

## DEMIELINIZZAZIONE IMMUNOMEDIATA: ESPRESSIONE IN SITU DI CITOCHINE E ALTRI FATTORI SOLUBILI DELL'INFIAMMAZIONE

N. Rizzuto, S. Ferrari, T. Cavallaro

*Sezione di Neurologia, Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Università degli studi di Verona*

La poliradicolonevrite infiammatoria cronica demielinizzante (CIDP), è un'affezione del sistema nervoso periferico, che presenta analogie cliniche (andamento cronico progressivo o remittente-ricidivante) e patologiche (lesioni demielinizzanti multifocali associate ad infiammazione) con la sclerosi multipla. La disponibilità di materiale biotico fa sì che la CIDP rappresenti un modello più accessibile per lo studio su tessuto della patogenesi e dell'evoluzione dei fenomeni demielinizzanti.

1- Su 146 biopsie di nervo surale di pazienti affetti da CIDP, è stato eseguito uno studio morfometrico che ha mostrato demielinizzazione (100% dei casi), edema endoneurale (47%), iperplasia schwannica (28%), infiltrati infiammatori (26%), attivazione macrofagica (45%). Nel 20% dei casi era inoltre presente una spiccata focalità delle lesioni patologiche, in particolare della demielinizzazione.

2- La caratterizzazione immunoistochimica della componente cellulare infiammatoria ha evidenziato in tutti i casi la presenza di linfociti T (CD3, UCHL-1), sia CD4+ che CD8+, di attivazione macrofagica (CD68) e di iperespressione di MHC di classe II. Per quanto attiene alla componente solubile infiammatoria, la citochina IL1 era presente sui linfociti e sui macrofagi così come sulle cellule endoteliali ed endoneurali. La determinazione dell'IFN-gamma era limitata agli infiltrati infiammatori organizzati mentre il TNF-alfa era presente anche sulle cellule infiammatorie sparse nell'endonevrio.

3- Lo studio della componente umorale del processo demielinizzante, in particolare la ricerca di depositi di immunoglobuline e di frazioni del complemento ha evidenziato presenza di frazione C3d del complemento su alcune guaine mieliniche nel 30% dei casi. Allo scopo di verificare un eventuale ruolo delle immunoglobuline circolanti anti-mielina nella patogenesi della lesione, e la loro funzione di innesco nella deposizione di C3d, abbiamo testato il siero dei pazienti, mediante immunofluorescenza indiretta. In nessun caso è stata rivelata attività anticorpale anti-mielina sulle guaine mieliniche. Tali dati suggeriscono un meccanismo complemento-mediato, non anticorpo-dipendente, nel processo demielinizzante nel sottogruppo di CIDP identificato dal deposito di C3d sulle guaine mieliniche.

4- Nei pazienti con biopsia nervosa caratterizzata da netta focalità delle lesioni è stata condotta su siero la ricerca di anticorpi antiganglioside-GM1, frequentemente riportati in associazione alle neuropatie multifocali motorie (MMN). La negatività per anti-GM1 ha permesso di escludere un ruolo di tali anticorpi nella multifocalità delle lesioni. I nostri dati contribuiscono a definire le differenze tra CIDP e MMN. La focalità delle lesioni demielinizzanti identifica una caratteristica comune di un gruppo di pazienti con CIDP e potrebbe rappresentare una fase di evoluzione del processo demielinizzante.

5- In 2 pazienti con neuropatia demielinizzante cronica progressiva la biopsia del nervo surale ha mostrato, oltre ad aspetti di demielinizzazione, evidenza ultrastrutturale di aumentata periodicità delle guaine mieliniche, depositi di IgM, C3d e complesso terminale del complemento sulla mielina, in assenza di anticorpi anti-MAG. Il riscontro in entrambi i casi di elevati titoli di anticorpi anti-sulfatide circolanti suggerisce che il processo demielinizzante complemento-mediato non sia esclusivo delle neuropatie anti-MAG.

## IMMUNO-MEDIATED DEMYELINATION: IN SITU EXPRESSION OF CITOKINES AND OTHER SOLUBLE FACTORS

N. Rizzuto, M. Morbin, S. Ferrari, T. Cavallaro

*Sezione di Neurologia, Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Università degli studi di Verona*

Chronic inflammatory and demyelinating polyneuropathy (CIDP) is a peripheral nervous system disease sharing some clinical and pathological features with multiple sclerosis: both may have remitting-relapsing or progressive course and are characterized by multifocal demyelinating lesions associated with inflammatory features.

For this reason CIDP represents a simple and more accessible model for investigating pathogenesis and evolution of demyelination in human pathological tissues.

1. On 146 CIDP sural nerve biopsies a morphometric study was performed. The pathological findings included demyelination (100% of cases), onion bulb structures (28%), endoneurial edema (47%), inflammatory cell infiltration (26%), macrophage activation (45%). In 20% of cases a clear focality of lesions was present.

2. Immunophenotypical characterization of cellular mediated inflammation showed in all cases diffuse T cell infiltration (CD3, UCHL-1), with CD4+ and CD8+ in equal percentages, macrophage-like positive cells (CD68) and upregulated MHC class II expression. Among pro-inflammatory soluble factors, IL1 was expressed on T cells, macrophagic cells, endothelial cells and endoneurial cells. IFN gamma was expressed exclusively in the florid inflammatory infiltrates while TNF alpha was present in perivascular as well as in sparse inflammatory endoneurial cells.

3. The study of the role of humoral mediated immunity in demyelinating mechanisms, in particular for immunoglobulins and deposition of complement fractions, showed the absence of immunoglobulins and in 30% of cases the presence of C3d fraction on some myelin sheaths. To ascertain an eventual role of anti-myelin antibodies in determining demyelination and/or activation of complement pathway we tested for their presence in the serum of patients through indirect immunofluorescence. An antimyelin activity was never found. Together with the C3d deposition, this data suggests that in a subgroup of cases the complement system induces demyelination through an alternative pathway.

4. In the serum of patients with a bioptical finding of a clear focality, we investigated the presence of anti-ganglioside GM1 antibodies, which are often seen in association with another focal condition, the so-called motor multifocal neuropathy (MMN). The absence of these antibodies shows that they are not involved in the pathogenesis of focal CIDP and helps in the differential diagnosis between CIDP and MMN. The focality of demyelination and inflammation could represent a particular phase in the evolution of CIDP.

5. In two patients with chronic progressive demyelinating neuropathy, sural nerve biopsy showed a histological pattern of demyelination associated with ultrastructural findings of widely spaced myelin and immunohistochemical detection of IgM, C3d fraction and terminal complement complex without circulating anti-MAG antibodies. The detection in both cases of significant high titles of anti-sulphatide antibodies suggests that complement-mediated demyelination is not an exclusive characteristic of anti-MAG neuropathies.

## LO SVILUPPO DELL'INFIAMMAZIONE NELLA SCLEROSI MULTIPLA. MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA MIGRAZIONE DEI LINFOCITI NEL CERVELLO

F. Rossi

*Istituto di Patologia Generale, Università degli studi di Verona*

Lo scopo del presente progetto è consistito nella caratterizzazione delle vie biochimiche che controllano l'attivazione integrinica durante la migrazione linfocitaria nel cervello e nella individualizzazione di nuovi potenziali target per la terapia della encefalite sperimentale allergica (EAE)/sclerosi multipla (SM). I risultati ottenuti nel primo anno di finanziamento hanno mostrato che gli inibitori di tirosin chinasi rappresentano una nuova classe di farmaci che bloccano la EAE attraverso il blocco dell'entrata dei linfociti nel cervello.

Nel secondo anno di finanziamento è stato caratterizzato il ruolo delle small G proteins rho e della protein chinasi A (PKA) nella migrazione dei linfociti nel cervello e l'effetto di alcuni farmaci sulla EAE. **RISULTATI:**

a) Studio delle small G proteins rho e PKA nell'adesione dei linfociti al l'endotelio cerebrale in vitro.

- L'esoenzima C3 (derivato dal Clostridium Botulinum) che blocca irreversibilmente e selettivamente le small G proteins rho A, B e C ha inibito in maniera significativa (50-60% inibizione dell'adesione dei linfociti all'endotelio cerebrale infiammato) in alcuni esperimenti. Tuttavia, complessivamente, è stata riscontrata una certa variabilità, probabilmente dovuta alla difficoltà di diffusione della tossina botulinica attraverso la membrana cellulare, come anche descritto precedentemente nella letteratura.

- Per lo studio del coinvolgimento della PKA, è stata usata la teofillina, un inibitore di fosfodiesterasi, che aumenta l'cAMP intracellulare e quindi attiva la funzione della PKA. Linfociti trattati con teofillina 1mM, 4h, 37°C, hanno aderito 65% in meno rispetto alle cellule controllo in saggi di adesione Stamper-Woodruff

b) Studio della migrazione dei linfociti T specifici per il PLP139-151 nel cervello.

È stato studiato il coinvolgimento di Rho proteins e PKA nella migrazione dei linfociti nel cervello, valutato con un metodo radioattivo basato sulla marcatura delle cellule con <sup>3</sup>H-glicerolo. Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- Lo studio della Rho A ha fornito risultati molto promettenti *in vitro*, tuttavia questo problema scientifico estremamente importante rimane aperto *in vivo* in quanto non esistono inibitori efficaci e riproducibili nelle nostre condizioni sperimentali.

- La teofillina blocca di circa 50-60% l'accumulo nel cervello in topi SJL dei linfociti attivati con Concanavalina A oppure di linee encefalitogeniche specifiche per il PLP139-151.

c) Analisi delle interazioni linfocita-endotelio cerebrale con microscopia intravitale.

Il metodo di studio della interazione fra i linfociti e l'endotelio cerebrale *in situ* mediante videomicroscopia è stato migliorato durante i 2 anni di finanziamento ISS; è stato possibile visualizzare la microcircolazione cerebrale senza necessità di una "finestra", ma direttamente attraverso la teca cranica dell'animale, quindi senza minima alterazione dell'integrità della pressione e circolazione endocranica. Sono stati ottenuti i seguenti risultati utilizzando inibitori di secondi messaggeri:

- La tossina della pertosse che blocca le proteine trimeriche G $\alpha$ i non ha inibito l'adesione di cellule T reattive a PLP 139-151 linee encefalitogeniche nel cervello.

- La tyrphostina AG490, un inibitore della Jak-2 kinasi ha inibito efficacemente l'adesione dei linfociti all'endotelio cerebrale (70% inibizione della percentuale di cellule che aderiscono, con conseguente aumento della percentuale di rotolamento).

- Come descritto anche al punto a), utilizzando la microscopia intravitale, la esoenzima C3 ha inibito in maniera significativa l'adesione sotto flusso in alcuni esperimenti, tuttavia i risultati ottenuti sono stati variabili.

- La teofillina ha bloccato circa 50% dell'adesione dei linfociti attivati all'endotelio cerebrale sotto flusso.

d) Effetto della theophyllina sulla EA.E. Sono stati seguiti 2 protocolli sperimentali: D Nel primo tipo di protocollo sono state pretrattate le linee T encephalitogeniche prima di essere iniettate mentre l'animale ha ricevuto 1.5 mg/al giorno di teofillina (per via orale, considerando che un topo di circa 20-30g beve 3ml di acqua al giorno) per una durata di 25 giorni. Somministrando 1.5 mg di farmaco al giorno, la malattia è comparsa in tutti i topi (controllo e trattati), ma la gravità clinica è stata ridotta in maniera significativa nei topi trattati con teofillina. 2) Nel secondo tipo di protocollo sono state pretrattate solo le linee T prima di essere iniettate in vivo. La malattia si è sviluppata in tutti i topi con la stessa gravità, suggerendo che il trattamento con il farmaco non è tossico e che le cellule sono capaci in vivo di recuperare ed indurre efficacemente la malattia. Nei topi trattati con la teofillina derivati da esperimenti di tipo 1 si è verificata una diminuzione dei focolai infiammatori.

- Effetto della tyrphostina AG490 sulla EAE indotta coi modello attivo. Alla luce dei risultati ottenuti sulla EAE passiva nel primo anno di finanziamento (vedi il resoconto complessivo), l'effetto della AG490 è stato testato anche sul modello della EAE indotta attivamente mediante immunizzazione con il peptide PLP131-151. Questi esperimenti non erano stati previsti nel progetto originale, tuttavia, abbiamo considerato opportuno e scientificamente rilevante espandere e completare lo studio farmacologico effettuato con la AG490. Conformemente ai dati derivati dal modello passivo, la AG490 è stata efficace nell'inibire la EAE attiva mediante un meccanismo di blocco della capacità adesiva dei linfociti e presumibilmente anche attraverso potenziamento della secrezione da parte dei linfociti attivati di citochine inibitorie sulla EAE. In conclusione, il secondo anno di finanziamento ha raggiunto gli obiettivi proposti ed è stato estremamente positivo in quanto: 1) è stato rafforzato il nuovo approccio terapeutico della EAE basato sull'inibizione delle vie di trasduzione di secondi messaggeri coinvolti nell'adesione linfocitaria; 2) i farmaci che interferiscono con l'attività della protein kinasi A, come la theophyllina, già utilizzata nel uomo, sono efficaci nel inibire la EAE.

## DEVELOPMENT OF INFLAMMATION IN MULTIPLE SCLEROSIS. MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN LYMPHOCYTE MIGRATION INTO THE BRAIN

F. Rossi

*Istituto di Patologia Generale, Università degli studi di Verona*

The overall goal of our research proposal was to characterize the biochemical pathways controlling integrin activation during lymphocyte migration into the brain and to determine potentially new targets for the therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) Multiple sclerosis (MS) based on inhibitors of signal transduction. The results obtained during the first year of founding showed that tyrosine kinase inhibitors represent a new class of drugs that block EAE by inhibiting lymphocyte entry into the brain.

During the second year of founding we characterized the role of protein kinase A (PKA) and Rho small G proteins in the migration of lymphocytes into the central nervous system (CNS) and the effect of some drugs on EAE. RESULTS

a) Role of IKA and Rho small G proteins in lymphocyte adhesion on brain endothelium in vitro, in Stamper-Woodruff assays.

- In order to study the role of PKA, we used theophylline, a phosphodiesterase inhibitor that increases the intracellular cAMP, and thus, activates the function of PKA. Lymphocytes treated with 1mM theophylline (4h, 37°C) adhered 65% less on inflamed brain endothelium when compared with control cells.

- Exoenzyme C3 derived from *Clostridium Botulinum*, an irreversible and selective inhibitor of Rho A, B, C proteins, blocked 50-60% of lymphocyte adhesion on inflamed brain endothelium. in some experiments. However, a certain experimental variability was encountered, probably due to the fact that botulinum toxin difficulty penetrates through the cell membrane, as also previously described in the literature.

b) Study of lymphocyte migration into the brain in vivo

We next studied the role of PKA and Rho proteins in lymphocyte accumulation into the brain by using a radioactive method based on cell labeling with 3H-glycerol. The following results were obtained:

- theophylline blocked 50-60% of Con A activated lymphocytes or T cell lines specific for PLP 139-151 accumulation into the brain of WL mice.

- the role of Rho A needs further study as new tools need to be developed for in vivo studies.

c) Analysis of lymphocyte-endothelium interactions by using intravital microscopy. The method we set up to study the interactions between lymphocytes and brain endothelium in situ was significantly improved during the 2 years of ISS funding. We are now able to visualize the brain superficial microvasculature directly through the skull without the need of a "window" into the bone; in this conditions, the integrity of blood microcirculation is not altered. The following results were obtained:

- Tyrphostin AG490, a tyrosine kinase inhibitor which efficiently blocks the pathogenesis of EAE (see 1998 report) inhibited 70% of lymphocyte adhesion on brain endothelium in postcapillary venules and consequently increased the percentage of the rolling cells on vessel wall. No inhibitory effect was obtained using other tyrosine kinase inhibitors such as AG1478 and Herbimycin A.

- theophylline blocked 50% of lymphocyte adhesion on brain endothelium under flow.

- As described at a), exoenzyme C3 inhibited significantly the adhesion of activated lymphocytes in some experiments, but its effect was extremely variable.

d) Effect of theophylline on EAE

As the drug has a reversible effect, 2 experimental protocols were used: 1) In the first type of experiments, encephalitogenic T-cell lines specific for PLP139-151 were treated with theophylline and injected im. into WL mice. Mice also received 1.5 mg/day theophylline for 25 days. The drug was administered per os dissolved in drinking water, considering that a 25g mouse drinks 3ml/day. All mice developed disease but disease severity was significantly reduced in mice treated with theophylline ( $p < 0.005$ ). Immunohistochemically, brains from theophylline-treated animals revealed less inflammatory infiltrates than control animals. 2) In the second type of experiments, mice received only theophylline-treated T cell lines with no systemic tyrostatin administration; in these experiments no significant difference in clinical score was observed. This suggests that theophylline has no toxic effect, and encephalitogenic T cell lines recuperated and efficiently induced the disease.

- Although not proposed in 1997, in the second year of funding we also studied the effect of AG490 on actively-induced EAE. We considered this study extremely relevant in order to complete the first demonstration of the effect of a tyrosine kinase inhibitor on EAE. As also showed for the passively-induced EAE, AG490 efficiently blocked actively-induced disease in a dose dependent manner. In mice treated with AG490 blood leukocytes are less adhesive and antigen-stimulated cells have a modified pattern of cytokine secretion (secrete more IL-10 and IFN- $\gamma$ , but not TNF and IL-4). The data was recently published on Eur. J Immunol.

In conclusion, the second year of funding was extremely positive for the following reasons: 1) our data further support that inhibitors of signal transduction involved in lymphocyte adhesion represents a new and effective therapy for EAE; 2) PKA is a negative regulator of lymphocyte adhesion, and drugs that interfere with PKA activity such as theophylline, already used in humans, may be used to block demyelinating diseases.

## IMMUNITÀ CELLULARE AD ANTIGENI MITOCONDRIALI NELLA SCLEROSI MULTIPLA

M. Salvetti (a), G. Ristori (a), C. Montesperelli (a), A. Perna (a), C. Buttinelli (a), R. Bomprezzi (a), A. Chersi (b), P. Riccio (c), C. Fieschi (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli studi di Roma "La Sapienza"*

(b) *Centro Ricerche Sperimentali, Istituto Regina Elena, Roma*

(c) *Dipartimento di Biologia, Università degli studi della Basilicata, Potenza*

Il nostro lavoro ha mostrato la prima evidenza di una risposta T linfocitaria a peptidi N-formilati nell'uomo. Abbiamo utilizzato sequenze peptidiche N-formilate da antigeni *self* (mitocondriali) e *non self* (microbiche) per isolare cloni T cellulari specifici per entrambe le classi di determinanti da individui sani, compresa una coppia di gemelli monozigoti. Nonostante le differenze con la controparte murina (fenotipo CD4+ e restrizione MHC di classe II a differenza del fenotipo CD8+ e restrizione di classe I riscontrato nei roditori), la risposta T cellulare a peptidi N-formilati nell'uomo presenta caratteristiche adatte al disegno di vaccini sicuri ed efficaci (produzione di grandi quantità di interferon  $\gamma$ , restrizione permissive e degenerata).

Avendo dimostrato l'esistenza di tali risposte, abbiamo studiato possibili alterazioni della reattività T cellulare verso peptidi formilati ed antigeni mitocondriali nella sclerosi multipla (31 pazienti con sclerosi multipla remittente e 31 controlli appaiati per età e sesso). I dati non supportano un contributo delle cellule T specifiche per peptidi N-formilati o per altri antigeni mitocondriali nella patogenesi di questa malattia. Nonostante questo, sono necessari ulteriori studi per escludere del tutto un ruolo patogenetico di questi determinanti.

## CELLULAR IMMUNITY TO MITOCHONDRIA IN MULTIPLE SCLEROSIS

M. Salvetti (a), G. Ristori (a), C. Montesperelli (a), A. Perna (a), C. Buttinelli (a), R. Bomprezzi (a), A. Chersi (b), P. Riccio (c), C. Fieschi (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli studi di Roma "La Sapienza"*

(b) *Centro Ricerche Sperimentali, Istituto Regina Elena, Roma*

(c) *Dipartimento di Biologia, Università degli studi della Basilicata, Potenza*

We present the first evidence of the T-lymphocyte response to N-formylated peptides in humans. N-formylated peptide sequences from self (mitochondrial) and foreign (microbial) antigens were used to isolate T-cell clones specific for both classes of determinants from healthy individuals, including a set of monozygotic twins. In spite of differences with its murine counterpart (CD4+ phenotype and MHC class II restriction vs. CD8+ phenotype and class I restriction in the mouse), the T cell response to N-formylated peptides in humans maintains a favourable profile (production of substantial amounts of interferon- $\gamma$ , permissive/degenerate MHC restriction) for the design of safe and effective vaccines.

Having shown the existence of such responses, we investigated possible dysregulations of the T cell reactivity to formylated peptides and to mitochondrial antigens in multiple sclerosis (31 patients with relapsing-remitting disease and 31 age and sex matched controls). The data does not support a contribution of T cells specific for N-formylated peptides or for other mitochondrial antigens to the pathogenesis of this disease. Nonetheless, additional efforts are needed to completely exclude a pathogenetic role of these determinants.

## CONTROLLO DELLA RISPOSTA DA STRESS DA PARTE DI PROSTANOIDI ANTI- INFIAMMATORI IN CELLULE DI GLIOMA ED IN MONOCITI UMANI.

A. Rossi<sup>(a)</sup>, G. Elia<sup>(a)</sup>, C. Amici<sup>(b)</sup>, G. Belardo<sup>(b)</sup>, M.G. Santoro<sup>(a,b)</sup>

*(a) Istituto di Medicina Sperimentale, CNR, Roma*

*(b) Dip. di Medicina Sperimentale e di Biologia, Università degli Studi "Tor Vergata", Roma.*

La risposta da stress (SR) ha un ruolo centrale nei meccanismi biologici di difesa cellulare dal danno causato dall'accumulo di proteine alterate o aggregate. In cellule di mammifero la SR è mediata dall'attivazione del fattore trascrizionale HSF 1 che controlla l'espressione di proteine citoprotettive (proteine da shock termico, HSP) utilizzate per il recupero dell'omeostasi cellulare. Il ruolo citoprotettivo delle HSP è stato descritto in vari tipi di patologie umane di tipo infiammatorio ed in varie malattie degenerative del sistema nervoso, tra cui la sclerosi multipla (MS). Nel caso della MS oltre ad un possibile ruolo della proteina da shock termico hsp70 come chaperon per la M13P, è stato proposto un ruolo protettivo delle HSP attraverso un possibile meccanismo di "down-regulation" della risposta immunitaria ed infiammatoria. Tuttavia, il meccanismo molecolare alla base dell'attività anti-infiammatoria delle HSP non è ancora noto.

Nel corso degli ultimi due anni è stata caratterizzata la risposta da stress in cellule di glioma C6 ed in monociti/macrofagi dopo aumento della temperatura, esposizione a citochine (TNF $\alpha$ ) o trattamento con i prostanoidi ciclopentenonici di tipo A e J (cyPG). I risultati ottenuti hanno portato a diverse osservazioni interessanti che possono essere riassunte in: 1) i cyPG sono in grado di attivare il fattore HSF1 in maniera comparabile allo shock termico sia in cellule C6 che in monociti/macrofagi umani e murini in una situazione di non-stress. 2) L'attivazione di HSF 1 è accompagnata dall'induzione della trascrizione e traduzione del gene hsp70 in cellule umane, ma non in cellule murine, in cui HSF1, pur acquisendo la capacità di legarsi al DNA, risulta non essere correttamente fosforilato con conseguente blocco dell'attività trascrizionale. 3) In monociti umani, oltre alla sintesi di hsp70, i cyPG inducono l'espressione di ferritina con un meccanismo indipendente da HSF1 e specifico per i monociti (Elia et al., Eur. J Biochem. 264:736-745, 1999). 4) I cyPG inibiscono l'attivazione del fattore NF- $\kappa$ B da parte di citochine (TNF $\alpha$ , IL1), LPS ed esteri del forbolo sia in monociti/macrofagi che in cellule di glioma C6. L'inibizione è causata dal blocco della fosforilazione e conseguente degradazione della proteina inibitoria di NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ . La chinasi di I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK, è stata da noi recentemente identificata come il target molecolare delle cyPG in cellule umane. 5) Alcuni inibitori di serin proteasi con attività inibitoria per NF- $\kappa$ B, sono stati identificati come potenti attivatori di HSF1 ed induttori di hsp70 in cellule umane (Rossi et al., J Biol. Chem. 273:16446-16452, 1998). 6) L'attivazione di HSF1 risulta essere associata al blocco dell'attivazione e della translocazione nucleare di NF- $\kappa$ B. Il trattamento con diversi induttori di HSF1, tra cui arsenito di sodio, metalli pesanti e l'ipertermia stessa, risulta nel blocco dell'attivazione di NF- $\kappa$ B con un meccanismo I $\kappa$ B $\alpha$ -mediato (Morimoto and Santoro, Nature Biotechnol. 16:833-838, 1998).

Questi risultati contribuiscono alla comprensione del meccanismo coinvolto nell'azione anti-infiammatoria della risposta da stress attraverso il blocco funzionale del fattore NF- $\kappa$ B. Inoltre, avendo NF- $\kappa$ B un ruolo critico nella patogenesi dell'encefalite sperimentale autoimmune (Hilliard et al., J Immunol. 163:2937-2943, 1999), questi dati identificano i prostanoidi ciclopentenonici ed altri induttori di HSP come una nuova classe di molecole ad attività anti-infiammatoria e citoprotettiva di potenziale interesse nel trattamento di malattie degenerative ed infiammatorie del SNC, tra cui la sclerosi multipla.

## CONTROL OF THE STRESS RESPONSE BY ANTI-INFLAMMATORY PROSTANOIDS IN GLIONIA CELLS AND IN HUMAN MONOCYTES.

A. Rossi<sup>(a)</sup>, G. Elia<sup>(a)</sup>, C. Amici<sup>(b)</sup>, G. Belardo<sup>(b)</sup>, M.G. Santoro<sup>(a,b)</sup>

*(a)Istituto di Medicina Sperimentale, CNR, Roma*

*(b)Dip. di Medicina Sperimentale e di Biologia, Università degli Studi "Tor Vergata", Roma.*

The stress response has a critical role in preserving cellular function and homeostasis by preventing protein degradation and aggregation via the activation of the transcription factor HSF1 which controls the expression of cytoprotective heat shock proteins (HSP). The cytoprotective role of HSP has been described in a variety of human inflammatory diseases and in degenerative diseases of the central nervous system (CNS), including multiple sclerosis (MS). In the case of MS, a protective role for HSP via different mechanisms, including the hsp70 chaperone activity for MBP and down-regulation of immune and inflammatory responses, has been suggested. However, the molecular mechanism responsible for the anti-inflammatory activity of HSP is still unknown.

We have now characterized the activation of the stress response by hyperthermia, exposure to cytokines (TNF $\alpha$ ), or treatment with type A and J cyclopentenone prostanoids (cyPG) in C6 glioma cells and in monocyte/macrophages, which play a pivotal role in inflammation. These studies have led to several interesting observations that can be summarized in the following: 1) CyPG activate HSF1 in both C6 cells and in human and murine monocyte/macrophages to levels comparable to heat shock in a situation of non-stress. 2) HSF1 activation is followed by hsp70 gene transcription and translation in human cells, but not in murine cells, where HSF1 cannot undergo inducible phosphorylation after cyPG treatment, resulting in loss of transcriptional activity. 3) In human monocytes, apart of hsp70, cyPG are able to induce the synthesis of ferritin with a mechanism independent of HSF 1 activation and specific for monocytes (Elia et al., Eur. J Biochem. 264:736-745, 1999). 4) CyPG are potent inhibitors of the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B by cytokines (TNF $\alpha$ , IL1), LPS and phorbol esters in C6 cells and in monocyte/macrophages. The inhibition is due to the block of phosphorylation and consequent proteasome-mediated degradation of the inhibitory NF- $\kappa$ B protein, I $\kappa$ B $\alpha$ . We have recently identified the I $\kappa$ B $\alpha$  kinase, IKK, as the molecular target for cyPG in human cells. 5) Several serine protease inhibitors with NF- $\kappa$ B-inhibitory activity were identified as potent activators of HSF1 and hsp70 inducers in human cells (Rossi et al. J Biol. Chem. 273:16446-16452, 1998). 6) HSF1 activation was found to be associated with the block of NF- $\kappa$ B activation and nuclear translocation. Treatment with different HSF1 inducers, including sodium arsenite, heavy metals and hyperthermia itself, results in inhibition of NF- $\kappa$ B activation via an I $\kappa$ B $\alpha$ -mediated mechanism (Morimoto and Santoro, Nature Biotechnol. 16:833-838, 1988).

These results contribute to the understanding of the mechanism of the anti-inflammatory activity of the stress response via the block of NF- $\kappa$ B function. Moreover, as NF- $\kappa$ B has been shown to play a crucial role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (Hilliard et al., J Immunol. 163:2937-2943, 1999), these results identify cyclopentenone prostanoids and other HSP inducers as a new class of molecules with anti-inflammatory and cytoprotective activity, opening new perspectives for therapeutic intervention in inflammatory and degenerative diseases of the CNS, including multiple sclerosis.

**STATO FUNZIONALE DEI LINFOCITI T MBP-SPECIFICI NELLA SCLEROSI MULTIPLA: STUDIO SERIALE IN SINGOLI PAZIENTI DURANTE FASI DI STABILITÀ E REMISSIONE DELLA MALATTIA**

E. Mancini<sup>(a)</sup>, A. Monizio<sup>(b)</sup>, D. Accapezzato<sup>(a)</sup>, G. Ristori<sup>(c)</sup>, M. Salvetti<sup>(c)</sup>, F. De Rosa (a), M.T. Fiorillo<sup>(b)</sup>, V. Barnaba (a), R. Sorrentino <sup>(b)</sup>

*(a) Istituto di Clinica Medica, Policlinico Umberto I; (b) Dip. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo; (c) Dip. di Scienze Neurologiche, Università "La Sapienza", Roma.*

Scopo di questo lavoro era quello di analizzare alcuni aspetti della risposta immune alla proteina basica della mielina (MBP) in pazienti con sclerosi multipla (MS). Più precisamente, attraverso uno studio longitudinale, volevamo analizzare come la risposta T varia nel tempo in uno stesso paziente, verificare se fosse possibile ritrovare uno stesso clone T specifico per MBP nelle linee cellulari generate a tempi diversi e quindi correlare lo stato funzionale di questi cloni con la fase della malattia monitorata attraverso la risonanza magnetica (MRI). Sono stati analizzati 12 pazienti con MS clinicamente definita, e seguiti con risonanza magnetica (3DEL-MRI) per sei mesi consecutivi. Per diverse ragioni, soprattutto la mancanza di crescita di linee T MBP-specifiche, l'analisi della risposta T è stata fatta solo su sei pazienti. Le linee T MBP-specifiche da ciascun paziente a tempi diversi sono state analizzate per l'espressione del TCR. L'analisi di sequenza è stata fatta su quei frammenti di DNA che, ad una analisi elettroforetica su gel di poliacrilamide, risultavano della stessa lunghezza. I risultati sono qui riassunti: **1° paziente (P)**: le famiglie di TCR ricorrenti in molte delle linee cellulari generate a tempi diversi sono: V $\beta$ 2, V $\beta$ 5 and V $\beta$ 12. Tra queste le V $\beta$  5 sono le più interessanti: infatti la stessa sequenza appare in due linee cellulari al tempo del secondo prelievo ed in una del terzo prelievo. Inoltre, altre sequenze utilizzate dai TCR presenti in altre linee erano conservate. Quindi è possibile rintracciare lo stesso clone T in tempi diversi nello stesso individuo in seguito a stimolazione con MBP. **2° (P)**: Di nuovo poche famiglie di catene beta del TCR erano presenti nelle linee cellulari T MBP-specifiche. Una stessa sequenza di TCR appartenente alla famiglia V $\beta$ 5 si amplificava in più di una linea cellulare ma solo al tempo del secondo prelievo. E' degno di nota il fatto che tutte le V $\beta$ 5 che si sono amplificate anche a tempi diversi erano simili in quanto utilizzavano la stessa regione J. **3° (P)**: questo paziente mostra da 0 a 1 lesioni all'analisi MRI-3DEL ed il repertorio di TCR utilizzati in diverse linee T MBP-specifiche era piuttosto ristretto: solo due famiglie V $\beta$  erano presenti: V $\beta$ 5 and V $\beta$ 8. Tuttavia le sequenze CDR3 utilizzate erano diverse. **4° (P)**: questo paziente non sembra avere lesioni riscontrabili alla risonanza magnetica per tutto il tempo dello studio. Il numero di linee T MBP-specifiche va dal 20% iniziale al 80% finale ed il repertorio del TCR utilizzato decresce nel tempo. Tuttavia era estremamente variabile sia in termini di famiglie V amplificate sia in termini di sequenze CDR3. **5° (P)**: questo paziente mostra una lesione al tempo del primo prelievo e nessuna lesione al tempo del secondo e terzo prelievo. E' interessante che la diminuzione del numero di lesioni si accompagna all' diluizione di un clone T che esprime una catena V $\beta$ 8: 4/4 linee T analizzate esprimono lo stesso TCR al tempo del primo prelievo (3DEL=1), due su cinque al tempo del secondo prelievo (3DEL=0) ed una su sei al tempo del terzo prelievo. Sembra quindi che uno stesso clone T è molto ben rappresentato al tempo dell'apparizione della prima lesione per poi tendere a scomparire. Non sappiamo ovviamente se questo clone scompare per morte programmata oppure se, attraversando la barriera emato-encefalica, migra verso la sede della lesione. **6° (P)**: questo paziente è anche interessante: si ritrova una catena V $\beta$ 7 espressa al tempo del primo e secondo prelievo e non più rintracciabile successivamente. Contemporaneamente, una sequenza V $\beta$ 1 compare in due linee cellulari al tempo del secondo prelievo e si stabilizza al tempo del terzo. Questo paziente mostra una lesione al tempo del primo prelievo e nessuna lesione al tempo del secondo e terzo prelievo. Il clonaggio di queste linee mostra che 48 su 52 cloni T derivati dalla linea cellulare che esprime la catena V $\beta$ 7 al tempo del primo prelievo possiedono la sequenza in esame, 2 su 4 cloni T la esprimono al tempo del secondo prelievo mentre la V $\beta$ 1 segue il percorso opposto: 1 su 19 cloni MBP-specifici esprimono quella sequenza al tempo del 2° prelievo e 4 su 4 al tempo del 3° prelievo. La conclusione di questa parte del lavoro è che è possibile ritrovare uno stesso TCR che risponde ad MBP in tempi diversi nello stesso paziente (di solito non più di 2-3 mesi), tuttavia questa sequenza tende a diluirsi nel tempo e ad essere sostituita da altre sequenze specifiche. Questi dati sono in accordo con il fenomeno dell' 'epitope spreading' già descritto in modelli animali. Sebbene in alcuni pazienti è possibile vedere la comparsa e la scomparsa di alcune sequenze in concomitanza con le diverse fasi della malattia, tuttavia è impossibile trarre conclusioni o anche suggerimenti circa il ruolo giocato da questi TCR nell'alternanza delle fasi.

## FUNCTIONAL STATUS OF MBP-SPECIFIC T LYMPHOCYTES IN MULTIPLE SCLEROSIS: SERIAL STUDY IN SINGLE PATIENTS IN ACTIVE AND STABLE PHASES OF THE DISEASE

E. Mancini<sup>(a)</sup>, A. Monizio<sup>(b)</sup>, D. Accapezzato<sup>(a)</sup>, G. Ristori<sup>(c)</sup>, M. Salvetti<sup>(c)</sup>, F. De Rosa (a), M.T. Fiorillo<sup>(b)</sup>, V. Barnaba (a), R. Sorrentino <sup>(b)</sup>

*(a) Istituto di Clinica Medica, Policlinico Umberto I; (b) Dip. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo; (c) Dip. di Scienze Neurologiche, Universita "La Sapienza", Roma.*

The aim of this project was to analyze some aspects of the immune response to the myelin basic protein (MBP) in patients with multiple sclerosis (MS). More precisely, by performing a longitudinal study, we were interested in analyzing how the T cell response to MBP varies through time in a same patient, in verifying whether it is possible to trace a same T cell clone specific for MBP in T cell lines raised at different times and, finally, to correlate the functional status of these T cell clones with the disease phase as monitored by magnetic resonance (MRI). Twelve patients with clinically defined relapsing-remitting MS were selected for this study and underwent to complete clinical and instrumental analysis and magnetic resonance (3DEL-MRI) for six consecutive months. For different reasons, mainly failure to grow specific T cell lines at the time of each bleeding, only six patients could be analyzed. MBP-specific T cell lines from each patient at different times were analyzed for the expression of TCR. Sequence analysis was performed for those fragments possessing the same length, as derived from polyacrilamide gel electrophoresis in non denaturing conditions. The results are summarized below: **1° patient:** the TCR beta families recurring in several T cell lines raised at different times were V $\beta$ 2, V $\beta$ 5 and V $\beta$ 12. Among these, the V $\beta$  5 was more interesting: the same sequence appeared in two cell lines from the second bleeding and one from the third bleeding. Moreover, other TCR sequences were similar. Therefore, the same sequence can be found at different times in a same individual upon stimulation with MBP. **2° patient:** Again few families of TCR were present in these T cell lines. A same TCR sequence belonging to the V $\beta$ 5 family did amplify in more than one cell line from the second bleeding only. However, all the V $\beta$ 5 sequenced amplified at different times were similar in that they used the same J region. **3° patient:** this patient shows from 0 to 1 lesion detectable by 3DEL and the repertoire of TCR in the several MBP-specific T cell lines analyzed was quite restricted: only two V beta chain families were present, V $\beta$ 5 and V $\beta$ 8. However their CDR3 sequences were different. **4° patient:** this patient showed no lesion detectable by magnetic resonance through all the time of our study. The number of MBP-specific T cell lines went from 20% to 80% through time and the repertoire of TCR was concomitantly decreasing. However, it was extremely variable both in terms of TCR families expressed as well as in the CDR3 sequences utilized. **5° patient:** this patient showed 1 lesion at the time of the first bleeding and no lesions at the time of the second and third bleeding. Interestingly, the decrease in the number of lesions goes along with a maximal expansion of a TCR sequence (V $\beta$ 8): 4/4 T cell lines analyzed expressed a same TCR at the time of first bleeding (3DEL=1), 2 out of 5 T cell lines expressed the same TCR at the time of second bleeding (3DEL=0) and 1 out of 6 at the time of third bleeding (3 DEL=0). So it appears that the T cell clone expressing this TCR is very well represented during the appearance of the first lesion and is diluted out afterwards. We do not know of course whether it disappears from peripheral blood because programmed cell death or because migration through the hemato-encephalic barrier. **6° patient:** the sixth patient is also interesting: there is a V $\beta$ 7 sequence which is expressed at the time of the first and second bleedings and it is not detectable at the following bleedings. Meanwhile, a V $\beta$ 1 sequence appears in two cell lines during the second bleeding and it is still present in two cell lines at the time of the third bleeding. It is interesting that this patient shows one lesion during the first bleeding and no lesions at the time of the second and third bleeding. T cell cloning of these T cell lines shows that 48 out of 52 T cell clones at the first bleeding are positive for the V $\beta$ 7 sequence, 2 out of 4 during the second bleeding whereas the V $\beta$ 1 is present in 1 out of 19 T cell clones in the T cell line at the time of the second bleeding and 4 out of 4 specific T cell clones at the time of the third bleeding. The conclusion of this part of the study is that it is possible to find a same TCR responding to MBP at different times (usually no more than two-three months), however this sequence appears to be diluted out afterwards. In the last patient, the disappearance of one sequence is paralleled by the appearance of a second TCR at increasing frequency. This phenomenon goes along with different phases of the disease. The data reported above fit well with the phenomenon of the epitope spreading already described in murine models. We do not know of course if these T cell clones play any causal role in the alternation of the different phases.

## ANALISI DI SEQUENZE RETROVIRALI ENDOGENE UMANE IN SOGGETTI AFFETTI DA SCLEROSI MULTIPLA

D. Taruscio (a), G. Zoraqi (a), F.R. Guerini (b), P. Ferrante (b), I. Gabrielli (a)

(a) *Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanita', Roma*

(b) *Laboratorio di Biologia, Fondazione Don Gnocchi, IRCCS, Milano*

I retrovirus endogeni (ERV) sono sequenze retrovirali ancestrali, stabilmente integrate nel genoma di quasi tutti i vertebrati e pertanto ereditate come caratteri mendeliani. Gli ERV umani (HERV) rappresentano sino all'1% del nostro genoma. Le loro funzioni biologiche devono tuttora essere chiaramente identificate, tuttavia essi possono contribuire al rimodellamento genomico. Trascritti di HERV sono stati identificati in vari tipi cellulari, tra cui monociti periferici di individui sani. La loro trascrizione puo' essere modulata da fattori esogeni ed endogeni (ad es., età e stato di differenziamento della cellula, citochine infiammatorie o steroidi). Diversi studi suggeriscono che gli ERV possano giocare un ruolo, diretto o indiretto, nella iniziazione e/o promozione di patologie autoimmuni. Nel topo, gli ERV hanno effetti immunitari diretti, codificando superantigeni endogeni e proteine immunosoppressive. La localizzazione cromosomica delle sequenze retrovirali puo' pure influenzare la regolazione della funzione immune: la integrazione delle sequenze in prossimità di geni importanti nella regolazione immune potrebbe alterare (aumentare o reprimere) la normale funzione dei geni stessi.

In questo studio, sono stati analizzati i siti di integrazione cromosomici di due famiglie di HERV (HRES-1 e HERV 4-1), su metafasi di linfociti periferici di pazienti affetti da sclerosi multipla (MS), mediante ibridazione in situ a fluorescenza. Entrambe le sequenze si localizzano preferenzialmente in prossimità di siti fragili e/o breakpoints genomici. I siti di integrazione dei due HERV non mostrano polimorfismi in soggetti normali. L'obiettivo di questo studio è stato quello di indagare se nei pazienti affetti da MS siano osservabili differenti pattern di integrazione di questi due HERV, in confronto ai soggetti sani. Abbiamo analizzato nove casi di MS esaminando per ciascun paziente e per ciascuna sonda 25 metafasi. L'analisi delle due sequenze retrovirali sui cromosomi bandeggiati non ha mostrato alcuna differenza di integrazione fra i soggetti affetti da MS e i controlli sani: infatti, per HERV 4-1 si osservavano inserzioni multiple su diversi cromosomi, mentre per HRES-1 si identificava una singola inserzione sul cromosoma 1q42. Questi risultati preliminari indicano che un eventuale ruolo di HERV 4-1 e/o HRES-1 nei pazienti affetti da MS non si riflette in alterazioni dei siti di integrazione cromosomici. Come ulteriore sviluppo della ricerca, è in corso una indagine molecolare per caratterizzare, mediante RT-PCR, i trascritti di HERV 4-1 nei linfociti periferici di pazienti affetti da MS cronica progressiva primaria e MS "relapsing remitting" in fase stabile o acuta; contestualmente vengono analizzati controlli sani appaiati per sesso e per età.

## ANALYSIS OF HUMAN RETROVIRAL SEQUENCES IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

D. Taruscio (a), G. Zoraqi (a), F.R. Guerini (b), P. Ferrante (b), I. Gabrielli (a)

(a) *Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanita', Roma*

(b) *Laboratorio di Biologia, Fondazione Don Gnocchi, IRCCS, Milano*

Endogenous retroviruses (ERVs) are ancestral retroviral sequences permanently integrated in the genome of virtually all vertebrates and consequently inherited as Mendelian traits. Human ERVs (HERVs) represent up to 1% of human genome. ERV function has not yet been clearly identified although they may contribute in shaping and reorganizing the genome. HERV transcripts have been identified in various cell types, including in the peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals. Transcription may be influenced by exogenous and endogenous factors (e.g., cell age and differentiation stage, inflammatory cytokines or steroids). Several studies suggest that ERVs could play a role, directly or indirectly, in the initiation and/or promotion of autoimmune diseases. In mice, ERVs have direct immune effects by encoding endogenous superantigens and immunosuppressive proteins. The chromosomal location of retroviral sequences may also influence the immune regulation. The integration of retroviral sequences upstream or downstream of genes which are important in immune regulation might result in induction or disruption of normal cellular gene function.

In this study, the chromosomal integration sites of two HERV families (HRES-1 and HERV 4-1, used as probes) were investigated on metaphases of peripheral lymphocytes of multiple sclerosis (MS) patients by fluorescence in situ hybridization. Both retroviral sequences show insertion sites preferentially located close to genomic fragile sites and/or breakpoints. The integration sites of the two HERVs show no polymorphisms in normal individuals. The aim of our study was to investigate whether different integration patterns may be observed in MS patients as compared to healthy subjects. Nine MS patients were analyzed; for each probe and each patient 25 metaphases were examined. The location of the two retroviral sequences on banded chromosomes showed no differences between normal and MS samples, i.e.: multiple insertions on several chromosomes were observed for HERV 4-1, whereas a single insertion on chromosome 1q42 was detected for HRES-1. According to these preliminary results, any possible role of HERV 4-1 and HRES-1 in MS patients is not reflected in changes concerning their integration sites on chromosomes. As further step, molecular investigations are currently in progress to characterize HERV 4-1 transcripts by RT-PCR in peripheral lymphocytes of primary chronic progressive MS and acute and stable relapsing remitting MS patients, as well as sex- and age-matched healthy controls.

## INTERAZIONI TRA FAS ED IL SUO LIGANDO NELLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA

B. Simon<sup>(a)</sup>, F. Malisan<sup>(b)</sup>, P. Nicotera<sup>(a)</sup>, M. Leist<sup>(a)</sup>, R. Testi<sup>(b)</sup>

*(a)Dept. Molecular Toxicology and Biochemical Sciences, University of Konstanz, Germania*

*(b)Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università "Tor Vergata", Roma*

Studiando i segnali apoptotici che derivano dal recettore Fas, abbiamo identificato il disialoganglioside GD3 come un importante mediatore nel pathway lipidico generato da Fas nelle cellule tumorali ematopoietiche. Il GD3 si accumula nelle cellule emopoietiche dopo il cross-linking del loro recettore Fas e induce direttamente l'apoptosi in queste cellule.

Il GD3 è un disialoganglioside minore nella maggior parte dei tessuti normali, mentre presenta una maggiore espressione in vari tipi di tumore di origine neuroectodermica. Inoltre, è abbondante nei tessuti in via di sviluppo e nei tessuti adulti che vanno incontro ad un numero relativamente elevato di eventi apoptotici, quali il timo e il tratto gastrointestinale. Nel sistema nervoso centrale, il GD3 è debolmente espresso nel tessuto adulto del cervello, mentre risulta maggiormente espresso nelle cellule microgliali attivate o in quelle reattive dell'astroglia. Nel corso della oligodendrogenesi, il GD3 è espresso sulle cellule precursori, ma manca quasi del tutto negli oligodendrociti dell'adulto. Incrementati livelli di GD3 sono stati riscontrati in tessuti di cervello provenienti da pazienti affetti da varie patologie neurodegenerative, quali la sclerosi multipla, la sindrome di Creutzfeld-Jacob e la panencefalite sclerosante subacuta. Inoltre, aumentate concentrazioni di GD3 nel liquido cefalorachidiano sono state riscontrate in pazienti HIV positivi ed in alcuni casi di sclerosi multipla.

Abbiamo quindi deciso di studiare la sensibilità degli oligodendrociti di embrioni murini ai ganglioside GD3 in considerazione del fatto che 1) il GD3 è in grado di indurre apoptosi in cellule ematopoietiche; 2) il GD3 è un marcatore dell'attivazione delle cellule microgliali; 3) esistono livelli più elevati di GD3 nel liquido cefalorachidiano di alcuni pazienti affetti da sclerosi multipla. Abbiamo così osservato che il GD3 induce apoptosi *in vitro* nella maggior parte degli oligodendrociti primari in un minimo di 12 ore ed in modo dose-dipendente. Al contrario, altri gangliosidi di controllo quali GD1a e GD1b non sono in grado di indurre apoptosi confermando la specificità del segnale apoptotico di GD3 sugli oligodendrociti. Inoltre, i neuroni del cervelletto, ma anche le cellule microgliali e gli astrociti sembrano sostanzialmente GD3-resistenti. Quest'ultima osservazione suggerisce anche che nella glia di embrioni di topo, soltanto gli oligodendrociti sono sensibili al segnale apoptotico indotto dal disialoganglioside GD3 *in vitro*. Dal momento che le cellule microgliali attivate -abbondantemente presenti nelle lesioni di sclerosi multipla - esprimono e rilasciano GD3, è possibile che in tale patologia, il GD3, presentato o rilasciato dalle cellule microgliali o dai linfociti T infiltranti, sia responsabile della perdita selettiva degli oligodendrociti.

In questa fase del lavoro, stiamo quindi caratterizzando la provenienza e la natura del segnale apoptotico indotto da GD3 ed il suo possibile ruolo nella patogenesi delle lesioni cerebrali in corso di sclerosi multipla.

## ROLE OF FAS/FAS LIGAND-INDUCED OLIGODENDROCYTES CELL DEATH IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

B. Simon<sup>(a)</sup>, F. Malisan<sup>(b)</sup>, P. Nicotera<sup>(a)</sup>, M. Leist<sup>(a)</sup>, R. Testi<sup>(b)</sup>

<sup>(a)</sup>Dept. Molecular Toxicology and Biochemical Sciences, University of Konstanz, Germania

<sup>(b)</sup>Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università "Tor Vergata", Roma

Investigating the apoptotic signals which originate from Fas receptor, we have identified the disialoganglioside GD3 as a new lipid mediator in hematopoietic tumor cells. GD3, not only accumulates in hematopoietic cells after Fas cross-linking, but directly induces apoptosis in these cells.

The disialoganglioside GD3 is a minor ganglioside in most normal tissues, while it is also highly expressed in atherosclerosis and a variety of tumors, particularly of neuroectodermal origin such as melanomas. Moreover, GD3 is abundant in developing tissues and in adult tissues displaying relatively high apoptotic rates, such as the thymus and the gastrointestinal tract. In the central nervous system, GD3 is a minor ganglioside in normal adult brains but is expressed in activated microglia and in reactive astroglia. Interestingly, GD3 is found on precursor cells during oligodendrogenesis, while in normal adult brain, no GD3 was found on oligodendrocytes. Increased GD3 expression has been found in brain tissue from patients with various neurodegenerative disorders, such as multiple sclerosis, Creutzfeld-Jacob disease, and subacute sclerosing panencephalitis. Moreover, GD3 concentration was increased in the cerebrospinal fluid of some multiple sclerosis cases and of HIV-infected subjects.

As 1) GD3 directly induces apoptosis in hematopoietic cells; 2) GD3 is a marker of microglial cells activation and 3) in some multiple sclerosis patients, elevated levels of GD3 are found in the cerebrospinal fluid, we decided to test whether GD3 could be an apoptotic mediator on murine oligodendrocytes. We could then show that GD3 induces apoptosis *in vitro* of most of the primary oligodendrocytes in a dose-dependent manner, in only 12 hours. On the contrary, other control gangliosides such as GD1a or GD1b were not able to induce apoptosis confirming GD3 apoptotic signal specificity onto oligodendrocytes. Moreover, microglial cells, astrocytes and cerebellar granule neurons are substantially resistant to GD3. This suggests that within murine embryonic glia, only oligodendrocytes seem to be sensitive to the GD3 apoptotic signal *in vitro*.

Activated microglial cells, highly present in multiple sclerosis lesions, express and release GD3. GD3 could then be responsible for the selective oligodendrocytes loss. We are now investigating the origin and the nature of the apoptotic signals induced by GD3 in the cerebral lesions of multiple sclerosis.

## CARATTERIZZAZIONE DEGLI ASPETTI MOLECOLARI NECESSARI PER IL TRASFERIMENTO PASSIVO DELL'ENCEFALITE AUTOIMMUNE SPERIMENTALE (EAE) IN PRIMATI NON-UMANI

A. Uccelli (a), H. Brok (b), E. Capello (a), R. Bontrop (b), D. Giunti (a), M. Vergelli (c), G.L. Mancardi (a), A. Ben-Nun(d), M. Abbruzzese (a), B. 't Hart (b)

(a) Dipartimento Scienze Neurologiche, Genova

(b) Department of Immunobiology, BPR Centre, Rijswijk, The Netherlands

(c) Dipartimento Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Firenze

(d) Department of Immunology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

Lo scopo di questo studio era di analizzare le basi molecolari della risposta autoimmunitaria verso antigeni mielinici responsabili della demielinizzazione e dell'infiammazione a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC) del common marmoset *Callithrix jacchus* (*C. jacchus*). Tali informazioni sono necessarie alla caratterizzazione funzionale del potenziale encefalitogenico di linfociti T auto-aggressivi attraverso esperimenti di trasferimento passivo tra individui geneticamente compatibili. E' opinione comune che l'EAE nel marmoset sia il risultato di un attacco autoimmunitario sinergico di una componente cellulare ed umorale diretto principalmente contro due delle principali proteine mieliniche, la proteina basica della mielina (MBP) e la glicoproteina mielinica degli oligodendrociti (MOG). Abbiamo pertanto studiato il ruolo della risposta alla MBP e alla MOG nei meccanismi patogenetici dell'EAE. Dopo immunizzazione con mielina in toto o con singole proteine mieliniche è possibile ottenere una EAE con diversi fenotipi. Dal momento che la MOG, a differenza dell'MBP, è il target sia di una risposta immunitaria cellulare che umorale in grado di determinare sia infiammazione che demielinizzazione, abbiamo concentrato la nostra attenzione sul ruolo della MOG nella patogenesi dell'EAE. A questo scopo abbiamo selezionato tre coppie di gemelli di marmoset. Il sistema immunitario di una coppia gemellare di marmoset è altamente simile e tollerante nei confronti gemello dal momento che questi animali nascono in una condizione di chimerismo dovuta alla condivisione in utero della circolazione placentare. Nell'ambito di ciascuna coppia di animali, un individuo è stato immunizzato con MBP mentre l'altro con MOG ricombinante. I nostri risultati hanno evidenziato che tutti gli animali immunizzati con MOG sviluppano EAE, mentre l'immunizzazione con MBP non è risultata encefalitogenica. Negli animali immunizzati con MOG, la risposta anticorpale è prevalentemente diretta verso gli aminoacidi 4-33 e 44-76, mentre linfociti T specifici per MOG riconoscono, come epitopo immunodominante, la sequenza 14-36. La risposta verso questo determinante encefalitogenico è ristretta da un allele monomorfo, *Caja-DRB\*W1201*, condiviso da tutti i marmoset. Questi dati suggeriscono che questo meccanismo di restrizione della risposta cellulare T mediato da un'unica molecola DRB1 presente su tutti gli animali esaminati potrebbe stare alla base dell'alta suscettibilità (100%) del marmoset all'EAE e potrebbe rappresentare un possibile meccanismo attraverso cui i geni dell'MHC determinano la suscettibilità alle malattie. Abbiamo quindi confrontato le caratteristiche neuropatologiche degli animali immunizzati con MOG e con MBP con quelle di altri tre marmoset immunizzati con mielina in toto. La malattia indotta con mielina in toto e con MOG presenta aspetti simili ed è caratterizzata da infiammazione, demielinizzazione e danno assonale, dati non riscontrabili nella malattia indotta con MBP. La presenza di patologia assonale è stata dimostrata con esperimenti di immunistochimica con anticorpi monoclonali anti-amyloid precursor protein e anti-neurofilamenti non fosforilati nell'ambito di aree di demielinizzazione attive/recenti.

Questi dati suggeriscono che il danno assonale potrebbe rappresentare un evento precoce nella patogenesi delle malattie demielinizzanti del SNC e sottolineano l'importanza di poter disporre di un modello animale nel quale possano essere studiate terapie mirate al riparo del danno assonale e alla sopravvivenza dell'assone.

## PASSIVE TRANSFER OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS (EAE) IN NON-HUMAN PRIMATES: MOLECULAR BASIS FOR SUCCESSFUL INDUCTION OF DISEASE

A. Uccelli (a), H. Brok (b), E. Capello (a), R. Bontrop (b), D. Giunti (a), M. Vergelli (c), G.L. Mancardi (a), A. Ben-Nun (d), M. Abbruzzese (a), B. 't Hart (b)

(a) *Dipartimento Scienze Neurologiche, Genova*

(b) *Department of Immunobiology, BPR Centre, Rijswijk, The Netherlands*

(c) *Dipartimento Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Firenze*

(d) *Department of Immunology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*

The aim of this proposal was to dissect the molecular basis of the autoimmune response to myelin antigens which lead to a demyelination and inflammation within the central nervous system (CNS) of the common marmoset *Callithrix jacchus* (*C. jacchus*). These information will allow to functionally characterize the encephalitogenic potential of autoreactive T-cells as can be demonstrated by means of passive transfer experiments between compatible siblings. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in marmosets is thought to result from the synergy of cellular and humoral autoimmune factors which are predominantly directed to two myelin antigens, namely myelin basic protein (MBP) and myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). Thus, we focus on the contribution of the autoimmune response to MOG and to MBP in the disease process leading to EAE. Following immunization with whole myelin or single myelin proteins EAE with different phenotypes can be obtained. Since MOG, in contrast to MBP, is the target of both a cellular and humoral immune response which leads to inflammation and demyelination, we dissected the role of MOG in EAE pathogenesis. For this purpose, three marmoset twin couples were selected. The immune systems of twin siblings can be regarded as highly similar as they are complete bone marrow chimeras due to the sharing of the placental blood stream *in utero*. Of each twin, one sibling was immunized with purified MBP and the other with recombinant MOG both in CFA. The results show that all MOG-immunized monkeys develop severe demyelinating EAE, whereas MBP was non-encephalitogenic. B cell responses in MOG-immunized animals were predominantly directed to amino acids 4-33 and 44-76. T cells from these animals preferentially recognized one immunodominant epitope (aa24-36). The response to this encephalitogenic determinant is restricted exclusively by the monomorphic *Caja-DRB\*W1201* molecule shared by all marmosets. These findings suggest that susceptibility to EAE may be linked to this unique restriction and provide a possible mechanism for MHC linkage to diseases.

In order to characterize the pathological picture of animals immunized with different antigens, we analyzed the brain and spinal cord of the animals immunized with MOG, MBP and in three other marmosets immunized with whole myelin homogenate. Inflammation, sharp demyelination and axonal damage was present in EAE induced with whole myelin as well as with recombinant MOG, but not with MBP alone. The presence of axonal pathology was supported by immunohistochemistry with anti-amyloid precursor protein and anti-non phosphorylated neurofilaments monoclonal antibodies within early active demyelinated plaques. These findings suggest that axonal damage may be an early event in the pathogenesis of autoimmune demyelinating diseases of the CNS and highlights the importance of animal models in which therapies targeting repair and axonal survival may be exploited.

## ATTIVATORI DISTALI DEL GENE MBP NEGLI OLIGODENDROCITI E NELLE CELLULE DI SCHWANN

A. Pizzagalli (a), C. Taveggia (a), E. Fagiani (a), M.L. Feltri (a), A. Peterson (b), A. Messing (c), L. Wrabetz (a)

(a) *DIBIT, IRCCS San Raffaele, Milano*

(b) *Dept. Molecular Oncology, McGill University, Canada*

(c) *Dept. Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, USA*

Nelle fasi iniziali della Sclerosi Multipla gli episodi di demielinizzazione nel cervello e nel midollo spinale sono seguiti da eventi di rimielinizzazione, ma dopo ripetuti danni la capacità degli oligodendrociti (OL) di rimielinizzare si esaurisce. La rimielinizzazione è più efficace nel nervo periferico che nel cervello e nel midollo spinale, in parte questo può riflettere differenze nella capacità degli OL e delle cellule di Schwann (SC) di trascrivere i geni mielinici in risposta ai danni. La proteina basica della mielina (MBP) viene sintetizzata sia dagli OL nel cervello e midollo spinale sia dalle SC nei nervi periferici, ciò offre un'opportunità per identificare tali differenze. La sintesi di MBP è necessaria per la mielinogenesi, e presumibilmente per la rimielinizzazione nel cervello. L'espressione di MBP è regolata principalmente a livello trascrizionale. Tuttavia, i fattori nucleari che attivano la trascrizione di MBP non sono ancora noti.

Abbiamo precedentemente mostrato che gli OL e le SC usano serie differenti di siti di 'DNA binding' e di proteine per attivare la trascrizione nel promotore prossimale di MBP. Di recente, noi ed altri abbiamo identificato attivatori distali del gene MBP che funzionano negli OL e SC in topi transgenici. Peterson e coll. hanno identificato un elemento enhancer di 588 bp che si trova a 9.6 Kb a monte del gene MBP murino che è necessario per attivare l'espressione del gene reporter *lacZ* nelle SC, mentre noi ed altri abbiamo mostrato che più piccole regioni del promotore prossimale di MBP sono sufficienti per attivare l'espressione di *lacZ* negli OL. Inoltre, i nostri studi hanno anche dimostrato che sono necessari altri elementi, ancora ignoti, per una trascrizione quantitativa di MBP nel cervello.

Per identificare elementi distali rilevanti del gene MBP che agiscono negli OL e SC, abbiamo analizzato mediante trasfezione transiente una serie di delezioni progressive del promotore murino di 9.6 Kb di MBP fuso al gene reporter della luciferasi. Abbiamo trovato che la regione in 5' di 9.6 Kb di MBP è sufficiente per attivare l'attività luciferasica di 200 volte in colture di OL, 27 volte in colture di SC, ma non in molte altre cellule. L'analisi per delezione ha mostrato che dal 50% al 70% dell'attivazione dipende dalle sequenze poste fra 9.6 e 9.0 Kb a monte di MBP sia per gli OL che per le SC. Tuttavia, la regione di 588 bp si comporta come un enhancer solo nelle SC. Infatti, quando fusa in entrambe le orientazioni o al promotore prossimale di MBP o al promotore eterologo TK, questa regione non aumenta il livello basale di trascrizione di questi promotori negli OL, mentre, quando fusa in entrambe le orientazioni ai promotori eterologhi o di gene mielinico P0 o TK, questa regione attiva entrambi i promotori di 3-4 volte nelle SC. Questi risultati sono coerenti con quelli trovati nei topi transgenici di Peterson et al., dove il frammento di 588 bp fuso in entrambe le orientazioni al promotore eterologo della proteina heat shock 68 attiva il gene reporter *lacZ* solo nelle SC, ma non negli OL. Noi concludiamo che la sequenza di 588 bp è un importante attivatore trascrizionale del gene MBP, gene espresso in modo specifico negli OL e nelle SC, ma solo nelle SC funziona come un enhancer. Inoltre, la nostra analisi di trasfezione in colture di OL e SC, avvalorata dall'analisi in

vivo, può costituire un modello più conveniente e rapido per effettuare un'analisi per mutagenesi della funzione attivante.

Per confermare che questa regione potrebbe funzionare da enhancer con un promotore eterologo mielinico nei topi transgenici, abbiamo dapprima caratterizzato il livello basale del trasgene mP0TOT, costituito dal gene mielinico P0 fuso al gene reporter *lacZ*, la sua espressione è ristretta appropriatamente alle SC mielinizzanti nei nervi periferici in via di sviluppo. A 5 giorni dopo la nascita (P5), la sua espressione era scarsamente rilevabile, mentre già a P5 il frammento di 9.6 Kb del promotore MBP, che contiene la regione con attività enhancer, attiva ad alti livelli l'espressione di *lacZ* nei topi transgenici. Perciò, abbiamo creato linee di transgenici con il frammento di 588 bp clonato a monte di mP0TOT. La progenie verrà analizzata per l'espressione di *lacZ* nei nervi durante le prime due settimane di vita e comparata con le linee di mP0TOT. Questi esperimenti determineranno se l'enhancer contiene elementi di DNA in grado di aumentare in modo coordinato l'espressione di differenti geni mielinici.

L'analisi della sequenza dell'enhancer di 588 bp ha mostrato la presenza di numerosi 'binding sites' associati con fattori trascrizionali conosciuti. L'analisi per mobility shift aveva mostrato che proteine nucleari del cervello e delle SC legano sequenze in questa regione di 588 bp, sebbene i legami avessero specificità cellulare diversa. Perciò abbiamo mappato l'intero enhancer di 588 bp mediante analisi di DNase I footprint e ristretto i possibili binding sites a due classi: quelli che sono protetti solo da estratti di SC, ma non di cervello o di fegato; e quelli che sono protetti solo da estratti di cervello, ma non di SC o di fegato. Il legame differenziale di sequenze entro la regione di 588 bp da parte di proteine di SC e OL è consistente con la differente funzione che abbiamo trovato mediante l'analisi per trasfezione. Un'analisi al computer di queste sequenze ha rivelato parecchi interessanti fattori trascrizionali; per uno di questi è già stato ipotizzato un ruolo nell'attivare la mielinizzazione, ed è farmacologicamente accessibile. Questi candidati saranno ora identificati mediante supershift analisi usando anticorpi specifici.

In conclusione abbiamo sviluppato utili e validi modelli per studiare la funzione degli attivatori distali del gene MBP, sia in vitro che in vivo. Un'analisi preliminare dimostra che la regione di 588 bp è un attivatore della trascrizione di MBP sia negli OL che nelle SC, ma è un enhancer solo nelle SC, perciò può funzionare con promotori eterologhi, inclusi promotori dei geni mielinici. L'analisi biochimica conferma questa funzionale differenza fra OL e SC, poichè le sequenze legate dai fattori trascrizionali differiscono fra i due tipi cellulari. La caratterizzazione dei possibili fattori trascrizionali potrà fornire bersagli farmacologici per migliorare la rimielinizzazione come una strategia complementare alla prevenzione di ulteriori danni infiammatori dopo l'iniziale demielinizzazione nella Sclerosi Multipla.