

RUOLO DEL SISTEMA FAS NELLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA

B. Bonetti (a), C. Stegagno (a), N. Rizzuto (a), M. Colombatti (b), G. Moretto (a)

(a) *Istituto di Neurologia, Azienda Ospedaliera di Verona.*

(b) *Istituto di Immunologia, Università degli studi di Verona*

La Sclerosi Multipla (SM) e' una malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale in cui la mielina e le cellule che la producono, gli oligodendrociti, diventano il bersaglio di una risposta autoimmune. Tra i vari meccanismi citotossici responsabili della morte cellulare, è stato recentemente dimostrato che il sistema fas giuoca un ruolo determinante nelle fasi iniziali della risposta auto-immunitaria e nella formazione e risoluzione delle lesioni di SM. Il recettore fas viene attivato dal suo ligando, fasL, inducendo morte delle cellule bersaglio. Oltre alle forme legate alla membrana cellulare, sono state recentemente descritte forme solubili (s) biologicamente attive sia per il fas che per il fasL.

Obiettivo principale della ricerca era quello di verificare un'eventuale correlazione tra i livelli di sfas e sfasL ed attività di malattia ed investigare l'effetto sul sistema del fas di vari composti terapeutici impiegati nella SM. Durante il primo anno di ricerca abbiamo confermato che esiste un'associazione tra aumentati valori di sfas e fasi piu' acute della forma remittente-recidivante (RR) di SM.

Nel corso dell'ultimo anno abbiamo studiato, mediante metodica ELISA, le variazioni dei livelli plasmatici di sfas e sfasL in pazienti con RR-SM in terapia continuativa per 9-12 mesi con β -interferon (β -IFN) e copolimero-1 (COP-1). Sono stati valutati i valori sierici di sfas e sfasL ad intervalli trimestrali in 8 pazienti in trattamento con β -IFN e 6 con COP-1 e questi correlati alla valutazione clinica di ogni paziente. Sia i livelli di queste molecole che lo score clinico risultavano diminuiti rispetto ai valori iniziali, sebbene tale tendenza non fosse statisticamente significativa. Oltre alla correlazione positiva tra i valori di sfas/sfasL e la riduzione dell'EDSS, importanti variazioni di sfas e sfasL erano associate a ricadute cliniche ma anche a sindromi influenzali.

Per quanto riguarda l'effetto della terapia steroidea ad alte dosi (500 mg/die per 5 giorni), abbiamo studiato le variazioni indotte a breve termine (1, 3 e 5 giorni) sui valori sierici di sfas e sfasL nel siero di 15 pazienti. I dati ottenuti hanno indicato che i livelli di tali molecole tendevano ad aumentare rispetto ai valori basali raggiungendo il picco a 3 giorni dall'inizio del trattamento nella maggior parte dei pazienti (sfas: 22% e sfasL 34%) e ritornando ai valori basali dopo il trattamento. In 8 pazienti sono state effettuate misurazioni di sfas e sfasL nel liquido cerebro-spinale prima e dopo terapia steroidea ad alte dosi; anche nella maggior parte di tali campioni si osservava un netto incremento dei valori di sfas e sfasL. Tuttavia, sia nei campioni sierici che liquorali le variazioni di sfas e sfasL rispetto ai valori basali non raggiungevano una differenza significativa, principalmente a causa di un'ampia variabilità inter-individuale.

Dai risultati esposti risulta che il sistema fas viene modulato durante le ricadute di SM, è influenzato dai trattamenti immuno-soppressivi e quindi puo' essere considerato un marker dello stato di malattia; la sua valutazione mediante il dosaggio delle forme solubili nel siero e liquido cerebro-spinale tuttavia è profondamente influenzata anche da fattori non direttamente correlati alla malattia.

ROLE OF FAS SYSTEM IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

B. Bonetti (a), C. Stegagno (a), N. Rizzuto (a), M. Colombatti (b), G. Moretto (a)

(a) *Istituto di Neurologia, Azienda Ospedaliera di Verona.*

(b) *Istituto di Immunologia, Università degli studi di Verona*

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease of the central nervous system in which myelin and myelin-producing cells, the oligodendrocytes, become a target of the autoimmune response. Among the cytotoxic mechanisms involved, the fas system has been recently shown to play an important role in the early phases of the autoimmune response and in the formation and resolution of MS lesions. The fas receptor is activated and induces death of target cells upon binding with its ligand, fasL. In addition to membrane-bound molecules, biologically active soluble (s) forms have been described for either fas and fasL.

The aim of this research was to verify the correlation between sfas/sfasL levels and disease activity and to investigate the effects on the fas system of several therapeutical compounds employed in MS.

During the first year we have confirmed that increased levels of sfas were associated with acute disease activity in relapsing-remitting (RR) MS patients.

During the second year, we focused our attention on the changes of seric sfas and sfasL levels, as measured by commercial ELISA kits, in RR-MS patients during the treatment with β -interferon (β -IFN) and copolymer 1 (COP-1) for 9-12 months. We evaluated seric sfas and sfasL every three months in 8 subjects treated with β -IFN and 6 with COP-1, together with the clinical evaluation (EDSS). In comparison to basal conditions, either the levels of sfas/sfasL and the EDSS score were decreased at the end of the observation period; however, such decrease was not statistically significant. In addition to this correlation between sfas and EDSS, important changes of both sfas and sfasL were observed in relation to clinical relapses and flu-like episodes.

Regarding the effect of high doses (500 mg/die for 5 days), we studied the early changes induced on sfas and sfasL in the serum of 15 patients. The results obtained showed that, in comparison to basal values, such molecules increased shortly after the beginning of therapy reaching a peak at 3 days (sfas: 22% and sfasL: 34% increase) and decreased to basal levels at the end of the treatment period. In 8 patients we measured sfas and sfasL levels in the cerebrospinal fluid (CSF) before and at the end of steroid pulse; also in these patients we observed an increase of sfas and sfasL values. However, the increase of fas molecules both in the serum and CSF did not reach a statistical significance when compared to basal levels, mostly because of wide inter-individual variability.

Our results indicate that the fas system is modulated during MS relapses, is influenced by immune suppressive treatments and may thus be considered a marker of disease activity; however, its evaluation by the dosage of its soluble forms in the serum, but also in the CSF is greatly influenced by factors not strictly related to the disease.

RUOLO DELL' ENDOTELIO CEREBRALE NELLA EZIOPATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA

L. Callea (a), F. Bussolino (b)

(a) *Dipartimento di Genetica, Biologia e Chimica Medica, Università degli studi di Torino*

(b) *Divisione di Neurologia, Spedali Civili Brescia*

Nella precedente parte della ricerca avevamo dimostrato che il Platelet-activating factor (PAF), un mediatore dell'infiammazione e della vasopermeabilità, aumenta nel plasma e nel CSF di pazienti con Sclerosi Multipla "relapsing -remitting" (MS-RR) e che tale fenomeno correla con la captazione dalle mezzo di contrasto (gadolinio) da parte delle lesioni osservate alla risonanza magnetica nucleare (NMR). Questo studio era stato condotto su 9 pazienti affetti da MS-RR, da 8 affetti dalla forma "chronic-progressive"(MS-CP), nonché su un adeguato numero di controlli . In questo anno di ricerca abbiamo esteso le osservazioni precedentemente fatte su un maggior numero di pazienti, in particolare 15 pazienti con la forma (MS-RR) e 16 con la forma MS-CP. I livelli di PAF nel plasma sono aumentati nei pazienti con MS (4.86 ± 5.01 ng/ml; $n=31$) rispetto ai controlli (0.56 ± 0.96 ng/ml; $n=26$) ($p<0.02$ by t test). Le concentrazioni di PAF sono anche aumentate nel CSF nei pazienti con MS (5.09 ± 4.41 ng/ml; $n=31$) rispetto ai controlli (0.01 ± 0.04 ng/ml; $n=6$) ($p<0.02$ by t test). I livelli di PAF nel plasma, nel CSF dei pazienti con MS-RR (7.01 ± 3.93 ng/ml plasma, 12.41 ± 6.09 ng/ml CSF) erano piu' elevati rispetto al gruppo MS-CP (0.47 ± 0.89 ng/ml plasma, 0.78 ± 0.42 ng/ml CSF). I livelli di PAF nel plasma e nel CSF dei pazienti con MS-RR differivano a seconda che la permeabilità al mezzo di contrasto nella MRI fosse assente o modesta (0.78 ± 0.43 ng /ml plasma; 1.07 ± 3.89 ng/ml CSF) rispetto a evidente o marcata (8.51 ± 4.57 ng/ml plasma; 11.78 ± 5.08 ng/ml CSF) ($p<0.05$).

Due pazienti affetti da MS-RR sono stati seguiti per due anni per valutare la possibile correlazione nel tempo tra fase di esacerbazione della malattia, presenza di lesioni captanti il mezzo di contrasto alla MNR, e livelli di PAF nel liquor e nel plasma. Durante il periodo di osservazione i 2 pazienti hanno avuto rispettivamente 3 e 2 episodi di riacutizzazione della malattia in cui è stato possibile riscontrare la captazione del gadolinio. In 4 su 5 episodi si è osservato un aumento del PAF nel CSF e nel plasma, mentre in 1 episodio su 5 è stato possibile riscontrare un aumento del mediatore solo nel plasma.

ROLE OF CEREBRAL ENDOTHELIUM IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

L. Callea (a), F. Bussolino (b)

(a) *Dipartimento di Genetica, Biologia e Chimica Medica, Università degli studi di Torino*

(b) *Divisione di Neurologia, Spedali Civili Brescia*

We have previously demonstrated that PAF levels were significant higher plasma and cerebral spinal fluids (CSF) of patients with relapsing/ remitting (RR) multiple sclerosis (MS) studied by magnetic resonance imaging (MRI) than in healthy controls or in patients with secondary progressive MS (MS-CP). We also found that both plasma and CSF levels were correlated with the MRI number of gadolinium enhancing lesions, which are markers of blood-brain barrier (BBB) injury, whereas their peaks were not correlated with the MRI number of white matter lesions, nor with the expanded disability status score. During this year we have increased the number of patients studied Plasma levels of PAF are increased in MS subjects (4.86 ± 5.01 ng/ml; n=31) as compared to controls (0.56 ± 0.96 ng/ml; n=26) ($p < 0.02$ by t test). PAF amounts are augmented also in CSF of MS patients (5.09 ± 4.41 ng/ml; n=31; controls: 0.01 ± 0.04 ng/ml; n=6) ($p < 0.02$ by t test). PAF levels in plasma and in CSF are higher in MS-RR (7.01 ± 3.93 ng/ml plasma, 12.41 ± 6.09 ng/ml CSF) than in MS-CP (0.47 ± 0.89 ng/ml plasma, 0.78 ± 0.42 ng/ml CSF). In order to confirm that PAF appears concomitantly with the relapse of the disease, we have evaluated the PAF levels in plasma and CSF and the MRI number of gadolinium enhancing lesions in two patients with RR-MS at the onset of clinical exacerbation for 2 years During this interval of time, patient A and B had respectively three and two relapses with appearance of gadolinium enhancing lesions visualized by MRI. During the relapse, patient B showed a PAF level in plasma and in CSF higher than that of healthy controls. Patient A shared a similar behavior, but in a relapse episode we failed to detect the PAF increase in CSF . During the remitting phase, PAF was not increased in the plasma of both patients.

These data suggest that PAF is a mediator involved in the early phase of BBB damage, rather than characterizing the overall behavior of MS.

IL NEUROPEPTIDE α -MSH NELLA SCLEROSI MULTIPLA

A. Catania

III Divisione di Medicina Generale, Ospedale Maggiore di Milano

L'ormone α -melanocitostimolante (α -MSH) è un peptide filogeneticamente antichissimo, dotato di attività neuroimmunomodulatoria e antiinfiammatoria. Esso inibisce la produzione e l'effetto di citochine proinfiammatorie e di altri mediatori della flogosi in cellule periferiche e del sistema nervoso centrale. Gli effetti del peptide vengono esercitati attraverso il legame a recettori specifici (melanocortin receptors) sulle cellule bersaglio. α -MSH e alcuni suoi frammenti, tra cui il tripeptide [11-13] KPV, modulano la flogosi attraverso essenzialmente tre meccanismi di azione: effetto antiinfiammatorio diretto su immunociti periferici, effetto antiinfiammatorio su fagociti centrali, effetto antiinfiammatorio in tessuti periferici mediato da segnali che originano nel SNC e raggiungono la periferia attraverso vie nervose discendenti.

Il potente effetto antiinfiammatorio e anticitochinico centrale e periferico di α -MSH suggerisce la possibilità di un impiego terapeutico del peptide nella sclerosi multipla (SM). Abbiamo pertanto eseguito indagini *in vivo* e *in vitro* per stabilire se α -MSH possa avere un ruolo nel trattamento di questa malattia. Abbiamo inoltre misurato le concentrazioni di α -MSH nel plasma di pazienti con SM per stabilire se esista una correlazione tra livelli endogeni di α -MSH e gravità della malattia.

I risultati del primo anno di questo progetto di ricerca hanno dimostrato che α -MSH:

- inibisce la produzione di TNF- α nel tessuto cerebrale *in vivo* e *in vitro*
- inibisce la produzione di mediatori flogistici da parte di astrociti e microglia *in vitro*

I risultati del secondo anno della ricerca hanno dimostrato che l'effetto anti-infiammatorio di α -MSH si esercita principalmente attraverso l'inibizione della attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B. L'attivazione di NF- κ B viene inibita dal peptide per via di un effetto protettivo sulla degradazione della proteina inibitoria I κ B- α che si lega a NF- κ B e ne impedisce la migrazione nel nucleo.

In sintesi, i nostri risultati principali sono i seguenti:

- α -MSH esogeno inibisce l'attivazione di NF- κ B e la degradazione di I κ B in cellule di glioma e nella encefalite sperimentale
- α -MSH autocrino indotto via inserzione genica inibisce l'attivazione di NF- κ B in cellule di glioma
- α -MSH somministrato per via centrale inibisce l'attivazione periferica di NF- κ B

Studi Clinici

Il dosaggio di α -MSH nel sangue di pazienti con SM dimostra che i soggetti con punteggio di invalidità più alto hanno anche concentrazioni più elevate del peptide rispetto ai pazienti con minore invalidità; abbiamo osservato una *correlazione positiva tra EDSS ed α -MSH* che viene verosimilmente prodotto come contromisura endogena allo stato infiammatorio.

Abbiamo inoltre misurato α -MSH nel sangue di *pazienti con SM trattati con immunoglobuline endovena* o con placebo. Il peptide circolante è aumentato in maniera rapida ed altamente significativa nei pazienti trattati con immunoglobuline rispetto ai controlli. In accordo con questa osservazione abbiamo riscontrato un netto aumento di α -MSH nel sovrantante di monociti normali incubati con immunoglobuline *in vitro*. Questi risultati suggeriscono che parte dell'effetto positivo delle immunoglobuline nella SM e in altre malattie autoimmuni possa essere mediato dalla induzione di α -MSH endogeno.

THE NEUROPEPTIDE α -MSH IN MULTIPLE SCLEROSIS

A. Catania

III Divisione di Medicina Generale, Ospedale Maggiore di Milano

α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH), a neuroimmunomodulatory peptide of ancient origin, is known to be involved in control of host responses. In inflammatory cells, in the periphery, and within the central nervous system, α -MSH modulates the production and action of pro-inflammatory cytokines. This broad influence occurs via endogenous α -MSH (melanocortin) receptors. In brief, α -MSH and certain of its fragments such as α -MSH [11-13] KPV, modulate inflammation via three general actions: through direct actions on peripheral host cells; through actions on inflammatory cells within the brain to modulate local reactions; and via descending neural anti-inflammatory pathways that control inflammation in peripheral tissues.

The potent and broad anti-inflammatory actions of α -MSH, coupled with its extremely low toxicity and its effectiveness when administered centrally, raise the possibility that it might be useful in treatment of multiple sclerosis (MS). Therefore, we have performed experiments *in vivo* and *in vitro* to determine effects of the peptide that could be relevant for treatment of MS. Further, we have measured α -MSH concentrations in plasma of patients with MS to determine relation of the endogenous peptide with disease severity.

Results of the first year of our research showed that α -MSH:

- inhibits production of brain TNF- α *in vivo* and *in vitro*
- inhibits astrocyte and microglia inflammatory products *in vitro*

Results of the second year of our research showed that the key to this anti-inflammatory influence is inhibition of nuclear transcription factor NF- κ B. Activation of this nuclear factor is inhibited through peptide-induced preservation of I κ B which binds to NF- κ B and prevents its migration to the nucleus.

In brief, our main results are:

- exogenous α -MSH inhibits NF- κ B activation and I κ B α degradation in human glioma cells and in experimental brain inflammation
- autocrine α -MSH induced via gene construct insertion inhibits NF- κ B activation in human glioma cells.
- there is inhibition of peripheral NF- κ B activation by central action of α -MSH

Clinical Studies

Measurement of α -MSH in MS patients indicates that patients with greater disability score have increased circulating α -MSH relative to patients with low disability scores. There is a significant *correlation between EDSS and circulating α -MSH*, which is likely released as an endogenous countermeasure to reduce inflammation.

Measurement of α -MSH in plasma of *MS patients receiving i.v. immunoglobulin therapy* showed rapid and marked increase in circulating peptide during immunoglobulin infusion. Consistent with these findings, experiments *in vitro* showed that incubation of human monocytes with immunoglobulins causes release of α -MSH in the supernatants. These observations suggests that the beneficial effect of immunoglobulins in MS and other autoimmune disorders could be partly mediated by release of endogenous α -MSH.

PRODUZIONE DI CITOCINE E RISPOSTA IMMUNE AGLI ANTIGENI DEI RETROVIRUS UMANI ENDOGENI IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULPIPLA

M. Clerici (a), D. Trabattoni (a), M.L. Fusi (a), M. Saresella(b), D. Caputo (c), H. Urnovitz(d), C.L. Cazzullo (e), P. Ferrante (f)

(a) *Cattedra di Immunologia, Università degli studi, Milano*

(b) *Laboratorio di Biologia, Don C. Gnocchi Foundation, IRCCS, Milano*

(c) *Unità Sclerosi Multipla, Don C. Gnocchi Foundation, IRCCS, Milano*

(d) *Calypte Biomedical, Berkeley, CA 94304*

(e) *Associazione Ricerca Schizofrenia, Milano*

(f) *Cattedra di Virologia, Università Milano*

Sono stati analizzati alcuni parametri immunologici in pazienti affetti da Sclerosi Multipla (MS) per meglio definire i meccanismi immunopatologici coinvolti in questa patologia. In particolare è stata valutata la produzione *in vitro* di citochine antigene- e mitogeno-stimolata sia in pazienti con MS acuta (AMS) e in soggetti con MS stabile (SMS) e in un gruppo di soggetti sani (HC). Abbiamo anche analizzato se nei pazienti con sclerosi multipla fosse possibile osservare una risposta immune nei confronti dei retrovirus umani endogeni (HERV). A tale scopo abbiamo valutato la produzione di citochine dopo stimolazione delle PBMC con i peptidi di HERV. I risultati ottenuti indicano che la produzione di IL-2 e IFN- γ mitogeno-stimolata è più elevata mentre quella della IL-10 è minore nei soggetti AMS rispetto sia agli SMS che ai controlli sani. Mentre la produzione della IL-12 metabolicamente attiva (eterodimero p70), è paragonabile negli SMS, negli AMS e nei controlli sani; la produzione della IL-12 totale (eterodimero p70 + catena p40) è aumentata nei pazienti SMS rispetto sia agli AMS che agli HC. La produzione di IL-2 e IFN- γ HERV-specifica è più frequente e più potente negli AMS rispetto sia agli SMS che agli HC. La produzione delle citochine di tipo 2 HERV-specifica è più frequente nei pazienti SMS rispetto sia agli AMS che agli HC. Pertanto un profilo citochinico di tipo 1 caratterizza i pazienti AMS, mentre nei soggetti SMS è possibile evidenziare una predominante produzione di IL-10. In conclusione i pazienti MS sono caratterizzati da una complessa alterazione delle risposte immuni, che comprende modificazioni nella produzione di citochine e la presenza di risposte immuni specifiche per gli antigeni di HERV.

CYTOKINE PRODUCTION AND HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUSES SPECIFIC IMMUNE RESPONSES IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

M. Clerici (a), D. Trabattoni (a), M.L. Fusi (a), M. Saresella(b), D. Caputo (c), H. Urnovitz(d), C.L. Cazzullo (e), P. Ferrante (f)

(a) *Cattedra di Immunologia, Università degli studi, Milano*

(b) *Laboratorio di Biologia, Don C. Gnocchi Foundation, IRCCS, Milano*

(c) *Unità Sclerosi Multipla, Don C. Gnocchi Foundation, IRCCS, Milano*

(d) *Calypte Biomedical, Berkeley, CA 94304*

(e) *Associazione Ricerca Schizofrenia, Milano*

(f) *Cattedra di Virologia, Università Milano*

We analyzed some immunologic parameters in Multiple Sclerosis (MS) patients to better define the immunopathology underlying this condition. In particular *in vitro* antigen- and mitogen-stimulated cytokine production were analysed in MS patients with either acute (AMS) or stable (SMS) disease and in healthy controls (HC). We also investigated whether immune responses to human endogenous retroviruses (HERV) could be detected in MS and whether these immune responses would be correlated with disease status by analysing cytokine production after stimulation of PBMC with HERV peptides. Results showed that mitogen-stimulated IL-2 and IFN- γ was augmented and IL-10 was decreased in AMS compared to both SMS and healthy controls. Whereas the production of the metabolically active IL-12 (p70 heterodimer), was comparable in SMS, AMS and HC, production of the total IL-12 (p70 heterodimer and the p40 chain) were augmented in SMS compared to both AMS and HC. HERV-peptides IL-2 and IFN- γ production was more frequent and more potent in AMS compared to both SMS patients and HC. HERV-specific type 2 cytokine production was more frequent and potent in SMS compared to AMS and HC. Thus a prevalent type 1 cytokine profile was seen in AMS patients, while IL-10 production predominated in SMS individuals. In conclusion a complex alteration of the immune response is present in MS, including impairment of cytokine production and the detection of immune responses to HERV antigen.

PRESENZA DI ANTICORPI CONTRO PROTEINE REGOLATRICI DEL COMPLEMENTO NEI SIERI DI SOGGETTI AFFETTI DA SCLEROSI MULTIPLA

C. Pintér (a), S. Beltrami (a), P. Ferrante (a,b), A. Clivio (a)

(a) *Centro Interdipartimentale per la Ricerca Biomedica L.I.T.A. di Vialba, Università degli studi di Milano*

(b) *Laboratorio di Biologia, Fondazione Don Gnocchi, Università degli studi di Milano, Milano*

Il complemento svolge un ruolo attivo nell'insorgenza di lesioni nella Sclerosi Multipla (SM) attraverso l'induzione di un danno fisico alle cellule che producono mielina. Tutte le cellule somatiche sono tuttavia dotate di un repertorio di molecole di membrana che normalmente inibiscono l'attività della cascata del complemento (molecole RCA) e che quindi proteggono le cellule dalla lisi mediata da complemento. Abbiamo dimostrato, nei sieri di soggetti affetti da SM "relapsing-remitting" in fase acuta la presenza di anticorpi contro le molecole RCA CD46 e CD59, che tali anticorpi sono diretti contro i siti combinatori di tali molecole e che essi inattivano le loro funzioni regolatrici. Questo meccanismo può spiegare il danno operato dal complemento sulle cellule del sistema nervoso. Inoltre, abbiamo dimostrato che la maggior parte di questi pazienti contiene anche anticorpi diretti contro un epitopo della glicoproteina transmembranaria di HIV che è conservato in molti retrovirus umani. Ciò è in accordo con l'ipotesi secondo cui gli anticorpi autoreattivi potrebbero esser stati prodotti in seguito ad una risposta immunitaria nel corso di un'infezione da retrovirus oppure ad espressione di proteine codificate da retrovirus endogeni.

PRESENCE OF ANTIBODIES AGAINST COMPLEMENT REGULATORY PROTEINS IN SERA FROM PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

C. Pintér (a), S. Beltrami (a), P. Ferrante (a,b), A. Clivio (a)

(a) *Centro Interdipartimentale per la Ricerca Biomedica L.I.T.A. di Vialba, Università degli studi di Milano*

(b) *Laboratorio di Biologia, Fondazione Don Gnocchi, Università degli studi di Milano, Milano*

Complement was proposed to play an important role in the onset of Multiple Sclerosis (MS) lesions by inducing physical damage to myelin-producing cells. Every somatic cell is however endowed with a repertoire of membrane-bound molecules which normally down-regulate the complement activation cascade (Regulators of Complement Activation, RCA) and therefore protect cells from complement-dependent lysis. We show here that antibodies against two complement regulatory molecules expressed in the membrane of human cells (CD46 and CD59) are present in sera from relapsing-remitting MS patients in the acute phase, that they are directed against the active site of the RCA molecules and that they inactivate their regulatory function, thus providing a mechanism by which cells of the nervous system might be damaged in a complement-dependent fashion during the acute MS phase. Moreover, we found that most of these sera also contain antibodies reacting with an epitope of the transmembrane glycoprotein of HIV which is conserved in most retroviruses; this may support the hypothesis that self-reacting antibodies might have arisen in these patients as an immune response after retroviral infection or expression of endogenous retroviral proteins.

EFFETTO DELLE CITOCCHINE SULL'ORGANIZZAZIONE DEL CITOSCHELETRO NEURONALE MEDIATA DA GTP-ASI DELLA FAMIGLIA DI RHO: IMPLICAZIONI PER LE INTERAZIONI GLIA-ASSONE

C. Albertinazzi, A. Cattelino, S. Paris, D. Gilardelli, I. de Curtis

Unità di Adesione Cellulare, DIBIT, I.R.R.C.S. San Raffaele, Milano.

La ricerca svolta durante il secondo ed ultimo anno di questo progetto si è svolta come segue; abbiamo completato gli studi di espressione della GTPasi neuro-specifica Rac1B utilizzando anticorpi preparati in laboratorio contro la porzione carbossiterminale della proteina. L'analisi biochimica condotta su tessuto neurale ci ha permesso di stabilire che il polipeptide è espresso durante lo sviluppo neurale. Questo dato conferma e completa i dati precedenti relativi all'espressione del trascritto di Rac1B. La conferma dell'espressione della proteina endogena è importante per l'interpretazione dei risultati ottenuti dall'analisi della funzione di questa GTPasi durante lo sviluppo neuronale. Infatti, l'osservazione che un dominante negativo di Rac1B è in grado di sopprimere gran parte dell'estensione di neuriti che normalmente si osserva in cellule non trasfettate, può essere spiegata con l'inibizione specifica da parte di questo mutante dell'attività di Rac1B endogena. Quest'ipotesi è sostenuta dal fatto che l'espressione in neuroni primari dello stesso tipo di mutante della GTPasi Rac1A, ubiquitaria ed altamente simile a Rac1B, non è in grado di alterare in modo drammatico la neuritogenesi (Albertinazzi et al., 1998).

Durante il secondo anno abbiamo proseguito gli studi funzionali sulle GTPasi della famiglia di Rho con lo scopo di chiarire la relazione tra queste GTPasi, ed eventuali modificazioni del citoscheletro actinico indotte da fattori quali TNF-alfa e TGF-beta. Neuroni piastrati sia su glia che su laminina sono stati coltivati in presenza o assenza di diverse concentrazioni dei due fattori, ed analizzati per valutare gli effetti sulla neuritogenesi. L'analisi morfologica per immunofluorescenza non ha messo in evidenza differenze morfologiche tra cellule trattate e non trattate. Abbiamo quindi saggiato l'effetto di TNF-alfa e TGF-beta sull'organizzazione del citoscheletro actinico di cellule gliali. A questo scopo, culture di glia ottenute da retine sono state trattate per tempi brevi con uno dei due fattori, e analizzate per immunofluorescenza. L'analisi morfologica ha messo in evidenza un effetto transiente di entrambi i fattori sull'actina. Infatti, sia TNF-alfa che TGF-beta sono in grado di indurre una rapida riorganizzazione dell'actina che porta alla formazione di lamellipodi e "ruffles" ricchi di actina filamentosa. Lamellipodi e "ruffles" sono strutture tipiche di cellule in grado di migrare. E' noto che in fibroblasti la formazione di lamellipodi è mediata dall'attivazione di Rac. Utilizzando il costrutto dominante negativo di Rac1B, abbiamo quindi controllato se l'induzione della riorganizzazione citoscheletrica indotta da TNF-alfa e TGF-beta sia mediata da Rac. L'analisi per immunofluorescenza ha mostrato che cellule trasfettate con Rac1B-N17 non sono più in grado di indurre la formazione di lamellipodi e "ruffles" in seguito all'aggiunta dei due fattori. Esperimenti di trasfezione di cellule gliali non trattate con costrutti per le diverse GTPasi hanno dimostrato che la sovraespressione di Rac1B e RhoB, che abbiamo precedentemente dimostrato essere normalmente espresse nella glia, inducono due fenotipi completamente differenti. Nel caso di RhoB, le cellule gliali si contraggono. Questo risultato è in accordo con quanto noto da esperimenti precedentemente effettuati su fibroblasti. E' noto infatti che le proteine Rho attivano la contrazione delle fibre acto-miosiniche (fibre di stress) presenti anche nelle cellule gliali adese al substrato. Questa contrazione può causare il distacco delle cellule dal substrato. Nel caso di Rac1B, l'effetto è drammaticamente diverso. Infatti, la sovraespressione di Rac1B induce il disassemblaggio delle fibre di stress, con meccanismi ancora da chiarire, e la contemporanea formazione di protrusioni ramificate della membrana plasmatica, ricche di nuovi filamenti di actina. La nostra analisi funzionale mostra che le GTPasi Rac giocano un ruolo importante nei meccanismi di riorganizzazione citoscheletrica indotti da TNF-alfa e TGF-beta in cellule gliali. Il trattamento per periodi lunghi con TNF-alfa e TGF-beta non ha mostrato effetti evidenziabili sulla morfologia neuronale. Per poter osservare possibili effetti di questi fattori in seguito a trattamenti per periodi brevi, abbiamo recentemente messo ha punto un costrutto per esprimere GFP-Rac1B in vivo, e poter seguire direttamente l'effetto di citochine e fattori di crescita sulla morfologia neuritica, utilizzando tecniche di video-microscopia.

EFFECT OF CYTOKINES ON RHO-FAMILY GTP-ASES-MEDIATED ORGANIZATION OF THE NEURONAL CYTOSKELETON: IMPLICATIONS FOR AXON-GLIA INTERACTIONS

C. Albertinazzi, A. Cattelino, S. Paris, D. Gilardelli, I. de Curtis

Unità di Adesione Cellulare, DIBIT, I.R.R.C.S. San Raffaele, Milano.

The research done during the second and last year of the project has developed as follows; we have completed the expression study for the neural-specific Rac1B GTPase, by utilizing antibodies prepared in the laboratory against the carboxyterminal portion of the polypeptide. The biochemical analysis on neural tissue has allowed to establish that the Rac1B polypeptide is expressed during neural development. This result complements the data on the expression of the Rac1B transcript. To be able to show that the endogenous polypeptide is present, is important for the interpretation of the results obtained from the functional analysis during neuronal development. The observation that the dominant negative mutant N17-Rac1B is able to largely prevent neuritogenesis can be explained with the inhibition by this mutant of the activity of endogenous Rac1B. This hypothesis is supported by the fact that the expression in the same primary neurons of a similar mutant of the ubiquitous and highly related Rac1A GTPase is not able to affect dramatically neuritogenesis (Albertinazzi et al., 1998).

During the second year we have continued the functional studies on the Rho family GTPases, with the aim of clarifying the relationship between these GTPases and cytoskeletal modifications that may be induced by factors such as TNF- α and TGF- β . Neurons plated either on glia, or on laminin have been cultured in the presence of different concentrations of these two factors, and analyzed for the effects on neuritogenesis. The morphological analysis by immunofluorescence did not show any morphological difference between treated and untreated cells. We have therefore tested the effects of either TNF- α or TGF- β on the cytoskeletal organization of glial cells. For this, glial cells obtained from retinas were treated for short times with either factor, and then analyzed by immunofluorescence. The morphological analysis has shown a transient effect of both factors on actin. Both TNF- α and TGF- β were able to induce a fast reorganization of actin leading to the formation of lamellipodia and ruffles rich in filamentous actin. These structures are typical of cells able to migrate, and it is well known that in fibroblasts lamellipodia formation is induced following Rac activation. By utilizing the construct for the expression of a dominant negative form of Rac1B, we have therefore checked whether the induction of actin reorganization by TNF- α and TGF- β was mediated by Rac. Immunofluorescence analysis following incubation with TNF- α or TGF- β , has shown that glial cells expressing Rac1B-N17 were not able to form ruffles and lamellipodia anymore. Transfection experiments of untreated glial cells with constructs for the different GTPases have shown that over-expression of Rac1B and RhoB, which are normally present in glial cells, induce completely different phenotypes. When RhoB is over-expressed, cells contract. This results in agreement with previous findings from experiments in fibroblasts. In fact, it is well known that Rho proteins induce contraction of acto-myosin stress fibers, which are present in adherent glial cells. The contraction may eventually lead to detachment of the cells from the substrate. Over-expression of Rac1B in glial cells leads to a completely different phenotype. Rac1B over-expression induces both the disassembly of stress fibers, and the formation of highly branched, actin-rich protrusions at the plasma membrane.

Our functional analysis has shown that Rac GTPases play an important role in the cytoskeletal reorganization induced by TNF- α and TGF- β in glial cells. Prolonged treatments with TNF- α or TGF- β did not show any evident effect on neuronal morphology. To be able to analyse possible short-term effects of these molecules on neurite morphology, we have recently prepared and tested a construct to express GFP-Rac1B *in vivo*, with the aim of analyzing the effects of cytokines and growth factors on the morphology of neurites, by using videomicroscopy techniques.

STUDIO DEGLI EFFETTI DI CITOCHINE SULL'ATTIVITA' NERVOSA CEREBELLARE IN RODITORI SANI O AFFETTI DA ENCEFALITE ALLERGICA SPERIMENTALE

F. Eusebi

Dipartimento Medicina Sperimentale e Patologia, Università degli studi "La Sapienza", Roma

Nel corso dell'ultimo anno abbiamo dimostrato l'espressione funzionale del recettore CXCR-4 (fusina) in neuroni cerebellari di ratto ed abbiamo studiato con metodi elettrofisiologici il suo coinvolgimento nella modulazione della trasmissione sinaptica del cervelletto mediante trattamento con il suo agonista fisiologico, la chemochina "stromal-derived factor-1 α " (SDF-1 α). L'espressione del recettore è stata dimostrata nei granuli cerebellari, sia in colture primarie che in fettine, con metodi di immunofluorescenza e di Western blot. Il CXCR4 è anche presente in fibre radiali di natura gliale (le così dette fibre di Bergmann), mentre è assente nei neuroni di Purkinje, sia in fettina che in coltura. L'applicazione di SDF-1 α alle colture di granuli provoca aumenti transienti della concentrazione di Ca²⁺ intracellulare sia nel corpo cellulare che nei prolungamenti neuronali. Questi differiscono fra loro in quanto quelli che si osservano nei corpi cellulari non sono influenzati dalla rimozione di Ca²⁺ dal mezzo extracellulare, mentre quelli osservati nei prolungamenti neuronali sono assenti quando le cellule vengono stimulate in un mezzo privo di Ca²⁺. Al contrario, il trattamento delle colture con un mezzo contenente bloccanti dei recettori ionotropi per il glutammato AP-5 e CNQX riduce gli aumenti di Ca²⁺ intracellulare indotti da SDF-1 α in ambedue i compartimenti. Neuroni di Purkinje in fettina, analizzati con la tecnica del patch clamp, nella configurazione "whole cell", rispondono all'applicazione di SDF-1 α con una lenta corrente entrante, seguita da un aumento sia del livello di Ca²⁺ intracellulare che dell'attività sinaptica spontanea. In particolare, la corrente lenta entrante viene considerevolmente ridotta dal trattamento con bloccanti dei recettori ionotropi del glutammato, mentre si sviluppava pienamente quando le fettine cerebellari sono mantenute in un mezzo in cui è inibita la trasmissione sinaptica, indicando che questa corrente può essere almeno parzialmente mediata da glutammato extrasinaptico, rilasciato presumibilmente dalle cellule gliali e/o nervose circostanti. Queste osservazioni indicano un coinvolgimento funzionale del CXCR-4 nella modulazione della trasmissione sinaptica, aggiungendo un altro membro al repertorio dei recettori per le chemochine in grado di esercitare un ruolo neuromodulatorio nel cervelletto. Complessivamente, i risultati più rilevanti ottenuti nel periodo di finanziamento del progetto possono essere così riassunti: 1) cellule neuronali del cervelletto di ratto esprimono i recettori per le chemochine della classe CXC come il CXCR2 e il CXCR4; 2) questi recettori sono funzionali, in quanto la loro stimolazione induce la mobilitazione di Ca²⁺ dai depositi intracellulari e la attivazione di diverse vie di segnalazione intracellulare; in particolare, nel caso del CXCR2, l'attivazione di sfingomielinasi; 3) la attivazione dei recettori per le chemochine induce, nelle cellule nervose, correnti di diversa natura; 4) la stimolazione dei recettori per le chemochine ha effetti modulatori sulla trasmissione sinaptica cerebellare, agendo sia sulla liberazione di neurotrasmettitore che sulla attività neuronale.

STUDY ON THE EFFECTS OF CYTOKINES ON CEREBELLAR NERVOUS ACTIVITY IN HEALTHY RODENTS AND IN RODENTS WITH EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

F. Eusebi

Dipartimento Medicina Sperimentale e Patologia, Università degli studi "La Sapienza", Roma

During the last year we have demonstrated the functional expression of the chemokine receptor CXCR4 (fusin) in rat cerebellar neurones and, with electrophysiological techniques, we have also investigated its involvement in the modulation of cerebellar synaptic transmission, using the chemokine stromal-derived factor-1 α (SDF-1 α) as a specific and physiological agonist. Receptor expression has been demonstrated in cerebellar granule cells, both grown as primary culture and in cerebellar slices, with immunofluorescence and Western blot analysis. CXCR4 is also present in glial radial processes (the so called Bergmann's fibres), while it is absent in Purkinje neurones analysed in slices and in cultures. SDF-1 α administration to cultured granule cells induces transient increases of intracellular Ca²⁺ concentration both in cell body and in neuronal processes. These transients are different as for their dependence from external Ca²⁺, because those measured in the cell bodies are not reduced when Ca²⁺ is removed from the external medium, while those observed in the processes are inhibited when cells are stimulated in the absence of external Ca²⁺. Nevertheless, when cultures are exposed to the glutamate-gated receptor antagonists AP-5 and CNQX, the SDF-1 α -evoked intracellular Ca²⁺ increase is reduced in both cellular compartments. Whole cell patch clamped Purkinje neurones in cerebellar slices responded to SDF-1 α application by a slow inward current, followed by an increase of both intracellular Ca²⁺ level and spontaneous synaptic activity. In particular, the SDF-1 α -induced slow inward current was considerably reduced by ionotropic glutamate receptor blockers, but developed fully in a medium in which synaptic transmission was inhibited, indicating that this current might be, at least in part, mediated by extra-synaptic glutamate, possibly released from the surrounding glial and/or nerve cells. Taken together, these findings indicate a functional involvement of CXCR4 in the modulation of synaptic transmission, adding another member to the repertoire of the chemokine receptors exerting a neuromodulatory role in the cerebellum. In sum, the most relevant results obtained during the period of the project can be summarized as follows: 1) rat and mouse cerebellar neuronal cells express the CXC chemokine receptors CXCR2 and CXCR4; 2) these receptors are functional, because their stimulation induce Ca²⁺ mobilization from intracellular stores and the activation of several signal transduction pathways; in particular, for CXCR2, sphingomyelinase activation; 3) chemokine receptor activation induces, in neurones, different currents, with different properties; 4) chemokine receptor stimulation has modulatory effects on cerebellar synaptic transmission, acting both on neurotransmitter release and on neuronal activity.

ATTIVAZIONE DELL'EMOSSIGENASI-1 E PRODUZIONE DI MONOSSIDO DI CARBONIO IN CELLULE GLIALI. POSSIBILE COINVOLGIMENTO NELLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA.

G. M. Lauro^(a), B. Caronti^(b), C. Calderaro^(b), R. Businaro^(c), C. Fabrizi^(a)

^(a) *Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Roma "TRE", Roma*

^(b) *Dipartimento Scienze Neurologiche, Università "La Sapienza", Roma*

^(c) *Dipartimento Scienze Cardiovascolari e Respiratorie, Università "La Sapienza", Roma*

I dati ottenuti nel primo anno indicano che la proteina basica della mielina (MBP) induce l'espressione dell'emossigenasi-1 (HO-1) in cellule di tipo astrogliale umane derivate da gliomi (T67 e T70). L'induzione dell'HO-1 da parte dell'MBP, valutata con RT-PCR e western blot, risulta dose e tempo dipendente. I controlli effettuati trattando le cellule con polimixina B indicano una specificità di induzione da parte della MBP ed escludono la possibilità che si tratti di una contaminazione con prodotti batterici che secondo la letteratura sono dei buoni induttori dell'HO-1. Nel secondo anno abbiamo indirizzato i nostri studi all'identificazione dei possibili meccanismi molecolari coinvolti nella stimolazione delle cellule astrogliali ad opera della MBP.

Tre sono le ipotesi che abbiamo formulato: **a)** E' stato recentemente dimostrato che l'MBP può legarsi all' α_2 macroglobulina (α_2 M), un inibitore di proteasi a largo spettro (Gunnarson & Jensen, Arch Biochem Biophys, 359:192, 1998). Tale inibitore è sintetizzato in coltura dalle stesse cellule astrogliali (Fabrizi et al., J Neuroimmunol, 53:31, 1994) che sono in grado peraltro di esprimere sulla loro membrana anche il corrispondente recettore α_2 Mr/LRP (Nori et al., Neuroreport 4:423, 1993); **b e c)** la MBP potrebbe legarsi al recettore per il bFGF e/o al ganglioside GM1 come descritto per le cellule di Schwann nelle quali questa proteina induce proliferazione (Tzeng et al., J Neurosci Res 42:758, 1995; Tzeng et al., Neurochem Res 24:255, 1999).

I risultati ottenuti mostrano che: **1)** l' α_2 M lega e sequestra la MBP indirizzandola verso una via catabolica. Infatti, quando l' α_2 M* viene aggiunta al mezzo di coltura delle cellule astrogliali in associazione con l'MBP essa blocca l'induzione dell'HO-1 da parte dell'MBP stessa; **2)** la MBP non induce la proliferazione delle cellule astrogliali derivate da gliomi ma al contrario la inibisce in maniera dose dipendente. Alla luce di tali dati, sembra improbabile quindi che l'effetto dell'MBP sull'espressione dell'HO-1 possa essere imputabile al legame di tale molecola con il recettore del bFGF; **3)** sia la linea di astrocitoma T67 che la T70 esprimono sulla loro membrana il GM1 come dimostrato da colorazione con la subunità B della tossina colerica (CTB). Inoltre, quando tali cellule vengono coltivate in presenza di CTB si osserva una diminuzione della loro crescita così come osservato dopo trattamento con MBP.

Per ciò che riguarda l'espressione dell'HO-1 nella microglia umana fetale, confermiamo i nostri dati preliminari che dimostravano mediante RT-PCR l'assenza del messaggero per l'HO-1 sia in condizioni basali che dopo trattamento con induttori classici (ad es. emina) oppure con MBP che pure stimola la proliferazione di queste cellule del 30-40%. Questi dati sono in accordo con la letteratura che descrive anche *in vivo* una scarsa espressione della HO-1 nel cervello fetale di ratto (Sun et al. J Biol Chem 265:8212, 1990) ed un aumento nel corso di patologie (Fukuda et al., Neurosci Letters 199:127, 1995) e con l'età (Iijima et al., Neurosci Letters 271:113, 1999). A conferma di questi dati abbiamo verificato che anche in cellule di origine astrogliale ma incapaci di esprimere un marcatore di differenziazione come la GFAP, la MBP non induce HO-1. E' interessante notare che in coculture miste glio-neuronali allestite in presenza di MBP l'induzione dell'HO-1 nelle cellule astrogliali è associata ad un ruolo protettivo nei confronti delle cellule neuronali, mentre le cellule fetali microgliali, incapaci di attivare il sistema emossigenasico, in presenza di MBP inducono una notevole sofferenza neuronale valutabile con il test dell'MTT. A conforto di queste ipotesi è ampiamente dimostrato in letteratura che fattori trofici per il sistema nervoso, quali il TGF β sono capaci di indurre l'espressione di HO-1 ed è stato dimostrato che il TGF β aumenta durante le fasi di remissione della SM.

Nel valutare il significato di questi dati non si può non tenere conto delle interazioni tra diversi sistemi, NO/NOS e CO/HO-1, Fas e Fas-L ed il sistema delle citochine tutti presenti nel comparto gliale. Recenti osservazioni suggeriscono che nella patogenesi di molte malattie a componente autoimmune essi giochino un ruolo importante e che l'induzione dei rispettivi sistemi enzimatici sia funzionalmente correlata.

ACTIVATION OF HEME OXYGENASE AND PRODUCTION OF CARBON MONOXIDE IN GLIAL CELLS: POSSIBLE INVOLVEMENT IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

G. M. Lauro(a), B. Caronti(b), C. Calderaro(b), R. Businaro(c), C. Fabrizi(a)

(a) *Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Roma "TRE", Roma*

(b) *Dipartimento Scienze Neurologiche, Università "La Sapienza", Roma*

(c) *Dipartimento Scienze Cardiovascolari e Respiratorie, Università "La Sapienza", Roma*

Our previous data indicate that myelin basic protein (MBP) induces the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in human glioma-derived astroglial cells (T67 and T70). The same result can be obtained adding MBP in combination with polymixin B ruling out a possible bacterial contamination and a consequent induction of HO-1 expression by LPS. The expression of HO-1 resulted to be dose and time-dependent, as shown by western blot and RT-PCR performed at 50, 100, 200 µg/ml for 6, 12, and 24 hrs of treatment.

In the second year we aimed to identify the molecular mechanisms underlying MBP stimulation of astroglial cells. We tested the following hypotheses:

- (i) It has been recently demonstrated that MBP binds to α_2 macroglobulin (α_2 M) a broad spectrum proteinase inhibitor (Gunnarson & Jensen, Arch Biochem Biophys 359:192, 1998). This inhibitor is synthesised in the brain by astrocytes which express also the correspondent receptor α_2 Mr/LRP (Fabrizi et al., J Neuroimmunol 53:31, 1994; Nori et al., Neuroreport 4:423, 1993);
- (ii) MBP may bind to bFGF receptor and/or to the ganglioside GM1 as it has been previously reported for Schwann cells where MBP induces proliferation (Tzeng et al., J Neurosci Res 42: 758, 1995; Tzeng et al., Neurochem Res 24, 255, 1999).

Our results suggest that:

- (i) α_2 M acts as a sequestering factor for MBP resulting in an inhibition of HO-1 mRNA induction. As a matter of fact, the addition of α_2 M* decreases HO-1 mRNA induction;
- (ii) It is unlikely that MBP binds to bFGF receptor in our cultures since it does not induce proliferation of glioma-derived astroglial cells, as it was instead demonstrated for Schwann cells. On the contrary, MBP does inhibit in a dose-dependent manner, the tetrazolium salt reduction, an index of cell viability in the glioma-derived cells (MTT test);
- (iii) The ganglioside GM1 can be detected on plasma membrane of both T67 and T70 using the B subunit of cholera toxin (CTB), suggesting another possible mechanism of action of MBP in these cells. Furthermore, both MBP and CTB cause a similar reduction of T67 proliferation in a dose dependent manner.

Differently from glioma-derived astroglial cells, human fetal microglia fail to express HO-1 mRNA following stimulation with a typical inducer as hemin or with MBP. However, MBP is able to up-regulate microglia proliferation by 30-40%. Our data are consistent with previous reports indicating a poor expression of HO-1 in fetal rat brain (Sun et al., J Biol Chem 265:8212, 1990) and an increase during ageing (Iiyama et al., Neurosci Lett 271:113, 1999) and in pathological conditions (Fukuda et al., Neurosci Lett 199:127, 1995). In addition, we found that in poorly differentiated GFAP-negative glioma-derived cells the expression of HO-1 can not be detected. It is noteworthy that in glial-neuronal cocultures treated with MBP astroglia has a protective role towards neuronal cells whereas human fetal microglia induces the growth inhibition of neuronal cells as evaluated by MTT test. Interestingly, trophic factors for cells of the central nervous system, as TGF β , are able to induce the mRNA for HO-1, and the level of TGF β has been proved to be increased during MS remission.

RUOLO DELLE NEUROTROFINE NELLA APOPTOSI DI OLIGODENDROCITI

A. Levi, A. Di Luzio, A.M. Rinaldi, R. Possenti

Istituto di Neurobiologia, CNR, Roma

E' stato suggerito che la morte cellulare programmata possa contribuire alla patogenesi e alla progressione della sclerosi multipla. Negli anni recenti si è accumulata una serie di dati che suggerisce come lo NGF, oltre ad esercitare un' azione trofica attraverso l' attivazione del suo recettore tirosina chinasi TrkA, possa svolgere, su differenti tipi cellulari, un' azione pro-apoptotica attraverso il recettore a bassa affinità p75. In particolare è stato dimostrata una massiccia apoptosi indotta da NGF in colture primarie di oligodendrociti di ratto. I nostri sforzi sono stati mirati a stabilire modelli cellulari che permettano un facile approccio sperimentale allo studio dei meccanismi molecolari attraverso cui l' attivazione di p75 induce apoptosi in oligodendrociti. A questo scopo abbiamo utilizzato cellule L3, una linea di ratto con caratteristiche di precursori O-2A. Considerando che studi preliminari non hanno messo in evidenza un' azione pro-apoptotica dello NGF su L3 wild type, abbiamo deciso di modificare geneticamente tale linea in modo da: 1) diminuire la soglia della risposta apoptotica a una serie di induttori, 2) aumentare l' espressione di p75 rispetto ai livelli normalmente espressi da tali cellule. I razionali per tali scelte sono i seguenti: 1) è probabile che lo NGF non induca di per sé la morte cellulare, ma piuttosto collabori con altri induttori di apoptosi e 2), in una serie di condizioni patologiche (meglio studiate in cellule di Schwann), il recettore a bassa affinità viene indotto a livelli soprabasali. E' stato ipotizzato che l' elevata espressione di p75, più che la sua espressione a livello basale, fornisca un segnale apoptotico. Utilizzando un vettore di espressione retrovirale abbiamo introdotto nelle L3 una forma attivabile di c-Myc, che si considera un gene chiave nel determinare il livello soglia per una risposta apoptotica. In particolare, in fibroblasti murini, c-Myc stimola un loop autocrino di morte cellulare aumentando l' espressione sulla superficie cellulare di Fas e inoltre promuove il rilascio di citocromo-c dai mitocondri. L' attivazione di c-Myc nelle L3 in presenza di alte concentrazioni di siero (10% FCS) provoca un aumento della crescita, in condizione di mancanza di fattori trofici (0.5% FCS) l' attivazione di c-Myc porta ad apoptosi. Evento precoce in questo processo è il taglio proteolitico della poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), che risulta nella produzione di un frammento diagnostico di 85 kDa. Nel contesto di questo paradigma sperimentale, non siamo riusciti a mettere in evidenza alcuna modulazione da parte dello NGF della risposta apoptotica a c-Myc. E' tuttavia possibile che lo NGF agisca su alcune delle sottopolazioni, a diverso stadio di differenziamento, che si ottengono a partire dalle L3. Esperimenti atti a verificare tale punto sono in progresso. Un vettore retrovirale per p75 umano è stato utilizzato per produrre L3 sovraesprimenti tale recettore (L3-p75). Il livello di espressione ottenuto è stato di circa un ordine di grandezza superiore a quello del gene endogeno e, come determinato con immunofluorescenza indiretta, tutte le cellule esprimono quantità paragonabili del recettore umano. Una serie di esperimenti preliminari suggeriscono che le L3-p75, anche in assenza di NGF, sono più sensibili delle L3 parentali a morte programmata in risposta a ceramide. La risposta apoptotica delle cellule risulta poi stimolata da NGF. Stiamo attualmente caratterizzando questa sinergia tra p75 e ceramide per identificare quali sono le caspasi coinvolte. Inoltre, come precedentemente detto nel caso delle L3 che esprimono la forma inducibile di c-Myc, intendiamo studiare il ruolo di p75 sovraespresso in cellule L3 differenziate.

ROLE OF NEUROTROPHINS IN OLIGODENDROCYTE APOPTOSIS

A. Levi, A. Di Luzio, A.M. Rinaldi, R. Possenti

Istituto di Neurobiologia, CNR, Roma

It has been suggested that apoptosis may contribute to the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. Recently it has been shown that the nerve growth factor NGF is endowed not only of trophic functions, transduced by the tyrosine kinase receptor TrkA, but also of pro-apoptotic capacities mediated by the low affinity receptor p75. In particular NGF has been demonstrated to induce programmed cell death in primary cultures of rat oligodendrocytes. We wanted to establish cellular model systems in which to investigate the molecular mechanisms of NGF-induced programmed cell death. For this purpose we have taken advantage of L3, a rat derived cell line resembling O2-A precursors and capable of differentiating *in vitro* along an oligodendrocyte lineage. Since we have previously failed to demonstrate apoptosis in L3 cell cultures exposed to NGF, we decided to modify the cellular background with the aim of lowering the threshold of the induction of apoptosis and of increasing the expression of p75. Actually it is likely that NGF is not a direct inducer of cell death but that it synergizes with other cell death signals. Furthermore it has been suggested that it is the over-expression of p75 above physiological levels (as occurs in pathological instances) which mediates the apoptotic signal of NGF. By retroviral mediated gene transfer we have transduced an inducible allele of c-Myc into L3 cells since this proto-oncogene is a crucial regulator of the apoptotic threshold. We showed that activation of c-Myc in L3 cells promotes cell growth in the presence of 10% FCS, but induces apoptosis in cells deprived of growth factors (0.5% FCS). Cleavage of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) by activated caspases is an early event in the execution of the apoptotic program induced by c-Myc in L3 cells and the generation of a diagnostic 85 kDa fragment of PARP can be used as a marker to measure cell death. In a series of different experimental settings we failed to detect any effect of NGF on the c-Myc-induced apoptotic response of L3 cells. It is nevertheless possible that NGF may act on differentiated L3 which have acquired properties of mature oligodendrocytes. Experiments aimed at resolving this issue are in progress. We have used a retroviral vector to over-express human p75 in L3 cells, and we have obtained a cell line which synthesises the transduced gene about ten fold more than the endogenous one. Among the polyclonal population most of the cells have comparable levels of human p75 as assessed by indirect immunofluorescence. Preliminary experiments suggest that these cells are more sensitive to ceramide killing even in the absence of NGF. Furthermore this factor increase the apoptotic response to low level of ceramide. We are currently investigating which is the molecular basis for the synergy between ceramide and NGF and which are the caspases involved. As previously mentioned we are also investigating the effect of the over-expression of p75 on differentiated L3 cells.

FATTORI DI TRASCRIZIONE A DITA DI ZINCO NEL CONTROLLO DELLA MIELINOGENESI CENTRALE E PERIFERICA.

G. Levi, L. Paleari, S. Castello, U. Pfeffer, G. Merlo

Laboratorio di Biologia Molecolare, Centro di Biotecnologie Avanzate, IST., Genova

I principali obiettivi di questo progetto sono stati : 1. Studiare il ruolo di fattori di trascrizione Krox nel controllo della mielinogenesi periferica utilizzando modelli murini mutanti e biopsie surali di pazienti colpiti da diverse neuropatie periferiche. 2. Ricercare nuovi fattori di trascrizione di tipo Krox che controllino la mielinogenesi centrale. 3. Sviluppare nuovi approcci per il trasferimento genico nel sistema nervoso centrale.

I nostri risultati possono essere riassunti come segue:

Abbiamo trovato che Krox-24 è fortemente espresso dalle cellule di Schwann in proliferazione e da precursori degli oligodendrociti e che la sua espressione si arresta non appena questi due tipi cellulari cominciano a differenziare verso un fenotipo mielinizzante. Questi dati concordano con quello che abbiamo trovato studiando linee murine in cui un allele di Krox-20 o Krox-24 è stato inattivato per inserzione del gene reporter lacZ. Nel sistema nervoso periferico (PNS) Krox-20 viene espresso non appena la cellula di Schwann riceve un segnale differenziativo, per contro nel CNS Krox-20 non viene mai espresso negli oligodendrociti.

In regioni normali del nervo, Krox-20 è espresso solo nelle cellule di Schwann mielinizzanti da cui è assente Krox-24 che invece è espresso nelle cellule di Schwann non-mielinizzanti. In nervi colpiti da neuropatie acute o croniche abbiamo osservato un drastico aumento dell'espressione di Krox-24 nelle cellule di Schwann attivate che in generale non esprimono Krox-20. Coespressione dei due geni è stata osservata solamente in due casi particolari : 1. Cellule di Schwann che stanno rimielinando durante un processo rigenerativo. 2. Le cellule di Schwann extranumerarie presenti nei bulbi di cipolla nei pazienti affetti da Charcot-Marie Tooth di tipo 1.

Krox-24 non è presente nella materia bianca di sezioni postmortem del cervello di pazienti colpiti da Sclerosi Multipla, tuttavia abbiamo osservato l'attivazione di questo gene in cellule localizzate in una regione intorno alle placche di demielinizzazione. Questo potrebbe indicare che anche nel sistema nervoso centrale Krox-24 è riattivato nel processo rigenerativo. E' possibile che le cellule Krox-24 positive ai margini delle placche di demielinizzazione siano oligodendrociti che, dopo una fase di dedifferenziazione stiano iniziando a riformare mielina. E' quindi potenzialmente molto importante comprendere i meccanismi regolativi di Krox-24 nel sistema nervoso centrale.

Visto che Krox-24 è espresso nel cervello durante un periodo di sensibilità agli ormoni tiroidei, abbiamo deciso di studiare gli effetti della T3 sull'espressione di Krox-24 in topi neonati per vedere se fosse possibile estendere questi concetti allo sviluppo degli oligodendrociti in vivo.

Abbiamo iniziato una serie di esperimenti destinati ad identificare un nuovo fattore di trascrizione della classe Krox presente in oligodendrociti. Questo fattore di trascrizione dovrebbe legarsi ad un sito Kruppel ad alta affinità che abbiamo identificato nel promotore prossimale del JCVirus.

Abbiamo ottenuto preparazioni di oligodendrociti primari a vari stadi di differenziamento e ne abbiamo preparato estratti nucleari con cui abbiamo eseguito esperimenti di "band shift". Anticorpi anti-Krox-20 ed anti Krox-24 sono poi stati utilizzati per identificare la eventuale

presenza di questi fattori di trascrizione già noti. Come risultato di questi esperimenti abbiamo individuato una banda specifica che non corrisponde ne a Krox-20 ne a Krox-24 e che è selettivamente presente in oligodendrociti maturi e molto meno in cellule neonatali. Questa banda dovrebbe corrispondere ad un nuovo fattore di trascrizione a dito di Zinco di tipo Kruppel. Abbiamo fatto un'intensiva ricerca con il sistema del one-hybrid system in lievito per clonare questo fattore di trascrizione (sei milioni di cloni analizzati), anche se sei cloni promettenti sono stati identificati, anche se restano ancora alcuni cloni da analizzare, nessuno di quelli analizzati sinora si è per ora rivelato corretto.

Abbiamo portato avanti il lavoro di caratterizzazione delle condizioni ottimali per utilizzare la polyethylenimina 22kD per il trasferimento in vivo. Siamo in particolare riusciti, utilizzando le formulazioni opportune, ad ottenere un alto livello di trasferimento genico nel sistema nervoso centrale sia di animali neonatali che adulti a seguito di una singola iniezione intraventricolare. Abbiamo seguito gli effetti di iniezioni endovenose dello stesso materiale mettendo in evidenza un forte trasferimento genico nei polmoni. Per i dettagli si rimanda alla versione in inglese