

RIASSUNTI / ABSTRACTS

SOTTOPROGETTO / SUBPROJECT

EZIOPATOGENESI / ETIOPATHOGENESIS

RUOLO DEL NGF NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE IN RATTI CON EAE

L. Aloe, A. Micera

Istituto di Neurobiologia, CNR, Roma

I nostri studi hanno dimostrato che nell'encefalomielite allergica sperimentale (EAS) esistono ampie fluttuazioni nelle concentrazioni cerebrali di NGF correlabili allo stato patologico dell'animale. In aree cerebrali dove esistono cellule capaci di produrre NGF, i livelli di questa molecola si mantengono elevati durante la fase acuta dell'EAE, e diminuiscono successivamente nel midollo spinale e nel tronco dell'encefalo, dove i livelli basali di NGF sono di 10 volte più bassi rispetto a talamo e corteccia. In questa condizione sembra esistere una forte richiesta tissutale di NGF, testimoniata anche da una drammatica *up-regulation* dei recettori per il NGF. Anche se il significato funzionale di questi cambiamenti rimane da definire, la nostra ipotesi è che durante la fase acuta dell'EAS vi sia una necessità di maggiore sintesi e rilascio di NGF.

Per approfondire questi studi abbiamo recentemente somministrato NGF radioattivo nel ventricolo cerebrale di ratti affetti da EAS. I risultati dei nostri studi hanno mostrato che il NGF è captato da cellule dei ventricoli cerebrali e trasportato in varie regioni cerebrali, incluse le aree ricche di mielina. Per approfondire ulteriormente il ruolo dell'NGF abbiamo somministrato a ratti con EAS, durante la fase acuta e cronica, elevate quantità di anticorpo anti-NGF circolante. I risultati indicano che la presenza di anticorpi anti-NGF peggiora i sintomi clinici e le condizioni neuropathologiche dei ratti EAS. Questi studi e le osservazioni dimostrano che (a) pazienti affetti da MS hanno un elevato contenuto di NGF nel LCS; (b) che gli OLs localizzati nel nervo ottico di pazienti con MS esprimono un maggior numero di recettori per l'NGF; (c) che i segni clinici e neuropatologici nei *marmosets* affetti da EAS migliorano a seguito di somministrazione di NGF e suggeriscono un coinvolgimento del NGF in questa patogenesi. I risultati fin qui disponibili, suggeriscono un ruolo dell'NGF nel prevenire il danno neuronale e nel promuovere la sopravvivenza e/o differenziazione degli OLs durante la malattia.

EVIDENCE ON THE ROLE OF NGF IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF RATS AFFECTED BY EAE

L. Aloe, A. Micera

Istituto di Neurobiologia, CNR, Roma

We have shown that in experimental allergic encephalomyelitis (EAE), the brain NGF level correlated to physiopathological conditions of the disease. Thus, brain regions containing cells which normally produce NGF express high levels of NGF; whereas the spinal cord where the amount of NGF is about 10 times lower as compared to brain regions, the concentration of NGF is significantly reduced during the acute phase of EAE. Though the functional significance is not yet clearly known, the observation that the decrease of NGF in the spinal cord is associated to an enhanced expression of NGF receptors points to a role of NGF. To obtain useful information about the validity of this hypothesis, we have recently injected radiolabelled NGF into the brain of EAE rats. The results showed that NGF is taken up by cells of brain ventricular area and transported in different brain regions, including the white matter. To further explore the role of NGF, we exposed EAE rats during the acute and/or chronic relapsing phases to elevated levels of circulating anti-NGF antibodies. The results indicated that the inactivation of circulating native NGF exacerbates the clinical and neuropathological signs of EAE. These findings and the observations that (a) high levels of NGF are present in the CSF of MS patients; (b) the OLs localized in the optic nerve of patients with MS overexpress NGF-receptor; (c) that exogenous administration of NGF in brain of *marmosets* reduces the clinical symptoms and the neuropathological deficits of EAE supported the hypothesis of an involvement of NGF in the pathogenesis of this demyelinating disease. Our working hypothesis is that NGF can act both in preventing the damage of nerve cells and in promoting OL survival and/or differentiation.

PRODUZIONE E EFFETTI DELL'IFN- γ NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE: POSSIBILI IMPLICAZIONI NELLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA

F. Aloisi (a), L. Adorini (b), C. Agresti (a), A. Bernardo (a), E. Coccia (c), R. De Simone (a), G. Levi (a), L. Minghetti (a), B. Serafini (a)

(a) *Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Roche Milano Ricerche, Milano*

(c) *Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Nel corso del 1998 è stato ulteriormente studiato il ruolo dei linfociti T CD4⁺ e della citochina di tipo Th1 IFN- γ nei processi di attivazione gliale e di infiammazione nel SNC. Per comprendere se segnali da cellule T siano sufficienti ad attivare la microglia "resting", cellule microgliali dal SNC del topo adulto sono state coltivate con linee di linfociti Th1 e Th2, transgenici per il recettore del peptide OVA 323-339. In seguito ad interazione antigeno-specifica con cellule Th1, ma non Th2, le cellule microgliali mostravano aumentata espressione di molecole di superficie quali MHC di classe II, CD40 e CD54. Cellule microgliali dal SNC del topo adulto erano in grado di stimolare cellule Th1 a secernere IFN- γ e IL-2, ma si comportavano come deboli stimolatori della secrezione di IL-4 da parte di cellule Th2. Il trattamento della microglia adulta con IFN- γ induceva l'espressione di molecole MHC di classe II, CD40 e CD54 e rendeva la microglia capace di restimolare sia cellule Th1 che Th2. Il GM-CSF aumentava la capacità della microglia adulta di attivare cellule Th1, ma non Th2, senza indurre espressione di molecole MHC di classe II, CD40 o CD54. Questi risultati suggeriscono che l'interazione con cellule Th1 e/o fattori solubili rilasciati da queste (in particolare IFN- γ) sono sufficienti ad indurre la maturazione funzionale della microglia in una APC capace di sostenere l'attivazione di cellule T CD4⁺. Il GM-CSF potrebbe agire aumentando la risposta della microglia a segnali di tipo Th1.

Sono stati studiati in maggior dettaglio i segnali implicati nella regolazione della produzione gliale di IL-12 e prostaglandina E₂ (PGE₂), due mediatori che promuovono e inibiscono rispettivamente le risposte Th1. Abbiamo dimostrato che la microglia rilascia IL-12 in seguito ad interazione con cellule Th1, ma non Th2. La produzione di IL-12 dipende dal legame del TCR con il complesso MHC class II/peptide, dall'interazione CD40-CD154 e dalla secrezione di IFN- γ da parte delle cellule Th1 attivate. Cellule Th1 e in minor misura Th2 stimolavano anche la produzione microgliale di PGE₂. L'induzione di PGE₂ dipendeva da interazioni MHC class II/peptide/TCR ma non da interazioni CD40-CD154 né da secrezione di IFN- γ . Gli astrociti non erano in grado di produrre IL-12 e secernevano piccole quantità di PGE₂ in seguito ad interazione con cellule Th1 o Th2. Questi studi dimostrano il coinvolgimento di segnali diversi nell'induzione di IL-12 e PGE₂ ed evidenziano la stretta connessione tra reazioni pro-infiammatorie e meccanismi regolatori anti-infiammatori. Studi immunoistochimici sul SNC di topi con encefalomielite allergica sperimentale, una malattia Th1-mediata, hanno evidenziato aumentata espressione di ciclo-ossigenasi-2, l'enzima responsabile della sintesi di prostaglandine, in macrofagi/microglia e in rari astrociti.

Nel loro insieme, gli studi condotti nel corso dei tre anni indicano che l'IFN- γ e interazioni dirette con cellule Th1 possono contribuire alla immunopatologia e alla demielinizzazione nel SNC: i) promuovendo la maturazione della microglia in una APC capace di restimolare cellule T; ii) inducendo la sintesi microgliale di citochine proinfiammatorie; iii) inibendo la sintesi microgliale di citochine anti-infiammatorie; iv) contrastando l'azione deattivante della PGE₂ sulla microglia; v) compromettendo la vitalità e funzionalità degli oligodendrociti e il loro potenziale di rimielinizzazione. Questi risultati suggeriscono che la somministrazione intracerebrale di molecole capaci di contrastare l'azione dell'IFN- γ o le interazioni tra cellule Th1 e microglia potrebbe interferire con un circuito locale coinvolto nell'amplificazione dell'infiammazione e del danno cerebrale in corso di SM.

PRODUCTION AND EFFECTS OF IFN- γ IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: POSSIBLE IMPLICATIONS FOR THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

F. Aloisi (a), L. Adorini (b), C. Agresti (a), A. Bernardo (a), E. Coccia (c), R. De Simone (a), G. Levi (a), L. Minghetti (a), B. Serafini (a)

(a) *Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Roche Milano Ricerche, Milano*

(c) *Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

We have further investigated the involvement of T helper cells and of the Th1-derived cytokine IFN- γ in glial cell activation and CNS inflammation. To understand whether signals from preactivated T cells are sufficient to activate resting microglia, microglia from the adult mouse CNS were cocultured with I-A^d-restricted, OVA 323-339-specific TCR transgenic Th1 and Th2 cell lines. Upon Ag-specific interaction with Th1, but not Th2 cells, microglia strongly upregulated expression of MHC class II, CD40 and CD54 molecules. Adult microglia stimulated Th1 cells to secrete IFN- γ and IL-2, but were inefficient stimulators of IL-4 secretion from Th2 cells. Adult microglia exposed to IFN- γ showed enhanced expression of MHC class II, CD40 and CD54 molecules and became able to restimulate also Th2 cells. GM-CSF increased the ability of microglia to activate Th1, but not Th2 cells, without upregulating MHC class II, CD40 or CD54 molecules. These results indicate that interaction with Th1 cells and/or Th1 soluble factors (mainly IFN- γ) induce the functional maturation of adult mouse microglia into an APC able to sustain CD4⁺ T cell activation. GM-CSF could prime microglia for Th1-stimulating capacity, possibly by enhancing their responsiveness to Th1-derived signals.

We have also examined in more detail the signals involved in the regulation of the glial synthesis of IL-12 and prostaglandin E₂ (PGE₂), which promote and inhibit, respectively, Th1 responses. We have shown that microglia secrete IL-12 upon Ag-dependent interaction with Th1, but not Th2, cells. Th1-driven IL-12 production depends on TCR ligation by MHC class II/peptide complexes, CD40 engagement on microglia and IFN- γ secretion by activated Th1 cells. Th1 and, to a lesser extent, Th2 cells also stimulated production of PGE₂ by microglia. T cell-mediated induction of PGE₂ required MHC class II/peptide/TCR interactions but neither CD40 engagement nor the presence of IFN- γ . Astrocytes failed to produce IL-12 and secreted negligible amounts of PGE₂ upon interaction with Th1 or Th2 cells. These studies show that different signals from Th1 cells induce IL-12 and PGE₂ synthesis in microglia and highlight the close interconnection between pro-inflammatory reactions and counter-regulatory anti-inflammatory mechanisms. Immunohistochemical studies performed in mice with the Th1-mediated disease EAE revealed enhanced expression of cyclo-oxygenase-2, the inducible enzyme responsible for prostaglandin biosynthesis, on macrophages/microglia but only on few astrocytes.

Collectively, the studies performed during this three-year project indicate that IFN- γ and direct interactions with Th1 cells infiltrating the CNS parenchyma may contribute to CNS immunopathology and demyelination by: i) promoting the maturation of resting microglia into an APC capable of T cell restimulation; ii) inducing the synthesis of pro-inflammatory cytokines like IL-12 and TNF in microglia; iii) inhibiting the microglial synthesis of anti-inflammatory cytokines, like IL-10; iv) counteracting the deactivating effects of PGE₂ on microglia; v) affecting the viability and function of oligodendrocytes and their remyelination potential. These results suggest that reducing macrophage/microglia activation by the intracerebral delivery of agents interfering with IFN- γ activity or blocking microglia-Th1 interactions may target an important local loop for the amplification of T cell-mediated inflammation and tissue damage during the course of MS.

ANTICORPI ANTI INTERFERON IN CORSO DI TERAPIA DELLA SCLEROSI MULTIPLA: STUDIO DEL SIGNIFICATO CLINICO E DEGLI EPITOPI IMMUNOGENICI

G. Antonelli(a,b), F. Bagnato(c), C. Pozzilli(c), O. Turriziani(d), R. Tesoro(d), P. Di Marco(d), C. Gasperini(e), C. Fieschi (c), F. Dianzani(d,f)

(a) *Dipartimento di Biomedicina, Università di Pisa*

(b) *UNESCO Center for emerging and re-emerging infections c/o IRCCS "L. Spallanzani", Roma*

(c) *Dipartimento di Scienza Neurologiche, Università "La Sapienza", Roma*

(d) *Istituto di Virologia, Università "La Sapienza", Roma*

(e) *Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale "San Camillo- Forlanini", Roma*

(f) *Libero Istituto Universitario – Campus Biomedico, Roma.*

La comparsa di anticorpi neutralizzanti (AbN) l'interferon (IFN) è un fenomeno abbastanza comune in pazienti affetti da sclerosi multipla remittente-ricidivante (SMRR) in trattamento con IFN beta. Lo sviluppo di AbN è stato osservato sia durante il trattamento con IFN beta-1a ricombinante (r) che con rIFN beta-1b, i due tipi di IFN attualmente disponibili per il trattamento della SMRR. Tuttavia, sono pochi, e a nostro avviso, non ben definiti, i dati attualmente a disposizione riguardo la specificità, il significato clinico e gli aspetti quantitativi dello sviluppo degli AbN durante la terapia della SM con IFN beta.

Alla luce di queste considerazioni, ci siamo proposti di: valutare l'incidenza di AbN; quantificare e caratterizzare la risposta umorale all' rIFN beta-1a; identificare le caratteristiche cliniche e di risonanza magnetica (RM) dei pazienti che svilupperanno AbN in corso di terapia; studiare la specificità degli AbN contro l'IFN beta, prodotti durante il trattamento con rIFN beta-1a o rIFN beta -1b; analizzare l'incidenza e la specificità della sierconversione in pazienti trattati con rIFN beta 1a e successivamente con rIFN beta-1a o con rIFN beta 1b.

AbN il rIFN beta -1a sono stati sagggiati in 68 pazienti con SMRR e trattati con 3 o 9 MIU di rIFNβ-1a, tre volte alla settimana per 2 anni. I risultati ottenuti mostrano che gli AbN si sviluppano nel 3.2%, 13.8 % e 15.9% dei pazienti a 3, 6, e 24 mesi rispettivamente, e che la loro comparsa non è influenzata dal dosaggio. Di notevole interesse è il fatto che la percentuale di ricadute misurate antecedentemente all'arruolamento, come pure il grado di EDSS sono significativamente più alte nei soggetti che sviluppano AbN in corso di terapia. La marcata variabilità osservata fra i pazienti non ha permesso tuttavia di arrivare a considerazioni definitive circa il significato clinico dello sviluppo di AbN.

E' stata inoltre valutata la specificità degli AbN durante il trattamento della SMRR con rIFN beta-1a o rIFN beta -1b e l'effetto del cambiamento di terapia (da rIFN beta-1a a rIFN beta-1b) sulla incidenza e sulla specificità degli AbN. La capacità di neutralizzare il rIFN beta-1a e-1b è stata sagggiata nei sieri di pazienti SMRR e trattati o con rIFN beta-1a (n=9) o con rIFN beta-1b (n=16) risultati positivi agli AbN, mentre l'incidenza e la specificità degli AbN l'IFN beta sviluppati durante la terapia è stata studiata in 50 pazienti trattati per 2 anni con rIFN beta -1a e successivamente per un altro anno o con rIFN beta-1b (n=34) oppure di nuovo con rIFN beta-1a (n=16). I risultati dimostrano che tutti i sieri positivi, indipendentemente dal tipo di trattamento ricevuto, sono in grado di riconoscere entrambe le forme di rIFN beta e che un ulteriore anno di trattamento non influenza significativamente l'incidenza e la specificità degli AbN sviluppati durante i primi 2 anni di trattamento, anche quando si cambia tipo di IFN beta. Questi dati suggeriscono che la somministrazione di rIFN beta-1b a pazienti positivi agli AbN anti rIFN beta-1a ha scarse possibilità di superare l'effetto neutralizzante esercitato dagli anticorpi nel siero (e vice versa), e che un ulteriore periodo di trattamento con IFN beta-1b in pazienti precedentemente trattati con rIFN beta 1a, non modifica in modo significativo il "pattern" della risposta anticorpale all'IFN beta.

ANTIBODY TO INTERFERON DURING THERAPY OF MULTIPLE SCLEROSIS: STUDY ON THEIR CLINICAL SIGNIFICANCE AND IDENTIFICATION OF IMMUNOGENIC EPITOPES

G. Antonelli^(a,b), F. Bagnato^(c), C. Pozzilli^(c), O. Turriziani^(d), R. Tesoro^(d), P. Di Marco^(d), C. Gasperini^(e), C. Fieschi^(c), F. Dianzani^(d,f)

(a) *Dipartimento di Biomedicina, Universita' di Pisa*

(b) *UNESCO Center for emerging and re-emerging infections c/o IRCCS "L. Spallanzani", Roma*

(c) *Dipartimento di Scienza Neurologiche, Universita' "La Sapienza", Roma*

(d) *Istituto di Virologia, Universita' "La Sapienza", Roma*

(e) *Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale "San Camillo- Forlanini", Roma*

(f) *Libero Istituto Universitario – Campus Biomedico, Roma.*

The development of neutralizing antibodies (NABs) to interferon (IFN) is a common phenomenon of IFN beta therapy for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) patients. It has been clearly established that NABs may develop during treatment with both types of IFN currently available for the therapy of RRMS – rIFN beta-1a and rIFN beta-1b. However, few and, to our opinion, not definitive data are currently available on the specificity, clinical significance and quantitative aspects of NABs development during IFN beta therapy for MS. In the light of the above considerations we planned to assess the incidence on NABs to quantify and characterize the humoral response to rIFN β -1a; to identify baseline clinical and MRI characteristics of patients becoming NABs+; to provide details of clinical and MRI features of NABs+ patients; to study the specificity of NABs to rIFN beta developed during treatment with rIFN beta-1a or -1b; to analyze the incidence and the specificity of seroconversion in patients treated for 2 years with rIFN beta-1a and then re-treated for an additional year with rIFN beta-1a or rIFN beta-1b. NABs to recombinant interferon beta-1a (rIFN β -1a) were tested in 68 patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) treated with 3 million or 9 million international units of rIFN β -1a s.c., thrice weekly for 2 years. The results show that NABs occurred in 3.2%, 13.8% and 15.9% of the patients at 3, 6 and 24 months, respectively, and that their formation was non influenced by dosage regimen. Interestingly, relapse rates prior to study entry, baseline disability and volume of lesions on T2-weighted images were significantly higher in patients who developed NABs. The relationship between NABs formation and loss of clinical and/or magnetic resonance imaging (MRI) response showed much inter-patient variability thus not allowing definitive conclusions on this issue.

Then we examined the specificity of NABs developed during therapy for RRMS with recombinant interferon (rIFN) beta-1a or rIFN beta-1b, and studied the effect of switching from rIFN beta-1a to rIFN beta-1b on the incidence and specificity of NABs. The relative ability to neutralize rIFN beta-1a and -1b was assayed in sera positive for NABs derived from RRMS patients treated with either rIFN beta-1a ($n = 9$) or rIFN beta-1b ($n = 16$) while the incidence and specificity of NABs to IFN beta developed during therapy were studied in 50 RRMS patients who were treated for 2 years with rIFN beta-1a followed by a further year either switching to rIFN beta-1b ($n = 34$) or continuing treatment with rIFN beta-1a ($n = 16$). The results show that all positive sera, independent of the source, may recognize both forms of rIFN beta and that a further year of treatment does not significantly affect the incidence and specificity of the NABs developed during the first 2 years of treatment even if treatment is switched to a different type of IFN beta.

The data then suggest that it is unlikely that the administration of rIFN beta-1b to anti-rIFN beta-1a NABs-positive patients can overcome the inhibitory effect exerted by serum antibodies (and *vice versa*), and that a further period of treatment with IFN beta-1b in patients previously treated with rIFN beta-1a does not significantly change the pattern of antibody response to IFN beta.

STUDIO SULLA REGOLAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNE ALLE PROTEINE MIELINICHE NEL MODELLO DELLA "CHRONIC RELAPSING" ENCEFALITE ALLERGICA SPERIMENTALE NEL TOPO

F. Di Rosa (a), B. Serafini (b), A. Francesconi (a), P. Scognamiglio (a), A. Di Virgilio (c), L. Finocchi (a), I. Santilio (a), F. Aloisi (b), V. Barnaba (a)

(a) *Fondazione Andrea Cesalpino, I Clinica Medica, Università degli studi di Roma "La Sapienza"*

(b) *Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Servizio Qualità e Sicurezza Sperimentazione Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Per comprendere i meccanismi che sono alla base della remissione spontanea dell'Encefalite Allergica Sperimentale (EAE) indotta dal peptide 139-151 della Proteina ProteoLipide (PLP) nei topi SJL, abbiamo esaminato in diverse fasi di malattia sia il sito della risposta effettrice nel Sistema Nervoso Centrale (SNC), sia il sito di immunizzazione. Nel SNC, la frequenza delle cellule T produttrici IFN- γ specifiche per il peptide PLP 139-151 diminuiva con la remissione, così come la quantità di cellule infiltranti CD4⁺ e Mac-1⁺. Tuttavia, le cellule produttrici IL-4 erano sempre scarse e le cellule cicloossigenasi-2⁺ erano numerose solo al picco di malattia nel SNC, suggerendo che le citochine Th2 e le prostaglandine non determinano la remissione dell'EAE. Nel sito sottocutaneo di iniezione dei peptide PLP 139-151 con adiuvante, le cellule Mac-1⁺ cominciavano a diminuire già durante la fase acuta di malattia e le cellule DEC-205⁺ erano numerose solo nei tempi precoci, sebbene l'infiltrato infiammatorio fosse abbondante. Noi proponiamo che l'infiammazione nel sito di immunizzazione sia di breve durata nell'EAE indotta dal peptide PLP 139-151 e che ciò determini una stimolazione delle cellule T autoreattive temporanea ed una malattia auto-limitata.

Noi suggeriamo che, nell'EAE indotta dal peptide PLP 139-151, il consumo di antigene e/o la mancanza di un effetto prolungato dell'adiuvante nel sito di immunizzazione porti ad un'infiammazione limitata, con ridotto reclutamento e attivazione delle APC, ed infine diminuita migrazione ai linfonodi drenanti delle DC attivate e caricate con l'antigene. Perciò, le cellule T autoreattive sarebbero stimulate solo per un breve tempo nei linfonodi e ciò determinerebbe una malattia auto-limitata. Viceversa, l'EAE cronica sarebbe di lunga durata a causa della ripetuta stimolazione di numerose ondate di cellule T autoreattive nel tempo. La nostra ipotesi ha importanti implicazioni per la comprensione delle malattie autoimmuni croniche, che noi suggeriamo essere sempre mantenute dalla ripetuta stimolazione delle cellule T autoreattive. Si può ipotizzare che gli agenti infettivi, il cui ruolo nell'induzione delle malattie autoimmuni umane è stato già proposto, possano essere determinanti anche nella loro cronicizzazione, nel caso che i patogeni siano in grado di persistere nell'ospite.

STUDY ON THE REGULATION OF IMMUNE RESPONSE TO MYELIN PROTEINS IN THE MOUSE MODEL OF CHRONIC RELAPSING EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

F. Di Rosa (a), B. Serafini (b), A. Francesconi (a), P. Scognamiglio (a), A. Di Virgilio (c), L. Finocchi (a), I. Santilio (a), F. Aloisi (b), V. Barnaba (a)

(a) *Fondazione Andrea Cesalpino, I Clinica Medica, Università degli studi di Roma "La Sapienza"*

(b) *Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Servizio Qualità e Sicurezza Sperimentazione Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

We studied Proteo-Lipid Protein (PLP) 139-151 peptide induced Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE), an acute autoimmune disease of SJL mice resembling human Multiple Sclerosis. To understand the mechanisms underlying spontaneous remission of PLP 139-151 peptide induced EAE, we examined both the effector response site in the Central Nervous System (CNS) and the immunization site at different phases of disease. In the CNS, the frequency of PLP 139-151 peptide specific IFN- γ producing T cells as well as the amount of infiltrating CD4⁺ and Mac-1⁺ cells decreased with recovery. However, IL-4 producing cells were always rare and cyclooxygenase-2⁺ cells were numerous only at disease peak in the CNS, suggesting that Th2 cytokines and prostaglandins did not determine remission of EAE. By looking at the subcutaneous site of PLP 139-151 peptide plus adjuvant injection, we found that, although the inflammatory infiltrate was abundant, Mac-1⁺ cells started to decrease already during disease acute phase and DEC-205⁺ cells were numerous only at early time points. We propose that immunization site inflammation is short-lived in PLP 139-151 peptide induced EAE and this leads to a temporary autoreactive T cell stimulation and to a self-limited disease.

We suggest that in PLP 139-151 peptide induced EAE the consumption of exogenous antigen and/or the lack of a long lasting adjuvant effect lead to reduced inflammation and APC recruitment and activation in the immunization site, and ultimately to diminished migration of antigen loaded activated DC to the draining lymph nodes. Thus, autoreactive T cells would be stimulated only for a short interval in the draining lymph nodes and this would lead to a self-limited disease. Conversely, chronic EAE might have a long duration because of the stimulation of multiple waves of autoreactive T cells over time. Our hypothesis has important implications for the understanding of chronic autoimmune diseases, which we suggest are always maintained by repeated stimulation of autoreactive T cells. Indeed, it is tempting to hypothesize that infectious agents which have been involved in triggering human autoimmune diseases may play a major role in their chronicization, when the pathogens are able to persist in the host

VITA QUOTIDIANA CON LA SCLEROSI MULTIPLA: VALUTAZIONE DEI COSTI

M.A. Battaglia, e Gruppo di Ricerca EECLMS*
Istituto di Igiene Università di Siena

Premessa: le caratteristiche di cronicità e di grande variabilità della sclerosi multipla (SM) producono differenti livelli di carico economico per l'individuo, per la famiglia e per le strutture pubbliche e private. Il livello di disabilità che consegue alla progressione della malattia crea diversi bisogni in termini di servizi: ne risulta un loro ampio utilizzo ed i conseguenti oneri economici.

Soggetti: sono stati reclutati 221 pazienti presso gli ambulatori per la SM e presso le Sezioni AISM, in 9 città distribuite in tutta Italia. I soggetti sono stati selezionati allo scopo di ottenere una uguale distribuzione nelle seguenti categorie di disabilità (livelli EDSS): 4.0-5.5, 6.0-6.5, 7.0-8.5 e 9.0-9.5.

Materiali: per valutare i costi della SM in termini di decorso della malattia e di livello di disabilità, tra le persone con SM che risiedono a casa, sono stati utilizzati un questionario ed un diario quotidiano per 14 giorni. Il questionario raccoglie i dati sui costi che riguardano il periodo successivo alla diagnosi di SM fino al momento attuale, il diario registra le spese su base giornaliera. Tali dati comprendono tutte le spese relative all'assistenza ricevuta e ai servizi utilizzati nella propria casa, in ambulatorio e in ospedale.

Metodo: un coordinatore dello studio ha effettuato un'intervista a casa del paziente o in ambulatorio durante la quale ha somministrato il questionario e ha fornito le istruzioni per la compilazione del diario. Il coordinatore ha poi incontrato il soggetto una seconda volta a casa dopo la prima settimana di compilazione del diario per affrontare eventuali problemi. Una terza visita è stata effettuata il 14° giorno, alla fine delle due settimane di compilazione, per ritirare il diario completato ed eseguire il controllo finale della qualità.

Il questionario ed il diario sono stati compilati da 221 pazienti, 136 femmine e 85 maschi. La scala EDSS è risultata suddivisa nelle seguenti categorie: 52 soggetti (23.5%), 4.0-5.5; 74 (33.5%) 6.0-6.5; 69 (31.2%) 7.0-8.5; 26 (11.8%) 9.0-9.5.

Verrà presentato un esteso profilo dei dati demografici e dei dati relativi ai costi.

* Gruppo di Ricerca EECLMS: C. Ricci (*Siena*), M.R. Barulli (*Vicenza*), C. Basagni (*Siena*), R. Bergamaschi (*Pavia*), M. Betti (*Siena*), F. Bortolon (*Vicenza*), R. Bottaretto (*Belluno*), A. Bracci (*Roma*), M. Buccafusca, F. Cipriani (*Roma*), G. Fantozzi (*Pisa*), C. Fazio (*Messina*), F. Fenzo (*Vicenza*), L. Frasconi (*Siena*), P. Guglieri (*Genova*), A. Romani (*Pavia*), C. Solaro (*Genova*), S. Tonietti (*Pavia*), R. Vaccaro (*Belluno*)

AN EVALUATION OF THE EVERYDAY COSTS OF LIVING WITH MULTIPLE SCLEROSIS

M.A. Battaglia, and the EECLMS Study Group*
Istituto di Igiene Università di Siena

Background: The chronic, highly variable nature of multiple sclerosis (MS) creates various levels of financial burden on the individual, family and on private and public structures. The level of disability as the consequence of disease progression creates different needs in terms of services, resulting in a variability of service utilization and of the subsequent financial burden.

Subjects: 221 subjects were recruited from out-patient clinics and from MS Society local branches, in 9 cities throughout Italy. Patients were selected in order to achieve equal distribution in the following categories of disability levels (EDSS): 4.0-5.5, 6.0-6.5, 7.0-8.5 and 9.0-9.5.

Materials: A comprehensive questionnaire and a 14-day diary were utilized to evaluate the cost of MS, in terms of disease course and level of disability, for persons with MS who reside in the home. The questionnaire collects cost data regarding the period following the diagnosis of the disease to the present and the patient diary records expenses on a day-to-day basis. Cost data includes all expenses related to receiving care and services in the home, in the out-patient setting and in the in-patient hospital.

Methods: A study coordinator conducted interviews in the patient's home or in the out-patient clinic, at which time the questionnaire was administered and instructions for completing the diary were given. The study coordinator visited the patient's home after the first week of diary compilation in order to assess whether any problems had occurred. The coordinator made a third visit to the patient's home after 14 days in order to retrieve the completed diary and perform the final quality control.

A total of 221 subjects completed the questionnaire and diary, of which 136 were female and 85 were male. EDSS was divided into the following categories: 52 subjects (23.5%) 4.0-5.5, 74 (33.5%) 6.0-6.5, 69 (31.2%) 7.0-8.5 and 26 subjects (11.8%) 9.0-9.5.

A comprehensive demographic profile and cost data will be presented.

* Gruppo di Ricerca EECLMS: C. Ricci (*Siena*), M.R. Barulli (*Vicenza*), C. Basagni (*Siena*), R. Bergamaschi (*Pavia*), M. Betti (*Siena*), F. Bortolon (*Vicenza*), R. Bottaretto (*Belluno*), A. Bracci (*Roma*), M. Buccafusca, F. Cipriani (*Roma*), G. Fantozzi (*Pisa*), C. Fazio (*Messina*), F. Fenzo (*Vicenza*), L. Frasconi (*Siena*), P. Guglieri (*Genova*), A. Romani (*Pavia*), C. Solaro (*Genova*), S. Tonietti (*Pavia*), R. Vaccaro (*Belluno*)

LINFOCITI T $\gamma\delta$ CHE ESPRIMONO RECETTORI NK: RUOLO IMMUNOREGOLATORIO NELLA SCLEROSI MULTIPLA.

L. Battistini (a), G. Borsellino (a), R. Placido (a), B. Cipriani (a,d), D. Tramonti (a), S. Luchetti (a), S. Bach (a), M. Salvetti (b), S. Galgani (c), G. Ristori (b), C. Gasperini (c), C.F. Brosnan (d)

(a) *Laboratorio di Neuroimmunologia, I.R.C.C.S. Santa Lucia, Roma.*

(b) *Dipartimento di Neuroscienze, Università La Sapienza, Roma.*

(c) *Dipartimento di Neuroscienze "Lancisi", Ospedale S.Camillo, Roma.*

(d) *Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA.*

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria demielinizzante del sistema nervoso centrale determinata da una risposta autoimmunitaria diretta contro componenti del rivestimento mielinico. Nei pazienti SM a livello delle lesioni demielinizzanti sono stati ritrovati i linfociti $\gamma\delta$ esprimenti il recettore V δ 2, suggerendo che queste cellule sono coinvolte nello sviluppo e nella progressione della lesione stessa. Al fine di comprendere il ruolo giocato dai linfociti T $\gamma\delta$ nella SM abbiamo eseguito uno studio fenotipico e funzionale di tali cellule nel sangue periferico di pazienti SM e di donatori sani, con particolare attenzione ai recettori delle cellule NK (NKR), dato che l'espressione di tali recettori sembra regolare l'attività dei linfociti T. Inoltre, abbiamo analizzato la capacità dei linfociti T $\gamma\delta$ di produrre fattori solubili coinvolti nell'amplificazione della risposta immunitaria. I nostri risultati mostrano che nel sangue periferico dei donatori sani i linfociti V δ 2+ esprimono almeno un NKR, ed una percentuale significativa ne coesprime più d'uno. L'80% dei linfociti T V δ 2+ esprime il CD94, mentre gli altri NKR esaminati (p58.1, p58.2, p70, NKR-P1A, CD56, CD69) erano presenti sul 20% di questa sottopopolazione di cellule. Nei pazienti SM l'espressione del CD94 e del suo co-recettore inibitorio NKG2A erano diminuite. Nonostante il significato funzionale della ridotta espressione del CD94 non sia chiaro, è possibile speculare che queste cellule, in corso di SM, non siano più sotto il controllo di segnali regolatori negativi. Per quanto riguarda il NKR-P1A, l'espressione di tale recettore sulle cellule V δ 2+ era aumentata nei pazienti SM (54%) rispetto ai donatori sani (20%), suggerendo che nei pazienti SM le cellule V δ 2+ sono attivate.

Studi funzionali hanno dimostrato che l'espressione del NKR-P1A da parte delle cellule V δ 2+ è modulata dall'IL-12, citochina che attiva i linfociti T $\alpha\beta$ coinvolti nelle risposte di tipo Th1. Inoltre abbiamo dimostrato che l'espressione del NKR-P1A facilita la migrazione dei linfociti V δ 2+ attraverso l'endotelio vascolare.

Le cellule che esprimono il TCR V δ 2V γ 9 sono in grado di riconoscere e di rispondere ad antigeni non proteici quali l'isopentenil pirofosfato (IPP) in maniera non MHC-ristretta. Abbiamo quindi studiato la risposta dei linfociti T V δ 2+ all'IPP in termini di produzione di citochine e di chemochine, paragonandola a quella ottenuta in seguito a stimolazione con mitogeni o a cross-linking del TCR. Abbiamo mostrato in precedenza che le cellule V δ 2+ esprimono un pattern citochinico del tipo Th0: in seguito a stimolazione con anticorpi CD3 e CD28 tali cellule infatti producono IFN γ e TNF α , e circa il 50% delle cellule produce anche IL-4. La stimolazione con NKR-P1A, al contrario, determina produzione di solo IFN γ . Per analizzare la risposta all'IPP, sono state isolate linee di linfociti T V δ 2+. Le cellule sono poi state stimolate con IPP o con il mitogeno PHA, ed è stata misurata la produzione di IFN γ . In seguito a stimolazione con IPP le cellule V δ 2 producevano quantità maggiori di IFN γ (3.8 ng/ml) rispetto alla stimolazione con PHA (800 pg/ml).

Allo scopo di valutare ulteriormente la capacità dei linfociti T V δ 2+ di produrre fattori solubili ad azione proinfiammatoria, è stato studiato il rilascio di chemochine. I risultati hanno dimostrato elevate quantità di MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES in seguito a stimolazione con IPP o con anti-CD3+CD28. In colture dove veniva aggiunta l'IL-12, il rilascio di MIP-1 α era significativamente aumentato, mentre era diminuito quando veniva aggiunto TGF- β ; il rilascio di MIP-1 β non diminuiva con l'aggiunta di TGF- β indicando una differente regolazione di queste due chemochine. Non è stata riscontrata la produzione di MCP-1. L'espressione dei recettori per

le chemochine CCR1 e CCR5 da parte delle Vd2 in seguito a stimolazione con IPP confermano l'acquisizione di un fenotipo Th1.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che le cellule T V δ 2 possono essere attivate da antigeni non convenzionali in periferia, e grazie all'aumentata espressione di NKR1a migrare attraverso l'endotelio vascolare e rilasciare fattori solubili quali IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES responsabili della reazione infiammatoria che gioca un ruolo centrale nell'immunopatogenesi della SM.

Ulteriori esperimenti sono necessari per studiare la distribuzione dei linfociti V δ 2 NKR+ nelle lesioni cerebrali caratteristiche di questa malattia (acute, cronico-attive e cronico-silenti) e per meglio comprendere le interazioni tra questa sottopopolazione di linfociti T e le altre cellule effettrici coinvolte nel processo infiammatorio immuno-mediato che determina la demielinizzazione

$\gamma\delta$ T LYMPHOCYTES BEARING NK RECEPTORS: IMMUNOREGULATORY ROLE IN MULTIPLE SCLEROSIS

L. Battistini (a), G. Borsellino (a), R. Placido (a), B. Cipriani (a,d), D. Tramonti (a), S. Luchetti (a), S. Bach (a), M. Salvetti (b), S. Galgani (c), G. Ristori (b), C. Gasperini (c), C.F. Brosnan (d)
 (a) *Laboratorio di Neuroimmunologia, I.R.C.C.S. Santa Lucia, Roma.*
 (b) *Dipartimento di Neuroscienze, Università La Sapienza, Roma.*
 (c) *Dipartimento di Neuroscienze "Lancisi", Ospedale S.Camillo, Roma.*
 (d) *Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA.*

MS is an inflammatory demyelinating disease of the nervous system that is thought to share a dependence upon an autoimmune response to components of the myelin sheath and represents an inflammatory response dependent upon a Th1-type T cell response. In patients with MS the $\gamma\delta$ T cells within the lesions have been found to express the V δ 2 TCR, suggesting that $\gamma\delta$ T cells are involved in lesion formation and disease progression, but exactly what their contribution might be in this regard remains to be defined. To investigate this in greater detail we have performed phenotypic and functional analyses of the $\gamma\delta$ T cell populations in the peripheral blood of patients with MS and of healthy volunteers, with particular emphasis on the expression of natural killer cell receptors (NKR). We focused our attention on these receptors since they have been linked on both $\alpha\beta$ TCR+ and $\gamma\delta$ TCR+ cells to regulation of T cell function. In addition, we have examined the capacity of these cells to generate soluble factors involved in the generation of specific arms of the immune response. Our results show that in the peripheral blood of normal individuals V δ 2+ T cells express at least one NKR, with many expressing more than one. Of these the C-lectin type receptor CD94 predominated, being present on approximately 80% of all V δ 2+ T cells, whereas other NKR examined were present on <20% of the circulating cells. In MS patients the expression of CD94 and its inhibitory co-receptor NKG2A were reduced. Although the functional significance of this altered expression of CD94 remains unclear, it might suggest that many of these cells are no longer under the control of negative regulatory signals. With respect to the expression of NKRP-1A, in patients with MS we found that NKRP-1A expression was increased approximately two fold on the V δ 2+ subset (~54%) over that found in the normal controls (~20%), suggesting that in MS the V δ 2 subset of cells is in an activated state.

Functional studies showed that NKR-P1A expression on the V δ 2+ subset can be modulated by culture with IL-12, a cytokine that is known to activate $\alpha\beta$ T cells involved in Th1-type T cell responses. Furthermore, we have shown that NKR-P1A expression facilitates transmigration of V δ 2+ T cells across the vascular endothelium.

Cells that express the V δ 2V γ 9 TCR are known to respond to non-peptidic antigens associated with common pathogens, such as isopentenyl pyrophosphate (IPP), in a non-MHC restricted fashion. Therefore, it was of interest to determine whether activation of $\gamma\delta$ T cells with these antigens could elicit the release of proinflammatory factors such as cytokines and chemokines, and to determine whether this release was comparable to that found following activation via the TCR or mitogens. Previously, we have shown that V δ 2 cells express a Th0 cytokine pattern, with activation using antibodies to CD3+CD28 leading to the rapid release (6h) of IFN γ and TNF α , and approximately 50% also expressing IL-4. Interestingly, when these same cells were activated by cross-linking NKRP-1A, only IFN γ was released. To compare the activity of IPP with the T cell mitogen PHA, we prepared V δ 2+ T cell lines, activated these cells in the presence or absence of autologous feeders, and determined the release of IFN γ . Following stimulation with IPP, high levels of IFN γ were produced that was enhanced in the presence of autologous feeders (2ng/ml versus 3.8 ng/ml respectively). When PHA was used as the stimulus, much lower levels of IFN γ were induced and this was again reduced in the absence of autologous feeder cells (800 pg/ml versus 200 pg/ml), comparable to what was found following activation via CD3 (850 pg/ml).

To examine further the proinflammatory properties of V δ 2⁺ cells we studied the release of chemokines. Our data show that high levels of the chemokines MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES are rapidly released following activation with IPP or anti-CD3+CD28. Culture with IL-12 significantly enhanced IPP-induced expression and release of MIP-1 α that could be down-regulated by TGF β whereas the induction of MIP-1 β by IPP+IL-12 was refractory to cotreatment with TGF β , indicating that these chemokines are differentially regulated by these cytokines. In contrast, no secretion of MCP-1 was noted. Chemokine receptor analysis showed that these cells expressed CCR1 and CCR5 at high levels, in agreement with a Th1 -type response.

In conclusion, our data show that V δ 2 T cells can be activated by non conventional antigens in the periphery, upregulate NKR-P1A expression and transmigrate across the vascular endothelium and deliver proinflammatory signals through the secretion of soluble factors such as IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES, thus playing an important effector role in the immunopathogenesis of MS.

Further studies are required to investigate the distribution of V δ 2 NKR-P1A⁺ T cells at the site of the lesion and to better understand the cross-talk between these cells and the other effector cells involved in the inflammatory damage.

STUDIO DEL RUOLO DELL'INTERLEUCHINA 12 NELLA SCLEROSI MULTIPLA. CORRELAZIONI CLINICHE ED IMMUNOLOGICHE.

G. Bellone^(a), P. Ferrero^(b), L. Orsi^(b), L. Tarenzi^(b), A. Carbone^(a), I. Ferrero^(a), D. Tibaudi^(a), P. Rocca^(b), E. Artusio^(a), B. Bergamasco^(b), G. Emanuelli^(a)

(a) Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università degli studi di Torino

(b) Dipartimento di Neuroscienze, Università degli studi di Torino

L'interleuchina (IL)-12, una citochina eterodimerica formata da due catene, p40 e p35, è un fattore determinante per la generazione ed il mantenimento delle risposte immunitarie di tipo T helper (h) 1, ormai ritenute corresponsabili nella patogenesi della Sclerosi Multipla (MS). L'espressione abnorme di IL-12 osservata sia a livello centrale sia a livello periferico nelle forme acute di MS, aveva suggerito che questa citochina potesse rappresentare un marcatore caratteristico dell'attività clinica della malattia. Tuttavia, ancora oggi, i livelli della due forme di IL-12 (p70 biologicamente attiva e p40 inattiva) nel liquido cerebrospinale (CSF) e nel siero di questi pazienti non sono stati ben definiti.

Nella prima parte del nostro studio ci siamo quindi proposti di valutare, mediante uno specifico sistema radiometrico, i profili di IL-12 p70 e p40 nel CSF e nel siero di 336 pazienti affetti da disordini del sistema nervoso centrale con risposte infiammatorie e non, e in un gruppo di controllo. Inoltre, nel corso di questo ultimo anno abbiamo condotto anche uno studio longitudinale e prospettico sui livelli di IL-12 p70 e p40 nei CSF e nei sieri di 19 pazienti affetti da SM *relapsing-remitting* (RR) prima e dopo l'inizio di un trial pilota controllato con IFN- α 2a ricombinante durato sei mesi. Rispetto ai pazienti affetti da malattie neurodegenerative, sono stati riscontrati livelli medi di IL-12 p40 e p70 significativamente superiori non solo nel CSF e nel siero di pazienti con SM in fase attiva ma anche nei pazienti con sindrome di Guillain-Barré. Tuttavia, in quest'ultima patologia ed in altre malattie infiammatorie non è stato osservato un incremento dei corrispondenti indici di IL-12 e pertanto si può ritenere che il rilascio di IL-12 a livello centrale avvenga in prevalenza nella SM. Nelle forme SM RR i livelli di IL-12 sono indicativi di attività di malattia e dell'estensione della lesione (valutata mediante MRI). Inoltre sempre in questi casi, i livelli sierici e del liquor di IL-12 p40 e p70 rimangono elevati tra il I e III mese dalla ricaduta, ma tendono a diminuire o diventano non più dosabili tra il VI e XII mese. In generale, non sono state osservate correlazioni significative tra i livelli di IL-12 e quelli di IL-10 e TGF- β 1, sia nel liquor che nel siero, mentre invece è stata notata una correlazione positiva tra i livelli di IL-12 e di IFN- γ . Nello studio prospettico controllato effettuato sui pazienti prima e dopo sei mesi di terapia clinicamente efficace con IFN- α 2a ricombinante è stata riscontrata in tutti i casi una riduzione dei livelli di IL-12 p40 e p70 al termine del trattamento farmacologico con sporadici innalzamenti ai livelli *baseline*.

Nella seconda parte del nostro studio, abbiamo analizzato l'effetto della terapia con glucocorticoidi (GCC) sull'espressione delle citochine di tipo Th1 e Th2 nei pazienti con SM definita in fase acuta, al fine di stabilire il significato di queste citochine come indicatori biologici per una ottimale gestione della malattia.

Abbiamo analizzato, sia a livello di proteina che di messaggio, l'espressione costitutiva o indotta di IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β 1 nelle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) di 30 pazienti e di altrettanti donatori sani. I campioni di sangue eparinato sono stati raccolti al momento della diagnosi e dopo 10 e 20 giorni dall'inizio della terapia con GCC ad alte dosi. L'analisi del messaggero per le citochine nelle PBMC fresche o stimulate è stato effettuato mediante RT-PCR semiquantitativa, mentre le proteine sono state dosate nel loro surnatante mediante RIA o ELISA, a seconda della citochina.

Le PBMC dei pazienti hanno mostrato un'aumentata produzione di IL-12 p40 e p70, sia basalmente che sotto stimolo appropriato, rispetto ai donatori normali, mentre non sono state notate differenze significative nei livelli di IL-10 e TGF- β 1 tra i due gruppi. Dopo il trattamento

con GCC, è stata osservata generalmente una drammatica e persistente riduzione dell'espressione di IL-12 e IFN- γ in concomitanza con un aumento di sintesi di IL-4 e TGF- β 1 nei linfociti stimolati mediante anti-CD3. Non sono state invece osservate variazioni significative dei livelli di IL-10 prima e dopo terapia. La modulazione dell'espressione delle citochine durante il trattamento con GCC è stata confermata anche a livello di mRNA. In 8 pazienti sono anche state studiate le cellule dendritiche (DC) (generate *ex vivo* dalle PBMC aderenti in presenza di GM-CSF e IL-4) come possibili sorgenti di elevati livelli di IL-12. I risultati preliminari dimostrano che nei pazienti con SM in fase attiva, le DC immature o stimulate via CD40 ligando, rispetto a quelle dei donatori di controllo, i) stimolano potentemente la reazione linfocitaria mista (MLR); ii) rilasciano maggior quantità di IL-12 p70, sia costitutivamente che sotto stimolo ed iii) inducono la produzione di elevati livelli di IFN- γ in linfociti eterologhi. Dopo 10 giorni di trattamento con GCC, le DC dei pazienti sintetizzano meno IL-12 p70 e mostrano una ridotta capacità stimolatoria nei confronti delle cellule T.

In conclusione, i nostri dati confermano che un apparente aumento nell'espressione di IL-12 potrebbe svolgere un ruolo etiologico nella cronicizzazione della malattia. Inoltre, suggeriscono che l'effetto benefico della terapia steroidea nella SM non solo dipende da un effetto diretto sui linfociti T, ma anche sulle DC, cellule specializzate nel presentare loro l'antigene.

ROLE OF INTERLEUKIN-12 IN MULTIPLE SCLEROSIS. CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CORRELATION

G. Bellone^(a), P. Ferrero^(b), L. Orsi^(b), L. Tarenzi^(b), A. Carbone^(a), I. Ferrero^(a), D. Tibaudi^(a), P. Rocca^(b), E. Artusio^(a), B. Bergamasco^(b), G. Emanuelli^(a)

(a) Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università degli studi di Torino

(b) Dipartimento di Neuroscienze, Università degli studi di Torino

Interleukin (IL)-12, a heterodimeric cytokine consisting of p40 and p35 chains, is a critical inducer of Th1-type immune responses which are thought to be pathogenic in Multiple Sclerosis (MS). Enhanced expression of IL-12 has been already detected in acute MS plaques, as well as in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of active MS patients, suggesting this cytokine may serve as trait-marker of the clinical disease activity. However, cerebral spinal fluid CSF and serum levels of the biologically active (p70) and inactive (p40) IL-12 forms are not well established.

In the first part of our study we investigated profiles of IL-12 p40 and p70 by specific RIAs in paired CSF and serum from 336 patients with Central Nervous System (CNS) disorders, with and without an inflammatory response and controls. More recently, we also analyzed these IL-12 forms in longitudinal CSF and serum from 19 relapsing-remitting (RR) MS followed prospectively before and after starting a six-month placebo controlled treatment with recombinant IFN-g 2a. Average CSF and serum IL-12 p40 and p70 levels were significantly higher in patients with active MS compared with neurological normal controls. Levels in patients with Guillain-Barré syndrome (GBS) and other CNS conditions but not those with neurodegenerative diseases were also elevated. However, an elevation of corresponding IL-12 indices was not found in GBS and other inflammatory diseases indicating that intrathecal IL-12 release may occur predominantly in MS. In RR MS IL-12 levels reflect clinical and lesional MRI activity. In the same patients, CSF and serum IL-12 p40 and p70 levels were low or absent in samples taken at 6th and 12th month from a relapse; a significant increase in IL-12 p40 and p70 was noted at 1st and still persisted at 3th month. Overall, no significant correlation was found between the CSF and serum levels of IL-12, IL-10 and Transforming growth factor- α 1. However, a significant positive correlation between the levels of IL-12 and IFN- α was observed, both in serum and CSF. Interestingly, in patients followed prospectively before and after six-months of clinically effective IFN- α 2a treatment, consistently low IL-12 p40 and p70 levels at the end of therapy were found with a sporadic increase at baseline.

In the second part of our study we investigated the effect of glucocorticoid (GCC) treatment on Th1 and Th2 interleukin expression in patients with defined acute phase MS, in order to establish the value of these cytokines as biological markers for an optimal management of the disease.

We evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 30 patients and healthy subjects the constitutive and induced expression of IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 and TGF- β 1. Blood samples were collected from the patients at diagnosis and after 10 and 20 days from the beginning of the therapy with GCC at high doses. The cytokine mRNA analysis was performed by semi-quantitative RT-PCR, while the proteins were detected in the supernatants by RIA or ELISA.

PBMC from patients showed an increased production of IL-12 p40 and p70, either constitutively or in response to bacterial products, compared to normal donors. By contrast, no significant difference in IL-10 and TGF- β 1 production was observed between the two groups.

After GCC treatment, a dramatic and persistent down-regulation of basal and induced expression of IL-12 was observed, together with a significant reduction of IFN- γ release and an increased IL-4 and TGF- β 1 production by anti-CD3-activated T lymphocytes. No differences were detected in the amount of IL-10 before and after therapy. The modulation of cytokine

expression was also confirmed at mRNA level. In 8 patients we have also investigate the dendritic cells (DC) as a potential source of the increased levels of IL-12. Preliminary results demonstrated that in a MS patients immature and CD40 L stimulated-DC, generated ex vivo from adherent cells in the presence of GM-CSF and IL-4, in comparison with those of normal controls: i) released enhanced levels of IL-12 p70; ii) induced higher IFN- γ synthesis by allogeneic T cells and iii) strongly stimulated MLR. After 10 day GCC treatment, DC from patients secreted less IL-12 p70, both spontaneously and upon CD40 L, and showed a decreased T cell stimulatory capacity.

In conclusion our data confirm that an apparent up-regulation of IL-12 may play an etiological role in the chronicity of MS. In addition, we suggest that beneficial effects of GCC in MS patients not only relies on direct effects on T cells, but also on DC, their professional antigen-presenting cells.

EFFETTI DELLE CITOCINE SUL RILASCIO DI NEUROTRASMETTITORE DAI NEURONI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE: ANALISI FUNZIONALE E MOLECOLARE DEL MECCANISMO D'AZIONE

F. Benfenati, V. Tancredi, G. D'Arcangelo, C. Cafè, M. D'Antuono, F. Onofri
Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli studi "Tor Vergata", Roma

I neuroni esprimono recettori per le interleuchine (ILR) accoppiati a proteina cinasi intracellulari che includono MAP cinasi (MAPK) a tirosina cinasi non recettoriali (Src e Jak cinasi). Durante l'ultimo anno abbiamo ulteriormente analizzato la biologia cellulare e molecolare di substrati presinaptici per MAPK come le sinapsine che possono essere bersagli intracellulari delle citochine e studiata la correlazione tra gli effetti fisiologici dell'interleuchina-6 (IL-6) nell'ippocampo e neocorteccia di ratto e l'attivazione di vie di trasduzione del segnale.

1. Identificazione di un terzo membro della famiglia delle sinapsine con siti di consenso per la fosforilazione ad opera di MAPK/Erk, potenziale bersaglio dell'azione di citochine a livello presinaptico. E' stato clonato e caratterizzato un gene codificante una nuova isoforma delle sinapsine, la sinapsina III. Un'elevata omologia esiste nei domini A, C ed E delle tre sinapsine, suggerendo che essi possano avere importanza funzionale. Il dominio variabile J tra i domini A e C è basico e ricco in prolina e glutammina. Vari siti di consenso per la fosforilazione ad opera di CaM cinasi II e MAPK sono stati identificati nel dominio J, con un numero rilevante (10) di siti per MAPK. E' quindi possibile che la sinapsina III sia un ottimo substrato per MAPK e che possa rappresentare un'effettore intracellulare degli effetti biologici di neurotrofine e interleuchine. La distribuzione tissutale della sinapsina III è simile a quella delle altre sinapsine. Analisi mediante Northern e Western blotting hanno rivelato che l'espressione è specifica per il cervello e che la sinapsina III è colocalizzata con le altre sinapsine con massima concentrazione a livello delle vescicole sinaptiche e rapporto sinapsina Ia:IIa:IIIa di 4:2:1. I risultati suggeriscono che la sinapsina III giochi un ruolo simile alle altre sinapsine nella regolazione della funzione presinaptica. **2. L'inattivazione della MAPK/Erk è associata agli effetti fisiologici dell'IL-6 sulla plasticità sinaptica a livello ippocampale.** L'IL-6 ha indotto, nella regione CA1 dell'ippocampo, una diminuzione dose-dipendente del potenziamento post-tetanic (PTP) e del potenziamento a lungo termine (LTP) che è risultata completamente antagonizzata dall'inibitore delle tirosina cinasi, lavendustina A (LavA). L'analisi mediante immunoblotting con anticorpi fosfo-specifici ha rivelato che l'inibizione di PTP ed LTP era associata ad una stimolazione della fosforilazione di STAT3 su residui di tirosina e ad una diminuzione della duplice fosforilazione (tirosina e treonina) della MAPK/Erk, in assenza di effetti significativi sull'attivazione di SAPK/Jnk. Questi effetti si manifestavano in maniera tempo-dipendente e venivano efficacemente antagonizzati dal trattamento con LavA. **3. Effetti di IL-6 sulla diffusione dell'eccitamento nella neocortex di ratto.** Gli effetti inibitori di IL-6 sulla diffusione dell'eccitamento in fettine di corteccia somato-sensoriale, valutati analizzando sia il segnale ottico intrinseco (mediante videomicroscopia all'infrarosso) che il potenziale di campo, erano accompagnati da un aumento dose-dipendente della fosforilazione di STAT3 su residui di tirosina e da una diminuzione della duplice fosforilazione (tirosina e treonina) della MAPK/Erk, in assenza di effetti significativi a carico di SAPK/Jnk. Sia gli effetti fisiologici che quelli biochimici venivano completamente antagonizzati da trattamento combinato con LavA.

La dipendenza degli effetti fisiologici dell'IL-6 dall'attivazione di tirosina cinasi intracellulari e la loro correlazione con l'inattivazione della MAPK/Erk indicano che tirosina cinasi e MAPK/Erk sono coinvolte nei fenomeni di plasticità sinaptica e possono rappresentare bersagli intracellulari preferenziali per gli effetti dell'IL-6 sul sistema nervoso centrale adulto. Inoltre, gli effetti inibitori sul rilascio di glutammato e sulla diffusione dell'eccitamento indicano che gli effetti protettivi dell'IL-6 sulla sopravvivenza neuronale possano essere attuati mediante una diminuzione dell'attività nervosa, del rilascio di neurotrasmettitori eccitatori e della attività della MAPK/Erk.

EFFECTS OF CYTOKINES ON NEUROTRANSMITTER RELEASE FROM CENTRAL NEURONS: A FUNCTIONAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF THEIR MECHANISMS OF ACTION

F. Benfenati, V. Tancredi, G. D'Arcangelo, C. Cafè, M. D'Antuono, F. Onofri

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli studi di Roma "Tor Vergata", Roma

Neurons express interleukin receptors (ILR) coupled with intracellular kinases including MAP kinase (MAPK) and non-receptor-type tyrosine kinases (e.g. Src and Jak kinases). In the last year of the research we have further investigated the cellular and molecular biology of presynaptic MAPK substrates such as the synapsins that can be intracellular targets for the effects of cytokines and studied in detail the physiological effects of interleukin-6 (IL-6) in the rat hippocampus and cerebral cortex and how they correlate with the activation/inactivation of the intracellular signal transduction pathways.

1. Identification of a third member of the synapsin family bearing consensus sites for MAP kinase/Erk phosphorylation and potential cytokine target in the nerve terminal. A gene encoding a third member of the synapsin family of neuronal phosphoproteins, synapsin III, has been cloned and characterized. Among all three synapsins, there is high homology in domains A, C, and E, suggesting that these domains have functional significance. The variable domain between domains C and E, domain J, is basic and rich in proline and glutamine. Several conserved consensus sites for CaM kinase II and MAPK/Erk exist in domain J, with an unusually high number (10) of MAPK consensus sites. It is thus likely that synapsin III is a substrate for MAPK/Erk, and plays a role in downstream responses to the action of neurotrophins and interleukins. The tissue distribution and subcellular localization of synapsin III are similar to those of the other synapsins. Northern blot and Western blot analyses revealed that, in differentiated tissues, synapsin III expression is brain-specific. Subcellular fractionation studies also revealed that synapsin III localizes to the same fractions as synapsins Ia and IIa, with a synapsin Ia:IIa:III ratio of approximately 4:2:1. These results demonstrate that synapsin III is associated with synaptic vesicles where it co-localizes with synapsins Ia and IIa and suggest that synapsin III may play a role similar to that of synapsins I and II.

2. An inactivation of MAPK/Erk accompanies the physiological effects of IL-6 on hippocampal synaptic plasticity. IL-6 caused a dose-dependent decrease in post-tetanic potentiation (PTP) and long-term potentiation (LTP) in the CA1 region of the hippocampus that were antagonized by the tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A (LavA). Immunoblotting with phospho-specific antibodies revealed that the IL-6-induced inhibition of PTP and LTP was accompanied by a stimulation of STAT3 tyrosine phosphorylation and an inhibition of MAPK/Erk dual phosphorylation, in the absence of changes in SAPK/Jnk activation. These effects were time-dependent and effectively counteracted by LavA.

3. Effects of IL-6 on synaptic transmission and on the spread of excitation in rat neocortex. The inhibitory effects of IL-6 on the spread of excitation in rat cortical slices evaluated both as intrinsic optical signal (by using infrared videomicroscopy) and extracellular recordings were accompanied by a dose-dependent stimulation of STAT3 tyrosine phosphorylation, an inhibition of MAPK/Erk activity, a decreased phosphorylation of the presynaptic MAPK/Erk substrate synapsin I and no detectable effects on SAPK/Jnk. The effects of IL-6 were effectively counteracted by the tyrosine kinase inhibitor LavA.

The dependence of the physiological effects of IL-6 on synaptic plasticity in the CA1 region of the hippocampus and on the spread of excitation in the cerebral cortex on the activation of intracellular tyrosine kinases as well as the correlation with the inactivation of MAPK/Erk indicate that tyrosine kinases and MAPK/Erk are involved in synaptic plasticity and may represent preferential intracellular targets for the actions of IL-6 in the adult central nervous system. In addition, the inhibitory effects of IL-6 on glutamate release and on the spread of excitation in the rat cerebral cortex indicate that the protective effect of IL-6 on neuronal survival could be mediated by a down-regulation of neuronal activity, release of excitatory neurotransmitters and MAPK/Erk activity.

EFFETTI MOLECOLARI DI CITOCINE PRO-INFIAMMATORIE NELL'ENCEFALO *IN VIVO*

M. Bentivoglio, G.-Y. Kong, Z.-C. Peng

Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Facoltà di Medicina, Università di Verona

Una messe di dati ha indicato che la citochina pro-infiammatoria interferone (IFN)- γ , insieme al *tumor necrosis factor* (TNF)- α , giuoca un ruolo chiave nella sclerosi multipla (SM). Tuttavia, tali dati sono stati per lo più ottenuti *in vitro*, mentre le evidenze *in vivo* sono assai più scarse ed incerte. Abbiamo quindi studiato nell'encefalo la risposta alla somministrazione acuta di citochine mediante iniezioni stereotassiche intracerebroventricolari (icv). Abbiamo dapprima analizzato gli effetti della somministrazione icv di IFN- γ nel ratto ed abbiamo quindi studiato nel topo la risposta alla somministrazione di IFN- γ , IFN- γ +lipopolisaccaride (LPS) o +TNF- α , nel corso di una settimana, utilizzando come controlli iniezioni icv di ovalbumina. Gli esperimenti sono stati condotti in parallelo in topi *wild-type* e in topi con delezione selettiva del gene del recettore dell'IFN- γ (IFN- γ R^{-/-}). Dopo iniezione di IFN- γ , è stata evidenziata nella microglia (come documentato con esperimenti di doppia marcatura) un'induzione cospicua e selettiva di immunoreattività della nitrossido-sintasi inducibile (iNOS) in topi *wild-type*, con un picco a 24 h, nel parenchima periventricolare e nei fasci di fibre. In seguito ad iniezioni di IFN- γ +LPS e IFN- γ +TNF- α l'immunoreattività iNOS era potenziata e persisteva più a lungo. E' interessante notare che nei topi IFN- γ R^{-/-} sono state riscontrate, in seguito ai trattamenti icv, solo poche cellule iNOS-immunoreattive (ir) intorno al tramite dell'iniezione. Il numero di cellule CD4+ and CD8+ è grandemente aumentato nell'encefalo di topi *wild-type*, con un picco a 4 giorni, dopo iniezioni di IFN- γ e IFN- γ +TNF- α , con un'induzione più persistente dopo IFN- γ +LPS. Non sono state invece riscontrate, nei topi *knock out*, differenze significative nella densità di cellule CD4+ e CD8+ dopo iniezioni di IFN- γ rispetto a quelle di ovalbumina. Nell'encefalo di casi di controllo iniettati con ovalbumina sono stati riscontrati numerosi oligodendrociti maturi CNPasi-ir. Nei topi *wild-type* la densità di cellule CNPasi-positive è diminuita marcatamente dopo iniezioni icv di IFN- γ . e sono stati osservati solo pochi elementi positivi a 4 e 7 giorni. Nei topi IFN- γ R^{-/-} gli oligodendrociti CNPasi-ir sono invece rimasti numerosi nell'encefalo. In topi *wild-type*, è stato osservato un numero molto esiguo di progenitori di oligodendrociti O4-positivi 24 h dopo iniezione di ovalbumina ed è stata riscontrata una marcata immunopositività O4 in fasci di fibre. La positività O4 è molto aumentata dopo iniezioni di IFN- γ . Nel loro insieme questi ultimi risultati indicano che gli oligodendrociti maturi sono specificamente affetti dall'IFN- γ , e che tale effetto è evidente dopo pochi giorni e si accompagna ad attivazione di precursori di oligodendrociti, indicativa di fenomeni di rimielinizzazione.

Abbiamo così ottenuto *in vivo* evidenze dirette di attivazione microgliale, induzione di sintesi di nitrossido, reclutamento di cellule T, azione duratura su oligodendrociti, scatenate da IFN- γ nel liquor, documentandone il potenziamento da parte di LPS and TNF- α . E' di rilievo che la delezione del gene dell'IFN- γ R gene ha fornito un potente controllo negativo della specificità degli effetti dell'IFN- γ .

MOLECULAR EFFECTS OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES ON THE BRAIN *IN VIVO*

M. Bentivoglio, G.-Y. Kong, Z.-C. Peng

Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Facoltà di Medicina, Università di Verona

A wealth of data indicated that the pro-inflammatory cytokine interferon (IFN)- γ , in concert with tumor necrosis factor (TNF)- α , plays a key role in multiple sclerosis (MS). However, previous relevant findings were mostly obtained in cultured cells, whereas information *in vivo* is much more elusive. We investigated the brain response to a burst of cytokines exploiting stereotaxic intracerebroventricular (icv) injections. We first analyzed the effects of IFN- γ icv administration in rat, and we then studied in mice the response to administration of IFN- γ , IFN- γ +lypopolysaccharide (LPS), or +TNF- α , over one week. Icv injections of ovalbumin served as controls. The experiments were conducted in parallel in wild-type mice and in gene-manipulated mice with targeted disruption of the IFN- γ receptor gene (IFN- γ R^{-/-}). Striking and selective induction of **inducible nitric oxide synthase (iNOS)** immunoreactivity in microglia (as documented by double labeling experiments) was detected in wild-type mice after IFN- γ injection, with a peak at 24 h, in the periventricular parenchyma, including the periaqueductal gray, and in fiber tracts. Enhancement and longer persistence of iNOS immunoreactivity was detected after injections of IFN- γ +LPS and IFN- γ +TNF- α . Interestingly, only a few iNOS-immunoreactive (ir) cells, confined around the injection needle track, were seen in IFN- γ R^{-/-} mice after the icv treatments. In wild-type mice, the number of **CD4+ and CD8+** cells in the brain increased greatly, peaking at 4 days, following injections of IFN- γ and IFN- γ +TNF- α ; a more persistent induction was detected after IFN- γ +LPS injections. In knock out mice, no significant differences in the density of CD4+ and CD8+ cells were detected after IFN- γ injection in respect to ovalbumin injections. Numerous **CNPase-ir mature oligodendrocytes** were detected in the brain of control ovalbumin-injected cases. In wild-type mice the density of CNPase-positive cells decreased markedly, and very few stained elements were seen at 4 and 7 days. In IFN- γ R^{-/-} mice CNPase-ir oligodendrocytes remained instead numerous in the brain after icv IFN- γ injections. In wild-type mice, 24 h after ovalbumin injection very few **O4-positive oligodendrocyte progenitors** were seen and marked O4 immunostaining was detected in fiber bundles. O4 positivity greatly increased after IFN- γ injections. Altogether the latter results indicate that the exposure to a burst of IFN- γ specifically affects mature oligodendrocytes; this effect becomes apparent after a few days, and is paralleled by an activation of oligodendrocyte precursors, indicative of remyelination phenomena.

We thus achieved a large body of direct evidence *in vivo* on microglia activation, induction of nitric oxide synthesis, recruitment of T cells, and long-lasting action on oligodendrocytes, elicited by IFN- γ from the cerebrospinal fluid, documenting the enhancement of these effects by LPS and TNF- α . Importantly, deletion of the IFN- γ R gene provided a powerful negative control of the specificity of the effects elicited by IFN- γ .