

ZN-FINGER TRANSCRIPTION FACTORS AND THE CONTROL OF CENTRAL AND PERIPHERAL MYELINATION.

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

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

The major objectives of this project were :

1. Study the role of Krox transcription factors in the control of peripheral myelination using mutant mice and sural nerve biopsies from patients affected by peripheral neuropathies. 2. Search for new Krox genes controlling central myelination. 3. Develop new strategies of gene delivery in the CNS.

Our results are as follows :

Immunolocalization of Krox-20 and Krox-24 and analysis of transgenic mice in which one allele of either *Krox-20* or *Krox-24* has been disrupted by in-frame insertion of *lacZ* show that in the PNS *Krox-24* is expressed in proliferating and non-myelinating Schwann cells (SC) while *Krox-20* is expressed as soon as a SC receives a signal inducing differentiation to a myelinating phenotype. In the CNS *Krox-20* is never present in oligodendrocytes, but another Krox-like transcription factor which we named OK1 (Oligodendrocyte Krox 1) (see later) is activated when they begin to myelinate. A possible interpretation of the results is that two Krox transcription factors might compete with opposite regulatory effects for a common responsive element in the promoter of a down-stream gene whose expression would be directly regulating the onset of myelination. As long as *Krox-24* is expressed myelination would be repressed and the proliferation of SC or oligodendrocytes could take place while the expression of *Krox-20* or of OK1 would permit the reactivation of the myelination program.

In patients affected by acute or chronic neuropathies we observe a dramatic increase of the expression of *Krox-24* in activated Schwann cells which, in general arrest the expression of *Krox-20*. In severe cases of demyelinating peripheral neuropathies we could only detect the expression of *Krox-24* and not of *Krox-20*. In cases in which regeneration is taking place we often found coexpression of the two genes in remyelinating Schwann cells. Supernumerary Schwann cells present in the onion bulbs of patients affected by Charcot-Marie Tooth (CMT) express both transcription factors. *Krox-24* was not detected in the white matter of post-mortem brain sections of patients with normal myelination; in MS patients, however, a layer of *Krox-24* positive cells was located at the periphery of demyelination plaques. Although the staining procedure of post-mortem section did not always allow for good double staining, in at least two cases, in serial successive sections, we could stain similar cells with GalC and *Krox-24* antibodies suggesting that oligodendrocytes located at the periphery of the plaques are re-expressing *Krox-24*. This would suggest that these cells have regressed to an undifferentiated state and they might attempt to proliferate and remyelinate affected areas.

By gel retardation assay we have identified a new Krox-like transcription factor which corresponds neither to *Krox-20* nor to *Krox-24* and which is detectable prevalently in mature oligodendrocytes and much less in neonatal cells. This band is not detected in nuclear extracts from many other cell types. Interestingly, a similar band was detected in extracts of HeLa cells and CG4 cells which are both known as able to activate the JCV promoter. These results encouraged us to continue the research and identification of OK1 using the one-hybrid system approach, however, although we have analysed more than 4 million clones we were so far unable to clone the OK1 gene.

Polyethylenimine (PEI) is proving to be an efficient and versatile vector for gene delivery *in vivo*. We have shown that certain formulations of plasmid DNA with linear poly ethylenimine can produce complexes which are sufficiently small and stable in physiological fluids so as to provide high diffusibility. Intraventricular injection of PEI-complexes formulated in glucose showed the complexes to be highly diffusible in the cerebrospinal fluid of newborn and adult mice, diffusing from a single site of injection throughout the entire brain ventricular spaces. Transfection efficiency was followed by histochemistry of β -galactosidase activity and double immunocytochemistry was used to identify the cells transfected. Transgene expression was found in both neurons and glia adjacent to ventricular spaces.

Co-expressing *bcl-X_L* with *luciferase* or *LacZ* significantly increased expression of both these genes at 1 week post-injection. A remarkable aspect of PEI delivery after intra-ventricular injection is that most transfected cells are ependymal cells which are considered to be "stem cells" in the CNS. Optimisation of this approach of gene transfer could be an invaluable tool to transfer gene to pluripotent progenitor cells.

TRASDUZIONE DEL SEGNALE DA PARTE DEL TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 1 E 2 IN OLIGODENDROCITI: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FUNZIONALE

M. Levrero (a), A. Costanzo (a), A. Bernardo (b), G. Natoli (a), F. Guido (a), F. Moretti (a), V.L. Burgio (a), C. Agresti (b),

(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*

Il progetto si proponeva di indagare i meccanismi molecolari conseguenti all'attivazione dei recettori (R1 ed R2) del TNF α negli oligodendrociti di ratto, focalizzando lo studio sulle capacità di segnalazione dei trasduttori intracellulari finora conosciuti, e valutando il loro effetto biologico. I progressi compiuti nella comprensione dei meccanismi di trasduzione del segnale del TNF e la identificazione di almeno alcune delle molecole coinvolte nelle risposte citoprotettive al TNF ci hanno indotto ad eseguire una prima serie di esperimenti volti sia alla identificazione di nuove molecole coinvolte nella trasduzione del segnale che ad una migliore caratterizzazione funzionale delle varie componenti del pathway di trasduzione in sistemi cellulari già testati.

Gli effetti del TNF sulla cellula bersaglio (induzione di citotossicità vs risposte citoprotettive; attivazione del fattore trascrizionale NF κ B e induzione di numerose protein-kinasi) sono mediati da due recettori, p55TNF-R1 e p75TNF-R2, i cui domini citoplasmatici non posseggono alcuna evidente attività enzimatica ma reclutano proteine che funzionano come adattatori e/o trasduttori del segnale. TRADD agisce come "scaffold" e promuove a sua volta l'aggregazione di FADD, RIP e TRAF2. La via dipendente da FADD trasduce un segnale citotossico, mentre RIP e TRAF2 sono sufficienti e necessari per l'induzione, rispettivamente di NF κ B e delle Stress-Activated Protein Kinases (SAPK) o cJun N-terminal Kinases (JNK), non essendo invece rilevanti ai fini dell'effetto citotossico. La via di segnalazione che porta all'attivazione di NF κ B è stata ulteriormente caratterizzata con l'identificazione della "NF κ B inducing Kinase" (NIK) che interagisce con TRAF2 e con IKK α (I κ B Kinase alpha), una delle subunità del complesso catalitico attivabile da citochine definito IKK, responsabile dell'attivazione del fattore trascrizionale NF κ B attraverso la fosforilazione di I κ B α e la sua conseguente degradazione a livello proteasomiale. I meccanismi di regolazione dell'attività del complesso IKK, che comprende anche la subunità catalitica IKK β , la subunità regolatoria IKK γ e altre proteine tra cui MEKK1 sono tuttora oggetto di studio. Numerose evidenze pubblicate alla fine del 1996 hanno infine identificato in NF κ B il principale fattore coinvolto nella risposta citoprotettiva seguente alla stimolazione con TNF.

Abbiamo quindi analizzato le proprietà segnalatorie di NIK, studiando in particolare il suo ruolo nella attivazione TNF-mediata delle chinasi JNK/SAPK e p38, utilizzando mutanti puntiformi e di delezione della molecola (Natoli 1997). In secondo luogo abbiamo generato una serie di mutanti dominanti negativi in grado di interferire con la segnalazione del TNF α a diversi livelli e ne abbiamo valutato gli effetti sulla segnalazione e sulla citotossicità del TNF α (Natoli 1998). Abbiamo anche caratterizzato, con approccio biochimico e genetico, le proprietà della proteina Zn-finger A20, la cui espressione è indotta dal TNF α attraverso l'attivazione di NF κ B, di modulare negativamente ed in modo selettivo l'attività del complesso IKK contribuendo così alla estinzione delle risposte (Natoli 1998). Abbiamo potuto identificare nei quattro Zn-finger carbossiterminali il dominio necessario alla sua attività regolatoria e, mediante multimerizzazione dell'ultimo Zn-finger, disegnare un potente inibitore delle risposte NF κ B mediate (Natoli 1998). Nell'ambito del nostro sforzo di caratterizzazione del *TNF signaling* e della sua regolazione abbiamo anche identificato, mediante screening genetico in lieviti, e caratterizzato una nuova proteina, c-E10, contenente un dominio CARD (caspase recruiting domain), coinvolta positivamente nel signaling del TNF-R1 verso il complesso IKK (Costanzo

1999). L'applicazione delle conoscenze acquisite ci hanno permesso di analizzare il ruolo relativo che i differenti componenti della via di segnalazione del TNF hanno nella apoptosi e nella attivazione di NFkB TNF-mediata in oligodendrociti primari di ratto. A tal fine abbiamo messo a punto un sistema che permette di sovraesprimere queste molecole negli oligodendrociti mediante l'infezione delle cellule con retrovirus ricombinanti e di monitorarne gli effetti biologici prima e dopo la stimolazione con TNF α (Natoli 1998). I dati ottenuti indicano che: a) gli oligodendrociti primari di ratto sono, almeno nelle condizioni di coltura standard, resistenti all'apoptosi da TNF α , anche dopo induzione del TNF-R1 mediata dall'IFN γ ; b) interferendo nel signaling del TNF α mediante l'infezione con retrovirus ricombinanti a livello della molecola TRAF2, si ha una forte sensibilizzazione all'apoptosi di cellule normalmente resistenti, maggiore di quella ottenibile mediante blocco di NFkB (Natoli 1998); c) la sovraespressione di TRAF2 wt risulta in una evidente citoprotezione. L'utilizzazione di questo approccio e al sua estensione ad altre cellule primarie, quali le cellule microgliali, permetterà di caratterizzare e successivamente di modulare le risposte al TNF α nel quadro delle patologie demielinizzanti.

TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 1 E 2 SIGNALING IN OLIGODENDROCYTES: MOLECULAR AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION

M. Levrero (a), A. Costanzo (a), A. Bernardo (b), G. Natoli (a), F. Guido (a), F. Moretti (a), V.L. Burgio (a), C. Agresti (b),

(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*

The aim of the project was to characterize at molecular level the mechanisms of TNF-R1 and TNF-R2 signal transduction in primary rat oligodendrocytes, focusing on signaling capacities of known TNF intracellular signal transducers, and to evaluate their biological effects. The advances in the comprehension of TNF α signal transduction and the identification of at least some of the molecules involved in cytoprotective responses to TNF led us to perform a first set of experiments aimed both to the identification of new molecules involved in TNF signaling and to a better functional characterization of TNF-R1 signaling pathways in already tested cellular systems.

The effects of TNF on target cells (cytotoxicity and apoptosis vs cytoprotective responses; activation of the transcription factor NF κ B and activation of many intracellular protein kinase pathways) are mediated by two distinct receptors, p55TNF-R1 and p75TNF-R2 whose cytoplasmic domains do not possess enzymatic activities but recruit proteins acting as adaptors and signal transducers. TRADD acts as a molecular scaffold that catalyzes the aggregation of the distal signal transducers FADD, RIP and TRAF2. While FADD is required for apoptotic signal transduction, RIP and TRAF2 are both sufficient and necessary for the activation, respectively, of NF κ B and the Stress-Activated Protein Kinase (SAPK) or cJun N-terminal kinase (JNK), but not for commitment to apoptosis. The pathway leading to NF κ B activation has been further elucidated by cloning of the NF κ B-Inducing Kinase (NIK), a TRAF2-associated protein-kinase that mediates NF κ B induction and interacts with IKK α (I κ B Kinases alpha), one subunit of the cytokines-activated catalytic complex named IKK that phosphorylates and targets I κ B α to proteosomal degradation, thus leading to NF κ B activation. The mechanisms that regulate the activity of the IKK complex, which also comprises the catalytic subunit IKK β , the regulatory subunit IKK γ and other proteins including MEKK1, are still under investigation. Furthermore, some of the aspects of cellular resistance to TNF-mediated apoptosis have been elucidated with the identification of transcription factor NF κ B as an important component of the cytoprotective response to TNF.

First, we have investigated the signaling properties of NF κ B-Inducing Kinase (NIK), and its role in TNF mediated JNK/SAPK and p38 activation by over-expression of point and deletion mutants of the molecule (Natoli 1997). Secondly, we generated a series of dominant negative mutants of TNF transducers able to interfere with TNF α signal transduction at various level and tested them in their ability to influence TNF α mediated apoptosis (Natoli 1998). We have also characterized, with a combined biochemical and genetic approach, the properties of the Zn-finger protein A20, whose expression is induced by TNF α through the activation of NF κ B, to selectively downregulate the IKK complex, thus leading to the extinction of the response (Natoli 1998). We have identified in the last four carboxyterminal Zn-fingers of A20 the domain required for its regulatory activity and, by multimerization of the last Zn-finger, we designed a potent inhibitor of NF κ B-mediated responses (Natoli 1998). In the frame of our continuous effort to characterize the TNF signaling we have also identified, by genetic screening in the yeast, and

characterized c-E10, a new CARD (caspase recruiting domain) protein that act as an additional adaptor in the TNF-induced activation of the IKK complex (Costanzo 1999).

The application of this new information allowed us to analyze the relative contribution of different components of TNF signal transduction in TNF cytotoxicity in primary rat oligodendrocytes. For this purpose we infected oligodendrocytes with recombinant retroviruses expressing wild type or dominant negative mutants of TNF signal transducers and tested their biological effects after TNF stimulation (Natoli *et al.* 1998). The results we obtained indicate that: a) primary rat oligodendrocytes are resistant to TNF α mediated apoptosis under standard culture conditions, even after IFN γ -mediated TNF-R1 upregulation; b) in oligodendrocytes the interference with TNF signal transduction at TRAF2 level strongly sensitize these cells to apoptosis (Natoli 1998); c) over-expression of TRAF2 wt results in an evident cytoprotection. By extending this approach it will be possible to further characterize responses in both oligodendrocytes and microglial cells, to evaluate their effects in experimentally induced demyelinating diseases and to design in the future strategies for interfering with TNF responses *in vivo*.

RUOLO DELLE PROTEASI NELLA INDUZIONE E NELLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA

G.M. Liuzzi (a), M.P. Santacroce (a), A. Fasano (a), M. Trojano (b), C. Avolio (b), G. De Fazio (b), P. Livrea (b), P. Riccio (c)

(a) Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli studi di Bari

(b) Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Università degli studi di Bari

(c) Dipartimento di Biologia, D.B.A.F., Università della Basilicata, Potenza.

Abbiamo indagato sul coinvolgimento delle proteasi nel processo di distruzione della barriera ematoencefalica (BBB) e nella successiva demielinizzazione.

Nell'ipotesi che in corso di MS l'attività delle gelatinasi possa aumentare in relazione allo stadio clinico della malattia sono stati determinati, mediante zimografia, i livelli sierici della gelatinasi B (MMP-9) in 19 pazienti con RR-MS attiva, 42 con RR-MS inattiva, 20 con malattie neurologiche infiammatorie (IND), 13 con malattie neurologiche non infiammatorie (NIND) e 17 donatori sani (HD). Un incremento dei livelli di MMP-9 è stato determinato sia nei sieri dei pazienti con RR-MS attiva ($1,495 \pm 0,1$) che in quelli dei pazienti con RR-MS inattiva ($1,019 \pm 0,072$) in confronto con IND ($0,975 \pm 0,114$), NIND ($0,306 \pm 0,042$) e HD ($0,337 \pm 0,06$). I livelli di MMP-9 aumentavano significativamente nei pazienti con RR-MS attiva rispetto a quelli con RR-MS inattiva. Tale risultato suggerisce che nella MS i livelli di MMP-9 potrebbero essere correlati con l'attività clinica della malattia e che l'aumento della MMP-9 potrebbe contribuire alla patogenesi dell'MS, facilitando la migrazione dei linfociti T attraverso la BBB. Una ulteriore conferma del possibile coinvolgimento della MMP-9 nella induzione dell'MS scaturisce anche dalla significativa riduzione dei livelli di MMP-9 nei sieri prelevati per 24 mesi da 36 pazienti RR-MS trattati con rIFN β -1b. I livelli di MMP-9 correlavano con il miglioramento dei parametri clinici, con l'attività della malattia evidenziata dall'MRI e con la produzione di anticorpi neutralizzanti l'rIFN β -1b (NABs). Tali risultati suggeriscono che i benefici clinici del trattamento con rIFN β -1b possano essere in parte dovuti alla capacità del farmaco di ridurre l'infiltrazione dei linfociti T nel CNS interferendo con la produzione di MMP-9.

Al fine di valutare l'origine delle proteasi precedentemente identificate nel CSF dei pazienti MS, i sovrinatanti colturali da microglia ed astrociti (1×10^5 cellule/pozzetto) attivati *in vitro* con IL-1 (10U/ml), LPS (10 ng/ml) e IFN γ (200ng/ml) venivano incubati per 24h con la MBP o analizzati mediante zimografia. Cellule gliali attivate con acetato di forbolmiristato (PMA) e concanavalina A (Con A), o non attivate venivano utilizzate rispettivamente come controllo positivo e negativo. L'attività della MMP-9 aumentava nei sovrinatanti da microglia attivata con PMA, Con A, LPS e IFN γ . Non si osservava invece alcun incremento dei livelli di MMP-9 nei sovrinatanti da microglia attivata con IL-1. Nei sovrinatanti da astrociti attivati con IL-1 si osservava solo un modesto incremento dell'attività della MMP-9 mentre nessuna attività veniva rilevata nei sovrinatanti da astrociti e microglia non attivati. Un'attività proteolitica in grado di degradare la MBP veniva rilevata, mediante SDS-gel elettroforesi, nei sovrinatanti da microglia attivata con LPS ma non nei sovrinatanti da microglia non attivata.

Nell'ipotesi che le proteasi anti-mielina presenti nel liquor possano essere rilasciate anche dalle cellule endoteliali, sovrinatanti di cellule endoteliali di capillari cerebrali di ratto (1×10^5 cellule/pozzetto) dopo 4, 8 e 24h di attivazione con TNF- α venivano incubate per 24h con MBP purificata ed analizzati mediante SDS-gel elettroforesi. Sovrinatanti da cellule endoteliali non attivate venivano utilizzati come controllo. I risultati ottenuti evidenziavano la presenza di attività anti-MBP nei sovrinatanti di cellule attivate per 24 h con TNF- α , ma non nei sovrinatanti di cellule non attivate o di quelle attivate per 4 e 8h.

In conclusione i nostri risultati mostrano che proteasi diverse sono coinvolte nei processi di distruzione della BBB e nella demielinizzazione in corso di MS.

ROLE OF PROTEASES IN THE INDUCTION AND PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

G.M. Liuzzi (a), M.P. Santacroce (a), A. Fasano (a), M. Trojano (b), C. Avolio (b), G. De Fazio (b), P. Livrea (b), P. Riccio (c)

(a) *Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli studi di Bari*

(b) *Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Università degli studi di Bari*

(c) *Dipartimento di Biologia, D.B.A.F., Università della Basilicata, Potenza.*

Aim of this study was to establish the involvement of proteases both in the disruption of the blood brain barrier (BBB) and in demyelination.

In the hypothesis that during MS gelatinase activity could be increased in relation to the disease stage gelatinase B (MMP-9) levels were measured by zymography in serum samples from 19 clinically active and 42 clinically inactive RR-MS patients, 20 patients with inflammatory neurological diseases (IND), 13 patients with non-inflammatory neurological diseases (NIND) and 17 healthy donors (HD). Elevated levels of MMP-9 were detected in samples from both RR-MS active ($1,495 \pm 0,1$) and RR-MS inactive ($1,019 \pm 0,072$) patients when compared with IND ($0,975 \pm 0,114$), NIND ($0,806 \pm 0,042$) and HD ($0,337 \pm 0,06$). Levels of MMP-9 significantly increased in samples from active RR-MS in comparison with inactive RR-MS. This result suggests that MMP-9 levels in MS could be related with clinical disease activity and that MMP-9 elevation could contribute to MS pathogenesis facilitating T-cell migration across the blood brain barrier.

A confirm of the possible involvement of MMP-9 in the mechanisms of lymphocyte migration through BBB comes from the significant decrease of MMP-9 serum levels measured by zymography in 36 RR MS patients treated with rIFN β -1b during a 24 months follow-up. Levels of MMP-9 correlated with the improvement of clinical signs, MRI disease activity and neutralizing anti-rIFN β -1b antibody (NAB) production. This result can suggest that the clinical benefit of IFN-beta-1b treatment in MS patients may be in part a result of the ability of this drug to significantly reduce T-lymphocyte infiltration into the CNS by interfering with the production of MMP-9.

To establish the origin of anti-myelin proteases and MMP-9 activity previously identified in the CSF of MS patients, the supernatants collected from primary microglia and astrocytes (1×10^5 cells/well in 96 well plate) after 24 h *in vitro* activation with IL-1 (10U/ml), LPS (10 ng/ml), and IFN- γ (200 ng/ml) were incubated for 24 h with MBP or analyzed by zymography. As positive control, glial cells were activated with phorbol myristate acetate (PMA) and concanavalin A. Culture supernatants from non-activated glial cells were used as negative control. As a result, the activity of MMP-9 was increased in microglial cells after activation with PMA, Con A, LPS and IFN- γ . No increase of MMP-9 levels were observed in supernatants from microglia activated with IL-1. Only a slight increase of MMP-9 was observed after activation of astrocytes with IL-1. No activity of MMP-9 was observed in supernatants from both non-activated microglia and astrocytes. As assessed by SDS-gel electrophoresis, a MBP-degrading activity was found in the supernatants collected after 24 h of incubation from LPS activated microglia, but not into the supernatants from non-activated cells. In the hypothesis that the anti-myelin protease present into the CSF could also originate from endothelial cells, supernatants from rat brain microvascular endothelial cells (1×10^5 cells/well in 96 well plate) after 4, 8 and 24 h of activation with TNF- α were incubated for 24 h with purified MBP and analyzed by SDS-gel electrophoresis. Culture supernatants from non-activated endothelial cells were used as control. Results obtained indicate the presence of MBP-degrading activity into the supernatants collected after 24 h of incubation from TNF- α activated cells, but not into the supernatants from either non-activated cells or from cells activated for 4 and 8 h.

In conclusion, our results clearly show that different enzymes are involved in the processes of both blood brain barrier breakdown and demyelination in course of MS.

ESTROGENI E GLIA: ATTIVAZIONE DEL RECETTORE DEGLI ESTROGENI IN CELLULE GLIALI

A. Maggi, E. Vegeto

Laboratorio di Farmacologia Molecolare MPL, Università degli studi di Milano

Sulla base di numerose evidenze sia cliniche che sperimentali che hanno proposto un ruolo benefico dell'estrogeno nella manifestazione della sclerosi multipla (MS), abbiamo proposto di studiare l'attività degli ormoni steroidei femminili su cellule di tipo macrofagico, come la microglia, che giocano un ruolo importante nel processo infiammatorio associato alla MS. Nel secondo anno del programma di ricerca abbiamo valutato se l'estrogeno e il progesterone modulano l'espressione della metalloproteinasi-9 della matrice extracellulare (MMP-9) e della proteina pro-apoptotica Nip-2. La sovraespressione di MMP-9 è presente nella MS ed è stata correlata con la distruzione della barriera emato-encefalica e con l'influsso di cellule mononucleate che contribuiscono alla distruzione incontrollata della matrice extracellulare. La nostra ipotesi di lavoro prevede che gli effetti benefici degli ormoni steroidei femminili nella MS siano mediati, fra gli altri effetti, dal controllo dell'espressione della MMP-9 nella microglia. Dapprima abbiamo analizzato i livelli di mRNA della MMP9 per mezzo di un'analisi Northern su cellule U937 e macrofagi primari trattati con ormoni e altri fattori, come TNF α e IL1 β , i quali modulano l'espressione di questo enzima. Abbiamo osservato che sia l'estrogeno che il progesterone riducono i livelli di MMP-9 in modo dose-dipendente; inoltre, questi ormoni potenziano l'effetto inibitorio del TNF- α e dell'IL1- β sui livelli di mRNA di MMP9 in cellule U937. Mediante il saggio di trasfezione transiente, usando il promotore umano di MMP9 unito al gene CAT ed il vettore di espressione per l'isoforma- α del recettore degli estrogeni (ER- α) abbiamo confermato l'azione inibitoria dell'estrogeno sulla trascrizione della MMP-9, effetto che contrasta il forte aumento mediato invece dal forbolo-miristato acetato (PMA). È interessante notare che l'estrogeno ha un effetto differente a seconda dell'isoforma recettoriale con cui interagisce: infatti, utilizzando l'ER- β l'estrogeno induce la trascrizione del promotore della MMP-9 e potenzia l'attività positiva del PMA. Questi risultati suggeriscono che l'estrogeno può modulare, in modo positivo o negativo, a seconda del recettore utilizzato, la trascrizione di MMP-9 ed interferire con molecole che hanno come bersaglio nel processo infiammatorio proprio MMP-9. Nip-2 è una proteina coinvolta nel processo apoptotico di cellule neuronali. L'inibizione estrogeno-dipendente dell'espressione di Nip-2 è stata dimostrata in questo laboratorio ed è stata correlata con la concomitante protezione dal fenomeno apoptotico indotto su cellule neuronali. Una regolazione errata del processo apoptotico è stata da lungo tempo associata con l'inizio e la progressione di patologie del sistema immunitario. Come abbiamo dimostrato nel corso del primo anno, estrogeno e progesterone prevengono, anche se solo parzialmente, l'apoptosi di cellule U937 indotta da TNF- α ; come conseguenza, abbiamo studiato se questi ormoni potessero alterare il programma apoptotico modulando l'espressione del gene Nip2 in cellule di tipo macrofagico. Usando l'analisi di Northern abbiamo dimostrato che l'estrogeno può ridurre i livelli di mRNA di Nip2 circa del 25% in cellule U937. Una bassa dose di LDL ossidate (oxLDL, 2 μ g/ml), lipidi che provocano apoptosi, promuove l'espressione sia di MMP9 che Nip2 in macrofagi primari. Questo effetto è parzialmente inibito dall'estrogeno e completamente bloccato dal progesterone, entrambi a concentrazioni nanomolari. In esperimenti preliminari abbiamo osservato che l'estrogeno blocca il potenziale apoptotico delle oxLDL in macrofagi primari; il controllo trascrizionale della MMP9 e di Nip2 potrebbe essere davvero uno dei meccanismi molecolari dell'azione dell'ormone in questo processo anche in cellule di tipo macrofagico. In conclusione, i risultati ottenuti dal nostro gruppo portano alle seguenti conclusioni: 1) le proteine recettoriali per estrogeno e progesterone sono espresse nella microglia di ratto, nei macrofagi derivati dai monociti e nelle linee cellulari di monoblasti; 2) in potenziale anti-infiammatorio degli ormoni steroidei femminili in queste cellule potrebbe essere esercitato dalla modulazione dell'espressione di proteine pro-infiammatorie o di fattori coinvolti nell'apoptosi; 3) abbiamo identificato un gene (Nip2) la cui espressione potrebbe essere coinvolta negli effetti anti-apoptotici degli ormoni femminili nei macrofagi. Questi risultati rafforzano l'ipotesi per cui gli ormoni steroidei femminili partecipano al processo infiammatorio mediante la modulazione dell'attività delle cellule macrofagiche.

ESTROGEN AND GLIA: ESTROGEN RECEPTOR ACTIVATION IN GLIAL CELLS.

A. Maggi, E. Vegeto

Laboratorio di Farmacologia Molecolare MPL, Università degli studi di Milano

Many clinical and experimental lines of evidence have suggested a beneficial role for estrogen in the manifestation of multiple sclerosis (MS), as physiological changes of this hormone (as it occurs during menstrual cycle, pregnancy and post-partum) positively affect the onset and symptoms of MS; in addition, estrogen has been shown to play a protective role against inflammatory or autoimmune reactions in experimental models of neural and glial cells. We proposed to study the activity of female steroid hormones on macrophage-like cells, including microglial cells, which play an important role in the inflammatory process of MS. In the second year of the research program we have investigated whether estrogen and progesterone modulate the expression of the matrix-metalloproteinases-9 (MMP-9) and the pro-apoptotic protein Nip-2. Over-expression of MMP-9 is prevalent in inflammatory processes and in MS it has been correlated with the disruption of the blood-brain barrier and for the influx of mononuclear cells that contribute to the uncontrolled extra-cellular matrix destruction. We hypothesized that the beneficial effects of female steroid hormones in MS might be mediated by the control of MMP-9 expression of microglia. We first analyzed the levels of MMP-9 mRNA by Northern blot analysis on U937 cells and primary macrophages treated with hormone and other factors, such as TNF- α and IL-1 β , known to modulate MMP-9 expression. We observed that both estrogen and progesterone reduce the levels of MMP-9 in a concentration-dependent manner; in addition, estrogen and progesterone further potentiate the inhibitory effect of TNF- α and IL-1 β on MMP-9 mRNA levels in U937 cells. By transient transfection assay, using the human MMP-9 promoter linked to the CAT reporter gene and the expression vector coding for the estrogen receptor alfa (ER- α) isoform, we confirmed that estrogen down-regulates MMP-9 transcription and that this effect counteracts the strong increase mediated by phorbol-myristate acetate (PMA). Interestingly, we could prove that in this experimental assay, estrogen has a different effect depending on which ER isoform was expressed: in fact, when the ER- β isoform was assayed we observed that estrogen can induce MMP-9 promoter transcription and trigger the PMA positive activity. These results suggest that estrogen can modulate MMP-9 transcription and interfere with molecules that target MMP-9 in the inflammatory process. We then analyzed the hormonal regulation of Nip-2, a protein involved in the apoptotic process of neural cells. Estrogen-dependent inhibition of Nip-2 expression has been demonstrated in this laboratory and it has been correlated with the concomitant differentiation of neural cells induced by the hormone. Defective apoptosis has since long been associated with the onset and progression of immune-associated diseases. As we have demonstrated in the first year of this MS research program that estrogen and progesterone partially prevent apoptosis of U937 cells induced by TNF- α , we tested whether these hormones could alter the apoptotic program by modulating Nip-2 gene expression in macrophage-like cells. Using northern blot analysis we demonstrate that estrogen can reduce Nip-2 mRNA levels by 25% in U937 cells. A low dose of the pro-apoptotic oxidized LDL (2 μ g/ml), induced both MMP-9 and Nip-2 mRNA in primary macrophages; interestingly, this effect was partially inhibited by estrogen and completely blocked by progesterone; both hormones were used at nanomolar concentrations. In preliminary experiments we have observed that estrogen blocks oxLDL apoptotic potential in primary macrophages: MMP-9 and Nip-2 transcriptional control might indeed be one of the mechanisms of hormone action. In conclusion, we have been able to demonstrate that female steroid hormones can participate the inflammatory process driven by macrophage-like cells. The results obtained by our group during the research program sponsored by the Istituto Superiore di Sanità lead to the following conclusions: 1) specific receptor proteins for estrogen and progesterone are expressed in human macrophage-like cells, i.e. primary microglial cells, monocytes-derived macrophages and monoblast cell lines; 2) an anti-inflammatory potential of female steroid hormones in these cells might be exerted by modulating the expression of pro-inflammatory factors and proteins involved in apoptosis; a weak activity is observed when the hormones are tested alone, but their influence for example on MMP-9 regulation becomes significant when the hormones are challenged with stimulatory or inhibitory signals. Astroglial cells express the ER, as demonstrated previously in our laboratory, however, estrogen does not prevent apoptosis of rat astroglial primary cell cultures induced by 2-chloroadenosine; 3) we identified a gene (Nip-2) whose expression might be involved in the anti-apoptotic effects of the female hormones in macrophages.

CARATTERIZZAZIONE DELLA RISPOSTA ANTICORPALE NEL LIQUOR CEREBROSPINALE DI PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA

M. Colombo (a), M. Dono (a), P. Gazzola (b), S. Roncella (a), M. Ferrarini (a), G.L. Mancardi (b)

(a) Servizio di Immunologia Clinica, Ist. Nazionale per la Ricerca sul Cancro, IST, Genova

(b) Dip. di Scienze Neurologiche e di Neuroriabilitazione, Università degli studi di Genova

Scopo della presente ricerca e' quello di analizzare il repertorio dei geni delle catene V_H delle cellule B nel liquor cerebrospinale (CSF) e nel sangue di pazienti affetti da sclerosi multipla (MS), utilizzando tecniche di PCR in 10 casi di SM definite sul piano del decorso clinico e degli esami di laboratorio e in 10 altri pazienti affetti da altre malattie neurologiche (OND). Negli anni precedenti lo studio ha evidenziato che le cellule B nel CSF di pazienti affetti da SM sono espanse in maniera oligoclonale, senza un utilizzo preferenziale di alcune famiglie V_H, mentre nel sangue degli stessi pazienti la risposta B era policlonale. I trascritti dei geni V_H sono spesso associati all'isotipo IgG e le cellule B del liquor sono secernenti, in quanto siamo riusciti ad amplificare le IgG utilizzando primers specifici per la porzione secretoria delle immunoglobuline. Un accumulo oligoclonale di cellule B e' stato evidenziato solo in 3/10 casi di OND. Interessante e' che tali casi erano encefaliti virali o una radiculite post-infettiva.

Nell'ultimo anno, in due casi di MS, abbiamo sequenziato i trascritti dei geni V_H3 e V_H4. L'analisi delle sequenze V(D)J nel CSF di tali casi di MS ha permesso di evidenziare che i geni V_H3 e V_H4 erano estensivamente mutati rispetto alla sequenza "germline". Inoltre una sostanziale proporzione di cloni analizzati aveva la stessa sequenza HCDR3 e gli stessi geni V_H anche se avevano un diverso numero e una diversa posizione delle mutazioni puntiformi. Tale reperto e' indicativo di un attivo processo di "diversificazione intraclonale". Utilizzando una PCR specifica per il gene V_H3 e' stato possibile evidenziare un grande numero di sequenze correlate, permettendo quindi di disegnare alberi genealogici indicativi di un processo di diversità intraclonale fra cloni generati da uno stesso progenitore. L'analisi della regione V(D)J da un paziente con accumulo oligoclonale di cellule B nel CSF e meningite virale ha permesso di evidenziare numerose mutazioni puntiformi a carico dei geni V_H3. Tuttavia, in tale caso, non e' stato evidenziato un processo di "diversificazione intraclonale".

Metodiche di PCR sono state utilizzate per evidenziare nel sangue degli stessi pazienti i segmenti V(D)J evidenziati nel CSF. Solo in 1/3 dei casi tali sequenze sono state riscontrate anche nel sangue, dimostrando che tali sequenze sono molto meno rappresentate nel sangue rispetto al CSF. Tutti questi dati suggeriscono che nella MS il liquor e' un compartimento ove l'espansione, la differenziazione e la maturazione cellulare B e' mantenuta in loco da una continua stimolazione antigenica.

CHARACTERIZATION OF THE HUMORAL ANTIBODY RESPONSE IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS.

M. Colombo (a), M. Dono (a), P. Gazzola (b), S. Roncella (a), M. Ferrarini (a), G.L. Mancardi (b)

(a) *Servizio di Immunologia Clinica, Ist. Nazionale per la Ricerca sul Cancro, IST, Genova*

(b) *Dip. di Scienze Neurologiche e di Neuroriabilitazione, Università degli studi di Genova*

The study was designed to analyze the Ig V_H gene repertoire of B cells in the cerebrospinal fluid (CSF) and peripheral blood of multiple sclerosis (MS) patients using PCR technologies in 10 clinically and laboratory definite MS cases and 10 patients with other neurological disorders (OND). The study in the previous years showed that in MS B cells in the CSF were oligoclonally expanded with no preferential usage of certain V_H families, while the B cell response in the PBL of the same patients was polyclonal. These V_H gene transcripts were often associated with a IgG isotype and the B cells in the CSF were secreting cells, since we could amplify the IgG secretory using a primer specific for the secretory piece of the IgG. Oligoclonal B cell accumulations were found only in 3/10 of the patients with OND. Notably these OND patients had viral encephalitis or post-infection radiculitis.

In the last year, in two MS cases, we have sequenced the V_H3 and V_H4 of IgG transcripts. Analyses of the Ig V(D)J sequences on the CSF from MS patients disclosed that V_H3 and V_H4 genes were extensively mutated compared to germline sequences. Moreover, a substantial proportion of the molecular clones analyzed shared the same HCDR3 and the same V_H genes albeit with different number and location of point mutations, thus indicating an ongoing process of intraclonal diversification. A larger number of clonally-related V_H sequences could be obtained by using a V_H3 gene specific PCR so that genealogical trees depicting the process of diversification could be drawn. Analyses of the Ig V(D)J from the CSF of a patient with viral meningitis and oligoclonal B cell accumulations revealed that V_H3 genes were extensively mutated. However, no intraclonal diversification could be observed even using V_H3 gene specific PCR methodologies.

Clone-specific PCR and sequencing was used to detect the V(D)J gene segment found in the CSF of one MS patient in the PBL of the same patient. Only 1/3 of the V(D)J sequences investigated could be demonstrated in the PBL indicating that the V(D)J genes utilized by B cells in the CSF are much less represented in the PBL. Collectively, the data suggest that in MS there is a compartmentalized clonal expansion. B cell differentiation and maturation is driven and maintained by antigens in the CNS.

CASPASI-1 E' COINVOLTA NEL PROCESSO DI DEMIELINIZZAZIONE IMMUNOMEDIATA

G. Martino

Unità di Neuroimmunoterapia Sperimentale, Dip. di Neurologia, Istituto Scientifico San Raffaele - DIBIT, Milano

Caspasi-1 è stata indicata come un fattore cruciale nell'attivazione proteolitica e nel rilascio di citochine proinfiammatorie quali interleuchina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18 fattore di necrosi tumorale (TNF) α e interferone (IFN) γ . La sclerosi multipla (SM) ed il suo modello animale, l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAS), sono malattie infiammatorie demie-linizzanti del sistema nervoso centrale (SNC). Abbiamo studiato **(a)** il ruolo di caspasi-1 nell'induzione e nella fase effettrice dell'EAS murina e **(b)** il ruolo di caspasi-1 come possibile marker di attività di malattia in pazienti con SM. **(a)** Abbiamo rilevato che i livelli di caspasi-1 sono fortemente elevati (otto volte rispetto al basale) in topi C57BL/6 in cui era stata indotta EAS mediante immunizzazione con il peptide 40-55 della glicoproteina oligodendrocitaria della mielina (MOG). Le fluttuazioni dei livelli di mRNA di caspasi-1 correlano con il decorso clinico della malattia e con la trascrizione di altre citochine proinfiammatorie come IL-1 β , IL-6, TNF α e IFN γ , come rilevato mediante RT-PCR semiquantitativa. Abbiamo quindi studiato la suscettibilità di topi caspasi-1^{-/-} all'induzione di EAS con peptidi di MOG, dimostrando che l'incidenza di malattia è dipendente dalla quantità e dalla immunogenicità dell'antigene usato: i topi caspasi-1^{-/-} sono resistenti all'induzione di EAS con basse dosi di MOG40-55, protocollo al quale i topi di controllo C57BL/6 sono totalmente suscettibili. Abbiamo anche dimostrato che le cellule T caspasi-1^{-/-} rispondono normalmente all'antigene encefalitogenico in un saggio di proliferazione antigene-specifico ma producono meno IFN γ delle cellule T derivate dal ceppo di controllo. Abbiamo quindi eseguito studi di inibizione farmacologica impiantando pompe osmotiche intraperitoneali che rilasciavano per circa dieci giorni Z-Val-Ala-DI-Asp-FMK, un inibitore specifico di caspasi-1. L'incidenza di EAS è risultata drammaticamente ridotta (60% di animali protetti) quando la pompa intraperitoneale è stata impiantata un giorno prima dell'immunizzazione. Al contrario, non abbiamo riscontrato differenze tra topi trattati con l'inibitore e controlli, quando la somministrazione dell'inibitore è stata iniziata sette giorni dopo l'immunizzazione. L'esame neuropatologico ha rilevato negli animali trattati una riduzione della demielinizzazione e del danno assonale. **(b)** Abbiamo misurato, ogni 15 giorni per un anno, i livelli di mRNA di caspasi-1 in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di otto pazienti con SM ricorrente remittente e ne abbiamo correlato le fluttuazioni con l'andamento clinico e i dati di risonanza magnetica (RMN). L'mRNA di caspasi-1 è risultata misurabile in tutti i 169 campioni di pazienti SM testati e ad andamento fluttuante in tutti i pazienti. I livelli di mRNA di caspasi-1 oscillano nei pazienti tra 0,17 e 88,03 AU. La media (\pm SE) è risultata 12,67 AU (\pm 1,30), significativamente più alta di quella rilevata nei donatori sani ($p < 0,001$) e risultante dalla media misurata nei donatori sani (\pm 3SD). La correlazione tra le fluttuazioni di caspasi-1 e gli attacchi clinici è stata calcolata su dati ottenuti nel mese precedente una ricaduta e nella settimana seguente. Nei pazienti SM un aumento di due volte dei livelli di mRNA di caspasi-1 è stata rilevato nella settimana precedente una ricaduta clinica ($p = 0,05$), con tendenza a ritornare a livelli basali la settimana seguente. Abbiamo anche rilevato una correlazione statisticamente significativa tra il numero di nuove lesioni di RM captanti gadolinio nel cervello e i livelli di mRNA di caspasi-1 ($r = 0,67$; $p = 0,01$). Tuttavia, quando abbiamo correlato i livelli di mRNA di caspasi-1 con il numero di lesioni RM captanti il gadolinio persistenti dallo scan precedente, non abbiamo trovato alcuna significatività ($r = 0,10$; $p = 0,49$). I nostri risultati suggeriscono un ruolo cruciale di caspasi-1 nel processo patogenetico sottostante la demielinizzazione immunomediata sperimentale e umana e indicano come caspasi-1 possa rappresentare un possibile indice periferico di infiammazione del SNC nella SM.

CASPASE-1 IS CRITICALLY INVOLVED IN EXPERIMENTAL AND HUMAN IMMUNE-MEDIATED DEMYELINATION

G. Martino

Unità di Neuroimmunoterapia Sperimentale, Dip. di Neurologia, Istituto Scientifico San Raffaele - DIBIT, Milano

Caspase-1 has been shown to play a crucial role in the proteolytic activation and release of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-18, tumor necrosis factor (TNF) α and interferon (IFN) γ . Multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) are inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system (CNS). We studied **(a)** the role of caspase-1 in the induction and effector phase of EAE in mice and **(b)** the role of caspase-1 as a possible surrogate marker of disease activity in MS patients. **(a)** Caspase-1 levels are strongly elevated (8-fold increase) in C57BL/6 mice in which EAE was induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-peptide 40-55. Fluctuations of caspase-1 mRNA levels positively correlated with EAE clinical course and with the transcription rate of IL-1 α , IL-6, TNF α , IFN γ . Caspase-1^{-/-} mice are resistant to EAE induction by low doses of MOG40-55 compared to wild type C57BL/6 which are fully susceptible to the same immunization protocol. Caspase-1^{-/-} T-cells are able to respond normally to encephalitogenic antigens in an antigen-specific proliferation assay but produce less IFN γ . Intraperitoneal release before immunization of the pharmacological inhibitor of caspase-1 Z-Val-Ala-Dl-Asp-FMK for about 10 days reduced dramatically EAE incidence (60% disease-free animals). Intraperitoneal release of the inhibitor on day seven post-immunization did not produce any effect. Neuropathological examination revealed decreased myelin and axonal damage and a reduced number of infiltrating macrophages. **(b)** We measured caspase-1 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 8 patients with relapsing-remitting MS every 15 days over a one-year period and compared its fluctuations with clinical and magnetic resonance imaging (MRI) evidence of disease activity. Caspase-1 mRNA levels were measurable in all the 169 MS samples tested and tended to fluctuate over time in all the MS patients. The levels of caspase-1 mRNA ranged between 0.17 to 88.03 AU. The calculated mean (\pm SE) was 12.67 AU (\pm 1.30). The mean was significantly higher than that found in healthy donors ($p < 0.001$) which originated from the mean value measured in healthy donors ($\pm 3SD$). The relationship between caspase-1 fluctuations and clinical attacks was calculated on data obtained in the month preceding the attack and in the week immediately thereafter. In MS patients, a two fold increase of caspase-1 mRNA mean levels was observed in the week preceding an acute attack ($p = 0.05$). The caspase-1 mRNA levels tended to return to the basal values in the 1st week following the attack. We found a statistically significant relationship between caspase-1 PBMC mRNA levels and the number of new gadolinium-enhancing brain-MRI lesions ($r = 0.67$; $p = 0.01$) but not with the number of persisting lesions from the previous scan ($r = 0.10$; $p = 0.49$). Our results suggest a crucial role for caspase-1 in the pathogenic process underlying immune-mediated experimental and human demyelination and indicate that caspase-1 might represent a suitable peripheral marker of CNS inflammation in MS.

CARATTERIZZAZIONE DELLA RISPOSTA LINFOCITARIA VERSO PEPTIDI E LIPOPEPTIDI DELLA MIELINA UMANA NELLA SCLEROSI MULTIPLA

L. Massacesi (a), B. Mazzanti (a), M. Vergelli (a), A.M. Papini (b), S. Mazzucco (b), M. Chelli (c), R. Tosi (d), R. Butler (d), G. Greco (d), D. Fruci (d)

(a) Dipartimento Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Università degli studi di Firenze

(b) Dipartimento Chimica Organica, Università degli studi di Firenze

(c) C.S. Comp. Eterocic., CNR, Firenze

(d) Ist. Biol. Cellulare, CNR, Roma

Il razionale di questo progetto si basa su una serie di osservazioni sperimentali che mostrano come l'aggiunta di lipidi ad antigeni peptidici potrebbe favorire l'induzione di risposte linfocitarie T citotossiche (CTL) "in vivo" in diversi modelli sperimentali. Date le notevoli difficoltà nello studiare la risposta citotossica mediata da linfociti T CD8+ verso antigeni mielinici nella Sclerosi Multipla (SM) è stato ipotizzato che l'utilizzazione di lipoderivati di peptidi sintetici di proteine mieliniche potrebbe essere utile per una più efficiente generazione in vitro di linfociti T CD8+. Per questo motivo sono stati sintetizzati una serie di peptidi umani lipoconjugati e non, basati sulla sequenza della proteina basica della mielina (MBP) umana, uno degli autoantigeni candidati coinvolti nella SM. Durante il primo anno del progetto è stata valutata la capacità di legame di tali peptidi alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di Classe I umano in modo da identificare un pannello di peptidi da utilizzare nei successivi approcci sperimentali. I peptidi nativi e i lipoderivati che hanno mostrato affinità di legame verso la molecola HLA-A2 sono stati selezionati e utilizzati per la generazione di linee di linfociti T CD8+ a partire da linfomonociti di sangue periferico (PBL) di soggetti HLA-A2 (sia pazienti con SM che donatori normali). Sebbene la resa globale di linfociti T CD8+ citotossici sia stata insoddisfacente e nessuna differenza sia stata evidenziata tra pazienti e controlli sia utilizzando i peptidi nativi che i rispettivi lipoderivati, in alcuni individui è stato osservato un leggero incremento della risposta citotossica utilizzando i lipopeptidi rispetto ai peptidi nativi.

Poiché i meccanismi che sono alla base degli effetti "immunoadiuvanti" degli antigeni lipoconjugati non sono ancora stati chiariti è stato condotto in parallelo uno studio mirato a indagare gli effetti biologici della coniugazione di lipidi a peptidi antigenici sulla risposta linfocitaria T CD4+. A questo scopo è stata sintetizzata una serie di lipoderivati di due peptidi della MBP di guinea pig (aa 74-85 e 83-99) immunodominanti nel ratto Lewis. Tali molecole sono state utilizzate per l'induzione della encefalomyelite allergica sperimentale (EAE) nel ratto Lewis e per lo studio della risposta linfocitaria T CD4+ in coltura. Questo studio fornisce nuovi sviluppi per la comprensione degli effetti biologici della lipoconiugazione sulla risposta linfocitaria T, indicando che il legame di un antigene peptidico ad una catena lipidica può risultare in effetti biologici diversi per i diversi epitopi e che tale fenomeno potrebbe essere correlato con la suscettibilità dei peptidi alle proteasi endogene. Nel loro insieme tali risultati suggeriscono che gli effetti biologici della lipoconiugazione sono esercitati principalmente a livello di processazione e presentazione dei peptidi da parte delle molecole MHC. Tuttavia dallo studio degli effetti dei diversi lipoderivati di due epitopi immunodominanti della MBP umana (83-99 e 141-160) sulle funzioni di cloni di linfociti T umani specifici per la MBP è stato osservato che le risposte funzionali di tali cellule a peptidi con funzioni lipidiche legate in differenti posizioni erano distribuite clonalmente. Tali dati suggeriscono che gli effetti biologici della lipoconiugazione di antigeni peptidici sono più complessi e potrebbero almeno in parte essere esercitati a livello del riconoscimento del complesso peptide-MHC da parte del recettore del linfocita T (TCR).

Infine durante lo svolgimento del progetto il nostro interesse si è rivolto anche ad altre modificazioni post-traslazionali di antigeni peptidici, come la glicosilazione, che potrebbe

influenzare la rilevazione di risposte immunitarie specifiche. In particolare, durante il terzo anno, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su un'altra proteina mielinica probabilmente coinvolta nel meccanismo immunopatogenetico dell SM la glicoproteina mielinica oligodendrocitica (MOG) che nella sua conformazione naturale presenta un sito di glicosilazione in posizione 31. Tale sito è localizzato in stretta vicinanza della sequenza aminoacidica che è immunodominante sia per la risposta linfocitaria T che B in diversi modelli animali. Sono stati quindi sintetizzati glicoderivati del peptide MOG 30-50 in modo da studiare la risposta immunitaria a questa parte della molecola in diversi sistemi sperimentali. Mentre la glicosilazione del peptide non influenzava la risposta linfocitaria T essa esercitava un profondo effetto sulla risposta anticorpo mediata. Utilizzando il peptide glicosilato ma non quello "wild-type" anticorpi specifici sono stati rilevati nel siero di pazienti con SM e altre malattie neurologiche. Evidenze sperimentali suggeriscono che tali anticorpi riconoscono un epitopo conformazionale glicopeptidico. Sebbene anticorpi anti-Asn31-MOG non siano specifici per la SM è stato dimostrato che i titoli nei sieri dei pazienti SM variavano con il tempo e che tali cambiamenti erano, almeno in un sottogruppo di pazienti, correlate con l'attività di malattia come evidenziato da MRI eseguita serialmente.

In conclusione, durante lo svolgimento di tale progetto è stata eseguita la sintesi di numerosi antigeni peptidici modificati. I risultati sperimentali hanno dimostrato che questi prodotti sintetici rappresentano degli strumenti utili per lo studio della risposta immunitaria verso epitopi antigenici. Infatti in diverse condizioni sperimentali i peptidi coniugati potrebbero:

1. aumentare o diminuire il riconoscimento di epitopi nativi interferendo con i meccanismi di processazione e presentazione da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC);
2. modificare l'esito della risposta funzionale di singoli cloni di linfociti T;
3. agire come epitopi conformazionali più simili ai determinanti riconosciuti in natura dal sistema immunitario.

CHARACTERIZATION OF LYMPHOCYTE RESPONSE TO HUMAN MYELIN PEPTIDES AND LIPOPEPTIDES IN MULTIPLE SCLEROSIS

L. Massacesi (a), B. Mazzanti (a), M. Vergelli (a), A.M. Papini (b), S. Mazzucco (b), M. Chelli (c), R. Tosi (d), R. Butler (d), G. Greco (d), D. Fruci (d)

(a) *Dipartimento Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Università degli studi di Firenze*

(b) *Dipartimento Chimica Organica, Università degli studi di Firenze*

(c) *C.S. Comp. Eterocic., CNR, Firenze*

(d) *Ist. Biol. Cellulare, CNR, Roma*

The rationale of this project was based on a series of experimental observations showing that lipoconjugation of peptide antigen may favor the induction of cytotoxic T cell (CTL) responses "in vivo" in different experimental models. Given the long lasting difficulties in studying the CD8+ T cell-mediated cytotoxic responses to myelin antigens in Multiple Sclerosis (MS) it was hypothesized that the use of lipoderivative of synthetic peptides of myelin proteins may be helpful for a more efficient generation of CD8+ myelin specific T cells in vitro. For this reason a series of wild type and lipoconjugate nonamer peptides based on the sequence of human myelin basic protein (MBP), one of the candidate autoantigen in MS, was undertaken. The binding capacity of these molecules to MHC class I human molecules was investigated in the first year of the project in order to identify a panel of candidate lipopeptides to be used in the following experimental approaches. Lipoconjugated and wild type peptides which showed high affinity binding to HLA-A2 were selected and used for generating CD8+ T cell lines from the peripheral blood lymphocytes (PBL) of HLA-A2+ subjects (either MS patients and normal donors). Although the global yield of CD8+ CTL was unsatisfactory and no difference was detected between MS patients and controls either by using the wild type or the lipoconjugated peptides, in some individuals a slightly increased CTL response was observed by using lipopeptides compared to the wild type analogs.

In parallel, since the basic mechanisms underlying the "immunoadjuvant" effects of lipoconjugated antigens are still poorly understood, a study aimed to investigating the biological effects of lipoconjugation of peptide antigens on CD4+ T cell responses was designed. To this purpose a series of lipoderivatives of the immunodominant peptides of guinea pig MBP (aminoacid 74-86 and 83-99) for Lewis rat was synthesized. These molecules were used for the induction of EAE in Lewis rats and for the study of CD4+ T cell responses in culture. This study provide new insights into our understanding of the biological effects of lipoconjugation on T cell responses, indicating that the binding of a peptide antigen to a lipid chain may results in different biological effects for different epitopes and that this is related to the susceptibility of peptide antigens to endogenous proteases. Taken together these findings suggests that the biological effects of lipoconjugation are exerted mainly at the level of processing and presentation of the peptides by MHC molecules. However when we studied the effects of different lipoderivatives of two immunodominant epitopes of human MBP on the functions of human MBP-specific T cell clones we observed that the functional responses of these cells to peptides bound to lipid moieties at different sites were clonally distributed. These data suggest the biological effects of lipoconjugation of peptide antigens are more complex and may at least in part be exerted at the level of T cell receptor recognition of the peptide-MHC complexes.

Finally during the development of the project we become interested on other post-translational modifications of peptide antigens, such as glycosylation, which may affect the detection of specific immune responses. In particular, we focused our attention on myelin

oligodendrocyte glycoprotein (MOG) which in its natural conformation carry a glycosylation site at position 31. This is located in proximity of the amino acid sequence which is immunodominant for both T and B cell responses in several animal models. We therefore develop the synthesis of glyco derivatives of MOG 30-50 in order to investigate the immune response to this portion of the molecule in different experimental systems. Whereas glycoconjugation of the peptide antigen did not affect T cell responses it exerts a profound effect on antibody mediated responses. Using the glyco derivative of MOG 30-50 peptide but not its wild type analog we could detect specific autoantibody in the sera of patients affected by several neurological diseases including MS. Experimental evidence suggests that these antibodies recognize a conformational glycopeptide epitope. Although the antibodies to the glycosylated peptide were not specific for MS we demonstrated that the titers in the sera of MS patients vary over time and that these changes were, at least in subgroup of patients, correlated with disease activity as measured by serial gadolinium -enhanced Magnetic Resonance Imaging of the brain.

In summary, during the development of this project the synthesis of a number of modified peptide antigens was performed. The experimental results demonstrated that these synthetic products are powerful tools to study the immune responses to antigenic epitopes. Under different experimental conditions conjugated peptides may:

1. improve or decrease the recognition of wild type epitopes by interfering with the mechanisms of processing and presentation by APCs
2. modify the outcome of the functional response of single T cell clones
3. act as conformational epitopes closer to the native determinants recognized by the immune system

EFFETTI DELLE CITOCHINE NELLA TRASMISSIONE SINAPTICA IN CO-COLTURE PRIMARIE DI NEURONI E ASTROCITI

C. Verderio, M. Matteoli

Centro CNR di Farmacologia Cellulare e Molecolare, Dipartimento di Farmacologia Medica, Università degli studi di Milano

La sclerosi multipla é una malattia infiammatoria demielinizzante del Sistema Nervoso Centrale (SNC) che coinvolge citochine e altri mediatori infiammatori. E' stato precedentemente dimostrato che la produzione di citochine nel SNC altera diverse funzioni astrocitarie, che comprendono la captazione di glutammato e la funzionalità dello scambiatore Na/K. Tramite le loro azioni sugli astrociti, le citochine possono indirettamente compromettere la funzionalità neuronale. Infatti, é ormai ampiamente accettato che un efficiente funzionalità sinaptica tra neuroni richiede la partecipazione attiva degli astrociti (Bacci et al., 1999a). Scopo del nostro progetto é stato determinare se la produzione di citochine nel SNC influenza la comunicazione bidirezionale tra neuroni e astrociti. Per approfondire questo punto, abbiamo utilizzato colture primarie di neuroni e di astrociti ippocampali, un modello sperimentale che consente di studiare il ruolo delle cellule gliali durante la trasmissione sinaptica. Come parametro di funzionalità sinaptica, modulata dalla presenza di cellule gliali, abbiamo valutato le oscillazioni spontanee di calcio citosolico, che caratterizzano neuroni ed astrociti in condizioni basali (Bacci et al. 1999b; Verderio et a., 1999) e dopo trattamento con interferone γ . Mentre il trattamento con interferone non altera l'omeostasi intracellulare del calcio in colture di neuroni prive di astrociti, provoca alterazioni di calcio citosolico a livello degli astrociti, generando insorgenza o aumento di frequenza delle oscillazioni di calcio. Le oscillazioni di calcio indotte da interferone negli astrociti a loro volta inducono aumenti di calcio nei neuroni adiacenti in colture miste glia-neuroni. E' interessante notare che gli aumenti di calcio che si manifestano nelle colture gliali dopo trattamento con interferone spesso originano da cellule microgliali, che costituiscono un contaminante comune di queste colture. Gli aumenti di calcio indotti da interferone a livello delle cellule microgliali sono seguiti da onde di calcio citosolico che si propagano sia alle cellule microgliali vicine che agli astrociti adiacenti. Nei 30/60 minuti successivi all'applicazione dell'interferone si osserva morte delle cellule microgliali. Questi risultati indicano che l'interferone γ , alterando l'omeostasi del calcio negli astrociti, attraverso un possibile effetto sulle cellule microgliali, interferisce sulla funzionalità nervosa.

- Bacci A., Verderio C., Pravettoni E. and Matteoli M. (1999a) Role of glial cells in synaptic function. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 354: 403-409.
- Bacci A., Verderio C., Pravettoni E. and Matteoli M. (1999b) Synaptic and intrinsic mechanisms shape oscillations in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 11: 389-397.
- Verderio C., Bacci A., Coco S., Pravettoni E., Fumagalli G. and Matteoli M. (1999) Astrocytes are required for the oscillatory activity in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 11: 2793-2800.

ROLE OF CYTOKINES ON SYNAPTIC TRANSMISSION IN NEURON-ASTROCYTE CO-CULTURES

C. Verderio, M. Matteoli

Centro CNR di Farmacologia Cellulare e Molecolare, Dipartimento di Farmacologia Medica, Università degli studi di Milano

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the CNS involving cytokines and other inflammatory mediators. It has been found previously that cytokine production in the CNS alters different astrocytic functions, including glutamate uptake and Na/K exchanger functionality. Through their action on astrocytes, cytokines may indirectly compromise neuronal function and, indeed, it is now widely believed that an efficient synaptic functionality essentially requires the participation of adjacent astrocytes (Bacci et al., 1999a). Aim of our proposal was to determine whether cytokine production in the CNS affect the bidirectional communication between astrocytes and neurons. To gain insights into this issue, we used primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes, an experimental model which allows to study glial contribution to synaptic function. To monitor synaptic activity, as influenced by the presence of glial cells, we have recorded spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and fluctuations of membrane potential in neurons and astrocytes, under control conditions (Bacci et al., 1999b; Verderio et al., 1999) and after IFN- γ treatment. Whereas application of IFN- γ does not alter intracellular calcium homeostasis in neurons maintained in pure neuronal culture, it induces $[Ca^{2+}]_i$ elevations in astrocytes, increasing the frequency or triggering the occurrence of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations. The IFN- γ -induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in astrocytes result in $[Ca^{2+}]_i$ elevations in neighboring hippocampal neurons growing in mixed cultures. Interestingly, $[Ca^{2+}]_i$ elevations occurring in glial cultures after IFN- γ treatment frequently originate from microglial cells, which represent a common contaminant in this type of cultures. IFN- γ -induced $[Ca^{2+}]_i$ increases occurring in microglial cells are followed by spreading of $[Ca^{2+}]_i$ waves to neighbouring microglial cells and/or astrocytes and, in 30-60 min after IFN- γ application, by microglial cell death. These results indicate that, by altering calcium homeostasis in astrocytes, possibly via an effect on microglial cells, IFN- γ ends up affecting neuronal properties.

- Bacci A., Verderio C., Pravettoni E. and Matteoli M. (1999a) Role of glial cells in synaptic function. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 354: 403-409.
- Bacci A., Verderio C., Pravettoni E. and Matteoli M. (1999b) Synaptic and intrinsic mechanisms shape oscillations in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 11: 389-397.
- Verderio C., Bacci A., Coco S., Pravettoni E., Fumagalli G. and Matteoli M. (1999) Astrocytes are required for the oscillatory activity in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 11: 2793-2800.

RUOLO DELLE CITOCHINE PROINFIAMMATORIE NEGLI OLIGODENDROCITI

F. Blasi (a), A. Brogi (b), E. Costantino-Ceccarini (b), R. D'Angelo (b), A. Luddi (b), M. Melli (b), M. Riccio (c), S. Santi (c), M. Strazza (b)

(a) Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università degli studi, Bologna

(b) Centro Studio Cellule Germinali, CNR, Siena

(c) Istituto Citomorfologia, CNR, Bologna

Brogi et al. (1996) hanno dimostrato un aumento della concentrazione di ceramide endocellulare in oligodendrociti differenziati di ratto trattati con IL-1 β .

La via metabolica attivata dal ceramide negli oligodendrociti differenziati induce l'espressione di geni che sono anche caratteristici di cellule in proliferazione, quali: 1. c-Myc, che è presente nel nucleo con una massima concentrazione fino a 4 ore dopo l'aggiunta di ceramide alla coltura cellulare e poi decresce. 2. Cdc25A che è presente nel citoplasma ed è evidenziabile nel nucleo dopo 3 ore di trattamento con ceramide. 3. PCNA (antigene nucleare di proliferazione cellulare), che ha un ruolo essenziale sia nella riparazione che nella sintesi del DNA, ed è evidenziato utilizzando anticorpi specifici. L'induzione di tale proteina è caratteristica anche delle cellule apoptotiche.

In contrasto con l'effetto del ceramide esogeno sugli oligodendrociti, è sorprendente che l'aumento del ceramide intracellulare a seguito di un trattamento anche molto prolungato con IL-1 β (72 ore) non induca apoptosi. Questa apparente contraddizione può essere spiegata se l'IL-1 β , attraverso la via metabolica del ceramide, attiva funzioni diverse da quelle della morte cellulare.

Recentemente Blasi et al. (1999) hanno dimostrato che l'IL-1 β è espressa costitutivamente negli oligodendrociti progenitori e differenziati in coltura ed *in vivo*, in sezioni di emisferi cerebrali di ratto di 1, 4 giorni di età e di animale adulto. L'IL-1 β è una proteina pleiotropica con un ampio spettro di funzioni ed un suo ruolo nella crescita o differenziazione degli oligodendrociti non può essere escluso.

Per meglio caratterizzare il ruolo dell'IL-1 negli oligodendrociti abbiamo inibito la funzione della proteina utilizzando l'antagonista recettoriale (IL-1Ra) ed il peptide anti-ICE. L'aggiunta degli inibitori a colture di progenitori di oligodendrociti non ha alcun effetto sulle cellule. L'aggiunta degli inibitori ad oligodendrociti da 4 a 18 ore dopo l'inizio della differenziazione induce morte cellulare. L'aggiunta di un eccesso di IL-1 β insieme agli inibitori annulla l'effetto, suggerendo che l'IL-1 β compete con l'antagonista recettoriale, e, nel caso del peptide anti-ICE, sopperisce alla mancanza di IL-1 β endogena attiva. L'effetto dell'antagonista recettoriale dimostra che l'IL-1 β deve interagire con il recettore per la sua funzione negli oligodendrociti. L'effetto dell'antagonista di ICE dimostra che l'IL-1 β sintetizzata dagli oligodendrociti deve essere processata ed interagire con il suo recettore a formare un loop autocrino.

Per chiarire il ruolo dell'IL-1 β nei progenitori stiamo studiando la via metabolica di trasmissione del segnale attivata dall'IL-1 β tramite la tecnica dei due ibridi in lievito. Abbiamo costruito una cDNAteca da RNA di emisferi di ratto da 1 a 13 giorni di età, che, prima dell'amplificazione, contiene circa dieci milioni di ricombinanti indipendenti. I cloni positivi isolati fino ad ora sono in via di caratterizzazione.

La tecnica RDA è stata utilizzata per studiare l'espressione differenziale di messaggeri paragonando RNA ottenuto da oligodendrociti progenitori e differenziati. Il clonaggio differenziale è stato ottenuto sottraendo il cDNA delle cellule differenziate da quello dei progenitori. La cDNAteca è stata analizzata come descritto nei precedenti rapporti. Su cinquanta ricombinanti indipendenti abbiamo isolato 6 cDNA diversi, ciascuno dei quali era ripetutamente

rappresentato. Le sequenze selezionate corrispondono al prodotto di geni già noti: la vimentina, la proteina ribosomale L3, EF2, la catena pesante della dineina, RACK1 e Hsp90. Per eliminare le sequenze ad alta frequenza di distribuzione, abbiamo ibridizzato alla cDNAteca le sonde derivate da tutti i ricombinanti selezionati. Il 99% dei cloni è risultato positivo a conferma del forte arricchimento di questi cDNA nei progenitori e nella cDNAteca. I rimanenti 60 cloni sono stati sequenziati permettendo l'identificazione di 15 ricombinanti diversi che corrispondono a: le proteine ribosomali S3a, L23a, P0, L15, L19; la subunità α della "p55 GTP binding protein", l'ATPasi proteosomale p45, la nexina, la "huntingtin interactin protein" (HIP1), ed una serie di cloni non ancora descritti ed a funzione ignota numerati come segue: clone 11, clone 95, clone 96, clone 254, clone 279, clone 288. Tutti i cDNA clonati sono stati ibridizzati a northern blots di RNA estratti da oligodendrociti progenitori e differenziati. L'analisi quantitativa dell'intensità di ibridazione ai due tipi di RNA dimostra che i ricombinanti isolati sono differenzialmente espressi. Per confermare l'espressione differenziale di questi messaggeri "in vivo" durante lo sviluppo del SNC e la differenziazione degli oligodendrociti, abbiamo ibridizzato i ricombinanti ad un RNA poli-A+ estratto da emisferi cerebrali, e da tronco cerebrale di ratto di 1, 2, 4, 6 giorni dopo la nascita e di animale adulto. I risultati confermano quanto osservato con l'RNA di cellule primarie. L'espressione differenziale dei cloni 11, 95, 96, 254, 279 e 288, che non presentano alcuna omologia con le sequenze sia procariotiche che eucariotiche presenti nelle banche dati, è in corso. L'ibridazione del clone 288 agli emisferi cerebrali mostra un aumento della quantità di ambedue le bande di messaggero fino a 4 giorni dopo la nascita, seguito da un decremento che continua fino all'età adulta. Nel tronco cerebrale la diminuzione del messaggero inizia dal giorno uno dopo la nascita e continua fino all'età adulta.

Attualmente stiamo isolando con la tecnica del RT-PCR le sequenze complete dei cDNA non ancora descritti, per caratterizzarli da un punto di vista strutturale e funzionale.

Conclusioni. Il nostro gruppo ha, per la prima volta, dimostrato l'espressione costitutiva del gene dell'IL-1 β e la presenza della proteina corrispondente negli oligodendrociti di ratto progenitori e differenziati *in vivo* ed *in vitro*, indicando un ruolo della citochina nelle prime ore della differenziazione cellulare. La definizione della funzione è ancora oggetto di studio e prevediamo di poterla chiarire tramite gli esperimenti di clonaggio con la tecnica dei due ibridi in lievito. La tecnica RDA applicata agli oligodendrociti progenitori e differenziati ha fornito informazioni sulla espressione di messaggeri specifici in oligodendrociti progenitori ed ha permesso di identificare nuove sequenze che sono in via di caratterizzazione.