

Scopi specifici:

- svelare i meccanismi alla base del differenziamento oligodendrogliale indotto da GPR17;
- identificare i segnali che accendono e spengono GPR17 durante il differenziamento;
- verificare eventuali alterazioni del recettore nella SM.

RISULTATI

Svelare i meccanismi alla base del differenziamento oligodendrogliale indotto da GPR17

GPR17 è normalmente presente negli oligodendrociti immaturi (pre-OL), ma deve scomparire affinché le cellule completino la loro maturazione. Abbiamo innanzitutto svelato alcuni dei meccanismi responsabili dello spegnimento spontaneo di GPR17 durante il differenziamento: GPR17 viene spento da enzimi noti come GRK, a loro volta regolati dalla famiglia di mTOR. Come GRK e mTOR fossero legati l'un l'altro nel regolare GPR17 era ancora del tutto sconosciuto. Ora sappiamo che queste due famiglie di enzimi sono interconnesse fra di loro da

Mdm2, che quindi emerge come nuovo potenziale bersaglio nell'oligodendrogenesi. Inoltre, abbiamo mostrato che "forzando" la presenza di GPR17 nei pre-OL, queste cellule si bloccano ad uno stadio immaturo che impedisce la mielinizzazione. Questi dati sono particolarmente interessanti poiché GRK2 è disregolata nelle persone con SM.

Identificare i segnali che accendono e spengono GPR17 durante il differenziamento

Avevamo già mostrato che il medium pre-esposto a cellule nervose contiene fattori che spingono gli OPC ad "accendere" GPR17. Mostriamo ora che uno di questi fattori è il glutammato, noto trasmettitore che rilasciato dai neuroni potrebbe dare il via alla mielinizzazione. Mostriamo anche che due ormoni, Insulina e Insulin-like Growth Factor, potrebbero partecipare allo spegnimento di GPR17 nei pre-OL subito prima della mielinizzazione. È interessante notare che questi fattori attivano vie intracellulari connesse con mTOR (si veda sopra), suggerendo che possano iniziare segnalazioni che attraverso quest'ultimo contribuiscono a spegnere GPR17. Infine, abbiamo identificato un nuovo microRNA (miR-125a-3p) che partecipa alla regolazione di GPR17. I microRNA sono regolatori degli RNA messaggeri (mRNA), segnali che dal nucleo vanno al citoplasma dove indirizzano la sintesi delle proteine. miR-125a-3p regola contemporaneamente più mRNA coinvolti nella mielinizzazione, incluso

quello di GPR17. Abbiamo anche dimostrato che l'espressione eccessiva di miR-125a-3p disregola GPR17 impedendo la mielinizzazione e, soprattutto, che i livelli del microRNA sono aumentati nel *liquor* di pazienti con lesioni attive (analisi condotta su 30 pazienti, di cui 28 con la forma recidivante remittente, 2 con la forma secondariamente progressiva, 11 dei quali con lesioni attive), suggerendo miR-125a-3p come nuovo possibile biomarcatore di malattia.

Verificare eventuali alterazioni del recettore nella SM
Per verificare se GPR17 subisce alterazioni nella SM, abbiamo analizzato il recettore in topi ESA, evidenziando un aumento persistente di GPR17 nel midollo spinale. Sulla base dei dati mostrati sopra secondo i quali l'espressione "forzata" di GPR17 nei pre-OL li blocca ad uno stadio immaturo, abbiamo indagato più in dettaglio il destino finale degli OPC esprimenti GPR17 utilizzando un nuovo topo "reporter" da noi sviluppato e messo a disposizione del progetto (topi GPR17-iCreER^{T2}xCAG-eGFP), nel quale è possibile, somministrando il farmaco tamossifene, rendere visibili le cellule che esprimono GPR17 e che rimangono verdi per tutto il resto della vita dell'animale. L'induzione di ESA in questi topi ha mostrato che, nonostante un marcato aumento

del recettore ai siti di demielinizzazione, solo una minima parte delle cellule che lo esprimono diventa mielinizzante. Riteniamo che questo sia dovuto alla presenza di elevate concentrazioni di segnali pro-infiammatori intorno alle lesioni, quali ad esempio SDF-1 (Stromal Derived Factor 1), molecola pro-infiammatoria che si accumula anche nelle lesioni dei pazienti con SM, e che proprio in questo progetto abbiamo mostrato interagire con GPR17. Dati iniziali *in vitro* confermano questa ipotesi. Inoltre, dati preliminari, inizialmente non previsti in questo studio, ottenuti su campioni cerebrali autoptici di pazienti con SM, confermano un marcato aumento di GPR17 ai bordi e all'interno delle lesioni attive.

CONCLUSIONI

L'espressione di GPR17 è regolata da GRKs/mTOR e dal microRNA miR-125a-3p. I livelli di quest'ultimo sono aumentati nel *liquor* di pazienti con SM e lesioni attive, fornendo le basi per la validazione di un nuovo marcatore di malattia. Infine, dati *in vivo* mostrano una disregolazione di GPR17 nella SM e saranno importanti per indirizzare il disegno di ligandi specifici che possano alleviare il blocco del differenziamento presente nella malattia, ristabilendo un'adeguata rimielinizzazione.

Innovative re-myelinating strategies for multiple sclerosis via the exploitation of the new oligodendrocyte receptor GPR17

INTRODUCTION AND AIMS

There are currently no strategies to promote re-myelination in multiple sclerosis (MS). This project stems from our previous evidence of a role for the membrane receptor GPR17 in the maturation of oligodendrocyte precursors (OPCs), the myelin forming cells. Ligands targeting GPR17 may implement myelination, raising new therapeutic opportunities for MS.

In detail, we aimed at:

- unveiling the mechanisms by which GPR17 promotes OPC differentiation;
- identifying the signals turning on and off GPR17;
- assessing whether and how GPR17 is dysregulated in MS.

RESULTS

Unveiling the mechanisms by which GPR17 pro-

otes OPC differentiation

We had already shown that GPR17 is maximally expressed in immature pre-oligodendrocytes (pre-OLs), but that it has to disappear from the cell membrane to allow cells completing maturation. First, we identified some of the mechanisms at the basis of physiological GPR17 silencing during OPC differentiation. GPR17 is normally silenced by a group of enzymes called G protein-coupled receptor kinases (GRKs), which are, in turn, regulated by the "mammalian target of rapamycin" mTOR. Up to now, how GRKs and mTOR were connected to each other in modulating GPR17 function had remained elusive; here, we show, for the first time, that these two families of enzymes are linked together by Murine double minute 2 (Mdm2), a new potential target in oligodendrogenesis. We then confirmed that "forcing" GPR17 expression in pre-

OLs blocks cells at immature stages and prevents myelination. These findings are particularly interesting in view of the previously reported defect of GRK2 in MS patients.

Identifying the signals turning on and off GPR17

We had already shown that, when placed on cultured OPCs, medium obtained from neuronal cultures stimulated these cells to express GPR17. Now, we show that one of the factors contained in this medium is glutamic acid, a well-known neurotransmitter, which, upon release by neurons, could initiate OPC differentiation. We also show that two hormones (Insulin and Insulin-like Growth Factor) could play a role in turning GPR17 off in maturing OPCs before they start myelinating. Interestingly, these factors activate intracellular signals intertwined with the mTOR pathway described above, suggesting they could initiate a cascade involving mTOR and culminating with GPR17 silencing. Finally, we also identified another player in GPR17 regulation: the microRNA miR-125a-3p. MicroRNAs are small molecules involved in the regulation of messages that, by going from the nucleus to the cytoplasm (the messenger RNAs, mRNAs), address the synthesis of new proteins. We showed that miR-125a-3p simultaneously acts on several mRNAs involved in myelination, including GPR17 mRNA, and that its abnormal over-expression leads to GPR17 dysregulation and impaired myelination. We followed up this finding furthermore by analyzing miR-125a-3p levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of 30 MS patients (28 with the relapsing-remitting and 2 with the secondary-progressive form), 11 of whom with active lesions. Interestingly, miR-125a-3p was significantly elevated in the CSF of MS patients bearing active lesions, suggesting this miRNA as a new potential MS biomarker.

Assessing whether and how GPR17 is dysregulated in MS

To verify whether GPR17 undergoes changes during MS development, we analyzed GPR17 in EAE mice and showed that there is persistent and excessive GPR17 upregulation in the spinal cord of these mice. Based on data from aim 1 showing that GPR17 forced expression blocks pre-OLs at immature stages, we performed fate mapping studies in the first conditional GPR17 reporter mouse (GPR17-iCreER^{T2}xCAG-eGFP transgenic mice), in which, upon tamoxifen administration, GPR17 expressing cells become green and can be visualized for animals' entire life. EAE induction in these mice showed that, despite marked GPR17 upregulation, only a low number of OPCs complete maturation and start myelinating. We hypothesize this be due to presence of inflammatory mediators like Stromal Derived Factor 1 (SDF-1), a cytokine markedly accumulating at demyelinating lesions in MS patients, that has been shown by us to interact with GPR17. Initial *in vitro* data confirm this hypothesis. Consistently, preliminary studies, that had not been originally included in the project, performed on CNS samples from MS patients showed marked GPR17 upregulation at the borders and inside active lesions.

CONCLUSIONS

During OPC differentiation, GPR17 expression is regulated by both GRKs/mTOR cascades and by the new microRNA miR-125a-3p. The latter is abnormally upregulated in the CSF of MS patients with active lesions, setting the basis for the identification of a new potential biomarker. GPR17 is abnormally upregulated during MS development due to persistent inflammatory milieu. These changes will have to be taken into account when designing specific GPR17 ligands able to relieve OPC differentiation blockade and re-establish myelination in MS.

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

Publications

Zappelli E, Daniele S, Abbracchio MP, Martini C, Trincavelli ML. A rapid and efficient immunoenzymatic assay to detect receptor protein interactions: G protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4):6252-64

Daniele S, Trincavelli ML, Fumagalli M, Zappelli E, Lecca D, Bonfanti E, Campiglia P, Abbracchio MP, Martini C. Does GRK-β arrestin machinery work as a “switch on” for GPR17-mediated activation of intracellular signaling pathways? *Cell Signal*, 2014, 26(6):1310-25

Sensi C, Daniele S, Parravicini C, Zappelli E, Russo V, Trincavelli ML, Martini C, Abbracchio MP, Eberini I. Oxysterols act as promiscuous ligands of class-A GPCRs: in silico molecular modeling and in vitro validation. *Cell Signal*, 2014, 26(12):2614-2620

Zaratin P, Battaglia MA, Abbracchio MP. Nonprofit foundations spur translational research. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(11):552-5

Boda E, Di Maria S, Rosa P, Taylor V, Abbracchio MP, Buffo A. Early phenotypic asymmetry of sister oligodendrocyte progenitor cells after mitosis and its modulation by aging and extrinsic factors. *Glia*, 2015, 63(2):271-286

Fumagalli M, Bonfanti E, Daniele S, Zappelli E, Lecca D, Martini C, Trincavelli ML, Abbracchio MP. The ubiquitin ligase Mdm2 controls oligodendrocyte maturation by intertwining mTOR with G protein-coupled receptor kinase 2 in the regulation of GPR17 receptor desensitization. *Glia*, 2015, 63(12):2327-39

Marschallinger J, Schäffner I, Klein B, Gelfert R, Rivera FJ, Illes S, Grassner L, Janssen M, Rotheneichner P, Schmuckermair C, Coras R, Boccazzi M, Chishty M, Lagler FB, Renic M, Bauer HC, Singewald N, Blümcke I, Bogdahn U, Couillard-Despres S, Lie DC, Abbracchio MP, Aigner L. Structural and functional rejuvenation of the aged brain by an approved anti-asthmatic drug. *Nat Commun*, 2015, 6:8466

Parravicini C, Daniele S, Palazzolo L, Trincavelli ML, Martini C, Zaratin P, Primi R, Coppolino G, Gianazza E, Abbracchio MP, Eberini I. A promiscuous recognition mechanism between GPR17 and SDF-1: Molecular insights. *Cell Signal*, 2016, 28(6):631-42

Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP. CNS remyelination as a novel reparative approach to neurodegenerative diseases: The roles of purinergic signaling and the P2Y-like receptor GPR17. *Neuropharmacology* 2016, 104:82-93

Lecca D, Marangon D, Coppolino GT, Méndez AM, Finardi A, Costa GD, Martinelli V, Furlan R, Abbracchio MP. MiR-125a-3p timely inhibits oligodendroglial maturation and is pathologically up-regulated in human multiple sclerosis. *Sci Rep*, 2016, 6:34503

Lecca D, Fumagalli M, Ceruti S, Abbracchio MP. Intertwining extracellular nucleotides and their receptors with Ca²⁺ in determining adult neural stem cell survival, proliferation and final fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, 371(1700)

Abstract

Coppolino GT, Lecca D, Viganò F, Menichetti G, Marangon D, Bonfanti E, Fumagalli M, Dimou L, Abbracchio MP. Fate mapping of the oligodendroglial precursor cells expressing GPR17 receptor in experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. Next Step 5 - Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan (Italy). June 3, 2014

Marangon D, Lecca D, Meraviglia V, Rosa P, Abbracchio MP. Gene regulation of GPR17, a checkpoint receptor in oligodendroglial differentiation and myelination. Next Step 5 - Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan (Italy). June 3, 2014

Abbracchio MP, Parravicini C, Daniele S, Bonfanti B, Zappelli E, Fumagalli M, Sensi C, Martini C, Eberini I, Trincavelli ML. Comparative evaluation of GPR17 receptor in silico and in vitro on cultured primary oligodendrocyte precursor cells. *Purinergic Signalling* 2014, 10(4):836-837, M:188. Purines 2014 - Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases, International Conference on Signalling, Drugs and Targets, Bonn (Germany). July 23-27, 2014

Abbracchio MP. New regenerative medicine via P2Y and P2Y-like receptors: the case of GPR17, a new target for remyelination. *Purinergic Signalling* 2014, 10(4):661-661. Purines 2014 - Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases, International Conference on Signalling, Drugs and Targets, Bonn (Germany). July 23-27, 2014

Abbracchio MP, Lecca D, Coppolino GT, Fumagalli M, Bonfanti E, Menichetti G, Zaratin P, Furlan R. Promoting re-myelination in MS via the GPR17 receptor, a new key actor in oligodendrogenesis. MS Boston 2014: Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting, Boston (USA). September 10-13, 2014

Parravicini C, Sensi C, Daniele S, Primi R, Zappelli E, Russo V, Trincavelli ML, Martini C, Abbracchio MP, and Eberini I. Oxysterols act as promiscuous ligands of class-A GPCRs: in silico molecular modeling and in vitro validation. Seminario Dottorandi ed Assegnisti di Ricerca - Società Italiana di Farmacologia (SIF), Rimini (Italy). September 16-18, 2014

Bonfanti E, Fumagalli M, Daniele S, Lecca D, Zappelli E, Gelosa P, Martini C, Trincavelli ML, Abbracchio MP. Time-dependent and critical role of the GPR17 receptor during oligodendrocyte differentiation: implications for the development of new remyelination strategies. Seminario Dottorandi ed Assegnisti di Ricerca - Società Italiana di Farmacologia (SIF), Rimini (Italy), September 16-18, 2014

Coppolino GT, Lecca D, Viganò F, Menichetti G, Marangon D, Bonfanti E, Fumagalli M, Dimou L, Abbracchio MP. Fate mapping of the oligodendroglial precursor cells expressing GPR17 receptor in experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. Seminario Dottorandi ed Assegnisti di Ricerca - Società Italiana di Farmacologia (SIF), Rimini (Italy), September 16-18, 2014

Lecca D, Marangon D, Meraviglia V, Fratangeli A, Rosa P, Abbracchio MP. Gene regulation of GPR17, a checkpoint receptor in oligodendroglial differentiation and myelination. Seminario Dottorandi ed Assegnisti di Ricerca - Società Italiana di Farmacologia (SIF), Rimini (Italy), September 16-18, 2014

Fumagalli M, Bonfanti E, Daniele S, Lecca D, Zappelli E, Martini C, Trincavelli ML, Abbracchio MP. Time-dependent and critical role of the GPR17 receptor during oligodendrocyte differentiation: implications for the development of new remyelination strategies. Annual meeting of the Italian Purine Club, Istituto Superiore di Sanità, Roma (Italy). September 22, 2014

Fumagalli M. Extrinsic mechanisms regulate the GPR17 receptor during oligodendrocyte precursor cell maturation: implications for the development of new remyelinating strategies. Scientific seminar, Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), Università degli Studi di Torino (Italy). April 17, 2015

Lecca D, Marangon D, Meraviglia V, Valenza F, Rosa P, Abbracchio MP. Gene regulation of GPR17 is an active mechanism time-modulating oligodendroglial differentiation and myelination. *The Brain, Beyond Neurons*, Paris (France). May 11-12, 2015

Coppolino GT, Lecca D, Marangon D, Viganò F, Menichetti G, Fumagalli M, Bonfanti E, Lombardi M, Furlan R, Verderio C, Dimou L, Abbracchio MP. Promoting re-myelination in Multiple Sclerosis via the GPR17 receptor, a new key actor in oligodendrogenesis. *The Brain, Beyond Neurons*, Paris (France). May 11-12, 2015

Fumagalli M, Bonfanti E, Coppolino G, Parravicini C, Menichetti G, Furlan R, Lecca D, Abbracchio MP. Innovative re-myelinating strategies for multiple sclerosis via the exploitation of the new oligodendrocyte receptor GPR17. Congresso Scientifico Annuale - AISM e la sua Fondazione, Roma (Italy). May 29-30, 2015

Coppolino GT, Lecca D, Marangon D, Viganò F, Menichetti G, Fumagalli M, Bonfanti E, Furlan R, Dimou L, Abbracchio MP. Promoting re-myelination in Multiple Sclerosis via the GPR17 receptor, a new key actor in oligodendrogenesis. Next Step 6 - Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan (Italy). July 2, 2015

Parravicini C, Bonfanti E, Daniele S, Fumagalli M, Zappelli E, Sensi C, Martini C, Eberini I, Volpini R, Trincavelli ML, Abbracchio MP. In silico and in vitro characterization of new synthetic pro-myelinating compounds acting at the P2Y-like GPR17 receptor. 6th Joint German-Italian Purine Club Meeting, International Conference on Purinergic Signalling, Hamburg (Germany). July 23-25 2015

Zappelli E, Fumagalli M, Bonfanti E, Daniele S, Lecca D, Trincavelli ML, Abbracchio MP, Martini C. The ubiquitin ligase Mdm2 controls oligodendrocyte maturation by intertwining mTOR with G protein-coupled receptor kinase 2 in the regulation of GPR17 receptor desensitization. 6th Joint German-Italian Purine Club Meeting, Hamburg (Germany). July 23-25, 2015

Abbracchio MP, Fumagalli M, Marangon D, Coppolino GT, Bonfanti E, Finardi AM, Lecca D, Furlan R. New mechanisms regulating myelination in the central nervous system: the role of GPR17 and of a novel micro-RNA. *Journal of Neurochemistry* (2015). Vol.134. 25th ISN - APSN Joint Biennial Meeting International Society for Neurochemistry in conjunction with the Australasian Society for Neuroscience (ANS). Cairns (Australia), August 23-27, 2015

Marangon D, Coppolino GT, Finardi A, Furlan R, Abbracchio MP, Lecca D. Identification of microRNAs potentially regulating the expression of GPR17, a receptor involved in the development of oligodendroglial precursor cells. XVI Congresso della Società Italiana di Neuroscienze, Cagliari (Italy). October 8-11, 2015

Coppolino GT, Lecca D, Marangon D, Viganò F, Menichetti G, Fumagalli M, Bonfanti E, Furlan R, Dimou L, Abbracchio MP. Dysregulation of GPR17, a new key actor involved in oligodendrogenesis, in a rodent model of Multiple Sclerosis: implications for re-myelination strategies. XVI Congresso della Società Italiana di Neuroscienze, Cagliari (Italy). October 8-11, 2015

Lecca D, Marangon D, Coppolino GT, Meraviglia V, Bonfanti E, Fumagalli M, Rosa P, Furlan R, Abbracchio MP. New mechanisms regulating oligodendroglial differentiation: focus on the GPR17 receptor and related microRNAs. XVI Congresso della Società Italiana di Neuroscienze, Cagliari (Italy). October 8-11, 2015

Marangon D, Coppolino GT, Finardi A, Furlan R, Abbracchio MP, Lecca D. Identification of microRNAs potentially regulating the expression of GPR17, a receptor involved in the development of oligodendroglial precursor cells. 37° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Napoli (Italy). October 27-30, 2015

Coppolino GT, Lecca D, Marangon D, Viganò F, Menichetti G, Fumagalli M, Bonfanti E, Furlan R, Dimou L, Abbracchio MP. Dysregulation of GPR17, a new key actor involved in oligodendrogenesis, in a rodent model of Multiple Sclerosis: implications for re-myelination strategies. 37° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Napoli (Italy). October 27-30, 2015

Parravicini C. Promiscuous molecular recognition mechanism between GPR17 and SDF-1: in silico and in vitro investigations. 4° Workshop "Metodi Computazionali per Processi Chimici e Biochimici", Vignale Monferrato (Italy). September 16-18, 2015

Ceruti S, Parravicini C. Strategie integrate di farmacologia molecolare per lo sviluppo di nuovi modulatori di GPR17, un nuovo bersaglio terapeutico per malattie demielinizzanti. Scientific seminar, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Pavia (Italy). November 20, 2015

Lecca D. New mechanisms regulating oligodendroglial differentiation: focus on the GPR17 receptor and related microRNAs. Scientific seminar DiSFeB Meets NICO, Neuroscience builds a bridge from Milan and Turin. Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), Università degli Studi di Torino (Italy). May 20, 2016

Coppolino GT, Marangon D, Fumagalli M, Lecca D, Bonfanti E, Parravicini C, Furlan R, Abbracchio MP. Innovative re-myelinating strategies for multiple sclerosis via the exploitation of the new oligodendrocyte receptor GPR17. Congresso Scientifico Annuale - AISM e la sua Fondazione, Roma (Italy). May 25-27, 2016

Palazzolo L, Parravicini C, Daniele S, Trincavelli ML, Martini C, Zaratini P, Primi R, Coppolino GT, Gianazza E, Abbracchio MP, Eberini I. GPR17 molecular modelling: interaction with non conventional pro-inflammatory ligands. Congresso Scientifico Annuale - AISM e la sua Fondazione, Roma (Italy). May 25-27, 2016

Marangon D, Coppolino GT, Finardi A, Furlan R, Abbracchio MP, Lecca D. A new miRNA regulating oligodendrocyte maturation in physiology and disease. Next Step 7, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan (Italy). July 13, 2016

Palazzolo L, Parravicini C, Primi R, Coppolino G, Gianazza E. A promiscuous recognition mechanism between GPR17 and SDF-1: Molecular insights. Next Step 7, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan (Italy). July 13, 2016

Coppolino GT, Lecca D, Marangon D, Viganò F, Parravicini C, Eberini I, Magliozzi R, Furlan R, Dimou L, Abbracchio MP. GPR17, a key actor involved in oligodendrogenesis: implications for re-myelination strategies. 19° Seminario per Dottorandi, Assegnisti, Postdottorandi e Specializzandi della Società Italiana di Farmacologia, Rimini (Italy). September 20-22, 2016

Marangon D, Coppolino GT, Finardi A, Furlan R, Abbracchio MP, Lecca D. A new miRNA regulating oligodendrocyte maturation in physiology and disease. 19° Seminario per Dottorandi, Assegnisti, Postdottorandi e Specializzandi della Società Italiana di Farmacologia, Rimini (Italy). September 20-22, 2016

Lecca D, Marangon D, Coppolino GT, Menéndez Méndez A, Finardi A, Dalla Costa G, Furlan R, Abbracchio MP. Identification of a microRNA regulating the maturation of oligodendroglial precursor cells and pathologically up-regulated in human multiple sclerosis. Neuroscience 2016 - Society for Neuroscience, San Diego (USA). November 12-19, 2016

Parravicini C, Coppolino GT, Lecca D, Fumagalli M, Marangon D, Daniele S, Palazzolo L, Martini C, Gianazza E, Magliozzi R, Trincavelli ML, Zaratini P, Eberini I and Abbracchio MP. A promiscuous interaction between GPR17 and SDF1 may be at the basis of impaired remyelination in demyelinating diseases. Neuroscience 2016 - Society for Neuroscience, San Diego (USA). November 12-19, 2016

Marangon D, Coppolino GT, Menéndez Méndez A, Finardi A, Furlan R, Abbracchio MP, Lecca D. A brain-enriched miRNA regulating oligodendrocyte maturation as a new potential biomarker in multiple sclerosis. More than neurons. Toward a less neuronocentric view of brain disorders, Torino (Italy). December 1-3, 2016

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 9 mesi) e l'ammontare di 170.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 9 months) and the amount of € 170,000

Luca Palazzolo

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

MENTORE / MENTOR: **Ivano Eberini** e **Maria Pia Abbracchio**

Modellazione molecolare di GPR17: interazioni con ligandi pro-infiammatori non convenzionali

PREMESSE E OBIETTIVI

Il recettore GPR17, appartenente alla famiglia dei recettori accoppiati a G-proteina (GPCR), è un attore chiave nell'oligodendrogenesi ed è recentemente emerso come un bersaglio promettente per le malattie demielinizzanti, quale la SM. Sfidando il dogma secondo il quale i GPCR sono attivati esclusivamente da ligandi altamente specifici, recenti evidenze sperimentali suggeriscono l'esistenza di una farmacologia spuria per alcuni GPCR di classe A filogeneticamente correlati, tra cui GPR17 ed i recettori per le chemochine (CXCRn), molecole chiave nei processi infiammatori. Inoltre, i ligandi endogeni di GPR17 comprendono una varietà di molecole chimicamente non correlate, tra cui i nucleotidi extracellulari, i cisteinil-leucotrieni e gli ossisteroli, che agiscono come molecole di segnalazione di emergenza nei processi riparativi locali, nelle reazioni infiammatorie e nei fenomeni neurodegenerativi. Infine, è stato dimostrato che GPR17 ed alcuni CXCRn hanno un ruolo chiave nell'orchestrare le risposte infiammatorie nelle malattie neurodegenerative e nella maturazione dei progenitori degli oligodendrociti (OPC) verso cellule oligodendrocitarie mielinizzanti, fondamentali nel processo di formazione della mielina. Di nota, SDF-1, il ligando endogeno noto di CXCR4, è un promotore cruciale della maturazione degli OPC ed è presente ad alte concentrazioni nel cervello delle persone con SM. Con questo progetto, attraverso l'utilizzo di strumenti di biochimica computazionale, abbiamo studiato, dal punto di vista strutturale, le interazioni "non convenzionali" tra GPR17 ed i CXCRn e la loro abilità trasversale di essere attivati da ligandi coinvolti nell'infiammazione, come SDF-1.

RISULTATI

Abbiamo costruito *in silico* un modello chimerico di

GPR17 partendo da un allineamento multiplo di sequenze di differenti GPCR di classe A, ricostruendo localmente la topologia tridimensionale di questa proteina ed utilizzando come guide sia le strutture note di proteine omologhe disponibili presso la banca dati di proteine (P2Y₁₂, Rho e CXCR4), sia un modello di interazione tra CXCR4 e SDF-1 già pubblicato in letteratura, utile per modellare la porzione N-terminale (NTD) del recettore e l'intero complesso GPR17::SDF-1. Attraverso una simulazione di dinamica molecolare, abbiamo validato il nostro modello, analizzando la stabilità e le proprietà chimico-fisiche del complesso, e valutato l'evoluzione temporale delle interazioni tra alcuni amminoacidi chiave di GPR17 e SDF-1. Oltre alla presenza di un'estesa superficie di interazione tra le due proteine, che coinvolge sia la regione TM sia la porzione extracellulare di GPR17, abbiamo osservato che quest'ultima presenta un'elevata mobilità, essenziale per il riconoscimento e il legame con SDF-1. Analizzando le interazioni tra SDF-1 e GPR17, abbiamo osservato che il dominio NTD di SDF-1 si inserisce in una regione sommitale TM del recettore, precedentemente descritta come sito attivo per ligandi già noti di GPR17, sia naturali sia sintetici. In questo stesso sito, abbiamo caratterizzato le interazioni tra GPR17 e cangrelor, un noto antagonista ortosterico di questo GPCR, il quale instaura legami specifici con i medesimi amminoacidi interessati da SDF-1, ipotizzando che cangrelor possa ostacolare l'ingresso di SDF-1 nel sito TM di GPR17, inattivandolo.

Infine, per validare la nostra predizione *in silico*, abbiamo testato l'abilità di SDF-1 di interagire con GPR17 con due differenti modelli sperimentali *in vitro*. I risultati ottenuti, utilizzando rispettivamente un saggio di legame del GPT S su cellule 1321N1 transfettate stabilmente con GPR17 ed un modello di dif-

ferenziamento oligodendrocitario in colture primarie di OPC esprimenti GPR17, confermano le nostre predizioni *in silico*, dimostrando sia che SDF-1, a concentrazioni fisiologiche, è in grado di attivare GPR17 e di promuovere la mielinizzazione, anche attraverso la stimolazione di questo recettore, sia che questo effetto può essere contrastato da cangrelor.

CONCLUSIONI

Grazie ad un'approfondita analisi strutturale di GPR17, derivante dall'applicazione di specifiche strategie computazionali e dall'uso di modelli 3D, e alla successiva validazione *in vitro* delle ipotesi *in silico*, abbiamo dimostrato l'attivazione di GPR17 ad

opera di SDF-1 e proposto un ruolo di quest'ultimo nel promuovere la maturazione degli OPC anche *via* GPR17. Questi risultati mettono in luce una promiscuità tra questi recettori finora inesplorata, alla base della risposta infiammatoria e della mielinizzazione. Insieme all'evidenza che GPR17 e SDF-1 sono entrambi upregolati in condizioni di infiammazione, questi dati corroborano l'ipotesi di un *cross-talk* tra i GPCR di classe A nella regolazione degli OPC e della sua rilevanza nella SM. La conoscenza del modo in cui è possibile sincronizzare questi recettori e delle proprietà farmacologiche emergenti da questo *cross-talk* aiuterà nel disegno di nuovi approcci farmacologici per il trattamento nella SM.

GPR17 molecular modelling: interactions with non-conventional pro-inflammatory ligands

INTRODUCTION AND AIMS

The GPR17 receptor, belonging to the family of G-protein coupled receptors (GPCRs), is a key player in oligodendrogenesis and has recently emerged as a promising target for demyelinating diseases, such as MS. In line with the latest evidence challenging the dogma according to which GPCRs are exclusively activated by highly specific ligands, a spurious pharmacology has been lately reported for some phylogenetically related class-A GPCRs, including GPR17 and chemokine receptors (CXCRn), pivotal molecules involved in inflammatory processes. Additionally, GPR17 endogenous ligands comprise a multiplicity of chemically unrelated molecules, including extracellular nucleotides, cysteinyl-leukotrienes and oxysterols, which act as emergency signalling molecules in local repair processes, in inflammatory reactions and in neurodegenerative phenomena. Finally, it has been demonstrated that both GPR17 and some CXCRn play a key role in orchestrating the inflammatory responses in neurodegenerative diseases and in the maturation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) to myelinating cells. SDF-1, known as the CXCR4 endogenous ligand, is a key promoter of OPC maturation and is present at high concentrations in the brain of MS patients.

Within this project, using computational biochemistry tools, we studied the “unconventional” interac-

tions between GPR17 and CXCR4 from a structural standpoint, and their cross-ability to be activated by ligands involved in inflammation, such as SDF-1.

RESULTS

Starting from a multiple sequence alignment of different class-A GPCRs, we built an *in silico* chimeric model of GPR17, locally reconstructing the three-dimensional (3D) protein topology; as templates we used the known structures of homologous proteins, available at the Protein Data Bank (P2Y₁₂, rhodopsin and CXCR4), and a recently published interaction model between CXCR4 and SDF-1, useful for modelling the N-terminal domain (NTD) of the receptor and the whole GPR17::SDF-1 complex.

We further validated our model *via* molecular dynamics simulation, analysing the stability and the physicochemical properties of the complex, and we evaluated the temporal evolution of some interactions between key amino acids of GPR17 and SDF-1. Besides the presence of an extensive interaction area between these two proteins, which involves both the TM region and the GPR17 extracellular loops, we found that the latter have a high mobility, which is essential for recognizing and binding SDF-1.

Analysing the interaction between SDF-1 and GPR17 in detail, we observed that the SDF-1 NTD penetrates into the top TM region of the receptor, previously described as the active site for GPR17

known ligands, either natural or synthetic.

Within this site, we then characterized the interaction between GPR17 and cangrelor, a known orthosteric antagonist of this GPCR, which shares specific intermolecular bonds with the same amino acids interested by SDF-1, suggesting that cangrelor may hamper the SDF-1 entry into the TM site of GPR17, thus inactivating the receptor.

Finally, to validate our *in silico* predictions, we tested the ability of SDF-1 to interact with GPR17 with two different *in vitro* experimental models.

The results obtained using, respectively, a GPT S binding assay on 1321N1 cells stably transfected with GPR17 and an oligodendrocyte differentiation model of primary OPC cultures expressing GPR17, confirm our *in silico* predictions. Globally, we demonstrated that SDF-1 (at physiological concentration) is able to activate GPR17 and to promote myelination, and that this effect can be hindered by cangrelor, as also suggested by *in silico* data on this receptor.

CONCLUSIONS

Thanks to a deep structural analysis of GPR17, combining the application of specific computational strategies, the use of 3D models, and the subsequent *in vitro* validation of the *in silico* hypotheses, we demonstrated the activation of GPR17 by SDF-1 and we proposed a role of the latter in promoting the maturation of OPC also *via* GPR17.

These results highlight a so far unexplored promiscuity between these receptors, which is at the basis of the inflammatory response and of the myelination process. Together with the evidence that GPR17 and SDF-1 are both upregulated under inflammatory conditions, these data support the hypothesis of a cross-talk between class-A GPCRs in the OPC regulation and its importance in MS. The knowledge of the way in which these receptors are synchronized and of the emerging pharmacological properties of this cross-talk will help in the design of new pharmacological approaches for the treatment of MS.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Parravicini C, Daniele S, Palazzolo L, Trincavelli ML, Martini C, Zaratini P, Primi R, Coppolino G, Gianazza E, Abbracchio MP, Eberini I. *A promiscuous recognition mechanism between GPR17 and SDF-1: Molecular insights*. Cell. Signal., 2016, 28, 631-642

Palazzolo L, Parravicini C, Daniele S, Trincavelli M.L, Martini C, Zaratini P, Primi R, Coppolino G, Gianazza E, Abbracchio M.P, Eberini I. *GPR17 molecular modelling: interaction with non conventional pro-inflammatory ligands*. Congresso Scientifico Annuale - AISM e la sua Fondazione, Roma. May 24-27, 2016

Palazzolo L, Parravicini C, Primi R, Coppolino G, Gianazza E, Abbracchio M.P, Eberini I.
A promiscuous recognition mechanism between GPR17 and SDF-1: Molecular insights. NEXTSTEP 7 - DISFeB (UniMI), Milano. July 11, 2016

Parravicini C, Coppolino GT, Lecca D, Fumagalli M, Marangon D, Daniele S, Palazzolo L, Martini C, Gianazza E, Magliozzi R, Trincavelli ML, Zaratini P, Eberini I and Abbracchio MP.
A promiscuous interaction between GPR17 and SDF1 may be at the basis of impaired remyelination in demyelinating diseases. Neuroscience 2016 - Society for Neuroscience, San Diego (USA). November 12-19, 2016

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2014 per il periodo di un anno e l'ammontare di 26.300 €

Research Fellowship funded by FISM Grant 2014 for the period of 1 year and the amount of € 26,300

Bruno Bonetti

Dipartimento di Scienze Neurologiche e del Movimento, Università degli Studi di Verona, Verona

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Alessia Farinazzo, Ermanna Turano, Elena Bazzoli

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Gabriela Constantin, Stefano Angiari, Silvia Dusi, Dipartimento di Patologia Generale, Università degli Studi di Verona, Verona

Esosomi da cellule staminali mesenchimali adipose: un approccio innovativo nell'encefalomielite sperimentale autoimmune

PREMESSE E OBIETTIVI

Le cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo (ASC) possono rappresentare un approccio terapeutico promettente per il trattamento di diversi aspetti patologici della sclerosi multipla (SM). Le ASC esercitano il loro effetto benefico sia modulando la risposta immunitaria che attivando i precursori endogeni degli oligodendrociti.

Negli ultimi anni, diverse evidenze hanno mostrato che la maggior parte degli effetti biologici delle ASC sono mediati da fattori solubili rilasciati da vescicole extracellulari che influenzano sia il microambiente che le cellule circostanti. In particolare le vescicole extracellulari possono essere distinte in microvescicole (MVs) e nanovesicles (NVs) con proprietà strutturali e biochimiche distinte. Le NV derivate da ASC sono dotate di proprietà immuno-modulatorie e protettive in grado di agire sul microambiente nelle malattie neurodegenerative e infiammatorie ed in particolare nella SM.

L'obiettivo del nostro progetto è stato quello di valutare *in vivo* l'efficacia delle NV da ASC in termini di immuno-modulazione e neuroprotezione nel modello di ESA cronica e di indagare i meccanismi molecolari coinvolti nella malattia.

RISULTATI

In questo studio abbiamo valutato l'efficacia *in vivo* di NVs derivate da ASC somministrate per via endovenosa in fase pre-clinica nel modello cronico di ESA. Abbiamo dimostrato che le ASC-NVs hanno un effetto clinico benefico significativo nei topi malati ri-

spetto a quelli di controllo. Inoltre, l'analisi neuropatologica eseguita al picco della malattia ha mostrato che l'iniezione di ASC-NVs è stata in grado di indurre una diminuzione significativa dei processi infiammatori ed una riduzione delle aree di demielinizzazione nel midollo spinale degli animali trattati. Pertanto, le ASC-NVs sono state in grado di migliorare la gravità della malattia nel modello ESA, riducendo l'infiltrazione delle cellule T nel sistema nervoso centrale e la conseguente infiammazione.

Successivamente abbiamo studiato l'efficacia delle ASC-NVs *in vitro* ed *in vivo* ed i meccanismi alla base della loro capacità immunomodulatoria. Le NVs hanno mostrato *in vitro* una parziale inibizione della proliferazione delle cellule T antigene-specifiche e down-regolato la produzione di citochine pro-infiammatorie. Tuttavia, *in vivo* l'efficacia sui linfociti T si è dimostrata limitata.

Abbiamo, quindi, studiato l'effetto delle ASC-NVs sull'adesione delle cellule T specifiche MOG-attivate sia *in vitro* che *in vivo*. I nostri dati suggeriscono che le ASC-NVs non hanno influenzato l'attivazione endoteliale nel midollo spinale di topi ESA in quanto non sono state osservate differenze nell'espressione endoteliale di molecole di adesione. Successivamente abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla modulazione della capacità di adesione dei linfociti T attivati da ASC-NVs. Le ASC-NVs hanno efficacemente inibito l'adesione delle cellule T dopo l'esposizione alla chemochina CXCL12, senza però cambiamenti di espressione delle molecole di adesione. Il dato è stato ulteriormente confermato *in vi-*

vo mediante microscopia intravitale sul midollo spinale di topi affetti da ESA.

Da questi risultati emerge un nuovo meccanismo di azione delle ASC-NVs, che potrebbe spiegare la riduzione significativa delle cellule T infiltrare nelle lesioni ESA.

CONCLUSIONI

I nostri risultati indicano che le ASC-NV sono in grado di indurre immuno-modulazione e neuroprote-

zione nel modello animale della sclerosi multipla. In particolare, nel modello di ESA cronica, il trattamento preventivo con ASC-NVs è in grado di produrre effetti benefici sul decorso della malattia, così come nell' inibizione dei linfociti T nel SNC infiammato. Future applicazioni terapeutiche potrebbero quindi basarsi su l'utilizzo di ASC-NVs come strumento sicuro ed efficace per il trattamento di diversi aspetti patologici della SM, limitando così l'utilizzo di cellule parentali e dei loro potenziali effetti collaterali.

Exosomes from adipose mesenchymal stem cells: innovative therapeutic approach in experimental autoimmune encephalomyelitis

INTRODUCTION AND AIMS

Adipose mesenchymal stem cells (ASCs) may represent a promising therapeutic approach to treat different pathological aspects of multiple sclerosis (MS). ASCs exert their beneficial effects modulating the autoimmune response as well as activating endogenous oligodendrocyte progenitors.

In recent years, several evidences indicate that most biological effects of ASCs are mediated by soluble factors released by extracellular vesicles, which influence the surrounding cells. In particular, extracellular vesicles can be distinguished in microvesicles (MVs) and nanovesicles (NVs) with distinct structural and biochemical properties. ASC-derived NVs are source of protective and immune-modulatory factors able to modulate the microenvironment in neurodegenerative and inflammatory disorders, like MS.

The aim of our project was to assess the efficacy of ASC-derived NVs in terms of immune-modulation and neuroprotection in chronic EAE model and to investigate the molecular mechanisms involved.

RESULTS

In this study we investigated the efficacy *in vivo* of ASC-derived NVs when administered intravenously in the pre-clinical phase of chronic EAE. We showed that ASC-NVs have a significant beneficial effect on chronic EAE with amelioration of clinical scores as compared to control mice. Moreover, the neuropathological analysis performed at the peak of the disease showed that the injection of ASC-NVs induced a significant decrease of the inflammation

process as well as of the areas of demyelination in spinal cord of ASC-NVs treated animals. Therefore, ASC-derived NVs were able to ameliorate EAE severity by reducing T cells infiltration into the CNS and the subsequent inflammation.

We next investigated the mechanisms involved in the ASC-NVs efficacy, analyzing both *in vitro* and *in vivo* the immune-modulatory activity of ASC-NVs. ASC-derived NVs *in vitro*, partially inhibited antigen-specific T cell proliferation and induced the down-regulation of the production of pro-inflammatory cytokines. However, ASC-derived NVs exhibited a limited efficacy on T lymphocytes activation *in vivo*. Afterwards, we investigated the effect of ASC-NVs on the adhesion activity of MOG-specific activated T cells both *in vitro* and *in vivo*. Our data suggested that ASC-NVs did not influence the endothelial activation in EAE spinal cords since we observed no differences in endothelial expression of adhesion molecules. However, ASC-NVs have shown to effectively inhibited T cells adhesion after exposure to CXCL12 chemokine, without changes of adhesion molecules expression. This finding was further confirmed *in vivo* by intravital microscopy on spinal cords pial venules of EAE mice.

CONCLUSIONS

Taken together our results indicate that ASC-NVs are able to induce immune-modulation and neuroprotection in the animal model of MS. Specifically, in chronic EAE model, the preventive treatment with ASC-released NVs induce beneficial effects by ameliorating the disease course as well as inhibiting

the T lymphocytes trafficking in the inflamed CNS. Future therapeutic applications may therefore be based on the use of ASC-NVs as safe and efficient

tool for the treatment of different pathological aspects of MS, thus limiting the use of parental cells and their potential side effects.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Farinazzo A. Mesenchymal adipose-stem cells nanovesicles: innovative therapeutic approach for neuroprotection and neuroregeneration. Oral communication at XXIV° AINI Congress, Sorrento (NA) 1-4 Ottobre 2014

Bonetti B. Mesenchymal adipose-stem cells nanovesicles: innovative therapeutic approach for neuroprotection and neuroregeneration. Poster at 12° Congr. ISNI Congress, International Society of Neuroimmunology, Mainz (Germania) 9-13 Novembre 2014

Farinazzo A, Turano E, Marconi S, Bistaffa E, Bazzoli E, Bonetti B. Murine adipose-derived mesenchymal stromal cell vesicles: in vitro clues for neuroprotective and neuroregenerative approaches. *Cytotherapy* 2015 May;17(5):571-8

Farinazzo A. Mesenchymal adipose-stem cells nanovesicles: innovative therapeutic approach for neuroprotection and neuroregeneration. Oral presentation at 17° MS Lab Retreat, Sinalunga (SI) 15-17 Gennaio 2015

Bonetti B. Exosomes from adipose mesenchymal stem cells: innovative therapeutic approach in experimental autoimmune encephalomyelitis. Poster at Congresso Scientifico Annuale FISM, Roma 27-29 Maggio 2015

Farinazzo A. Mesenchymal adipose-stem cells nanovesicles: innovative therapeutic approach for neuroprotection and neuroregeneration. Oral communication at VI Meeting Stem Cell Research Italy, Bari 10-12 Giugno 2015

Farinazzo A. Preventive efficacy of ASC-derived nanovesicles in chronic EA: innovative therapeutic approach for neuroprotection and neuroregeneration. Oral presentation at 18° MS Lab Retreat, Limestre (Pistoia), 13-16 Gennaio 2016

Bonetti B. Exosomes from adipose mesenchymal stem cells: innovative therapeutic approach in EAE. Poster at Congresso FISM-AISM, Roma, 25-27 Maggio 2016

Bonetti B. Nanovesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Oral communication at VII Meeting Stem Cell Research Italy, Bologna, 21-23 Giugno 2016

Farinazzo A, Angiari S, Turano E, Bistaffa E, Dusi S, Mariotti R, Constantin G, Bonetti B. Nanovesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit T lymphocyte trafficking and ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Submitted

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 120.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years (extended by 6 months) and the amount of € 120,000

Luca Muzio

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

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Roberta de Ceglia, Linda Chaabane, Stefano Taverna, Giancarlo Comi, Gianvito Martino

COLLABORAZIONI CON ALTRI GRUPPI / COLLABORATIONS WITH OTHER GROUPS:

Emilia Biffi, Laboratorio di Neuroingegneria e Robotica Medica, Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria, Politecnico di Milano, Milano

Andrea Menegon, Nausica Mazzocchi, ALEMBIC (Advanced Light and Electron Microscopy Bio-Imaging Centre), Centro di Imaging Sperimentale, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Lia Forti, Centro di Ricerca in Neuroscienze, Dipartimento di Scienze Teoriche e Applicate, Divisione di Biomedica, Università degli Studi dell'Insubria, (VA)

Pierfausto Seneci, Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Milano, Milano

Acidosi nelle malattie neuroinfiammatorie: il ruolo dei canali Asics

PREMESSE E OBIETTIVI

Lo sviluppo di farmaci neuro-protettivi in grado di rallentare/inibire la neuro-degenerazione rappresenta un punto di svolta nel trattamento della SM, soprattutto considerando che gli immunomodulanti attualmente in uso non sono in grado di rallentare la degenerazione neuronale delle fasi avanzate di malattia. Parte del danno degenerativo riflette fenomeni infiammatori e comprende zone e momenti di acidificazione tissutale. L'acidosi influenza diversi canali neuronali tra i quali, gli Acid-Sensing Ion Channels (ASICs), che sono gli unici ad avere il protone come agonista. Il ruolo di questi canali nella patologia è documentato sia nel modello di encefalomielite autoimmunitaria sperimentale (ESA), sia in un trial clinico basato sull'amiloride, un farmaco antipertensivo in grado di inibire diversi canali ionici tra cui gli ASICs. In questo progetto ci siamo proposti di realizzare uno studio approfondito dei canali ASICs nelle diverse fasi di malattia del modello di ESA. Successivamente abbiamo condotto uno screening farmacologico per identificare nuove molecole attive sui canali ASICs e di studiare in modo specifico il ruolo di queste isoforme nel contesto SM. Le molecole da noi selezionate potranno essere impiegate

sia come piattaforma per studi funzionali, sia per generare futuri strumenti terapeutici per il trattamento della SM.

RISULTATI

Abbiamo studiato i livelli di acidificazione cerebrale in corso di ESA. Il modello sperimentale è stato indotto in topi C57BL/6 iniettati con il peptide Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) 35-55, secondo un protocollo ampiamente impiegato nel nostro laboratorio ed in accordo con le normative nazionali per la sperimentazione animale (IACUC protocollo approvato numero 427). La misurazione dell'acidosi tissutale è stata condotta con un metodo non invasivo basato su ^1H NMR e uno scanner 7 Tesla (Bruker). La misurazione del pH tissutale ha confermato la presenza persistente di acidosi nel cervello dei topi con ESA durante le fasi infiammatorie. Abbiamo testato in ESA l'effetto di due molecole in grado di inibire ASIC1a, ossia la PcTX ed il Diminazene aceturato (DA), appartenente alla famiglia delle diarylamidines. Dopo l'immunizzazione, gli animali sono stati osservati sino alla manifestazione del primo segno clinico. Il giorno successivo gli animali sono stati soggetti a iniezione intra cisterna magna di sa-

lina (gruppo di controllo), PcTx1, e DA. Un operatore cieco al trattamento ha provveduto a pesare ed analizzare lo stato clinico gli animali sino al giorno 40. Una settimana dopo il trattamento abbiamo misurato le performance motorie degli animali in un esperimento di *open field*. I topi sono stati messi in una arena e registrati per 30 minuti per misurare la distanza percorsa, la velocità media e la capacità esploratoria nei confronti delle regioni centrali dell'arena. Entrambi i trattamenti hanno mostrato una soddisfacente e significativa azione terapeutica negli animali. Infine, abbiamo analizzato il midollo spinale degli animali per demielinizzazione e danno assonale. L'inibizione degli ASICs mediata da DA e PcTx-1 ha sensibilmente ridotto l'entità delle aree demielinizzate e di conseguenza il danno assonale. Abbiamo successivamente realizzato cloni cellulari esprimanti i canali ASICs, che sono stati per prima cosa testati con elettrofisiologia a singola cellula (patch clamp) e successivamente usati per uno screening mirato a valutare nuove molecole in grado di inibire i canali ASICs con maggiore potenza, selettività e soprattutto in grado di oltrepassare la BBB. Lo screening è stato condotto impiegando una nuova metodologia ottica, basata sulla fluore-

scenza dei coloranti sensibili al voltaggio (VSDs), in grado di studiare l'attività dei canali ASICs in piena automazione. Abbiamo testato 24 molecole e due di queste hanno dimostrato una discreta potenza nell'inibire ASIC1a. Le suddette molecole sono state successivamente analizzate tramite patch clamp ed anche in questo saggio hanno dimostrato di essere in grado di inibire efficacemente i canali ASICs.

CONCLUSIONI

I dati da noi generati suggerisco gli ASICs come un rilevante target molecolare per il trattamento delle fasi infiammatorie caratterizzanti l'ESA. L'inibizione di questi canali ha prodotto risultati incoraggianti per lo sviluppo di nuove terapie mirate a bloccare questi canali in ambito SM. A questo proposito, il nostro progetto ha prodotto cloni cellulari esprimanti i singoli canali ASICs che si sono dimostrati rilevanti per eseguire screening farmacologici mirati a generare nuovi composti in grado di bloccare i suddetti canali. Con questi strumenti, abbiamo generato due molecole in grado di bloccare i canali ASICs *in vitro* che potranno essere ulteriormente modificate ed affinate per il trattamento farmacologico della SM.

ACidosis in CNS Inflammatory DIseases: the role of Asics channels (ACCIDIA)

INTRODUCTION AND AIMS

Local acidosis is associated with neuro-inflammation and can have significant effects in several neurological disorders, including multiple sclerosis. Despite local acidosis has been implicated in numerous pathological functions, very little is known about the modulatory effects of pathological acidosis on the activity of neuronal networks and on synaptic structural properties. Acid Sensing Ion channels (ASICs) belong to the Nac/Deg channel super-family, that includes epithelial Na⁺ channels subunits (ENaC) and a family of proteins called Degenerins (Deg). ASICs, as well as other members of this family, are found to be pH-sensitive and are responsible of acid-evoked currents in neurons. The main objective of this project is the investigation of ASICs in EAE mice during acute and chronic inflammation. Furthermore, we have planned the genera-

tion of technical instruments and strategies for future screening procedures aimed to identify new inhibitors of such channels.

RESULTS

We have investigated an animal model of multiple sclerosis (MS), namely the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), to identify the tissue acidosis occurring during neuroinflammation. Using ¹H NMR we found that persistent acidosis, with pH levels around pH 6.5, affects large regions of the CNS during acute inflammation. This suggests that ASICs, and in particular homotrimeric ASIC1a and/or heterotrimeric ASIC1a/2a, can participate to the neuropathological scenario featuring the EAE model. The diarylamidine Diminazene Aceturate (DA) and PcTx1 are well known to ASICs, although they are not suitable for the treatment of brain disorder for

their poor Blood-Brain-Barrier penetrance. Application such molecules in the cisterna magna of the fourth ventricle during acidosis significantly ameliorated the clinical disease course of EAE mice. In particular, both compounds increased locomotion of mice if compared with mice receiving saline (control) treatment. At day 40 mice were sacrificed and extensive pathological analyses were done on spinal cords. Both compounds were able to provide neuroprotective effects, reducing demyelination and axonal damage. Starting from these data we were operating to modify the chemical structure of DA, in order to increase its potency and specificity for both ASIC1 and ASIC2, as well as to increase its brain permeability. We firstly generated stable CHO-K1 cell clones expressing the murine ASICs and then we performed a rational structure-based optimization of DA, that should lead to the synthesis of a candidate lead compound for the treatment of acidosis-mediated neurodegeneration. We used the

optic Fast VSDs (VSDs) that shift their fluorescence spectra, in response to changes of membrane potential to study ASICs expressing CHO cell clones. Using the fluorescence-based high-throughput methodology we have tested the ability of 24 new ASIC1s inhibitors to selectively inhibit such channels during acidosis. We selected two compounds showing the ability to block ASICs currents that were further validated by patch clamp.

CONCLUSIONS

These data, taken together, strongly suggest that ASICs are relevant target for the treatment of neuroinflammation occurring in MS. We have also developed and validated an innovative strategy to study ASICs *in vitro* that allows the pharmacological screening of new ASICs inhibitors. Using this approach we selected two compounds that are the ground for further chemical modification before moving to *in vivo* studies.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

De Ceglia R, Chaabane L, Biffi E, Bergamaschi A, Ferrigno G, Amadio S, Del Carro U, Mazzocchi N, Comi G, Bianchi V, Taverna S, Forti L, D'Adamo P, Martino G, Menegon A, Muzio L. Down-sizing of neuronal network activity and density of presynaptic terminals by pathological acidosis are efficiently prevented by Diminazene Aceturate. *Brain Behav Immun*. 2015 Mar;45:263-76. doi: 10.1016/j.bbi.2014.12.003

Mazzocchi N, De Ceglia R, Mazza D, Forti L, Muzio L, Menegon A. Fluorescence-Based Automated Screening Assay for the Study of the pH-Sensitive Channel ASIC1a. *J Biomol Screen*. 2016 Apr;21(4):372-80. doi: 10.1177/1087057115617455. Epub 2015 Nov 23

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 194.000 €

Research project funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 194,000

Giacomo Casella

Università Vita e Salute San Raffaele, Milano

MENTORE / MENTOR: **Roberto Furlan**

Microvescicole microgliali come vettore terapeutico per la neuroinfiammazione

PREMESSE E OBIETTIVI

Evidenze recenti suggeriscono che la microglia comunichi attraverso il rilascio di microvescicole con le cellule vicine, modificandone fenotipo e funzione. Recentemente è stato dimostrato che l'iniezione periferica di microvescicole può specificamente raggiungere il cervello. Inoltre, è stato osservato che le microvescicole microgliali sono preferenzialmente catturate dalla microglia. Le microvescicole di origine microgliale, perciò, rappresentano un promettente veicolo per la distribuzione di molecole anti-infiammatorie nel sistema nervoso centrale (CNS). Lo scopo finale del progetto è stato di generare una linea cellulare microgliale murina (BV2) capace di rilasciare microvescicole contenenti molecole anti-infiammatorie come l'interleuchina 4 (IL-4) ed usarle in neuroinfiammazione.

Complessivamente abbiamo diviso il progetto in 5 punti principali: a) ingegnerizzazione di una linea microgliale murina a esprimere l'IL-4 in modo costitutivo; b) ottimizzare un protocollo per far produrre vescicole e isolarle; c) verificare la capacità di queste vescicole di trasportare IL-4 e testare l'attività biologica su microglia ricevente *in vitro*; d) mettere a punto una tecnica per iniettare vescicole *in vivo* (intra cisterna o nella vena della coda) con lo scopo finale di raggiungere il CNS; e) valutare la capacità terapeutica di queste vescicole contenenti l'IL-4 in un modello murino di sclerosi multipla.

RISULTATI

In questi tre anni, ho caratterizzato una linea microgliale murina, le BV2, come sorgente di vescicole da utilizzare come tool terapeutico in neuroinfiammazione. In particolare, ho ingegnerizzato queste cellule a produrre microvescicole esprimenti sulla lo-

ro superficie la lactoproteina (Mfge8), strategia necessaria per aumentare la specificità di target, e nello stesso tempo le ho caricate con l'IL-4, una potente citochina anti-infiammatoria. Queste vescicole ingegnerizzate *ad hoc* hanno mostrato un'ottima attività biologica, in particolare hanno indotto un fenotipo antiinfiammatorio (M2) su cellule mieloidi. Attraverso una tecnica messa a punto nel nostro laboratorio, ho iniettato vescicole direttamente nel cervello di un topo e ho provato a studiarne la biodistribuzione. Iniettandole nello spazio liquorale, le vescicole vengono principalmente mangiate da cellule che risiedono nelle meningi; tuttavia non è ben chiaro se riescono a diffondere in profondità nel parenchima. Infine ho trattato topini malati di encefalite allergica sperimentale e sono riuscito a modulare la malattia. In particolare, questo trattamento ha protetto i topi da demielinizzazione e danno assonale e ha anche promosso l'espressione di geni antiinfiammatori in cellule mieloidi infiltranti, nel cervello e midollo spinale.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sono molto incoraggiati. Siamo riusciti a modulare l'infiammazione in topi EAE, iniettando una volta sola vescicole contenenti l'IL-4. Tuttavia ci sono ancora domande a cui rispondere, ad esempio quanto tempo dura l'effetto del nostro trattamento? È un effetto dipendente dall'IL-4, oppure da altre molecole come miRNA provenienti da cellule donatrici? Quali sono le cellule che noi bersagliamo *in vivo*? Che risvolti terapeutici concreti possono avere queste vescicole? Infine, un grande limite sono gli strumenti tecnici che adoperiamo, poiché risulta ancora difficile caratterizzare al meglio queste microparticelle e interpretare i dati ottenuti.

Microglial microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation

INTRODUCTION AND AIMS

Recent evidences suggest that microglia communicates through the release of microvesicles to neighboring cells to modulate their phenotype and function. Further, it has been recently shown that peripheral injection of engineered microvesicles can specifically target neural cells. We have preliminary evidence that microglia-derived microvesicles are preferentially up-taken by other microglia or by neurons. Thus, microglial microvesicles appear a promising drug-delivery tool to specifically target microglia and neurons with anti-inflammatory or neuro-protective molecules. Our final aim was to generate a cell line able to release microglial microvesicles able to target microglia and neurons when injected *in vivo*, and loaded with anti-inflammatory or neuroprotective molecules such as interleukin 4 (IL-4). We divided the project in five main points: a) stably engineer a mouse microglia cell line to express IL-4; b) optimize vesicle production and collection from this cell line; c) verify *in vitro* the ability of these vesicles to deliver IL-4 to target microglia and influence their phenotype or functions; d) verify *in vivo* the ability of *i.v.* or *i.c.* injected microvesicles to reach the CNS; e) verify *in vivo* the ability of IL-4-containing microvesicles to inhibit neuroinflammation.

RESULTS

During these three years, I characterized a microglial cellular line, BV2, as extracellular vesicles (EVs) source to use like therapeutic tool in neuroin-

flammation. In particular, I have engineered BV2 to produce EVs targeted with lactoprotein (Mfge8) to increase the target, and loaded with a strong anti-inflammatory cytokine IL-4. These vesicles showed a good biological activity, inducing the M2 anti-inflammatory phenotype in recipient myeloid cells. By a technique developed in my laboratory, I injected the EVs direct in the mice CNS and I tried to study the fate mapping. EVs injected in the liquor space, are principally “eaten” by resident meningeal cells and it is not clear if they can spread deep in CNS parenchyma. Finally, I treated EAE mice with EVs, and I was able to modulate the disease. In particular, this treatment protected mice from demyelination and axonal loss, and induced the M2 anti-inflammatory phenotype in CNS infiltrated myeloid cells.

CONCLUSIONS

The data obtained are very promising. We were able to modulate cronic EAE using IL-4EVs+ injected IC once. Concerning these data, however many aspects need to be examined in depth such as 1) do these effects are dependent to IL-4 encapsulated in EVs or to another molecules such as miRNA? 2) Which cells are we able to target? What are the therapeutic consequences of EVs using? Finally, current technical tools do not help us enough for EVs characterization and the data interpretation. We are confident about the potential of these small cellular particles.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI
PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Casella G, Garzetti L, Gatta AT, Finardi A, Maiorino C, Ruffini F, Martino G, Muzio L, Furlan R. IL4 induces IL6 producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation*. 2016 Jun 7;13(1):139. doi: 10.1186/s12974-016-0596-5

Casella G, Finardi A, Descamps H, Colombo F, Maiorino C, Ruffini F, Patrone M, Degano M, Muzio L, Becher B, and Furlan R. IL-27, but not IL-35, inhibits neuroinflammation down-regulating GM-CSF and inducing PD-L1. Submitted

Casella G, Colombo F, Finardi A, Ill-Raga G, Butti E, Podini P, Spinelli A, Muzio L, Comi G, Martino, and Furlan R. IL-4-containing extracellular vesicles inhibit neuroinflammation in a mouse model of multiple sclerosis. In preparation

Abstracts

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. Microglial microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation. Poster presentation: San Raffaele annual retreat, Milan 13- 15 March 2015

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. An emerging role of microglia microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation. 15thESNI course, Prague Czech Republic, 1-4 June 2015

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. Microglial microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation. Poster presentation XII European Meeting on Glia Cells in Health and Disease, Bilbao July 15-18 2015

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. Microglial microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation. Oral presentation: SINS, Società Italiana Neuroscienze, annual congress Cagliari 8-11 ottobre 2015

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. Myeloid cell-derived shedding vesicles as carriers of alternative polarizing factors. Poster presentation: ASCB, annual congress, San Diego, USA, December 12-16

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. Myeloid cell-derived shedding vesicles as carriers of alternative polarizing factors. Poster presentation San Raffaele annual retreat, Stresa March 18-20 2016

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. Myeloid cell-derived shedding vesicles as carriers of alternative polarizing factors. Oral presentation: SINS, Società Italiana Neuroscienze, National Meeting of PhD Students in Neuroscience Naples, April 14 2016

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. Myeloid cell-derived shedding vesicles as carriers of alternative polarizing factors. Oral presentation: XXV AINI congress Lecce, May 11-14 2016

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. Microglial Microvesicles as therapeutic vector for neuroinflammation. Poster presentation : Annual Scientific FISM Congress Rome, May 25-27 2016

Casella G, Colombo F, Finardi A, Furlan R. Myeloid cell-derived shedding vesicles as carriers of alternative polarizing factors. Poster presentation: 13th International congress of Neuroimmunology Jerusalem Israel, September 26-29 2016

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 40.000 €

Research Fellowship funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 40,000

Emanuela Colombo

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

MENTORE / MENTOR: **Cinthia Farina**

Astroцитi per la terapia cellulare della sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Grande attenzione è stata dedicata allo sviluppo di terapie innovative basate sul trapianto di cellule staminali per le malattie acute e croniche del sistema nervoso centrale (SNC), tra cui la sclerosi multipla (SM). Le possibilità di ristabilire la funzione neurologica risultano però notevolmente ridotte senza il sostegno di altri tipi cellulari nel garantire un ambiente appropriato per la riparazione del tessuto. Gli astroцитi, le cellule gliali più abbondanti nel sistema nervoso, giocano un ruolo critico nel SNC. Infatti, sono essenziali per l'attività e la sopravvivenza in condizioni fisiologiche e, in seguito a danno, hanno le capacità di ridurre l'infiammazione, sostenere la neuroprotezione e promuovere la riparazione dei tessuti. Gli obiettivi di questo progetto sono stati quello di investigare la validità del trapianto di astroцитi come opzione terapeutica nella sclerosi multipla sperimentale e di impostare la base scientifica per lo sviluppo di protocolli di terapia cellulare autologa per il trattamento della SM.

RISULTATI

Con l'obiettivo di indagare l'efficacia degli astroцитi come terapia cellulare nel modello sperimentale della SM, l'encefalomielite sperimentale autoimmune (ESA), abbiamo generato culture primarie di astroцитi murini isolati dal cervello. Dopo aver controllato la purezza delle culture ottenute, abbiamo messo a punto un test *in vitro* di co-cultura tra cellule T e astroцитi di topo al fine di valutare se le cellule gliali possano modulare l'attivazione dei linfociti T. Questi esperimenti hanno rivelato che gli astroцитi possono efficacemente bloccare la proliferazione delle cellule T, indicando che le preparazioni gliali possiedono un fenotipo immunosoppressivo *in vitro*. Da queste osservazioni, siamo passati allo studio *in vivo* sul modello murino per verificare l'efficacia clinica del

trapianto degli astroцитi durante l'ESA. Inizialmente abbiamo effettuato esperimenti preliminari per confermare la presenza delle cellule esogene, alcuni giorni dopo trapianto nel SNC, sia in topi sani sia in animali con l'ESA. Abbiamo poi ripetuto gli esperimenti ESA iniettando le cellule 7 o 24 giorni dopo l'immunizzazione con MOG₃₅₋₅₅, e abbiamo monitorato quotidianamente il decorso della malattia. I topi trapiantati con astroцитi al giorno 7 hanno mostrato una significativa minore incidenza e severità dell'ESA rispetto agli animali di controllo. Similmente, i topi iniettati con astroцитi durante la fase cronica dell'ESA sono rapidamente guariti dalla malattia. I nostri dati *in vivo* hanno quindi dimostrato che il trapianto di astroцитi esogeni, sia durante la fase pre-clinica che durante la fase cronica dell'ESA, allevia l'espressione della malattia.

Poichè lo sviluppo di protocolli di terapia cellulare per l'uomo deve tenere conto della difficoltà ad isolare astroцитi direttamente dal SNC, ci siamo proposti di verificare se le cellule somatiche come i fibroblasti possano essere utilizzati come fonte potenziale di astroцитi. Fibroblasti primari murini sono stati riprogrammati *in vitro* per generare cellule precursori neurali, che sono state poi differenziate per ottenere astroцитi maturi; queste colture derivate da fibroblasti sono state infine caratterizzate *in vitro*. Abbiamo subito osservato un significativo cambiamento nella morfologia cellulare durante il processo di differenziamento. Infatti, gli astroцитi differenziati hanno mostrato chiaramente un incremento di dimensioni dopo alcuni giorni di cultura e hanno assunto la tipica morfologia stellata dell'astroglia. Esperimenti di immunofluorescenza hanno dimostrato che alcuni tipici marcatori astroцитari erano espressi in maniera paragonabile sia dalle colture primarie di astroцитi che dalle cellule differenziate da fibroblasti.

CONCLUSIONI

La maggior parte delle attuali terapie per la cura della SM, che hanno come target principale il compartimento immunitario periferico, hanno mostrato in realtà una efficacia solo parziale. Idealmente dovrebbero essere formulati nuovi trattamenti che non solo mirino a ridurre l'infiammazione, ma che promuovano la neuroprotezione e la riparazione endogena del SNC. Le nostre osservazioni *in vivo* hanno evidenziato che il trapianto di cellule gliali è benefico per il modello sperimentale di sclerosi multipla. Infatti l'iniezione di astrociti nel SNC di topi con ESA, mi-

gliora l'espressione della malattia, sia in fase pre-acuta che cronica. Inoltre, i dati *in vitro* hanno evidenziato che gli astrociti hanno il potenziale di esercitare immunosoppressione. Infine, con l'obiettivo di rendere il trapianto astrocitario una vera alternativa per il trattamento della SM, abbiamo dimostrato che le cellule somatiche riprogrammate possono rappresentare una fonte facilmente accessibile di cellule gliali autologhe. Alla luce di questi dati, sono necessari ulteriori studi per individuare le specifiche funzioni esercitate dagli astrociti trapiantati e coinvolte nei meccanismi di riparazione dei tessuti.

Astrocytes for cell-therapy in multiple sclerosis

INTRODUCTION AND AIMS

Recent attention was devoted to the development of innovative therapies based on stem cell transplantation for acute and chronic disorders of the central nervous system (CNS), including multiple sclerosis (MS). Overall, the chances of restoring neurological function are greatly reduced without sustain of an appropriate environment provided by other cell types. Astrocytes, the most abundant glia cell type in the nervous system, play a critical role in healthy and injured CNS. They are essential for neuronal survival and activity under physiological conditions; after damage, astrocytes have the property to switch off inflammation, and support neuroprotection and tissue repair. Goal of this project was to address whether astrocyte transplantation may represent a therapeutic option in experimental MS; further, it aimed to set the scientific basis for the development of autologous cell therapy protocols for MS treatment.

RESULTS

With the aim of investigating the efficacy of cell-therapy with astrocytes in experimental MS model, the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), we generated cultures of primary mouse astrocytes isolated from brain of newborn animals. After checking the purity of the obtained cultures, we set up *in vitro* co-culture assays between T cells and mouse astrocytes to evaluate whether glia cells may modulate T lymphocyte activation. These ex-

periments revealed that astrocytes may efficiently block T cell proliferation, thus indicating an immunosuppressive phenotype for our cell preparations. Following the *in vitro* observation, we moved forward to an *in vivo* setting to address the clinical efficacy of astrocyte transplantation during EAE. At first, we performed preliminary experiments to confirm the engraftment of exogenous astrocytes some days after transplantation into the CNS of both naïve and EAE animals. Then we repeated EAE experiments by injecting cells 7 or 24 days post immunization (p.i.) with MOG₃₅₋₅₅ peptide and we daily monitored the course of the disease. Interestingly, mice transplanted with astrocytes at day 7 p.i. showed significant lower incidence and severity of EAE than control animals. Further, mice injected with astrocytes during the chronic phase of EAE efficiently recovered from disease. Our *in vivo* data demonstrated that the transplantation of exogenous astrocytes both during preclinical and chronic phases of EAE alleviates disease expression.

Unfortunately, when considering translation of these findings obtained in mouse model to human, cell therapy protocols would be limited by the availability of astrocytes isolated directly from CNS. Here we proposed to verify whether somatic cells as fibroblasts can be used as potential source of astrocytes. Mouse primary fibroblasts were *in vitro* reprogrammed to generate neural precursor cells and then cells were differentiated *in vitro* to obtain mature astrocytes; these fibroblast-derived cultures

were then characterized *in vitro*. Interestingly, we observed a significant change in cell morphology during the differentiation process. Indeed, differentiated astrocytes clearly showed an increment in cell size after some days in culture and displayed the typical stellate morphology of astroglia. Immunofluorescence analysis proved that some typical astrocytic markers were highly and equally expressed in primary and fibroblast-derived astrocytes.

CONCLUSIONS

Most current therapies for MS target primarily the peripheral immune compartment and have been shown to be only partly effective. Novel approaches ruling both the immune system to reduce inflammation and the CNS cells to promote neuroprotection

and endogenous repair are therefore desirable. Our *in vivo* observations highlighted that glia cell transplantation is beneficial for the experimental model of MS. In fact injection of astrocytes in the CNS of EAE mice ameliorates disease expression, during both pre-acute or chronic phase of the disease. Moreover, *in vitro* data demonstrated that astrocytes have the potential to exert immunosuppression. Finally, with the goal to make astrocyte transplantation a real alternative for MS treatment, we demonstrated that reprogrammed somatic cells may represent an easily accessible source of autologous astrocytes. Since no information is available about the mechanisms exerted by exogenous astrocytes to support tissue repair, further studies are needed in order to identify specific functions exerted by transplanted cells.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI PUBLICATIONS AND CONGRESS PRESENTATIONS

Colombo E, Farina C. Astrocytes: key regulators of neuroinflammation *Trends in Immunology*, 2016; Sep; 37(9):608-20

Colombo E, Di Dario M, Govi C, De Feo D, Messina MJ, Romeo M, Sangalli F, Moiola L, Rodegher M, Martino G, Martinelli V, Comi G and Farina C. Myeloid cells as target of fingolimod action in multiple sclerosis. *Neurology Neuroimmunology and Neuroinflammation*. 2015; Nov 4;2(6):e157

Colombo E, Di Dario M, Capitolo E, Chaabane L, Newcombe J, Martino G and Farina C. Fingolimod May Support Neuroprotection via Blockade of Astrocyte Nitric Oxide. *Annals of Neurology*. 2014; 76:325-337

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

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

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

Borsa di studio finanziata con il Bando FISM 2013 per il periodo di 2 anni e l'ammontare di 52.000 €

Research Fellowship funded by FISM Grant 2013 for the period of 2 years and the amount of € 52,000

Alessandra Mallano

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

COLLABORATORI / COLLABORATORS:

Michela Flego, Alessandro Ascione, Mara Gellini

Sviluppo di un anticorpo umano in grado di interrompere il *pathway* mediato da CD161 allo scopo di definire nuove strategie terapeutiche nella sclerosi multipla

PREMESSE E OBIETTIVI

Il CD161 è una molecola di superficie, espressa dalla maggioranza delle cellule NK e da circa il 24% delle cellule T periferiche. Tale recettore ha la funzione di indurre la produzione di citochine pro-infiammatorie (IFN- γ e IL-17) in cellule T e la loro migrazione trans-endoteliale; al contrario, induce effetti opposti sulle cellule NK, in quanto inibisce la produzione di citochine e la citotossicità. Recentemente è stata riportata un'espansione del *subset* delle cellule T CD161^{high}CD8⁺ nel sangue periferico e negli infiltrati cellulari del cervello correlata alla sclerosi multipla (SM). Queste osservazioni suggeriscono che il recettore CD161 e le cellule che esprimono CD161^{high} possano essere un potenziale *target* terapeutico per il trattamento della SM. L'obiettivo è quello di sviluppare un anticorpo umano antagonista anti-CD161 capace di legare selettivamente le cellule che esprimono il CD161 e di interrompere il suo *pathway* intracellulare inibendo il legame con il suo ligando. Questo anticorpo avrebbe l'effetto di inibire l'attivazione e la produzione di citochine pro-infiammatorie dai linfociti T CD161^{high}/CD8⁺ e di diminuire la loro adesione nei vasi sanguigni cerebrali e il loro accumulo nelle placche di demielinizzazione. Inoltre, considerando che le cellule NK regolatorie hanno un ruolo di controllo nella persistenza di cellule T autoreattive, anche nella MS, il blocco del *pathway* inibitorio del CD161 potrebbe ripristinare o potenziare il meccanismo protettivo delle NK. Per ottenere un anticorpo specifico per il CD161, proponiamo un approccio basato sul *phage-display*. Con questa tecnologia i fagi espongono porzioni variabili di anticorpi umani in formato *single chain Fragment variable* (scFv) sulla loro superficie e sono usati in cicli di *panning* contro un antigene. In questo modo, è possibile selezionare da un sistema immune artificiale, gli

scFv umani in grado di riconoscere l'antigene di interesse.

RISULTATI

Per selezionare anticorpi diretti verso la porzione del CD161 che riconosce il suo ligando, abbiamo usato il dominio extracellulare del CD161 nei cicli di *panning* e due diversi repertori: i) una libreria fagica sintetica, ETH-2, in cui la variabilità dei geni immunoglobulinici variabili deriva da due geni (uno per la catena pesante e uno per la catena leggera) con mutazioni nucleotidiche casuali sulla porzione CDR3 inserite mediante PCR; ii) una libreria naive, IORISS 1, in cui la variabilità del repertorio deriva direttamente dai geni dei linfociti B umani. Sono state usate due strategie per il *panning* che differiscono per l'esposizione dell'antigene: i) con l'antigene direttamente legato all'immunotubo, ii) con l'antigene biotinilato in soluzione acquosa e biglie magnetiche streptavidinate per recuperare i fagi specifici. Brevemente, un'aliquota di fagi rappresentativa della variabilità di tutto il repertorio è stata incubata con l'antigene specifico. I fagi aspecifici sono stati lavati via mentre i fagi specifici sono stati eluiti, amplificati e usati per i successivi cicli di *panning*. I cicli delle selezioni sono stati fatti in parallelo con un antigene di controllo (per il quale siamo certi che la libreria contenga un anticorpo specifico) per assicurarci che la procedura sia corretta. Purtroppo nessuna delle strategie ha permesso di isolare un anticorpo specifico anti CD161 da queste librerie. Uno dei possibili aspetti critici delle selezioni di anticorpi da repertori *in vitro* è la possibilità che essi non contengono anticorpi specifici per l'antigene di interesse.

CONCLUSIONI

In conclusione, abbiamo provato ad isolare un anticorpo antagonista contro l'antigene CD161. Abbia-

mo scelto la tecnologia del *phage display*, con librerie fagiche di scFv umani, poiché gli anticorpi ricombinanti che ne sarebbero derivati avrebbero avuto molti vantaggi utili per applicazioni cliniche, come l'origine umana, che li rende poco o per niente immunogenici e la possibilità di essere ulteriormente ingegnerizzati per modificare il loro peso molecolare o per modulare la loro affinità di legame al fine di migliorarne la sicurezza e l'efficacia clinica.

Purtroppo, non siamo stati in grado di isolare questo anticorpo specifico dalle due librerie fagiche anticorpali attualmente disponibili nel nostro laboratorio, ma crediamo ancora che il formato anticorpale qui

proposto potrebbe essere una valida piattaforma per lo sviluppo di nuovi farmaci da utilizzare da soli o in combinazione con altre terapie per il trattamento di MS, contribuendo così al raggiungimento di un approccio integrato, potenzialmente più efficace dei trattamenti attualmente disponibili.

L'idea di procedere in questo studio, è quello di utilizzare l'antigene CD161 espresso in un sistema eucariotico per avere un antigene potenzialmente con nuovi epitopi, estendendo così la probabilità di trovare anticorpi efficaci anti-CD161 dalle librerie disponibili oggi, in attesa di avere altri repertori anticorpali.

Development of a human antibody able to break the CD161-mediated pathway in order to design new therapeutic strategies in multiple sclerosis disease

INTRODUCTION AND AIMS

CD161, is a surface molecule, expressed by the majority of NK cells and approximately 24% of peripheral T cells. It plays a role in the activation of T cells to produce pro-inflammatory cytokines (IFN- γ and IL-17) and in T-cells trans-endothelial migration; moreover, CD161 was shown to induce opposing effects on NK cells, such as inhibition of cytokines productions and cytotoxicity. Recently, it was reported a multiple sclerosis (MS)-related expansion of the CD161high CD8+ subset peripheral blood T cells, that was also found in MS brain infiltrates.

These data suggest that CD161 receptor and CD161high-expressing cells could be a potential therapeutic target for the treatment of MS.

The aim of this project was the development of a human antagonist anti-CD161 antibody, able to bind selectively CD161-expressing cells and to interrupt its intracellular signaling pathway inhibiting the binding with its natural ligand. This antibody would have the effect to inhibit the activation and the production of pro-inflammatory cytokines by CD161high/CD8+ T lymphocytes, and, at the same time, it could also decrease the CD161 high CD8+ T cells adhesion to brain vessels and their accumulation in demyelinating plaques.

Moreover, considering that regulatory NK cells have a role in controlling the persistence of autoreactive T cells, also in MS, the blockade of CD161 inhibitory pathway, could restore or potentiate this NK-medi-

ated protective mechanism.

In order to obtain the CD161 specific antibody, we proposed a phage display antibody-based approach. In this technology, phages are used to display repertoires of only human variable antibody portion in single chain Fragment variable (scFv) format on their surfaces, and can be used in iterative cycles of panning against an antigen. Therefore, it is possible to select from an artificial immune system, human scFvs recognizing the antigen of interest.

RESULTS

We decided to use a CD161 extracellular protein domain as a bait during panning cycles, to drive the antibody selection directly on the CD161 binding ligand epitope, and we used two different antibody repertoires: i) synthetic phage library, ETH-2, where the variability of the immunoglobulin V genes repertoire derives from two V gene segments (one for heavy and one for light chain) with random nucleotide mutations in CDR3 regions inserted by PCR; ii) a naïve library, IORISS 1 where the variability of the immunoglobulin V genes repertoire derives directly from the human B-lymphocytes. We used two panning strategies which differ for the antigen exposure: i) direct antigen coating of immunotubes, ii) biotinylated antigen in aqueous solution and streptavidin-coated magnetic beads to capture bound specific phages. In brief, an aliquot of phages representing the variability of the repertoire, was incubated with the antigen, non-specifically ab-

sorbed phages were removed while the specific bound phages were eluted, amplified, and then used for further rounds of panning.

Selections cycle were performed in parallel on CD161 antigen and on a control antigen (since it is already known that the library contains an antibody against this antigen) to assure that the procedure was correct. Unfortunately, none of the strategies used give us the expected results, and we were not able to obtain any antibody against CD161 antigen from these libraries.

One of the possible critical aspects of selections of antibodies from *in vitro* repertoires, is the likelihood that, the used repertoires didn't contain the antibody having the desired specificity.

CONCLUSIONS

In conclusion, we tried to isolate an antagonist antibody against CD161 antigen. We chose a phage display antibody-based approach using a human scFv phage library, since the derived recombinant antibodies would have provided many advantages

for clinical applications, such as their human origin, that makes them poor or not at all immunogenic and the possibility to be promptly engineered to modify its molecular weight or to modulate its binding affinity in order to improve their safety and clinical effectiveness.

Unfortunately, we were not able to isolate this specific antibody from the two phage display libraries currently available in our laboratory, but we still believe that the antibody format here proposed may prove to be a solid platform towards the development of new drugs to be used alone or in combination with other therapeutics to treat MS, thus contributing to the achievement of an integrated approach, potentially more widely effective than currently available treatments. Our idea to proceed in this study, is to use antigen CD161 expressed in eukaryotic cell system to have an antigen with potentially new epitopes, thus extending the likelihood of finding effective anti-CD161 binders from the libraries available today, waiting to have other antibody repertoires.

Progetto di ricerca finanziato con il Bando FISM 2014 per il periodo di 1 anno (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di 30.000 €

Research project funded by FISM Grant 2014 for the period of 1 year (extended by 3 months) and the amount of € 30,000

La ricerca

sulla

**sclerosi
multipla**

**PROGETTI DI RICERCA E BORSE
DI STUDIO FINANZIATI DA FISM
2016/2015**

FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2016/2015

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM 2016 FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2016

SM PROGRESSIVA / PROGRESSIVE MS

Marcello Pinti

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia
Dipartimento di Scienze della Vita, Modena

Regolazione del metabolismo cellulare nei linfociti di pazienti con forme progressive di sclerosi multipla

Regulation of cell metabolism in lymphocytes from patients with progressive forms of multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 155.000 - 2 anni / years

Stefano Carlo Previtali

Fondazione Centro San Raffaele
Istituto di Neurologia Sperimentale (InSpe)
Divisione di Neuroscienze, Milano

Ruolo di Jab1 e della senescenza nella patogenesi delle forme progressive di SM in un modello animale

Role of Jab1 and senescence in the pathogenesis of progressive MS in a mouse model

Progetto di Ricerca / Reserch Project
€ 150.000 - 2 anni / years

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Laura Bonzano

Università degli Studi di Genova
Dipartimento di Neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia genetica e scienze materno-infantili (DINOEMI), Genova

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 40.000 - 1 anno / year

Martina Borghi

Azienda Ospedaliera Universitaria San Luigi Gonzaga
Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla e Neurobiologia Clinica, Orbassano (TO)

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 20.500 - 1 anno / year

Marco Bove

Università degli Studi di Genova
Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES)
Sezione di Fisiologia Umana, Genova

Monitoraggio e supporto attraverso un ausilio protesico con biofeedback del percorso riabilitativo in persone con sclerosi multipla

Monitoring and integrating the rehabilitative process of persons with multiple sclerosis by means of a prosthetic aid with biofeedback

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 170.000 - 3 anni / years

Davide Cattaneo

IRCCS, Fondazione Don Gnocchi
Centro Santa Maria Nascente, Milano

Identificazione dei disturbi precoci del cammino in soggetti non disabili affetti da SM: valutazione clinico-strumentale della progressione della malattia e di potenziali interventi terapeutici

Unraveling early walking dysfunction in non-disabled MS people: clinical and instrumental assessment of disease progression and potential therapeutic interventions

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 110.000 - 2 anni / years

Franca Deriu

Università degli Studi di Sassari, Dipartimento di Scienze Biomediche
Laboratorio di Fisiologia e Neurofisiologia Applicata, Sassari

Efficacia dell'allenamento controlaterale nella gestione della debolezza muscolare e della fatica in persone con sclerosi multipla

Effectiveness of contralateral training in the management of muscle weakness and fatigue in individuals with multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 128.500 - 2 anni / years

Ambra Mara Giovannetti

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

Allestimento italiano del programma "REsilience and Activity every DaY for MS", degli outcomes, e valutazione pilota di efficacia mediante impiego di metodologia mista (READY-It-MS)

Italian set up of the program "REsilience and Activity every DaY for MS", of outcomes, and pilot assessment of efficacy using a mixed methodology (READY-It-MS)

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 70.000 - 2 anni / years

Ludovico Pedullà

Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Fisiologia Umana, Genova

Studio dei correlati comportamentali e neurali in compiti di dual task in ambiente ecologico: indagine fNIRS prima e dopo un intervento riabilitativo in persone con sclerosi multipla

Behavioural and neural correlates of dual tasks negotiation in ecological setting: an fNIRS study to investigate cognitive-motor interference after rehabilitation in people with multiple sclerosis

Borsa di Ricerca / Research Fellowship
€ 50.000 - 2 anni / years

Giorgio Sandrini

IRCCS Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino
Università degli Studi di Pavia, Dipartimento di Scienze del Sistema Nervoso e del Comportamento
Dipartimento di Neurologia e Neuroriabilitazione, Pavia

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Vittorio Sanguineti

Università degli Studi di Genova
Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi (DIBRIS), Genova

Attività di stimolazione elettrica transcranica (tES) combinata con interazione aptica mediata da robot per il miglioramento delle funzionalità dell'arto superiore nella sclerosi multipla (ROBOTES)

Activity of combined trans-cranial electrical stimulation (tES) and robot-mediated haptic interaction to improve upper limb function in multiple sclerosis (ROBOTES)

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Carlo Trompetto

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

La distonia spastica nella sclerosi multipla: il lato oscuro dell'ipertono muscolare

Spastic dystonia in multiple sclerosis: the dark side of muscle hypertonia

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 60.000 - 2 anni / years

DIAGNOSI E MONITRAGGIO
DELLA MALATTIA / DISEASE DIAGNOSIS
AND MONITORING

Linda Chaabane

Fondazione Centro San Raffaele
Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Milano

Fluoro (19F) RMI: un nuovo metodo di imaging per la rilevazione dell'infiammazione nel SNC in vivo

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Elisabetta Pagani

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

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Maria Assunta Rocca

Fondazione San Raffaele, Unità di Neuroimaging della Sostanza Bianca del Sistema Nervoso Centrale, Istituto di Neurologia Sperimentale, Divisione di Neuroscienze, Milano

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 94.000 - 1 anno / year

PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO /
PATHOGENESIS AND RISK FACTORS

Stefania Ceruti

Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari
Laboratorio di Farmacologia Molecolare e Cellulare della Trasmissione Purinergica, Milano

Studi sui meccanismi molecolari e cellulari alla base della neuropatia trigeminale e della maggiore suscettibilità all'emicrania nella sclerosi multipla

Insights into the molecular and cellular mechanisms at the basis of multiple sclerosis-related trigeminal neuropathy and increased susceptibility to migraine pain

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 29.872,5 - 1 anno / year

Paola de Candia

Fondazione Multimedita Onlus, Laboratorio di Immunologia, Milano

Analisi del ruolo del miR-146a-5p extra-cellulare nella perdita di tolleranza immunologica nella sclerosi multipla

Unveiling the role of extracellular vesicle-associated miR-146a-5p in the loss of immune tolerance during multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Cinthia Farina

Fondazione Centro San Raffaele, Divisione di Neuroscienze, Istituto di Neurologia Sperimentale, Milano

Meccanismi di controllo astrocitario nella neuroinfiammazione

Mechanisms of astrocyte control in neuroinflammation

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 226.000 - 3 anni / years

Roberta Felici

University of Edinburgh
Centre for Regenerative Medicine, Edinburgh UK

Sviluppo di un dispositivo a microfluidi per lo studio della migrazione di cellule essenziali per la rimielinizzazione delle lesioni nella sclerosi multipla

Development of a microfluidic assay to study migration of cells essential for remyelination in MS lesions

Borsa di Ricerca / Research Fellowship
€ 81.000 - 2 anni / years

Martina Gabrielli

CNR Istituto di Neuroscienze
Dipartimento di Scienze Biomediche, Laboratorio di Comunicazione intercellulare nel cervello, Milano

Possibili effetti divergenti di microglia e macrofagi sui precursori degli oligodendrociti: ruolo delle vescicole extracellulari

Microglia versus macrophage effects on oligodendrocyte precursor cells: role of extracellular vesicles

Borsa di Ricerca Senior / Senior Research Fellowship
€ 68.000 - 2 anni / years

Luisa Imberti

Azienda Socio Sanitaria Territoriale Spedali Civili Brescia
Laboratorio CREA, UO Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Brescia

Identificazione di clonotipi delle cellule T in corso di leucoencefalopatia multifocale progressiva in pazienti con sclerosi multipla: ruolo nello sviluppo della malattia

Identification of progressive multifocal leukoencephalopathy-related T-cell clonotypes in natalizumab treated multiple sclerosis patients: role in the disease development

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 28.500 - 1 anno / year

Roberta Magliozzi

Università degli Studi di Verona, Sezione di Neurologia
Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento
Policlinico G.B. Rossi, Verona

Componenti strutturali e infiammatori della patologia corticale nella sclerosi multipla

Structural and inflammatory components of cortical pathology in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 80.000 - 3 anni / years

Giuseppe Matarese

Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di Endocrinologia e Oncologia Sperimentale, Napoli

La glicolisi come nuovo determinante metabolico tra la tolleranza immunologica e la patogenesi della sclerosi multipla

Glycolysis as novel metabolic determinant linking immune tolerance and pathogenesis of multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 307.500 - 3 anni / years

Simona Rolla

Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Orbassano (TO)

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

Gut microbiota and metagenomic diversity in the development of multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Barbara Serafini

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

Studio dei meccanismi immunopatologici in tessuto cerebrale donato da persone con sclerosi multipla: focus su linfociti T citotossici EBV-specifici, cellule NK e risposta all'IFN-gamma

Study of immunopathological mechanisms in the multiple sclerosis brain: focus on Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes, NK cells and response to IFN-gamma

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 100.000 - 2 anni / years

Loretta Tuosto

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

Ruolo del CD28 e della PI3K di classe 1A nella regolazione dei processi metabolici associati alle risposte pro-infiammatorie dei linfociti T nella SM

Role of CD28 and associated class 1A PI3K in the regulation of the cellular metabolic programs associated to pro-inflammatory T cell responses in MS

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 100.000 - 2 anni / years

Claudia Verderio

CNR, Istituto di Neuroscienze
Dipartimento di Scienze Biomediche, Milano

Coinvolgimento delle vescicole extracellulari rilasciate da cellule microgliali nelle disfunzioni sinaptiche nella sclerosi multipla

On the role of extracellular vesicles derived from inflammatory microglia in synaptic dysfunction in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Elisabetta Volpe

Fondazione Santa Lucia
Laboratorio di Neuroimmunologia, Roma

Studio del potenziale ruolo neuroprotettivo della interleuchina-9 nella sclerosi multipla

Study of the potential neuroprotective role of interleukin-9 in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 160.000 - 3 anni / years

Michele Zagnoni

University of Strathclyde
Centre for Microsystems & Photonics, Department of Electronic and Electrical Engineering, Glasgow, UK

Quali meccanismi regolano il reclutamento delle cellule coinvolte nella riparazione di lesioni nella sclerosi multipla?

How are repairing brain cells successfully recruited to multiple sclerosis lesions?

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

VERSO NUOVI TRATTAMENTI /
TOWARDS NEW TREATMENTS

Bruno Bonetti

Università degli Studi di Verona, Dipartimento di Neuroscienze, Biomeccanica e Movimento, Verona

Homing e target cellulare di esosomi isolati da cellule staminali mesenchimali in un modello sperimentale di encefalomielite autoimmune

Homing and cell target of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 113.000 - 2 anni / years

Alessia Capotondo

Fondazione Centro San Raffaele, Divisione di Neuroscienze Unità di Neuroimmunologia, Milano

Ingegnerizzare cellule microgliali per il rilascio di molecole terapeutiche nel SNC di topi con EAS

Engineering microglia cells for the delivery of therapeutic molecules in the CNS of EAE mice

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Luca D'Andrea

Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, Napoli

Nuove molecole sintetiche che inducono la sopravvivenza degli oligodendrociti attivando i recettori Axl

Novel synthetic molecules promoting oligodendrocytes survival in multiple sclerosis lesions by activation of Axl receptors

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Antonina Dolei

Università degli Studi di Sassari Dipartimento di Scienze Biomediche, Sassari

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 60.000 - 1 anno / year

Ivano Eberini

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

Approfondimento e modelling dei meccanismi di rimielinizzazione indotti da antimicotici azolici in uso clinico con caratteristiche di riposizionamento

Deciphering and modelling remyelinating mechanisms induced by clinically-used azole antifungals with exploitable repurposing properties

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 75.000 - 1 anno / year

Maira Gironi

Ospedale San Raffaele, INSPE Unità Operativa di Neuroimmunologia Clinica Centro Sclerosi Multipla, Milano

Anticorpi anti fosfolipidi ossidati: una potenziale risorsa naturale protettiva per la sclerosi multipla

Anti oxidized-phospholipids antibodies as inhibitors of neuroinflammation: exploiting a natural immune protective tool to fight multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Francesco Ria

Università Cattolica del Sacro Cuore, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Istituto di Patologia Generale, Roma

Liposomi "janus-faced" come strumenti terapeutici in grado di mediare un fenotipo T soppressorio nella sclerosi multipla

Janus-faced liposomes as therapeutic tools to drive T suppressor phenotype in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 300.000 - 3 anni / years

PROGETTI SPECIALI 2016 SPECIAL PROJECTS 2016

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Giampalo Bricchetto

Ricerca Scientifica, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, FISM, Genova

Applicazione mobile per il monitoraggio dell'emozione motore-cognitiva nella sclerosi multipla

MAppingMS: Mobile Application for monitoring of motor-cognition-emotion in Multiple Sclerosis

Progetto Speciale / Special Project
€ 95.238 - 1 anno / year

DIAGNOSI E MONITRAGGIO DELLA MALATTIA / DISEASE DIAGNOSIS AND MONITORING

Giancarlo Comi

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

Rischio individuale nelle sindromi clinicamente isolate di conversione a sclerosi multipla e progressione della malattia: un approccio integrato di clinica, genomica e di sanità pubblica

Individual risk in clinically isolated syndromes of conversion to multiple sclerosis and disease progression: an integrated public health clinical genomics approach

Progetto Speciale / Special Project
€ 95.238 - 3 anni / years

VERSO NUOVI TRATTAMENTI / TOWARDS NEW TREATMENTS

Giovanni Ristori

Centro Neurologico Terapie Sperimentali (CENTERS) Sapienza Università di Roma, Neurologia e Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale e Organi di Senso NESMOS Ospedale Sant'Andrea, Roma

Vaccino Bacille Calmette-Guérin (BCG) nella sindrome clinicamente isolata (RIS)

Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine in radiologically isolated syndrome (RIS)

Progetto Speciale / Special Project
€ 216.667 - 2 anni / years

PROGETTI DI RICERCA E BORSE DI STUDIO FINANZIATI DA FISM 2015 FISM FUNDED RESEARCH PROJECTS AND FELLOWSHIPS 2015

SM PROGRESSIVA / PROGRESSIVE MS

Alessandra Solari

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta
U.O. Neuroepidemiologia, Milano

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

*Managing the transition (ManTra) - a resource for persons with secondary progressive MS.
Phase 1: construction of the resource*

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 77.227,5 - 2 anni / years

Cristina Rivellini

Fondazione Centro San Raffaele
INSPE-Istituto di Neurologia Sperimentale
Ospedale San Raffaele, Milano

Ruolo di Jab1 nella patogenesi della SM progressiva
Role of Jab1 in the pathogenesis of progressive MS

Borsa di Ricerca / Reserch Fellowship
€ 50.000 - 2 anni / years

NEURORIABILITAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA / NEUROREHABILITATION AND QUALITY OF LIFE

Raffaella Molteni

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

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 25.000 - 1 anno / year

DIAGNOSI E MONITRAGGIO DELLA MALATTIA / DISEASE DIAGNOSIS AND MONITORING

Clara Ballerini

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

Valutazione dell'impatto delle terapie immunomodulatorie su pazienti SMRR tramite lo studio del repertorio TCR con tecniche di next generation sequencing

Impact of successful immunomodulatory therapies in SMRR on human TCR repertoire by next generation sequencing

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 155.000 - 2 anni / years

Annalisa Barla

Università degli Studi di Genova
DIBRIS - Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi, Genova

Rilevamento precoce di progressione della sclerosi multipla basato su scale cliniche e misure auto-riportate (DETECT-MS PRO)

Early DETECTION of Multiple Sclerosis progression driven by clinical scales and Patient Reported Outcome (DETECT-MS PRO)

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 110.000 - 2 anni / years

Antonio Bertolotto

Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavaliere Ottolenghi (NICO)
AOU San Luigi Gonzaga
SCDO Neurologia 2, Orbassano (TO)

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 72.000 - 1 anno / year

Piero Del Boccio

Università degli Studi "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara
Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche,
Centro Scienze dell'Invecchiamento (Ce.S.I.)
Unità di Biochimica Analitica e Proteomica, Chieti

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 29.500 - 1 anno / year

Lucilla Nobbio

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

Marcatori biologici per monitorare demielinizzazione e rimielinizzazione

Biomarkers to monitor demyelination and remyelination

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 111.350 - 2 anni / years

Girolama Alessandra Marfia

Università degli Studi di Roma Tor Vergata
Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Roma

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

**PATOGENESI E FATTORI DI RISCHIO /
PATHOGENESIS AND RISK FACTORS**
Sandra D'Alfonso

Università del Piemonte Orientale
Dipartimento di Scienze della Salute, Novara

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 185.000 - 2 anni / years

Francesca Santoni de Sio

Fondazione Centro San Raffaele
Dipartimento di Medicina Rigenerativa, Cellule Staminali e Terapia Genica, Milano

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 100.000 - 1 anno / year

Paolo Muraro

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

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 210.000 - 2 anni / years

Marco Patrone

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

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 56.000 - 1 anno / year

Roberta Rizzo

Università degli Studi di Ferrara
Dipartimento di Scienze Mediche Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Ferrara

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 82.000 - 2 anni / years

Michele Zampieri

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

Associazione tra i livelli di 5-idrossimetilcitosina e la poli (ADP-ribosilazione) nel cervello di individui affetti da SM

Link between 5-hydroxymethylcytosine levels and poly(ADP-ribosylation) in human MS brain

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 29.000 - 1 anno / year

Stefano Angiari

Università degli Studi di Verona
Dipartimento di Patologia e Diagnostica
Sezione di Patologia Generale, Verona

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

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

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 30.000 - 1 anno / year

Silvia Dusi

Università degli Studi di Verona
Dipartimento di Patologia e Diagnostica
Laboratorio di Neuroimmunologia, Verona

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

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

Borsa di Ricerca / Reserch Fellowship
€ 49.000 - 2 anni / years

Valerio Chiurchiù

IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

Plasticità e polarizzazione dei macrofagi e della microglia come target nella sclerosi multipla: "in/ex vivo" veritas

Targeting macrophage/microglia plasticity and polarization in multiple sclerosis: "in/ex vivo" veritas

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 55.000 - 1 anno / year

Vincenzo Barnaba

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

Ruolo delle risposte di cellule T CD8+ a epitopi associati a cellule T apoptotiche nella sclerosi multipla e nella encefalomielite sperimentale autoimmune

Role of CD8+ T cell responses to apoptotic T cell-associated epitopes in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 222.000 - 2 anni / years

Francesca Boscia

Università degli Studi di Napoli "Federico II"
Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Napoli

Studio del ruolo dell'isoforma dello scambiatore Na+/Ca+2 NCX3 nella rimielinizzazione del sistema nervoso centrale

Role of the Na+/Ca+2 exchanger NCX3 in central nervous system remyelination

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 98.000 - 1 anno / year

Vittorio Gallo

*Children's Research Institute
Center for Neuroscience Research, Washington DC, USA*

Meccanismi di segnalazione implicati in genesi e rigenerazione di oligodendrociti mediati da Sox17

Signaling mechanisms underlying Sox17-mediated oligodendrocyte generation and repair

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 184.260 - 3 anni / years

VERSO NUOVI TRATTAMENTI /
TOWARDS NEW TREATMENTS

Francesco Cucca

*Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica del CNR,
Dipartimento di Biomedicina, Monserrato (CA)*

Elucidazione del ruolo di BAFF e della sua via immuno-patogenetica nell'insorgenza della sclerosi multipla e utilizzo dell'avanzamento in conoscenza per lo sviluppo di terapie più mirate ed efficaci

Dissection of the BAFF pathway in multiple sclerosis with a view toward more specific and effective therapies

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 240.000 - 3 anni / years

Roberta Brambilla

*University of Miami
The Miami Project To Cure Paralysis, Miller School of
Medicine, Miami, USA*

Meccanismi molecolari della funzione protettiva del TNFR2 oligodendrogliale: un nuovo target terapeutico nelle patologie neuroimmuni

Molecular mechanisms of the protective function of oligodendroglial TNFR2: a new therapeutic target in neuro-immune disease

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 161.000 - 3 anni / years

Massimo Degano

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

Struttura cristallografica e caratterizzazione funzionale del recettore GPR17, un bersaglio innovativo per terapia di rimielinizzazione nella sclerosi multipla

Crystal structure and functional characterization of the GPR17 receptor, a novel pharmacological target for remyelination therapy in multiple sclerosis

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 150.000 - 1 anno / year

Rosetta Pedotti

*Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta
Unità di Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari,
Milano*

Il ruolo della prokineticina 2 nella autoimmunità del sistema nervoso centrale e neurodegenerazione

The role of prokineticin 2 in CNS autoimmunity and neurodegeneration

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 128.250 - 2 anni / years

Antonio Uccelli

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

Targeting terapeutico dell'attività e dell'espressione di REST allo scopo di ridurre la neurodegenerazione ed i deficit sinaptici in modelli di EAE cronica

Therapeutic targeting of REST activity and expression to reduce neurodegeneration and synaptic deficits in chronic EAE

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 235.000 - 3 anni / years

Flavia Valtorta

*Università Vita-Salute San Raffaele,
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Laboratorio di Neuropsicofarmacologia, Milano*

Meccanismi omeostatici presinaptici nel corso di trattamento cronico di neuroni con citochine proinfiammatorie ed in corso di encefalite allergica sperimentale

Presynaptic homeostatic mechanisms upon chronic treatments of neurons with inflammatory cytokines and in the course of EAE

Progetto di Ricerca / Research Project
€ 210.000 - 2 anni / years

COMITATO SCIENTIFICO FISM 2016

FISM SCIENTIFIC COMMITTEE 2016

BIOMEDICAL RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Maria Pia Abbraccio

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

Luciano Adorini

Chief Scientific Officer - Intercept Pharmaceuticals, MILANO

Clara Ballerini

NEUROFARBA Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Università degli Studi di Firenze, FIRENZE

Luca Battistini

IRCCS Santa Lucia, Unità di Neuroimmunologia, European Centre for Brain Research, ROMA

Antonio Bertolotto

AOU S. Luigi Gonzaga, Centro di riferimento Regionale Sclerosi Multipla (CReSM), Orbassano (TO)

Roberta Brambilla

University of Miami, The Miami Project To Cure Paralysis, Miller School of Medicine, MIAMI US

Sandra D'Alfonso

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi del Piemonte Orientale, NOVARA

Raj Kapoor

University College London Hospitals NHS, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, LONDON UK

Letizia Leocani

Unità di Neurofisiologia Sperimentale e MAGICS Center, INSPE, Ospedale San Raffaele, MILANO

Catherine Lubetzki

Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département des Maladies du Système Nerveux, PARIS France

Giuseppe Matarese

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", NAPOLI

Miriam Mattoscio

Imperial College London, LONDON UK

Marco Salvetti

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

Carla Taveggia

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

Lawrence Wrabetz

Hunter James Kelly Research Institute (HJKRI), University at Buffalo, Buffalo NY, US



SOCIAL & BEHAVIOURAL SCIENCE
RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Giovanni Abbruzzese

DINOEMI, Università degli Studi di Genova, GENOVA

Maria Pia Amato

NEUROFARBA Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino,
Università degli Studi di Firenze, FIRENZE

Roberto Bergamaschi

Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino, IRCCS, PAVIA

Marco Bove

Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Università degli Studi di Genova, GENOVA

Jürg Kesselring

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

Maria Assunta Rocca

Fondazione San Raffaele, MILANO

Alessandra Solari

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

COMITATO SCIENTIFICO FISM 2015

FISM SCIENTIFIC COMMITTEE 2015



BIOMEDICAL RESEARCH FISM SCIENTIFIC COMMITTEE

Luciano Adorini

Chief Scientific Officer - Intercept Pharmaceuticals, MILANO

Clara Ballerini

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Firenze, FIRENZE

Luca Battistini

IRCCS Santa Lucia, Unità di Neuroimmunologia, European Centre for Brain Research, ROMA

Diego Centonze

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

Gabriela Constantin

Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università degli Studi di Verona, VERONA

Sandra D'Alfonso

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi del Piemonte Orientale, NOVARA

Peter Goodfellow

Visiting Professor in Biosciences at the University of Kent, UK

Matilde Inglese

Mount Sinai School of Medicine, NEW YORK, USA

Paolo Muraro

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

Stefano Pluchino

Department of Clinical Neurosciences, Centre for Brain Repair and Wellcome Trust-MRC Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge, CAMBRIDGE, UK

Marco Salvetti

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

Carla Taveggia

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

Lawrence Wrabetz

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

SOCIAL & BEHAVIOURAL SCIENCE RESEARCH FISM
SCIENTIFIC COMMITTEE

Maria Pia Amato

Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino, Università di Firenze, FIRENZE

Monica Falautano

Dipartimento di Neurologia, Servizio di Psicologia, Ospedale San Raffaele, MILANO

Jürg Kesselring

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

Letizia Leocani

Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Dipartimento Neurologico, MILANO

Maura Pugliatti

Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgico Specialistiche, Sezione di Scienze Neurologiche, Psichiatriche e Psicologiche, Università degli Studi di Ferrara, FERRARA

Marco Rovaris

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

Alessandra Solari

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

DIRETTORE RICERCA SCIENTIFICA

Paola Zarin

Associazione Italiana Sclerosi Multipla, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla, GENOVA