

## PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES AND MYELIN PRODUCING CELLS

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

Initial experiments (Brogi et al. J. Cell. Bioch. 66, 532, 1997) have shown that IL-1 $\beta$  increases the level of endogenous ceramide in cultured oligodendrocytes activating the sphingomyelin pathway that mediates the effect of several extracellular agents leading to important biochemical and cellular changes. We have analyzed the pathway activated by ceramide in differentiated oligodendrocytes and found a pattern of gene expression very similar to that described in proliferating cells. 1. c-Myc maximum induction is reached after 4hr. of treatment with ceramide 2. CDC25A, initially present in the cytoplasm, translocates into the nucleus, 3hr. after addition of ceramide. 3. PCNA (proliferating cell nuclear antigen), a protein involved in DNA repair and/or DNA synthesis, is also induced, as indicated by the presence of the antigen in the cell nucleus. All these intermediates are found both in the process of cell growth and cell death. On the contrary long term exposure (72h) to increasing concentrations of IL-1 $\beta$ , which increases intracellular ceramide, does not induce oligodendroglial cell death. These results show that an increase of intracellular ceramide is not sufficient to induce apoptosis in oligodendrocytes, and that IL-1 $\beta$  signaling through the ceramide pathway in these cells can mediate functions other than programmed cell death.

Recently, Blasi et al.(1999) have shown that IL-1 $\beta$  is constitutively expressed in progenitor and differentiated oligodendrocytes from a primary culture and *in vivo*, in brain hemispheres of 1-4 days old and adult rats. In addition to the well described functions in the inflammatory process, IL-1 $\beta$  has pleiotropic effects and a role during oligodendrocyte growth and differentiation can not be excluded. To better understand the role of IL-1 $\beta$  in oligodendrocytes, we have inhibited IL-1 with the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), and the ICE inhibitor 1. Addition of either inhibitors to oligodendrocyte progenitors does not affect the cells, while their addition to oligodendrocytes at the beginning of differentiation (from 4 to 18 hr), induces cell death. The specificity of the inhibitor's effect is shown by experiments where an excess of IL-1 $\beta$  was added to the inhibitors. Such addition rescues the cells from death. The effect of IL-1Ra shows that, in oligodendrocytes, IL-1 $\beta$  interacts with its receptor to fulfill the function. The effect of the ICE antagonist shows that the IL-1 $\beta$  synthesized by the oligodendrocytes, is released from the cell, and interacts with the homologous receptor to form an autocrine loop.

In order to clarify the signal transduction pathway of IL-1 $\beta$  in oligodendrocytes we have utilized the yeast two hybrid system. A cDNA library, containing, before amplification, approximately ten million independent recombinant clones, is under screening and the positive cDNAs are under scrutiny.

The pattern of gene expression induced in oligodendrocytes by IL-1 $\beta$ , was analyzed utilizing the Representation Difference analysis technique (RDA). The RDA technique was described in the 1997 report. The sequencing of 50 randomly chosen clones resulted in the isolation of 6 independent recombinant cDNAs, highly represented in the library. The sequences correspond to already described cDNAs, i.e., vimentin, L3 ribosomal protein, EF2, dynein heavy chain, RACK 1 and Hsp90. To get rid of the most frequent clones, we have hybridized probes from the selected cDNAs to 12000 colonies of the library. Approximately 99% of the colonies were positive,

confirming the enrichment for these sequences obtained with the RDA. The remaining colonies were all sequenced, and matched the following cDNAs: the ribosomal proteins S3a, L23a, P0, L15, and L19; the  $\alpha$  subunit of the p55 GTP binding protein, the p45 proteosomal ATPase, nixin, HIP1 (Huntingtin interacting protein) and a number of cDNA recombinants not yet described, named clone 11, 95, 96, 254, 279 and 288. The recombinant probes were hybridized to northern blots of RNA from progenitor and differentiated oligodendrocytes. The quantitative analysis of the hybridization bands shows that the mRNAs corresponding to the cloned sequences are all enriched for, within the progenitor mRNA population. To confirm the differential expression *in vivo* during the development of the CNS, the same probes were hybridized to northern blots of poly-A+ RNA from brain stem and cerebral hemispheres of adult animals and newly borned rats, at different stages of brain development. The results are in agreement with those obtained with RNA from the primary culture of oligodendrocytes.

The hybridization of clone 288 to the cerebral hemispheres identifies two mRNA bands migrating at the position of approximately 1200 and 1800 bases, both decreasing with the age of the animals, with a minimum in adult rats. For the full characterization of the structure and the function of the newly discovered RNAs, we are now isolating the complete sequences, utilizing the RT-PCR technique.

**Conclusions.** Our results show, for the first time, the constitutive expression of the IL-1 $\beta$  gene and protein in progenitor and differentiated oligodendrocytes *in vivo* and *in vitro*, indicating an essential role of the cytokine at the beginning of oligodendrocyte differentiation. The functional studies are still in progress and should be completed by the cloning of the IL-1 receptor interacting protein(s) through the yeast two hybrid system. The RDA technique has provided information on the nature of the specific mRNAs expressed in progenitor oligodendrocytes. Furthermore, this approach has allowed the identification of new mRNA sequences that are under scrutiny from a functional and structural viewpoint.

## LOCALIZZAZIONE CELLULARE E GENICA DELL'HUMAN HERPESVIRUS-8 NELLE PLACCHE DEI PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI MULTIPLA

E. Merelli (a), P. Sola (a), R. Bedin (a), M. Cavazzuti (a), P. Barozzi (b)

(a) Dipartimento di Patologia Neuropsicosensoriale, Sezione di Neurologia, Università degli studi di Modena

(b) Dipartimento di Medicina Interna, sezione di Ematologia, Università degli studi di Modena

Negli ultimi anni nuovi studi (Challoner PB et al, 1995, PNAS 92:7440-44; Soldan SS et al, 1997, Nature Medicine 3:1394-97) hanno riproposto i virus herpetici quali fattori determinanti lo sviluppo della sclerosi multipla (SM) o quali agenti promotori delle fasi di ricaduta di malattia.

Sequenze genomiche appartenenti ad un nuovo herpesvirus umano, chiamato virus del sarcoma di Kaposi o HHV-8, sono state identificate nei tessuti di pazienti con AIDS, con e senza sarcoma (Chang Y et al, 1994, Science 266:1865-69). Il sequenziamento di questo virus ha rivelato una sua estesa omologia genomica con l'herpesvirus saimiri (HVS) e in minor grado con il virus di Epstein-Barr (EBV). Dati epidemiologici e sierologici indicano che l'infezione da HHV-8 non è comune nella popolazione sana, mentre è discretamente diffusa in pazienti con patologia disimmune quali linfomi, AIDS, trapianti.

Dal momento che le cellule T CD4+ e B CD19+ sono considerate il bersaglio principale dell'HHV-8 e che l'attivazione dei linfociti è cruciale per lo sviluppo della SM, abbiamo ritenuto opportuno studiare il possibile ruolo dell'HHV-8 nella patogenesi e nello sviluppo della SM. Dati sulla presenza di anticorpi anti HHV-8 nella popolazione sana del Nord Italia indicano una prevalenza di 7,3% (Whitby D et al, 1998, J Natl Cancer Inst 90:395-97). Abbiamo esaminato il siero di 66 pazienti affetti da SM mediante immunofluorescenza (IFA) (ABI Advanced Biotechnologies Incorporated, Columbia, Maryland) riscontrando una positività di 5 casi (7,5%), gli stessi sieri sono stati riesaminati con metodica ELISA (ABI Advanced Biotechnologies Incorporated, Columbia Maryland) che ha confermato la positività di 5 casi di cui 1 discordante.

Sono stati esaminati, mediante reazione polimerasica a catena *nested* (nPCR), campioni di DNA estratti da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di **63** pazienti affetti da SM e di **20** soggetti sani e il liquido cerebrospinale di **34** pazienti con SM in fase di ricaduta. I campioni di DNA estratti da PBMC di pazienti con SM non contenevano sequenze genomiche di HHV-8 così come i campioni normali, analogamente tutti i campioni liquorali sono risultati negativi per l'HHV-8.

Inoltre è stato esaminato il DNA estratto da tessuti autoptici cerebrali e midollari (placche, sostanza bianca perilesionale e sostanza grigia) di **17** casi di SM, **1** caso di neuromielite ottica (NMO) e campioni cerebrali di **13** adulti deceduti per cause traumatiche e di **7** neonati deceduti alla nascita, come controllo. I primers e i probes utilizzati per l'HHV-8 sono descritti in letteratura (Merelli et al 1997, J Neurol 244:450-54). Dei campioni cerebrali e midollari dei casi di SM esaminati **5/17** contenevano sequenze genomiche di HHV-8, mentre il caso di NMO risultava negativo. Dei tessuti cerebrali di adulti normali **3/13** furono positivi per HHV-8 così come **2/7** dei campioni cerebrali di neonati.

Il fatto che non si trovi materiale genetico virale appartenente all'HHV-8 nei PBMCs e nei campioni liquorali dei pazienti affetti da SM, mentre lo si ritrova in numerosi campioni di tessuti del sistema nervoso centrale sia di soggetti malati che normali (adulti e bambini), indica che questo herpesvirus è dotato di forte neurotropismo sia per l'encefalo che per il midollo. Allo scopo di stabilire se anche l'HHV-8, così come l'HHV-6 (Luppi M et al, 1993, J Med Virol 40:44-52), sia integrato nel genoma della cellula ospite e in particolare nell'oligodendrocita e di indagare l'influenza di una infezione latente di questo virus sui meccanismi di comparsa e riattivazione della malattia, si è iniziato ad esaminare i campioni di tessuti nervosi positivi per l'HHV-8, con la metodica di microdissezione (3D MO-188NE, Narishighe-Japan). Questa tecnica ci consente di prelevare l'oligodendrocita precedentemente individuato con anticorpi monoclonali, e di eseguire la nPCR per l'HHV-8 sulla singola cellula.

## CELLULAR AND GENOMIC LOCALIZATION OF HUMAN HERPESVIRUS-8 IN THE PLAQUES OF MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

E. Merelli (a), P. Sola (a), R. Bedin (a), M. Cavazzuti (a), P. Barozzi (b)

(a) Dipartimento di Patologia Neuropsicosensoriale, Sezione di Neurologia, Università degli studi di Modena

(b) Dipartimento di Medicina Interna, sezione di Ematologia, Università degli studi di Modena

In the last years some studies (Challoner PB et al, 1995, PNAS 92:7440-44; Soldan SS et al, 1997, Nature Medicine 3:1394-97) proposed newly discovered herpes viruses as promoter of multiple sclerosis (MS) development and in particular of the relapses.

DNA sequences of a new human herpes virus, named Kaposi Sarcoma virus or human herpes virus 8 (HHV-8), has been identified in the Kaposi's sarcoma tissues from patients with AIDS (Chang Y et al, 1994, Science 266:1865-69) and in benign lymphadenopathy; up to date HHV-8 is the eighth human herpes virus discovered. The HHV-8 sequence analysis data showed partial homology to herpes virus saimiri (HVS) and, to less extent, to Epstein Barr virus (EBV) genome.

Since the virus is present mainly in the immunocompromized patients like Castelman's lymphoma, AIDS and transplanted subjects and since CD4+ T cells and CD19+ B cells are thought to be the natural target cells of HHV-8, we thought it worthwhile to investigate the possible role of HHV-8 in the pathogenesis and development of MS. The serum prevalence of antibodies (ab) against HHV-8 in the healthy population of northern Italy is of 7,3% (Whitby D et al, 1998, J Natl Cancer Inst 90:395-97). We tested the sera of 66 MS patients by IFA (ABI Advanced Biotechnologies Incorporated, Columbia, Maryland) and the same sera were re-tested by ELISA (ABI Advanced Biotechnologies Incorporated, Columbia, Maryland) for control. Both assays evidenced 5/66 positive cases (7,5%) with 1 discordant case, thus demonstrating the same seroprevalence in MS and general population.

Moreover, we examined by nested polymerase chain reaction (nPCR) DNAs extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 63 patients of MS and 20 normal subjects, as well as the cerebral spinal fluid (CSF) of 34 patients. All the DNAs from PBMCs and the CSF samples were devoid of genomic sequences belonging to HHV-8.

We decided to continue the study by mean nPCR of autopic cerebral and spinal tissue samples from MS and control cases. 17 MS (plaques, peri-lesional white and gray matter), 1 case of neuromyelitis optica (NMO), brain tissue from 13 normal subjects and 7 from still born children were tested for HHV-8, using primers and probes as described in literature (Merelli et al 1997, J Neurol 244:450-54). 5/17 MS brain contained sequences of HHV-8 in the plaques or in the gray matter or in both, while NMO brain and spinal cord were negative. In the control tissues the virus was present in 2/7 infant brains and in 3/13 adult brains.

The same seropositivity for HHV-8 ab in MS and healthy population, the discrepancy between the absence of HHV-8 in the PBMCs and the CSF of all the MS and the presence of the same herpes virus in many of the brain and spinal cord specimens, reflect the fact that the virus is strongly neurotropic and that it may reside latent in many regions of the brain and the spinal cord.

To investigate the possible integration of HHV-8 in specific cellular sites particularly in the oligodendrocyte, may be of crucial importance in understanding the cell-virus relations and the clinical consequences of the infection; in fact, the integration may alter the expression of host cell protein directly or through the transactivation of other viral, retroviral, or cellular genes.

To this aim we initiated to examine the tissue samples positive for HHV-8 by means of the technique of micromanipulation (3D MO-188NE, Narishighe-Japan). This method allows to us to dissect and pick up the oligodendrocyte, previously identified with a monoclonal ab, and to perform the nPCR directly in the single cell.

## STUDI SULL'INDUZIONE DELLA VIA NITRIDERGICA E DELLE CHINURENINE NELL'ENCEFALOMIELITE ALLERGICA DEL RATTO

A. Chiarugi (a), A. Cozzi(a), E. Meli(a), C. Ballerini(b), E. Traggiai(b), B. Mazzanti(b), L. Massacesi(b),  
F. Moroni (a)

(a) Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università degli Studi, Firenze

(b) Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Università degli Studi, Firenze

Il rilascio di fattori citotossici derivante dall'attivazione dei fagociti mononucleati sembra possa svolgere un importante ruolo nella patogenesi del danno al parenchima neuronale in corso di sclerosi multipla (SM). Una volta stimolati da citochine attivanti come l'interferone  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), il tumor necrosis factor  $\alpha$  e l'interleuchina 1, le cellule monocito-macrofagiche periferiche o residenti nel sistema nervoso centrale sono in grado di indurre l'espressione della nitrossido (NO) sintetasi inducibile (iNOS) e di produrre grandi quantità di NO, un radicale dell'azoto altamente reattivo probabilmente implicato nei processi di demielinizzazione. Nelle stesse cellule, contemporaneamente all'induzione della via nitridergica, viene indotto anche il catabolismo del triptofano attraverso la cosiddetta "via delle chinurenine", con formazione di nucleotidi piridinici, cofattori essenziali al metabolismo ossidoriduttivo della cellula. Quali prodotti intermedi della via della chinurenine, si vengono a formare due composti dotati di proprietà neurotossiche: la 3-idrossichinurenina (3OHKYN, in grado di provocare morte neuronale apoptotica) e l'acido chinolinico (QUIN, un'eccitotossina agonista del recettore al glutammato di tipo NMDA). La sintesi di queste due neurotossine avviene grazie all'induzione di due enzimi della via delle chinurenine, l'indolamina dioxygenasi (IDO) e la chinurenina idrossilasi (KH). In base al fatto che il QUIN risulta aumentato nella encefalomielite allergica sperimentale del ratto (EAS, un modello di SM) e che inibitori della sintesi di NO sembrano ridurre la gravità dell'EAS stessa, è stato proposto che queste due neurotossine possano essere implicata nella patogenesi della SM.

Alla luce di quanto sopra, abbiamo voluto valutare il grado di induzione della via nitridergica e delle chinurenine nell'EAS del ratto. In questi animali, l'attività IDO aumentava nel midollo spinale e nel cervello rispettivamente da  $6,6 \pm 2$  a  $12 \pm 3$  e da  $2,2 \pm 0,6$  a  $3,3 \pm 0,6$  pmol/mg prot/min. L'attività KH aumentava nel midollo spinale da  $12 \pm 2$  a  $27 \pm 5$  6 pmol/mg prot/min e nel cervello da  $10 \pm 4$  a  $14 \pm 3$  pmol/mg prot/min. I contenuti di 3OHKYN aumentavano da  $0,4 \pm 0,2$  a  $5 \pm 0,5$  e da  $0,6 \pm 0,2$  a  $1,6 \pm 0,7$  nmol/gr rispettivamente nel midollo spinale e nel cervello. Analogamente, i contenuti di QUIN nel midollo spinale erano aumentati di circa 50 volte ripetuto ai controlli (da  $13 \pm 4$  a  $602 \pm 154$  pmol/gr) mentre nel cervello si rilevavano aumenti di solo 2.5 volte rispetto ai controlli (da  $3,1 \pm 0,3$  a  $7,3 \pm 1,5$  pmol/gr). Al contrario, i livelli ematici di 3OHKYN e QUIN non subivano variazioni in seguito all'induzione dell'EAS. Il 3,4-dimethoxy-[N-4-(3-nitrophenyl) thiazol-2-yl]-benzenesulfonamide (Ro 61-8048), un inibitore sellettivo della KH, somministrato *i.p.* nei ratti con EAS 15h e 3h prima del sacrificio, era capace di ridurre gli incrementi di 3OHKYN nel midollo spinale del 42% (alla dose di 100 mg/kg) e 77% (alla dose di 300 mg/kg). Allo stesso modo i contenuti spinali di QUIN si riducevano del 67% (alla dose di 100 mg/kg) e dell'85% (alla dose di 300 mg/kg). Ancora una volta, i contenuti ematici di 3OHKYN e QUIN non venivano alterati dal trattamento con Ro 61-8048. Nei ratti con EAS l'induzione della via nitridergica e delle chinurenine è stata valutata anche con tecniche di immuno-blot e di immunoistochimica. Entrambe le tecniche hanno rivelato un notevole aumento dell'espressione sia della iNOS che della KH nel midollo spinale ma non nel cervello. Inoltre, le cellule che esprimevano la KH e la iNOS presentavano anche antigeni di istocompatibilità di classe II°, rivelando la loro natura immunitaria ed il loro stato attivato. Al contrario, tali cellule non esprimevano la glioproteina fibrillare acida, tipico marker astrocitario. Nel midollo spinale o nel cervello dei ratti controllo non si rilevava l'espressione di livelli basali di KH e iNOS.

In seguito abbiamo voluto verificare l'ipotesi che le concentrazioni di QUIN misurate nei midolli dei ratti con EAS potessero essere sufficienti a causare morte neuronale. Per questo abbiamo esposto colture di neuroni corticali primari di ratto per 48 h alla tossina in un range di concentrazioni di 0.1-1  $\mu\text{M}$ . I risultati hanno dimostrato che il QUIN era effettivamente neurotossico e che tale tossicità poteva essere prevenuta da un antagonista del recettore NMDA (APV 100  $\mu\text{M}$ ), inibitori della NOS (nitroindazolo e tiocitrullina 10  $\mu\text{M}$ ) e inibitori della poli-ADP riboso polimerasi (piperidinyl-butoxy-isoquinolinone 10  $\mu\text{M}$ ).

Nel complesso i nostri dati dimostrano che nel midollo spinale di ratti con EAS si verifica una marcata induzione della via nitridergica e delle chinurenine con produzione di concentrazioni neurotossiche di QUIN. Il Ro 61-8048, riducendo la sintesi e l'accumulo di questa neurotossina, potrebbe prevenirne gli effetti tossici.

Nel corso degli studi compiuti nell'ambito del II° progetto di ricerca sulla sclerosi multipla dell'Istituto Superiore di Sanità, il nostro obiettivo è stato quello di analizzare gli aspetti tossici della sintesi di alcuni composti di origine macrofagica derivanti dal triptofano e dall'arginina. I nostri risultati dimostrano che le cellule monocito-macrofagiche sono in grado di sintetizzare grandi quantità di NO, 3OHKYN e QUIN, e che quest'ultimo, in un modello sperimentale di SM, raggiunge concentrazioni effettivamente neurotossiche. Allo scopo di ridurre la sintesi di questi metaboliti, abbiamo caratterizzato le proprietà del Ro 61-8048, inibitore della KH, e del norarmano, inibitore sia della KH che della iNOS. Le proprietà farmacologiche di tali molecole saranno oggetto di studio nel prossimo futuro.

## STUDIES ON THE INDUCTION OF THE NITRIDERGIC AND KYNURENINE PATHWAY IN RAT EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

A. Chiarugi (a), A. Cozzi(a), E. Meli(a), C. Ballerini(b), E. Traggiai(b), B. Mazzanti(b), L. Massacesi(b),  
F. Moroni (a)

(c) Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università degli Studi, Firenze

(d) Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Università degli Studi, Firenze

Mononuclear phagocytes may release toxic agents which are responsible for the central nervous system damage present in multiple sclerosis (MS). Under the effect of cytokines such as interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1, the inducible NO-synthase isoform (iNOS) is expressed in macrophages, leading to the induction of the nitridergic pathway and to the formation of nitric oxide (NO). This is a highly reactive radical which has been postulated to act as a primary agent of oligodendrocyte damage. In addition to the nitridergic pathway, the catabolism of tryptophan via the so-called "kynurenine pathway" is also induced, leading to the synthesis of pyridine cofactors (NAD and NADP) that are essential to the cellular red-ox metabolism. Some intermediate metabolites of this pathway are endowed with neurotoxic properties, *i.e.* 3-hydroxy-kynurene (3OHKYN, able to induce apoptotic neuronal death) and quinolinic acid (QUIN, capable of interacting with the NMDA-type glutamate receptors, thereby inducing excitotoxic neuronal death). The synthesis of these neurotoxic compounds results from the expression of two enzymes, namely indoleamine dioxygenase (IDO) and kynurenine hydroxylase (KH). It has been postulated that macrophage-derived NO, 3OHKYN and QUIN could play a pathogenetic role in MS. Indeed, the levels of QUIN are increased in rat experimental allergic encephalomyelitis (EAE, an experimental model of MS). Furthermore, the treatment with inhibitors of NO synthesis significantly ameliorates EAE symptoms.

In the present studies, we evaluated the induction of IDO and KH together with the synthesis of 3OHKYN and QUIN in the spinal cord, brain and blood of EAE-affected rats. IDO activity increased from  $6.6 \pm 2$  to  $12 \pm 3$  and from  $2.2 \pm 0.6$  to  $3.3 \pm 0.6$  pmol/mg prot/min in the spinal cord and brain, respectively. KH activity increased from  $12 \pm 2$  to  $27 \pm 5$  pmol/mg prot/min in the spinal cord and from  $10 \pm 4$  to  $14 \pm 3$  pmol/mg prot/min in the brain. 3OHKYN contents increased from  $0.4 \pm 0.2$  to  $5 \pm 0.5$  and from  $0.6 \pm 0.2$  to  $1.6 \pm 0.7$  nmol/gr in the spinal cord and brain, respectively. The contents of QUIN were increased 50 times over controls (from  $13 \pm 4$  to  $602 \pm 154$  pmol/gr) in the spinal cord, while only 2.5 times over controls (from  $3.1 \pm 0.3$  to  $7.3 \pm 1.5$  pmol/gr) in the brain. Conversely, no changes in 3OHKYN and QUIN contents were detected in the blood of EAE rats compared to controls. The effects of 3,4-dimethoxy-[N-4-(3-nitrophenyl)-thiazol-2-yl]-benzenesulfonamide (Ro 61-8048), a selective KH inhibitor, on the contents of 3OHKYN and QUIN were also investigated. When administered *i.p.* in EAE-affected rats at 100 and 300 mg/kg 15h and 3h before sacrifice, Ro 61-8048 reduced the spinal cord contents of 3OHKYN by 42% and 77%, respectively. Accordingly, QUIN contents were decreased by 67% and 85% with Ro 61-8048 100 and 300 mg/kg, respectively. The blood contents of 3OHKYN and QUIN were not affected by Ro 61-8048. With western blot and immunohistochemical techniques, a marked induction of KH and iNOS was revealed in the spinal cord but not in the brain of EAE-affected rats. KH and iNOS immunopositive cells also expressed MHC class II antigen, revealing their immune origin and their activated state. No expression of KH, iNOS and MHC class II antigen was revealed in the spinal cord and brain of control animals.

In another experimental setting, we investigated the possibility that the concentration of QUIN we measured in the spinal cord of EAE-affected animals (around 600 nM) could be able to

induce neuronal death. We found that primary cultures of cortical neurons died when exposed for 48 h at QUIN concentrations as low as 100 nM. The neurotoxic effect was prevented by either NMDA receptor antagonist (APV 100  $\mu$ M), NOS inhibitors (nitroindazole and thiocitrualline 10  $\mu$ M) and poly-ADP ribose polymerase inhibitor (piperidinyl-butoxy-isoquinolinone 10  $\mu$ M).

These results demonstrate that, in the spinal cord of EAE-affected rats, either the nitridergic and kynurenine pathway are induced in monocyteoid cells, resulting in an increased production of neurotoxins like NO, 3OHKYN and QUIN. Furthermore, this latter compound increased to levels sufficient to cause cell death in neuronal cultures. Ro 61-8048, by inhibiting KH, seems an effective tool to reduce QUIN formation, thus preventing its neurotoxic effect.

In the course of the studies funded by the Istituto Superiore di Sanità (2<sup>nd</sup> Multiple Sclerosis Research Project) we embarked upon experiments aimed at elucidating the role of neuroactive kynurenes in the damage of the central nervous system during MS. We demonstrated either with *in vitro* or *in vivo* experiments that monocyteoid cells were the main source of neurotoxins such as 3OHKYN and QUIN, as well as NO. Furthermore, in the spinal cord of EAE-affected rats macrophages were able to synthesize QUIN at concentrations sufficient to exert neurotoxicity *in vitro*. In order to limit the synthesis of these neurotoxins, we developed enzyme inhibitors like Ro 61-8048, a potent KH inhibitor, and norharmane, an inhibitor of both IDO and iNOS. These molecules could be useful tools in order to elucidate the role of activated macrophages in the pathogenesis of MS.

## EFFETTI DI MEDIATORI DELL'INFIAMMAZIONE SULL'ATTIVITA' CICLOSSIGENASICA ASTROCITARIA: INTERAZIONI, AZIONI DIFFERENZIALI SU COX-1 E COX-2, SISTEMI DI SECONDI MESSAGGERI COINVOLTI

G. Pistritto, G. Pozzoli, C. Mancuso, P. Preziosi, P. Navarra

*Istituto di Farmacologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

E' stato in precedenza da noi osservato che il lipopolisaccaride batterico (LPS) causa un aumento concentrazione-dipendente della produzione e rilascio di PGE2 da cellule astrocitarie dopo 24 ore di trattamento; questo effetto è in gran parte dovuto alla ciclossigenasi inducibile (COX-2), poiché esso è antagonizzato dal desametasone e da un inibitore specifico della COX-2, l'agente NS 398. E' possibile anche un coinvolgimento del fattore di trascrizione kB (NFkB), poiché inibitori di questo fattore, il dietilditiocarbamato (DDC) e l'aurotiomalato (ATM), antagonizzavano, almeno in parte, gli effetti dell'LPS sulla secrezione di PGE2. Sebbene sia noto che ATM e DDC hanno azione inibitoria su NFkB, tale azione non è specifica. Per dimostrare che gli effetti di ATM e DDC nel nostro paradigma sperimentale sono correlati all'inibizione di NFkB, nell'ultima parte del progetto di ricerca abbiamo condotto degli studi basati sulla metodologia dell'electrophoresis mobility shift assay (EMSA). Questo approccio permette di ottenere delle valutazioni semiquantitative dei livelli di NFkB attivato e translocato nel nucleo della cellula, ed anche eventuali effetti inibitori di antagonisti putativi. In effetti, trattamenti di 24 ore con LPS inducevano un forte aumento dei livelli di NFkB intranucleare. Questo aumento era abolito dal sale d'oro ATM, ma non era influenzato da DDC. Dunque, sebbene DDC abbia mostrato di essere più efficace di ATM nell'inibire la produzione di PG indotta da LPS, un'ordine di attività inverso emergeva dagli studi con EMSA, portando alla conclusione che, almeno nel nostro modello sperimentale, DDC antagonizza gli effetti di LPS sulla produzione di PG attraverso meccanismi indipendenti dall'inibizione di NFkB.

**EFFECTS OF INFLAMMATORY MEDIATORS ON CYCLO-OXYGENASE ACTIVITY  
IN ASTROCYTES: INTERACTIONS, DIFFERENCES BETWEEN COX-1 AND COX-2.  
SECOND MESSENGERS INVOLVED**

G. Pistrutto, G. Pozzoli, C. Mancuso, P. Preziosi, P. Navarra

*Istituto di Farmacologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

We have previously found that bacterial lipopolysaccharide (LPS) produce a concentration-dependent increase in PGE<sub>2</sub> release from astrocytes after 24-h treatments, this effect being mostly accounted for by inducible cyclo-oxygenase (COX-2), as the latter was markedly reduced by dexamethasone and the specific COX-2 inhibitor NS 398. Nuclear factor kB (NFkB) appeared to play a role in the activation of COX-2 induced by LPS, since certain inhibitors of this transcription factors, diethyldithiocarbamate (DDC) and aurothiomalate (ATM), were able to antagonize, at least in part, the effects of LPS on PGE<sub>2</sub> release. Although interference with NF-kB by ATM and DDC has been described, these agents lack specificity. Therefore, in the last part of the research project, electrophoresis mobility shift assay (EMSA) studies were carried out in order to show that the actions of ATM and DDC in our experimental paradigm are associated with the inhibition of NF-KB. This approach allows a semi-quantitative measure of NF-KB translocation into the cell nucleus, as well as the inhibition of such process by putative N-FkB antagonists. Indeed, 24-h treatments with LPS induced a clear increase in nuclear NF-KB. Such increase was completely abolished by ATM, while it did not appear to be modified by DDC.

Thus, although DDC proved to be more effective than ATM in inhibiting LPS-induced PG production in rat astrocytes, an inverse order of efficacy emerged from the EMSA analysis. It must be therefore concluded that (at least in our model) DDC counteracts LPS stimulation of PG production through mechanisms that do not depend on NF-KB inhibition.

**INDAGINE Sperimentale per la individuazione di un approccio terapeutico alla atassia cerebellare nella sclerosi multipla: sottotipi recettoriali serotonergici e controllo della funzionalità del sistema glutammatergico cerebellare in vitro**

M. Raiteri, M. Marcoli, G. Maura

*Sezione di Farmacologia e Tossicologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli studi, Genova*

Le fibre muschiate cerebellari, di natura glutammatergica, che contattano i granuli e determinano la attivazione del sistema intrinseco glutammatergico cerebellare, danno origine a sinaptosomi "giganti". Abbiamo precedentemente riportato che sui terminali "giganti" della fibre muscoidi cerebellari è localizzato un recettore 5-HT<sub>2</sub> inibente la liberazione di glutammato: il recettore presinaptico 5-HT<sub>2</sub> è stato caratterizzato farmacologicamente in termini di sottotipo nell'ultimo anno. Sono stati inoltre valutati gli effetti del trazodone sul recettore presinaptico 5-HT<sub>2A</sub> (utilizzato in clinica quale antidepressivo, generalmente considerato essere un antagonista dei recettori 5-HT<sub>2</sub>, ma che si comportava da agonista sul recettore 5-HT<sub>2C</sub> postsinaptico che controlla la via recettore NMDA/NO/cGMP cerebellare).

Nei sinaptosomi pesanti di cervelletto di ratto la depolarizzazione con KCl 15mM (120 s) determinava una liberazione di glutammato endogeno che ammontava a  $480 \pm 42$  pmol/mg proteine; la quantità di glutammato nei campioni di 3 minuti raccolti prima della stimolazione con K<sup>+</sup> era di  $120 \pm 10$  pmol/mg proteine sinaptosomiali ( $n = 7$ ); precedenti esperimenti hanno mostrato che la liberazione di glutammato indotta da depolarizzazione dai sinaptosomi pesanti cerebellari è quasi completamente dipendente dalla presenza dello ione Ca<sup>2+</sup> nel medium di perfusione. La liberazione di glutammato endogeno indotta da K<sup>+</sup> era inibita in modo concentrazione-dipendente da parte di 5-HT, (±)-DOI o trazodone (5-HT, pD<sub>2</sub> = 7.37; (±)-DOI, pD<sub>2</sub> = 7.29; trazodone, pD<sub>2</sub> = 6.42). Il massimo effetto inibitorio era di circa il 70% per 5-HT o (±)-DOI, ma solo 54% per il trazodone.

L'effetto inibitorio di 5-HT o (±)-DOI (entrambi alla concentrazione 0.1 μM) o di trazodone (0.3 μM) era antagonizzato da 1 μM ketanserina, potente antagonista del recettore 5-HT<sub>2A</sub> con moderata attività anche sul sottotipo 5-HT<sub>2C</sub>. Il composto MDL 100907 (0.3 - 1 μM), antagonista selettivo e potente del recettore 5-HT<sub>2A</sub>, preveniva completamente l'inibizione da parte degli agonisti mentre il composto SB 242084 (0.3 - 1 μM), antagonista potente e selettivo del recettore 5-HT<sub>2C</sub>, era inefficace nei confronti di 5-HT o (±)-DOI.

Si conclude che:

- il profilo farmacologico del recettore 5-HT<sub>2</sub> inibente la liberazione di glutammato dai terminali delle fibre muscoidi è corrispondente a quello del sottotipo 5-HT<sub>2A</sub>
- il trazodone può attivare il recettore 5-HT<sub>2A</sub> che controlla la liberazione di glutammato dalle fibre muscoidi. Il farmaco si comporta tuttavia da agonista parziale e con potenza circa 10 volte inferiore rispetto a quella di 5-HT o (±)-DOI.

Proponiamo che il trazodone, che attiva recettori serotonergici pre- e postsinaptici coinvolti nel potente controllo della trasmissione glutammatergica cerebellare, potrebbe essere considerato un farmaco di potenziale interesse per le atassie, meritevole di una valutazione della efficacia in gruppi selezionati di pazienti atassici in corso di sclerosi multipla.

**EXPERIMENTAL INVESTIGATION TO IDENTIFY A THERAPEUTIC APPROACH FOR CEREBELLAR ATAXIA IN MULTIPLE SCLEROSIS: SEROTONERGIC RECEPTOR SUBTYPES AND FUNCTIONAL CONTROL OF CEREBELLAR GLUTAMATE SYSTEM IN VITRO**

M. Raiteri, M. Marcoli, G. Maura

*Sezione di Farmacologia e tossicologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli studi, Genova*

Cerebellar glutamatergic mossy fibres which synapse onto granules and subserve activation of the intrinsic glutamatergic cerebellar pathway originate "giant" synaptosomes. We previously reported that release-inhibitory 5-HT<sub>2</sub> receptors are located on the external membrane of mossy fibres "giant" nerve terminals; the receptor has been now classified in terms of 5-HT<sub>2</sub> receptor subtype. The effect of trazodone, antidepressant drug generally thought of as a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist but behaving as an agonist at the postsynaptic 5-HT<sub>2C</sub> receptor inhibiting the NMDA receptor/NO/cGMP pathway in rat cerebellum, was studied on the presynaptic 5-HT<sub>2</sub> receptor.

Depolarisation with 15 mM KCl (120 s) of rat cerebellar giant synaptosomes in superfusion evoked overflow of endogenous glutamate amounting to  $480 \pm 40$  pmol/mg protein (mean  $\pm$  S.E.M., n = 7) while the basal release (3 min) amounted to  $120 \pm 10$  (mean  $\pm$  S.E.M., n = 7); the depolarisation-evoked overflow of glutamate was almost entirely Ca<sup>2+</sup>-dependent.

Depolarization-evoked overflow of endogenous glutamate from rat cerebellar "giant" mossy fibre synaptosomes was inhibited by 5-HT ( $pD_2 = 7.37$ ), ( $\pm$ )-DOI ( $pD_2 = 7.29$ ) or trazodone ( $pD_2 = 6.42$ ). Trazodone displayed partial agonist activity, inhibiting by a maximum of 54% glutamate overflow, in comparison with 5-HT and ( $\pm$ )-DOI (maximum inhibition 70%). 1  $\mu$ M ketanserin, a 5-HT<sub>2A</sub>/5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist, counteracted the inhibitory effect of 0.1  $\mu$ M 5-HT or ( $\pm$ )-DOI or 0.3  $\mu$ M trazodone. The agonist effects were prevented by the highly selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist MDL 100907 (0.3 - 1  $\mu$ M), while the potent and selective 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist SB 242084 (0.3 - 1  $\mu$ M) was ineffective against 5-HT or ( $\pm$ )-DOI.

It is concluded that:

- release of glutamate from cerebellar mossy fibres can be controlled by presynaptic 5-HT<sub>2</sub> heteroreceptors belonging to the 5-HT<sub>2A</sub> subtype;
- trazodone can activate the presynaptic 5-HT<sub>2A</sub> receptor, although with lower potency and efficacy with respect to 5-HT or ( $\pm$ )-DOI.

It is proposed that trazodone, which activates both pre- and postsynaptic 5-HT receptors controlling the cerebellar glutamatergic transmission, could be considered a potential drug for ataxias, suitable to undergo investigation in selected ataxic patients during multiple sclerosis.

**STIMOLAZIONE DI RISPOSTE LINFOCITARIE DI TIPO TH1 E TH2 DA PARTE DI ASTROCITI E MICROGLIA ED EFFETTI DELLA POLARIZZAZIONE DELLA RISPOSTA LINFOCITARIA SULLO STATO FUNZIONALE DELLE CELLULE GLIALI**

F. Ria (a), F. Aloisi (b), S. Columba-Cabezas (b), B. Serafini (b), L. Adorini (c)

(a) Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica, Roma

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

(c) Roche Milano Ricerche, Milano

La presenza di citochine di tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) e Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) nelle lesioni infiammatorie della sostanza bianca in corso di sclerosi multipla suggerisce una disgregazione sia delle risposte immunitarie cellulo-mediate che di quelle anticorpo-mediate, il cui contributo alla patogenesi del danno cerebrale rimane ancora scarsamente definito. Nel biennio di finanziamento abbiamo cercato di comprendere se e con quale efficienza cellule residenti nel parenchima cerebrale siano in grado di stimolare risposte di tipo Th1 e Th2, paragonando tali cellule tra loro e con le APC professionali. La capacità delle cellule cerebrali di funzionare come cellule presentanti l'antigene (APC) e di attivare le due sottopopolazioni di linfociti T è stata studiata utilizzando colture purificate di microglia e astrociti dal cervello di topo BALB/c, cellule B attivate e resting, cellule dendritiche e linee di cellule T naive e polarizzate in senso Th1 o Th2 ottenute da topi transgenici (DO11.10) esprimenti il recettore che riconosce il peptide 323-339 dell'ovalbumina (OVA). Gli esperimenti condotti dimostrano che:

- le cellule microgliali, le quali, dopo attivazione con IFN- $\gamma$ , esprimono e/o up-regolano numerose molecole dedicate alla interazione tra APC e cellule T sono in grado di stimolare sia la proliferazione delle popolazioni di linfociti T helper polarizzate inducendo la secrezione di notevoli quantità delle rispettive citokine, sia delle cellule T naive. Queste cellule non solo presentano il peptide OVA 323-339 ma sono anche in grado di processare la proteina nativa.
- gli astrociti, i quali, dopo attivazione con IFN- $\gamma$ , esprimono molecole MHC di classe II ma non CD40, stimolano la secrezione di citochine da parte di cellule Th2 in modo simile alla microglia ma sono molto meno efficienti della microglia nell'attivazione di cellule Th1 e non producono IL-12 dopo interazione con queste ultime. Gli astrociti sono inoltre molto meno efficienti della microglia nello stimolare la proliferazione di T naive, Th1 e di Th2 e nell'attivare le due popolazioni di cellule T in presenza della proteina nativa.
- è possibile stabilire una scala gerarchica tra le varie APC, in cui la microglia occupa una posizione più vicina alle DC che alle cellule large B.
- talune caratteristiche fanno ritenere la microglia attivata da IFN- $\gamma$  simile anche funzionalmente alle DC. Essa infatti produce IL-12 quando stimolata in interazione cognata ed induce differenziamento di cellule T naive verso Th1.
- Le cellule Th1 e Th2, una volta attivate generano un loop paracircolare rispettivamente positivo o negativo per la produzione di IL-12, che influenza a sua volta il differenziamento di cellule T naive.

## STIMULATION OF TH1 AND TH2 T CELL RESPONSES BY ASTROCYTES AND MICROGLIA AND EFFECTS OF T CELL POLARIZATION ON GLIAL CELL FUNCTION

F. Ria (a), F. Aloisi (b), S. Columba-Cabezas (b), B. Serafini (b), L. Adorini (c)

*(a) Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica, Roma*

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

*(c) Roche Milano Ricerche, Milano*

The presence of Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) and Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) type of cytokines in white matter inflammatory lesions during Multiple Sclerosis suggests a dysregulation of both cell mediated and humoral immune response, whose relative contribution to the pathogenesis of brain damage is still scarcely defined. During the two years of funding we tried to understand if and how efficiently cells residing in the brain parenchyma are able to stimulate Th1 and Th2 responses, comparing these cells between themselves and to professional antigen presenting cells (APC). The ability of brain derived cells to act as APC and to activate the two sub-populations of T cells has been studied using purified cultures of microglia and astrocytes obtained from the brain of BALB/c mice, naive T cells and T cell lines polarized towards Th1 or Th2 obtained from mice transgenic for TCR DO11.10, specific for peptide OVA 323-339 in I-Ad. The experiments performed show that:

- Microglial cells, that upon activation with IFN- $\gamma$  express and/or upregulate several molecules involved in the interaction between APC and T cell, are able to stimulate proliferation of both polarized T cell lines (inducing at the same time the secretion of large amounts of the appropriate cytokines) and of naive T cells. These cells not only present peptide OVA323-339, but are also able to process the native protein.
- Astrocytes, that, upon activation with IFN- $\gamma$  express MHC class II molecules but not CD40, B7-1 and B7-2 are able to stimulate the secretion of cytokines by Th2 cells similarly to microglia, but are less efficient than microglia in activating Th1 cells and do not produce IL-12 after interaction with this type of T cells. Furthermore, they are much less efficient than microglia in inducing the proliferation of naive and polarized T cells, and in activating these populations in the presence of native protein.
- It is possible to establish a hierarchy among APCs, in which microglia can be assigned a position closer to dendritic cells (DC) than to large B cells.
- Some characteristics allow to propose that IFN- $\gamma$  activated microglia are functionally similar to DC. In fact, microglial cells produce IL-12 when stimulated by Th1 polarized T cells in a cognate interaction and induce differentiation of naive T cells towards Th1 phenotype.
- Th1 and Th2 cells when activated in cognate interaction with APC generate a positive or negative paracrine loop, respectively, that influences the differentiation of naive T cells.

## LE CELLULE MICROGLIALI INDUCONO ANERGIA O ATTIVAZIONE DI CELLULE T SPECIFICHE PER MBP A SECONDA DEL LORO STATO DI ATTIVAZIONE

M. Matyszak, P. Ricciardi-Castagnoli

Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca, Milano

Il controllo dell'infiammazione tessuto specifica è largamente dipendente dalle cellule APC locali. Quindi, lo studio dell'interazione tra le APC locali e le cellule T è di fondamentale importanza per la comprensione di processi infiammatori come le risposte autoimmunitarie. Uno dei modelli di malattie autoimmunitarie più conosciuti è l'Encefalite Allergica Sperimentale (EAE) in cui la risposta immunitaria è diretta contro gli antigeni del Sistema Nervoso Centrale (CNS). L'EAE è il modello animale più comunemente usato per lo studio della Sclerosi Multipla (MS) ed è caratterizzata da lesioni infiammatorie multiple, spesso demielinanti. Può essere indotta in ceppi di animali suscettibili sia attraverso l'immunizzazione con antigeni del CNS in adiuvante completo di Freund o attraverso il trasferimento adottivo di cellule T CD4, attivate, specifiche per antigeni del CNS. Nei topi che presentano l'aplotipo u dell'MHC (H-2<sup>u</sup>) la Mielina Basica (MBP) costituisce il principale autoantigene, e il peptide ammino-terminale acetilato Ac1-11 il peptide immunodominante.

Le cellule microgliali sono fagociti mononucleari residenti a livello del CNS dove rappresentano una vasta popolazione di potenziali APC. Esse si trovano a livello del parenchima del cervello e sono quindi localizzate dietro la barriera ematoencefalica. È ben documentata l'attivazione delle cellule microgliali nelle lesioni infiammatorie della MS o EAE, ma la funzione immunologica di tali cellule rimane controversa. Poichè, durante l'infiammazione, le cellule microgliali up-regolano rapidamente molte molecole di superficie importanti per l'attivazione della risposta immunitaria, potrebbero giocare un ruolo fondamentale nella presentazione dell'antigene. Molti studi in vitro hanno mostrato che la microglia purificata da feti umani o da cervelli di topo può indurre proliferazione di cellule T. Tuttavia, altri hanno suggerito che le cellule microgliali sono APC non professioniste la cui funzione rimarrebbe controversa. Nel cervello dei roditori tali cellule non esprimono molecole di MHC di classe I o II né altri marker come il CD45. In seguito a danni o infezioni cerebrali, le cellule microgliali vengono però facilmente attivate, e tale attivazione precede ogni altro tipo di risposta. La microglia attivata cambia il proprio fenotipo immunologico, up-regolando l'MHC di classe I o II. Nelle risposte autoimmunitarie, come ad esempio durante la MS o l'EAE, le cellule microgliali esprimono anche le molecole B7 e CD40.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di capire se le cellule microgliali possono diventare APC professioniste, capaci di stimolare risposte primarie. Ci siamo inoltre occupati di analizzare se esistono delle differenze fra le cellule microgliali appartenenti a diversi ceppi di topo. Infatti, i topi PLJ (H-2<sup>u</sup>) sono estremamente suscettibili all'EAE, al contrario i topi Balb/c sono estremamente resistenti.

Abbiamo studiato in vitro la risposta delle cellule T CD4+ alla MBP e al peptide Ac1-11 nei topi H-2<sup>u</sup> in seguito a presentazione da parte di cellule microgliali resting o attivate. Abbiamo potuto dimostrare che le cellule microgliali resting, derivate da topi PLJ, esprimono bassi livelli di molecole costimolatorie, come B7.2 e CD40, e, cosa molto interessante, non esprimono B7.1. Cellule microgliali resting o attivate con IFNgamma non sono capaci di attivare cellule T CD4 naïve o cellule T CD4 prestimolate in vivo con MBP. Inoltre, in presenza del peptide Ac1-11, le cellule T esprimono un T cell receptor transgenico specifico per il peptide Ac1-11 vengono anergizzate. L'anergia è preceduta da una fase in cui le cellule T sono attivate, come può essere documentato dall'up-regolazione del CD69 e del recettore per l'IL-2. Le cellule microgliali sono capaci di diventare APC professioniste solo dopo un processo di attivazione "multi step" che coinvolge sia la stimolazione attraverso citochine (GM-CSF e IFNgamma) che l'interazione con

le molecole CD28 e CD40L presenti sulle cellule T. La microglia così attivata è capace di presentare l'MBP nativa sia alle cellule T vergini che memory. La stimolazione della microglia da parte del GM-CSF induce l'up-regolazione dell'espressione di molecole costimolatorie, in particolare B7.1, e delle molecole di MHC di classe II. La successiva attivazione della microglia da parte dell'IFNgamma incrementa ulteriormente le molecole di MHC di classe II sulla superficie cellulare e induce un'up-regolazione del CD40. L'interazione CD40-CD40L aumenta significativamente la capacità della microglia di fare il priming delle cellule T transgeniche per il T cell receptor specifico per MBP, come può essere dimostrato dalla accresciuta capacità delle cellule T di proliferare, ed è essenziale per la presentazione dell'MBP nativa alle cellule T CD4 pre-attivate in vivo. Sulla base di questi risultati noi proponiamo che le cellule microgliali possano svolgere funzioni diverse che dipendono dal milieu di citochine e dal tipo di interazione con le cellule T in cui sono coinvolte.

## MICROGLIA INDUCE MBP SPECIFIC T CELL ANERGY OR T CELL ACTIVATION, ACCORDING TO THEIR STATE OF ACTIVATION.

M. Matyszak, P. Ricciardi-Castagnoli

*Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca, Milano*

The control of tissue-specific inflammation is largely dependent on local APCs. Therefore, understanding the interaction between local APCs and T cells is crucial for better understanding of inflammatory processes, including autoimmune responses. One of the best-known models of autoimmune disease is EAE where the immune response is directed against the Central Nervous System (CNS) antigens. EAE is the most commonly used animal model for Multiple Sclerosis (MS). EAE is characterised by multiple inflammatory - often demyelinating - lesions. It can be induced in susceptible strains animals either by immunisation with CNS antigens in complete Freund's adjuvant or by adoptive transfer of activated, CNS antigen specific, CD4<sup>+</sup> T cells. In the H-2<sup>u</sup> mice MBP is the major autoantigen, with acetylated amino-terminal peptide Ac1-11 being the immunodominant peptide.

Much is known about the processes which initiate EAE in the CNS, but the subsequent immune responses in the brain are still poorly understood. In the CNS, microglial cells are the resident mononuclear phagocytes (which are the largest population of potential APCs). They reside in the brain parenchyma and are therefore behind the blood-brain barrier. The activation of microglia in inflammatory lesions such as MS or EAE lesions is well documented, but the immunological function of these cells is still controversial. Because microglia rapidly upregulate many immunologically important surface antigens during inflammation, they may be important for antigen presentation. Many *in vitro* studies have shown that microglia purified from fetal human and mouse brains can induce T cell proliferation. However, others have suggested that microglia are non-professional antigen presenting cells the function of which is still controversial. In the normal rodent brain they have a down-regulated immuno-phenotype expressing no MHC class I and II. Other markers such as CD45 are also down-regulated. However, these cells are easily activated and respond very rapidly in inflammation. Indeed there is hardly any pathology in the brain in which they are not involved. Following tissue injury or infection in the brain, microglia activation generally precedes any other response. Activated microglia change their immuno-phenotype, upregulating molecules such as MHC class I and II and CD45. In immune mediated responses, for example in multiple sclerosis or experimental allergic encephalomyelitis lesions, these cells also express B7 molecules and CD40. Although the activation of microglia after brain injury is well documented, understanding their function still remains difficult. There has been a number of studies on microglia cells as antigen presenting cells, but this topic remains controversial.

The aim of our studies was to investigate whether microglia cells can become professional antigen presenting cells, capable of stimulating primary responses, but also whether there are differences between microglia cells in different strain of mice. For example, PLJ mice (H-2u) are very susceptible to experimental allergic encephalomyelitis, an autoimmune disease in the brain, whereas BALB/c animals are resistant.

We have studied *in vitro* CD4<sup>+</sup> T cell responses to native myelin basic protein (MBP) and encephalomyelic peptide Ac1-11 in the H-2<sup>u</sup> strain of mice following presentation by resting and activated microglial cells. H-2<sup>u</sup> mice are susceptible to Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE), and MBP is the major target autoantigen, with MBP Ac1-11 being the immunodominant peptide. We have demonstrated that resting microglial cells, derived from this strain of mice, express a low level of co-stimulatory molecules, such as B7.2 and CD40 and, interestingly, they lack surface expression of B7.1. Resting and IFN- $\gamma$  activated microglial cells were unable to activate naive and *in vivo* primed MBP specific CD4<sup>+</sup> T cells, in the presence of MBP and MBP Ac1-11 peptide. Furthermore, in the presence of Ac1-11 peptide, CD4<sup>+</sup> TCR

Ac1-11 transgenic T cells became anergised. The anergy was preceded by a phase in which T cells were activated, as characterised by upregulation of CD69 and IL-2 receptor.

Microglial cells became professional antigen presenting cells only after a multistep activation process involving both stimulation through cytokines (GM-CSF and IFN- $\gamma$ ) and cognate signalling (B7-CD28 and CD40-CD40L interactions). Fully activated microglial cells were able to present native MBP to both unprimed and primed antigen-specific T cells. Co-culture of microglia with GM-CSF upregulated the expression of co-stimulatory molecules, in particular B7.1, and MHC class II molecules. Additional activation of microglial cells with IFN- $\gamma$  further induced MHC class II and CD40 upregulation. Cognate CD40-CD40L interaction significantly enhanced microglial ability to prime TCR transgenic T cells, as was shown by the enhancement of T cell proliferation, and was essential for presentation of native MBP to *in vivo* primed CD4+ T cells.

Based on these results we propose that microglial cells may serve different functions under different inflammatory conditions, depending on the cytokine milieu and the type of cognate interaction they are involved in.