

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

## Dottorato di ricerca in FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA SPERIMENTALI

CICLO XXIV

### Studi di caratterizzazione del meccanismo di azione del proteoglicano NG2/CSPG4 nella sclerosi multipla

Coordinatore:  
Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Barocelli

Tutor:  
Chiar.ma Prof.ssa Tiziana Mennini

Dottorando: Dott. Giovanni Ferrara

TRIENNIO ACCADEMICO 2009-2011

*Alla mia famiglia  
A Ilaria*

Dobbiamo anzitutto metter via il pregiudizio che il durare, a paragone del perire, valga assai di più: i monti che mai non passano non sono superiori alla rosa che, assetata, subito sfiorisce.

Heghel

## Riconoscimenti

Il lavoro di tesi è stato coordinato dalla Prof.ssa Elisabetta Barocelli dell'Università degli Studi di Parma ed è stato svolto presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" di Milano, nei laboratori di:

- Farmacologia e Farmacocinetica, responsabile dr.ssa Tiziana Mennini (Tutor);
- Chimica e biochimica delle proteine, responsabile dott. Mario Salmona;
- Neurobiologia Molecolare, responsabile dr.ssa Caterina Bendotti.

Collaborazioni:

Prof. Antonio Uccelli, Università degli Studi di Genova.

Prof.ssa Daniela Virgintino, Università degli Studi di Bari.

Dott. Roberto Furlan, Istituto Scientifico "San Raffaele" di Milano

Proff. Roberto Perris e Franco Granella Università degli Studi di Parma

Dott. Diego Franciotta, Istituto Neurologico "Mondino" di Pavia.

## Ringraziamenti

Desidero ringraziare innanzitutto il mio coordinatore di dottorato, la prof.ssa Elisabetta Barocelli, per l'immensa fiducia dimostratami.

Poi, un grazie speciale all'Istituto "Mario Negri", non so se è corretto ringraziare una istituzione di per se, ma il mio lungo peregrinare in ben tre laboratorio mi concede questo lusso. Ringrazio la dott.ssa Tiziana Mennini, mio tutor, per avermi insegnato ad essere risoluto nella ricerca, la dr.ssa Caterina Bendotti, il dott. Mario Salmona e il prof. Silvio Garattini. Tutti gli amici del laboratorio di Neurobiologia Molecolare e del dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare.

Ringrazio i dottori Sara Morando, Francesco Girolamo, Mariella Errede e Valentina Boldrin, per il preziosissimo aiuto. Ringrazio la prof. Daniela Virgintino, il prof. Antonio Uccelli e il dott. Roberto Furlan per i consigli preziosi ed il supporto costante.

Infine, ringrazio la mia famiglia per tutto il sostegno e Ilaria per tutto l'amore che infonde in ogni cosa. Ale, non hai letto questo lavoro, ma lo conosci molto bene.

## **Abbreviazioni**

SM, sclerosi multipla.

NG2, nerve-glia antigen 2.

NG2 KO, nerve-glia antigen 2 knock-out.

WT, wild type.

OPC, oligodendrocyte progenitor cells.

UNV, unità neurovascolare.

BEE, barriera emato-encefalica.

EAE, encefalomielite allergica sperimentale.

DC, cellule dendritiche.

ZSV, zona sub-ventricolare.

<b>RICONOSCIMENTI</b>	<b>4</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>5</b>
<b>SOMMARIO</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>17</b>
<b>Sclerosi multipla</b>	<b>18</b>
Cenni storici	18
Eziologia	20
Mimetismo molecolare	23
Epidemiologia	25
Predisposizione genetica	25
Gruppo etnico	27
Sesso	27
Fattori ambientali	27
Vitamina D	28
Agenti patogeni	29
<b>Aspetti clinici della Sclerosi Multipla</b>	<b>30</b>
Iter diagnostico	30
Varianti cliniche di SM	33
Sindrome clinicamente isolata (CIS)	33
Recidivante remittente (SMRR)	34
Primaria progressiva (SMPP)	35
Secondaria progressiva (SMSP)	35
Progressiva ricorrente (SMPR)	35
Benigna	36
Trattamenti farmacologici	37
<b>Mielina</b>	<b>41</b>
<b>Nerve-gliol antigen 2 (NG2)</b>	<b>43</b>
Attività funzionale di NG2	45
<b>Cellule esprimenti NG2</b>	<b>49</b>
Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs)	50
Periciti	52
<b>Encefalomielite allergica sperimentale (EAE)</b>	<b>54</b>
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>59</b>
<b>Pazienti e raccolta liquor</b>	<b>59</b>
<b>ELISA</b>	<b>60</b>
<b>Western Blot</b>	<b>61</b>

<b>Preparazione materiale genetico</b>	<b>66</b>
Estrazione DNA genomico	66
Purificazione cDNA	66
<b>Polymerase chain reaction (PCR)</b>	<b>68</b>
Genotipizzazione	68
Real-Time PCR	70
<b>Modelli animali utilizzati nello studio</b>	<b>72</b>
Condizioni di stabulazione	72
Topo C57BL/6	72
Topo NG2-KO	73
<b>Encefalomielite allergica sperimentale (EAE)</b>	<b>73</b>
<b>Sacrificio di animali e prelievo tessuti</b>	<b>74</b>
Perfusione intracardiaca	75
Inclusione in paraffina	76
<b>Istologia</b>	<b>77</b>
Colorazione istologica	77
Immuno-isto chimica	78
<b>Colture cellule</b>	<b>80</b>
Macrofagi e cellule dendritiche (DC)	80
Linfociti T	81
<b>Citometria a flusso</b>	<b>82</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>83</b>
<b>Screening in pazienti affetti da SM</b>	<b>83</b>
Test validazione sperimentale analisi liquor pazienti SM	84
Dosaggio anticorpi anti-NG2 in liquor di pazienti SM	90
Analisi clinica dei pazienti positivi agli auto-anticorpi diretti contro NG2	97
<b>Analisi del modello di EAE nel topo NG2 KO</b>	<b>101</b>
Induzione del modello EAE nel topo NG2 KO	101
Valutazione clinica del modello murino EAE nel topo NG2 KO	102
Danno di demielinizzazione e valutazione dell'infiltrato immunitario	105
Valutazione delle OPC nel modello murino EAE	108
Valutazione della Unità Neuro-Vascolare nel modello murino EAE	113
<b>Valutazione della risposta immunitaria nel topo NG2 KO</b>	<b>119</b>
Valutazione dei parametri infiammatori nel topo NG2 KO <i>in vivo</i>	120
Analisi dell'espressione di NG2 sulle cellule immunitarie	121
Studio <i>in vitro</i> dei linfociti T	125
Studio <i>in vitro</i> delle cellule dendritiche (DC)	127
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>139</b>
<b>INDICE DELLE FIGURE</b>	<b>145</b>





## Sommario

La Sclerosi Multipla (SM) è una patologia cronica, di natura autoimmunitaria che colpisce la mielina del sistema nervoso centrale (SNC). La mielina è una struttura multi-lamellare compatta che avvolge in modo concentrico l'assone dei neuroni ed è composta da lipidi (70%) e da proteine (30%). In natura, la mielina è la membrana cellulare più abbondante nel SNC dei vertebrati e una classe particolare di cellule gliali, gli oligodendrociti, è deputata alla sua produzione, alla sua maturazione e alla sua organizzazione. Gli oligodendrociti si contraddistinguono dalle altre cellule gliali attraverso le dimensioni ridotte del corpo cellulare, un grosso nucleo, l'assenza di filamenti intermedi, una morfologia stellata e la presenza citoplasmatica di glicogeno. Gli oligodendrociti, sono delle cellule terminalmente differenziate, mitoticamente inattive, che nell'embrione originano dalle cellule staminali neuro-epiteliali, presenti nella nicchia denominata zona sub-ventricolare (ZSV). Dalla ZSV originano i precursori della glia ristretta, che a loro volta generano le cellule precursori degli oligodendrociti (OPC), dove la linea differenziativa, si divide per creare poi gli oligodendrociti maturi da un lato e dall'altro gli astrociti. Nell'adulto, le OPC sono considerate come la "riserva" fisiologica dei nuovi oligodendrociti che formano la mielina, sono attivate durante l'infiammazione e mediano i processi di rimielinizzazione in seguito ad un danno di demielinizzazione seppur in modo inefficace.

Le cellule precursori degli oligodendrociti (OPC) e i periciti, cellule coinvolte nella organizzazione della unità neuro-vascolare (UNV) e nello specifico, nel mantenimento dell'integrità strutturale della barriera emato-encefalica (BEE), condividono l'espressione di Nerve/glial antigen 2 (NG2), un proteoglicano di membrana. Diverse sono le funzioni attribuite a NG2: attraverso diversi studi in

ambito oncologico sono emerse evidenze di un coinvolgimento del proteoglicano nell'adesione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, come recettore pro-apoptotico e molecola necessaria nei processi di migrazione cellulare. Di contro, ad oggi esistono poche evidenze sperimentali circa la funzione di NG2 nel SNC e in particolare sulle cellule OPC e sui periciti.

Lo scopo della presente tesi di dottorato è quello di caratterizzare funzionalmente il ruolo di NG2 in un modello *in vivo* di SM, noto come Encefalomielite Allergica Sperimentale (*EAE, ndr*) e di descrivere il ruolo di NG2 nella progressione di patologia avvalendosi di un topo geneticamente modificato privo della sua espressione cellulare (Topo NG2 knock-out, KO), ipotizzando di fatto, un ruolo centrale di NG2 nella progressione di malattia.

In particolare abbiamo ipotizzato che:

- Data la forte componente autoimmunitaria della SM, il proteoglicano potrebbe essere coinvolto nella risposta immune anomala tipica della SM e svolgere quindi un ruolo antigenico;
- Data la peculiare espressione cellulare di NG2, in due compartimenti coinvolti nella patologia (mielina e UNV), le OPC e i periciti possano essere coinvolte nella progressione di malattia.

Dapprima, per investigare il ruolo antigenico di NG2, abbiamo ricercato in campioni di liquor di pazienti SM, opportunamente raccolti e classificati, auto-anticorpi diretti con NG2 attraverso esperimenti di Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). Inoltre, abbiamo verificato la presenza di auto-anticorpi mediante tecniche di western blot e correlato il dato sperimentale con lo stato clinico dei pazienti SM. Abbiamo identificato una sotto-popolazione di pazienti SM che presenta attività auto-anticorpale e questi pazienti risultano avere una patologia più grave.

Pertanto, proponiamo gli auto-anticorpi diretti contro NG2 come un bio-marcatore prognostico di tipo negativo.

Avendo ottenuto un dato che dimostra il coinvolgimento di NG2 nella SM, per caratterizzarne il meccanismo di azione e capire quale possa essere la funzione delle cellule che lo esprimono, abbiamo studiato la sua espressione durante le fasi di patologia del modello murino di SM, EAE, nel topo di controllo, wild type (WT) e in seguito abbiamo studiato lo sviluppo e la progressione di malattia in topi geneticamente modificati, mancanti della proteina NG2 (NG2 KO). Paragonato al WT, il topo NG2-KO ha una diversa evoluzione di malattia; nello specifico, il topo NG2-KO risultava avere una progressione di malattia meno grave e un'incidenza di patologia minore. Per capire quale meccanismo sia alla base della protezione osservata nel topo NG2-KO, abbiamo eseguito diverse analisi e abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

- L'analisi neuroistologica ha evidenziato una minore demielinizzazione del topo NG2-KO rispetto al controllo e un maggiore numero di cellule OPC presenti nel SNC rispetto al WT;
- Nel contesto dell'UNV, le giunzioni *tight* della BEE nel topo NG2 KO, risultano avere una diversa organizzazione strutturale, rispetto al topo WT;
- In modo sorprendente abbiamo evidenziato che alcune cellule immunitarie (linfociti T, cellule dendritiche e macrofagiche) esprimono NG2, che il sistema immunitario del topo NG2 KO, di per se, risulta avere una risposta, in seguito a stimoli pro-infiammatori, differente rispetto al WT.

- Durante le fasi di malattia nel topo NG2 KO, le cellule effettrici fagocitiche di malattia (macrofagi), infiltrano in numero minore il parenchima nervoso, e i linfociti T che guidano la risposta immunitaria nel modello, esibiscono una proliferazione minore rispetto al WT, pur infiltrando il CNS come il nel topo WT affetto da EAE.

In base ai risultati ottenuti riteniamo quindi, che l'attività di NG2 possa condizionare in modo negativo l'evoluzione di patologia e che quindi le cellule che esprimono NG2 possano essere determinanti per la patologia stessa. Infine, gli auto-anticorpi riscontrati nel liquor di pazienti affetti da SM possano essere considerati come una risposta compensatoria alla patologia stessa.

## **Abstract**

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Although the events triggering MS are still unknown, T lymphocytes reactive toward the myelin sheath are thought to have a prominent role. The myelin sheath is the most abundant membrane structure in the vertebrate nervous system. Its unique composition and its unique segmental structure is responsible for the saltatory conduction of nerve impulses which allow the myelin sheath to support the fast nerve conduction in the thin fibers of the vertebrate system. Oligodendrocytes (OLs), a special class of glial cells, are essential for myelin production and organization; in fact, myelin is a spiral extension of the plasma membrane of OLs. OLs are terminally differentiated and originate from neuro-epithelial stem cells localized in the sub-ventricular zone (SVZ). The OLs lineage is well characterized, SVZ stem cells proliferate and lead to glial-restricted (GR) progenitors and then to oligodendrocyte precursor cells (OPCs), finally to mature oligodendrocytes. The OPCs, are activated during inflammation and mediate remyelination in MS patients even if in an inefficient way. Characterization by biochemical markers such as NG2 proteoglycan has been a specific tool to study the OLs maturation steps in both in vivo and in vitro experiment.

Nerve-glial antigen 2 (NG2), the product of the CSPG4 gene, is a single membrane-spanning chondroitin sulphate proteoglycan with a large extracellular domain and a short cytoplasmic tail. NG2 is expressed not only by OPCs but also by vascular mural cells, including pericytes in the CNS, that form the Neuro-

vascular unit (NVU) together with blood-brain barrier (BBB).

There are numerous functions attributed to NG2: several studies have shown the involvement in cell-cell and cell-extracellular matrix adherence. In contrast, little is known about NG2 function in the CNS and in particular on OPC cells. This work was focused on the study of NG2 in the CNS and our hypotheses are:

- Since the pathology is characterized by a relevant autoimmune component, we hypothesize that NG2 proteoglycan may be involved in the abnormal immune response typical of MS;
- Regarding NG2 expression in OPCs and pericyte cells, we hypothesize that these cells are involved in disease progression.

First of all, to investigate the role of NG2 antigen, we analyzed CSF samples of MS patients appropriately collected and classified, to find auto-antibodies against NG2 through ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) experiments. We verified the presence of auto-antibodies by western blot and correlated the experimental data with the MS patients clinical values. Again, we found a MS patient subset positive for NG2 autoantibodies and these patients show a more severe disease. Finally, we propose autoantibodies against NG2 as a prognostic biomarker.

To characterize the role of NG2 in OPCs and pericyte cells, we utilized an animal model of MS (EAE, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, obtained with MOG immunization), in NG2 knock-out (NG2-KO) mice. In NG2 KO, MOG immunization largely failed to produce a substantial demyelination phenotype and manifestation of disease was overall markedly attenuated, compared to WT. To understand the mechanisms involved in NG2-KO protection from EAE, several approaches were performed. Histological analysis was done and infiltrated cells (macrophages and T-cells) were counted. Compared to WT EAE affected mice, analysis showed an important reduction in demyelination in NG2-KO EAE affected

mice. Further histological analysis of CNS spinal cord sections demonstrated a reduced number of IBA1-positive macrophages in NG2KO mice. About T-cells, no significant difference was observed in the number of infiltrated, but proliferation of stimulated (anti-CD3) T-cells from NG2-KO was significantly lower, compared to WT. Cytokines production in in vitro analysis of stimulated T-cells showed different expression in NG2 KO compared to WT, in fact INF $\gamma$ , IL-17 and IL-4 mRNA levels were up-regulated. About mRNA levels analysis on dendritic cells (DCs), IL-12 was down-regulated and TNF $\alpha$  was up-regulated, but no differences was show on DCs maturation after LPS stimulation.

The OPCs analysis in SNC of NG2 KO EAE affected mice, showed the same number of cells compared to in naïve NG2, while in WT-EAE affected mice, the number of OPCs was dramatically lower than the naïve WT.

We also analyzed the NVU structure, studying the expression of Claudin-5 and Occludin BBB proteins. Prior to MOG immunization, the expression of all two markers was decreased in naïve NG2-KO mice, compared to wild type mice. However, during the disease phase we observed an increase in the two markers in NG2 null mice to a level comparable to WT mice prior to MOG challenge.

On the basis of results from our laboratories, we believe that the absence of NG2 can influence the course of disease in a protective way.



## Introduzione

Il sistema immunitario dei mammiferi è una complessa organizzazione di proteine, cellule, tessuti e organi che permettono la difesa verso l'agente lesivo ed è un sistema finemente regolato e altamente integrato, che agisce e si sviluppa attraverso un complesso equilibrio di stimoli attivatori e inibitori. La reazione del sistema immunitario si scatena contro agenti microbici e strutture macromolecolari e termina con la distruzione di questi in modo efficace. Una prerogativa fondamentale della risposta immunitaria risiede nella capacità di discriminare le molecole dell'ospite (self) da quelle non-self. Questa caratteristica impedisce reazioni anomale dirette contro l'ospite e garantisce la specificità della risposta.

La risposta immunitaria si sviluppa, in modo precoce attraverso sistemi aspecifici, immunità innata, e in modo tardivo attraverso sistemi specifici, immunità acquisita.

La risposta immunitaria acquisita è quindi definita come inducibile e agisce in modo indipendente dalle conseguenze patologiche sull'ospite. L'azione fisiologica è strutturata in più fasi: I) isolare, confinare e distruggere selettivamente l'agente lesivo; II) innescare tutti quei meccanismi atti allo spegnimento della risposta; III) instaurare una memoria cellulare. Le conseguenze di tipo patologico sono essenzialmente legate a due aspetti: incapacità nella regolazione dello spegnimento della risposta; errato riconoscimento delle molecole *self*.

L'incapacità di regolare l'attività immunitaria e il mancato riconoscimento dell'ospite, generano una classe di patologie note come malattie autoimmuni. In questo contesto si viene ad identificare una malattia autoimmune del sistema nervoso centrale nota come Sclerosi Multipla (SM) il cui evento patologico principale è la distruzione progressiva della mielina (Lucchinetti, Bruck et al. 2000).

## ***Sclerosi multipla***

### **Cenni storici**

Appartengono al Medioevo le prime descrizioni di sintomi neurologici riconducibili oggi alla SM. Il primo paziente noto affetto da SM è stato Lidwina di Schiedam, divenuta poi santa, che a seguito di una caduta, sviluppò sintomi neurologici come dolori lancinanti, cefalee, problemi di deambulazione e paralisi. La sua condizione peggiorò nel corso della vita e furono descritte addirittura le diverse recidive tipiche dell'evoluzione patologica della SM. Una volta che il metodo scientifico prese piede in medicina, la SM fu una tra le prime malattie ad essere descritta scientificamente. Infatti, nel 1868, Jean-Martin Charcot, un professore di neurologia dell'Università di Parigi, studiò una giovane donna con un particolare tremore che ricondusse ad un deficit di natura neurologica, e riscontrò inoltre borbottamento e movimenti oculari anormali (nistagmo). Esami post-mortem del tessuto nervoso della donna evidenziarono le caratteristiche placche associate oggi alla SM. Negli ultimi decenni del 19° secolo, prima in Inghilterra dal Dott. Moxon nel 1873 e poi negli Stati Uniti dal Dott. Seguin nel 1878 la SM fu delineata e classificata come una patologia ben precisa. Negli anni successivi, in seguito a diverse scoperte nel campo più ampio della neurologia, diversi furono i progressi sulla conoscenza della SM. Si pensi che all'epoca, l'esistenza stessa del sistema immunitario era ignota, così come quella della mielina, che fu scoperta solo nel 1878 da Ranvier, mentre per la scoperta degli oligodendrociti si sarebbero dovuti aspettare ancora cinquanta anni! Infatti, nel 1906, fu assegnato il Premio Nobel per la medicina a Camillo Golgi e Santiago Ramon y Cajal, che definirono nuove

sostanze chimiche per migliorare la visibilità delle cellule nervose al microscopio. Dotato di questa nuova tecnologia, il dottor James Dawson presso l'Università di Edimburgo nel 1916, eseguì dettagliati esami al microscopio del cervello di pazienti deceduti con SM. Dawson descrisse i fenomeni infiammatori peri-vascolari e del danno alla mielina. Nel 1925 Edgar Douglas Adrian effettuò la prima registrazione di una trasmissione nervosa su questa base lanciò una serie di esperimenti per determinare il funzionamento del sistema nervoso.

Una svolta fondamentale nello studio della SM ci fu con lo sviluppo del modello animale di malattia. Nel 1935, il dottor Thomas Rivers al Rockefeller Institute di New York dimostrò che il principale responsabile della SM è il tessuto nervoso. Tramite un'inoculazione di un omogenato di proteine della mielina, in opportune condizioni e prive di agenti virali in animali da laboratorio, dimostrò la possibilità di indurre il sistema immunitario ad attaccare la propria mielina, producendo una malattia molto simile alla SM. Questa forma di SM degli animali da laboratorio, è chiamata encefalomyelite allergica sperimentale (EAE ndr), più tardi sarebbe diventata un modello importante per lo studio e il trattamento della SM ed in generale dell'autoimmunità.

Nonostante queste scoperte abbiano rivelato l'importanza dell'autoimmunità e della capacità antigenica del sistema nervoso centrale, la maggior parte dei medici nel 1930 focalizzò la loro attenzione su tossine e sul controllo della circolazione sanguigna, ignorando, di fatto, le scoperte di Rivers. Una serie di esperimenti su animali di laboratorio dimostrò che, bloccando l'afflusso di sangue al cervello si otteneva una malattia per alcuni aspetti simili alla SM ma evidenze successive, confutarono di fatto questa tesi.

Nel 1943, dopo numerose prove sperimentali fu determinata l'effettiva composizione della mielina, la quota proteica e quella lipidica.

Negli anni '80 e '90 furono compiuti numerosi studi clinici condotti su potenziali approcci terapeutici, portando, di fatto, alla scoperta dell'interferone-beta come primo farmaco nella terapia della SM. Dal punto di vista diagnostico la risonanza magnetica (RM) diventò il mezzo più utilizzato e anche l'unico metodo in grado di evidenziare le placche di demielinizzazione e di tracciare un profilo di valutazione dell'efficacia terapeutica in relazione alla progressione di malattia. Nel corso degli ultimi vent'anni si sono, inoltre, resi disponibili nuovi farmaci denominati immunomodulanti che assieme allo sviluppo di tecniche riabilitative più efficaci hanno posto le basi dell'era terapeutica.

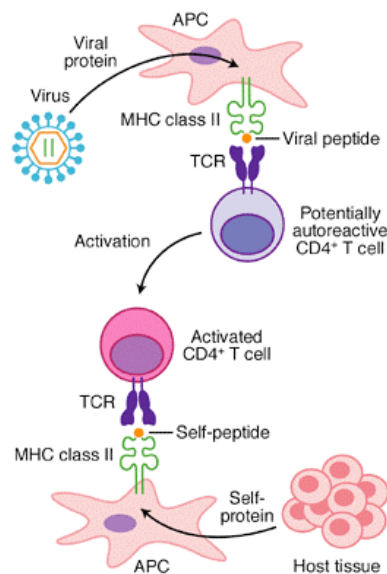
Oggi i pazienti affetti da SM hanno una vasta gamma di opzioni terapeutiche, come ad esempio l'uso di anticorpi monoclonali, tuttavia essendo una patologia cronica, le terapie hanno il solo merito di ritardare l'insorgenza dei sintomi più gravi, ma non di risolverla (Rolak 2009).

## **Eziologia**

Le cause della SM a oggi sono ancora sconosciute, tuttavia è considerata come una complessa patologia di natura multifattoriale. Diverse sono le ipotesi, la predisposizione genetica, l'influenza di agenti patogeni, sono fattori che hanno un rischio importante, ma l'ipotesi più accreditata che ha più evidenze sperimentali rimane la reazione anomala del sistema immunitario. (Olson, Ercolini et al. 2005).

Il presupposto patogenetico della SM è la presenza di cellule linfocitarie di tipo T che, forse attraverso fenomeni legati al mimetismo molecolare, diventano autoreattive, scatenando la risposta verso l'ospite e perdendo quella che è chiamata tolleranza self (Markovic-Plese, Pinilla et al. 2004). In seguito all'attivazione patologica, si verifica la perdita della funzione soppressoria da parte dei linfociti T a funzione regolatoria (T-reg) (Viglietta, Baecher-Allan et al. 2004).

L'antigene mielinico è quindi presentato al linfocita CD4 positivo (CD4+) dalla cellula che presenta l'antigene (APC) via Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe II (MHC II) assieme ai ligandi complementari a elementi di membrana del recettore dei linfociti T. L' ancoraggio reciproco dei diversi ligandi ai rispettivi recettori permette l'interazione funzionale linfocita CD4+/APC. Per raggiungere il sistema nervoso centrale, il linfocita attivato deve attraversare l'endotelio del capillare cerebrale (Springer 1994).



**Schema A:** Le risposte immunitarie sono basate sulla differenziazione “Self”/“non Self” attuata dal Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC), che nell’uomo è codificato dal complesso genico dell’ antigene leucocitario umano (HLA). Quando un agente estraneo è fagocitato dalle cellule presentanti l’antigene (APC), va incontro ad un processo di degradazione che culmina con l’associazione ad una molecola MHC sulla superficie della cellula per essere riconosciuto dalle cellule Immunocompetenti. Ogni molecola MHC ha il compito di legarsi ad un particolare peptide antigenico e presentarlo al recettore delle cellule T (TCR) che provvederà ad eliminarlo attraverso la fase effettrice della risposta immunitaria.

Esistono tre principali prove a carico che la SM sia una patologia autoimmune:

Nell’uomo esistono cloni di cellule linfocitarie di tipo T che riconoscono antigeni

mielinici (Pette, Fujita et al. 1990);

Peptidi sintetici che mimano le sequenze di proteina mieliniche inducono espansione clonale di cellule linfocitarie di tipo T (Bielekova, Goodwin et al. 2000);

Il modello sperimentale in vivo della SM si basa sull'immunizzazione di una proteina mielinica (Gold, Lington et al. 2006; Prinz, Garbe et al. 2006).

L'ipotesi che la SM sia una malattia autoimmune è supportata da diverse evidenze sperimentali. In primo luogo, cellule linfocitarie di tipo T antigene-specifiche per la mielina, possono essere isolate dal sangue periferico da persone affette da SM. In questo caso viene persa la tolleranza immunitaria verso l'ospite e si arriva ad un'attivazione incontrollata della risposta linfocitaria. In ogni caso, rimane non chiaro come le cellule T autoreattive vengano attivate nel compartimento immune periferico, quando il loro autoantigene è presente nel sistema nervoso centrale e non in periferia. Tuttavia, poiché i TCR (T-Cell Receptor) sono degenerati, c'è la possibilità di una cross-reattività (mimetismo molecolare) dove le cellule T autoreattive potrebbero attivarsi nel compartimento periferico immune cross-reagendo con antigeni particolari come ad esempio quelli di agenti microbici.

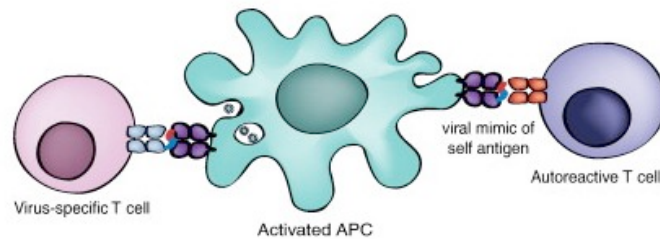
In secondo luogo, ulteriori prove a sostegno che la SM sia una malattia autoimmune vengono dagli studi con ligandi peptidici alterati (APL) nei pazienti SM che mimano antigeni mielinici. Gli APL sono stati progettati come agonisti parziali o antagonisti del TCR dei linfociti T autoreattivi con l'idea iniziale di inibire l'attivazione delle cellule T autoreattive. Purtroppo, è stato dimostrato che questi APL portano ad un'espansione clonale ed attivazione di cellule linfocitarie di tipo T APL specifiche, con una conseguente attivazione di una risposta immune verso la mielina.

Infine, l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE ndr), che è il modello sperimentale in vivo di malattia che riproduce le principali caratteristiche

istopatologiche di SM ed è ampiamente utilizzato anche per simulare l'infiammazione autoimmune e la demielinizzazione nel sistema nervoso centrale, si ottiene nel topo attraverso l'immunizzazione contro una proteina mielinica. In seguito, le cellule immunitarie come linfociti T e macrofagi migrano nel parenchima del CNS portando all'infiammazione tissutale e alla demielinizzazione.

### **Mimetismo molecolare**

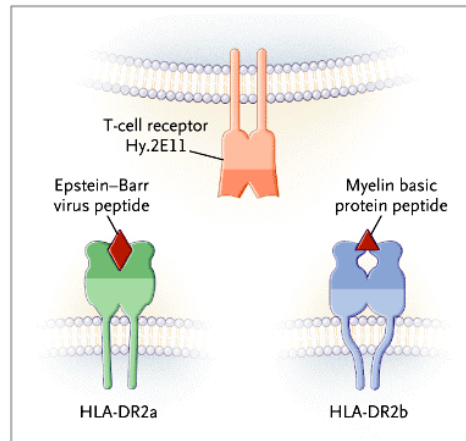
Il mimetismo molecolare è una delle più intriganti ipotesi a sostegno del meccanismo scatenante la malattia. E' noto che i linfociti di tipo T autoreattivi in fase attiva possono essere isolati da pazienti con SM, inoltre, le stesse cellule possono essere isolate anche da individui sani ma in una fase di quiescenza. Partendo da questo presupposto, i linfociti T autoreattivi esercitano il loro potenziale patogeno solo dopo attivazione, che può avvenire tramite diversi meccanismi, uno di quelli proposti è appunto il mimetismo molecolare (Olson, Ludovic Croxford et al. 2004). Quando le sequenze peptidiche di agenti virali, come il Virus di Epstein-Barr (EBV), risultano avere un alto grado di omologia con una proteina self, come ad esempio la proteina basica della mielina (MBP) e appartengono al medesimo complesso maggiore d'istocompatibilità MHC, il recettore delle cellule T si può attivare e scatenare una risposta immune verso una molecola self (Wucherpfennig 2004; Libbey, McCoy et al. 2007).



**Schema B:** *Quando una molecola esogena con elevata omologia strutturale a un antigene endogeno (come potrebbe essere il caso di uno mielino) viene in contatto col sistema immunitario, sarà presentato ai linfociti T specifici per quel dato antigene, che saranno attivati e stimolati a proliferare e monteranno una risposta immune diretta sia contro il peptide esogeno sia contro l'antigene endogeno.*

A dimostrazione di ciò un gruppo di studiosi ha isolato da pazienti di SM l'antigene specifico per il recettore di cellule T, selezionato in precedenza per la sua reattività verso la proteina basica della mielina (MBP) e dimostratosi in grado di reagire con un peptide analogo di un antigene virale, la polimerasi estratta dal virus di Epstein-Barr. L'imitazione non è solo per somiglianza tra i due peptidi, ma essi hanno parti di sequenza simile e appartengono al medesimo complesso d'istocompatibilità (MHCII). In questo studio, i ricercatori trasfettarono cellule di topo con il gene che codifica per il recettore specifico, stimolando la trasfezione di queste cellule con altre cellule ingegnerizzate per esprimere anche HLA-DR2A o HLA-DR2B. I risultati indicano che il recettore può riconoscere in ugual modo i due peptidi derivati, uno da EBV che lega HLA-DR2A e l'altro da MBP che lega HLA-DR2B (Lang, Jacobsen et al. 2002).





**Schema C:** *E' stato dimostrato che sequenze peptidiche di agenti virali, come il Virus di Epstein-Barr (EBV), risultano avere un'identità di sequenza alta con la proteina basica della mielina (MBP) e appartengono al medesimo complesso d'istocompatibilità MHC di classe 2, le HLA-DR stimolando quindi il medesimo recettore delle cellule T. Il recettore essendo in grado di legare entrambi i peptidi e riconoscendo entrambi come antigeni, si attiva fagocitandoli e determinando il danno.*

## Epidemiologia

La SM colpisce prevalentemente soggetti di sesso femminile, con un rapporto femmine/maschio variabile da 1.9 : 1 a 3.1 : 1. Esordisce tra i venti e i quarantacinque anni con un picco d'incidenza intorno ai trenta anni ed è rara prima dei quindici e dopo i sessanta anni. L'incidenza di malattia è pari a 1:1000, in Italia esistono circa 58000 persone affette. Si stima che in Europa e in America l'incidenza maggiore della malattia si presenti nelle regioni del Nord rispetto a quelle del Sud (Koch-Henriksen and Sorensen).

## Predisposizione genetica

Studi effettuati sui gemelli affetti da SM, indicano che esiste una chiara predisposizione genetica con tasso di concordanza del 25-30% e indice di

ereditabilità di 0,25-0,76 in gemelli monozigoti. Studi di popolazione indicano che circa il 20% dei pazienti con SM hanno almeno un parente affetto, il rischio di ammalarsi quindi nei parenti di primo grado è maggiore ed è pari a 3-5% in più rispetto alla popolazione generale. Sulla base di questi risultati, gli sforzi investigativi si sono concentrati sulla ricerca del gene responsabile di SM. Anche se non esistono evidenze dirette, il gruppo genico HLA (Human Leukocyte Antigen) esercita l'effetto di suscettibilità genetica più forte nella SM. Infatti, studi riguardanti il sequenziamento genico in individui affetti da SM hanno individuato una forte correlazione con l'allele HLA DRB1 \* 1501, che rappresenta poco meno del 50% della base genetica totale della malattia. Mentre invece, i geni HLA-DR-DQ comportano un rischio maggiore di sviluppare la SM e il rischio associato a un aplotipo HLA specifico sembra essere dipendente dal background etnico. L'associazione tra HLA-DRB1 \* 15 è nota da tempo nel nord Europa, mentre in altre regioni (ad esempio in Sardegna), l'associazione con l'insorgenza di malattia risiede nell'aplotipo HLA-DRB1 \* 0301, HLA-DRB1 \* 0405, e HLA-DRB1 \*(Marrosu, Murru et al. 2001). Altri aplotipi sono stati associati a pazienti affetti da SM come HLADRB1 \* 03, HLA-DRB1 \* 01, HLA-DRB1 \* 10, HLA-DRB1 \* 11, HLA-DRB1 \* 14, e HLA-DRB1 \* 08 ognuno di esse si differenziano sia per grandezza di effetto (penetranza), oppure per un effetto di combinazione. Tutte le associazioni sopra elencate e le frequenze relative di suscettibilità dell'aplotipo HLA, svolgono un ruolo nel determinare la suscettibilità e l'insorgenza di malattia (Masterman, Ligers et al. 2000; Dyment, Herrera et al. 2005; Barcellos, Sawcer et al. 2006; Ramagopalan, Morris et al. 2007).

## **Gruppo etnico**

La differente distribuzione degli aplotipi sembra essere correlata anche con i gruppi etnici. Infatti, come gli studi di popolazione hanno evidenziato un rischio relativo maggiore negli individui caucasici rispetto al resto delle popolazioni, così gli stessi dati hanno mostrato una minore prevalenza di SM negli afro-americani (Kurtzke, Beebe et al. 1979).

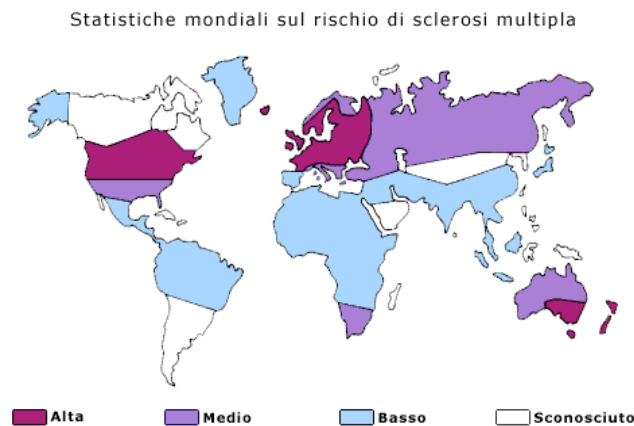
## **Sesso**

Non è chiaro il motivo per cui le donne siano affette più dell'uomo di SM. L'aumento dell'incidenza della SM nelle donne suggerisce anche un incremento nel rischio dovuto a fattori correlati a specifiche caratteristiche fisiologiche o ormonali femminili. Approfondimenti sperimentali dal punto di vista genetico non hanno evidenziato particolari geni implicati. (Ramagopalan, Byrnes et al.; Orton, Herrera et al. 2006).

## **Fattori ambientali**

Il numero totale stimato di persone affette da SM del mondo è pari a 2-2.500.000. La malattia non è equamente distribuita in tutto il mondo, esiste un gradiente latitudinale correlato alla frequenza di SM; la prevalenza varia tra i 5 casi ogni 100.000 nelle zone tropicali o in Asia e 100-200 casi per 100.000 nelle zone temperate, specialmente quelli con grandi popolazioni di origine nord-europea, compresi gli Stati Uniti, il Canada, la Nuova Zelanda e parti dell'Australia. L'irregolare distribuzione geografica tra le diverse popolazioni e le differenze

etniche d'insorgenza di malattia, hanno attirato l'interesse dei ricercatori per quasi un secolo. Sebbene siano stati proposti diversi meccanismi ad oggi, le ragioni del gradiente latitudinale rimangono sconosciute.



**Schema D:** *Rischio geografico di SM. Si stima che in Europa l'incidenza maggiore della malattia si presenti nelle regioni al Nord rispetto al Sud e così pure in America del nord. In conformità a diversi studi epidemiologici, si è potuta dividere la mappa del mondo in tre zone a diversa intensità d'incidenza della malattia.*

## Vitamina D

L'esposizione al sole e l'assunzione di vitamina D sono possibili spiegazioni per l'associazione tra latitudine e incidenza di SM (Acheson, Bachrach et al. 1960). Dati sperimentali ed epidemiologici suggeriscono che l'esposizione alla luce solare è inversamente correlata all'insorgenza della malattia (van der Mei, Ponsonby et al. 2003). Uno studio prospettico ha dimostrato che l'assunzione di supplementi vitaminici, precursori della vitamina D (25-idrossicolecalciferolo) e la vitamina D stessa, comporta una riduzione del 40% del rischio di ammalarsi, anche se le quantità di vitamina D assunte sono ritenute insufficienti per modificare le concentrazioni di vitamina D in circolo. Studi invece relativi alla molecola naturale hanno evidenziato che il consumo di pesce grasso e olio di fegato di merluzzo in Norvegia, entrambi ricche fonti di vitamina D, sono fattori di rischio negativi

(Munger, Levin et al. 2006.)

## **Agenti patogeni**

Il dogma dell'agente patogeno accompagna da sempre la storia naturale della SM. Diversi agenti infettivi, tra cui il virus di Epstein-Barr, l'herpes virus 6 e la *Chlamydomyxa pneumoniae* sono stati proposti come potenziali patogeni per la SM.

La maggior parte dei pazienti SM (99%) risultano essere positivi al Epstein-Barr virus rispetto a circa il 94% dei controlli (Ascherio and Munger 2007). Mentre la SM è molto rara negli adulti non infetti da EBV, persone con alti titoli di anticorpi anti-EBV hanno un rischio maggiore di sviluppare la SM rispetto a quelli con basse concentrazioni. Il rapporto sembra essere temporale; i titoli anticorpali nel plasma dovuto alla presenza dell'antigene nucleare EBV 1 (EBNA1) aumentano diversi anni prima della comparsa dei sintomi neurologici (Sundstrom, Juto et al. 2004; Levin, Munger et al. 2005). Individui con una storia di mononucleosi infettiva hanno un elevato rischio di sviluppare la SM. Considerando un intervallo di tempo minimo tra l'infezione dal virus della mononucleosi e il ricovero per SM non si è riscontrato un aumento significativo del rischio di malattia con un valore del 2.17 in un intervallo di confidenza tra 0.79-4.77 mentre analizzando l'effettivo rischio dieci anni dopo l'infezione del virus si nota che il rischio di sclerosi multipla assume un valore di 4.01 in un intervallo di confidenza tra 1.48 e 8.93. Il rischio di sclerosi multipla è maggiore nelle persone con precedenti infezioni da mononucleosi infettiva indipendentemente dal sesso, età, e indipendente dalla durata e dalla gravità dell'infezione. Il rischio di sclerosi multipla può aumentare dopo l'infezione del virus della mononucleosi infettiva e persiste per almeno trenta anni dopo

l'infezione (Nielsen, Rostgaard et al. 2007).

## ***Aspetti clinici della Sclerosi Multipla***

### **Iter diagnostico**

La SM è una malattia estremamente eterogenea con sintomi generici, sovrapponibili ad altre patologie neurologiche, per questo motivo è fondamentale trovare un iter diagnostico definito per stabilire con precisione nel più breve tempo possibile la diagnosi. I moderni criteri diagnostici per la SM richiedono prove oggettive di due lesioni del CNS separati nello spazio e nel tempo in modo da poter escludere altre potenziali cause di lesioni. Questi principi risalgono dai criteri di Schumacher nel 1965, quando furono gettate le basi per diagnosticare la SM. Nel 1983, i criteri di Poser sostituirono i criteri di Schumacher per la diagnosi della SM. I criteri di Poser incorporarono le novità precliniche sulla diagnostica scoperte proprio negli anni '70; questi criteri si basarono su una verifica dettagliata della letteratura e rispecchiarono le opinioni di venticinque esperti di SM (Poser, Paty et al. 1983). Nel 2000, una giuria internazionale fu convocata per sviluppare nuovi criteri diagnostici per la SM e i criteri emersi divennero noti come i criteri di McDonald. I criteri diagnostici di McDonald (2001 e 2005), cambiando il concetto di disseminazione spazio-temporale, consentendo una diagnosi precoce e spesso più accurata della malattia, utilizzando risonanza magnetica, potenziali evocati, e cambiamenti immunologici del CSF (Polman, Reingold et al. 2005).

La diagnosi differenziale include molte condizioni, che variano secondo la presentazione clinica. L'anamnesi dettagliata, un esame generale medico, associati ad un esame neurologico completo, sono essenziali per la diagnosi. La

storia può rivelare sintomi precedenti di SM, come la perdita della vista unilaterale, visione offuscata o doppia, segno di Lhermitte, o disturbi sensoriali in una parte del SNC. Questi sintomi sono utili nel suggerire una diagnosi di SM, ma non possono far parte dei criteri diagnostici a meno che non vi siano prove documentate di deficit elevato. Una volta che l'esame clinico ha rivelato evidenza di un attacco di SM, il passo successivo è al solito una risonanza magnetica. Tra tutti i metodi diagnostici è la più usata e nel corso degli anni ha assunto un ruolo di grande importanza sia nella diagnosi della SM, che nel monitoraggio del decorso della malattia. L'ubicazione, le dimensioni e l'orientamento delle lesioni visibili in risonanza magnetica possono spesso suggerire la presenza di malattia ma, in assenza di una precisa presentazione clinica, queste lesioni visibili all'RM non sono di per sé molto specifiche per la SM. La RM consente di evidenziare le placche tipiche di demielinizzazione, in più grazie all'utilizzo di un mezzo di contrasto paramagnetico (gadolinio) si è in grado di rivelare le alterazioni dello stato della barriera emato-encefalica, le prime fasi del processo infiammatorio e di evidenziare la formazione di nuove placche. L'aspetto più importante di questa tecnica è la capacità di individuare lesioni clinicamente non evidenti, questa caratteristica può essere determinante per la gestione dell'approccio terapeutico.

Alle analisi strumentali, si affiancano anche quelle di laboratorio come la corsa elettroforetica del liquor che origina bande oligoclonali. L'esame del liquor è spesso molto indicativo di SM, un incremento del tasso di sintesi delle immunoglobuline IgG in assenza di correlato sierico possono essere un indice di malattia. Inoltre analizzando il liquor di pazienti SM si è in grado di valutare l'indice di link che permette di valutare il danno della barriera emato-encefalica.

Considerando il lungo iter diagnostico della SM, sarebbe auspicabile lo studio e la caratterizzazione di bio-marcatori specifici di malattia. Ad oggi non esistono però

dei bio-marcatori validi ed unici di malattia.

Con il termine bio-marcatore si definisce un indicatore di un processo biologico che permette di (Harris and Sadiq 2009):

- Comprendere immuno-patogenicità di pazienti SM;
- Migliorare l'efficienza diagnostica della SM;
- Determinare fattori prognostici;
- Monitorare decorso clinico;
- Ottimizzare efficacia terapeutica;
- Monitorare la terapia.

La diagnosi precoce e il tempestivo intervento terapeutico sono fattori critici per garantire i migliori risultati a lungo termine. La disponibilità di bio-marcatori affidabili potrebbe modificare radicalmente la gestione della patologia nelle fasi critiche di progressione della malattia.

Identificazione di marcatori in grado di predire lo sviluppo della SM in popolazioni ad alto rischio permetterebbero di sviluppare strategie d'intervento per prevenire l'evoluzione della malattia. Studi con anticorpi anti-mielina e analisi di microarray di espressione genica finora non hanno fornito bio-marcatori in grado di predire lo sviluppo futuro della malattia, allo stesso modo, studi approfonditi su siero e il liquido cerebrospinale (CSF) non hanno evidenziato la presenza di bio-marcatori (Harris and Sadiq 2009).



## Varianti cliniche di SM

Sulla base della progressione dei sintomi esistono diverse tipologie di malattia, raggruppabili in sottotipi. Oggi i criteri di diagnostica e di suddivisione in sottotipi di malattia seguono i criteri di McDonald (McDonald, Compston et al. 2001).

Presentazione clinica	Dati aggiuntivi necessari
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 o + attacchi</li> <li>• 2 o + lesioni clinicamente obiettabili</li> </ul>	Nessuno (eventuali ulteriori evidenze devono essere compatibili con una SM)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 o + attacchi</li> <li>• 1 lesione clinicamente obiettabile</li> </ul>	Disseminazione nello spazio dimostrata da: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM</li> <li>• liquor positivo e 2 lesioni RM compatibili con SM</li> <li>• successiva ricaduta riconducibile a lesione in sede diversa.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 attacco</li> <li>• 2 o + lesioni clinicamente obiettabili</li> </ul>	Disseminazione nel tempo dimostrata da: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM</li> <li>• Successiva ricaduta</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 attacco</li> <li>• 1 lesione clinicamente obiettabile</li> </ul>	Disseminazione nello spazio dimostrata da: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM</li> <li>• Liquor positivo e 2 o + lesioni RM compatibili con SM</li> </ul> Disseminazione nel tempo dimostrata da: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM</li> <li>• Successiva ricaduta</li> </ul>
Esordio insidioso di sintomi compatibili con SM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liquor positivo</li> <li>Disseminazione nello spazio dimostrata da:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evidenza di RM di 9 o + lesioni iperintense in T2</li> <li>• 2 o + lesioni RM spinali</li> <li>• 4-8 lesioni RM encefaliche e 1 spinale</li> <li>• PEV positivi e 4-8 lesioni RM encefaliche</li> <li>• PEV positivi e &lt;4 lesioni RM encefaliche</li> <li>• 1 lesione RM spinale</li> </ul> </li> <li>Disseminazione nel tempo dimostrata da:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• RM</li> <li>• Progressione graduale per 1 anno</li> </ul> </li> </ul>

**Tabella 1:** I criteri diagnostici di "McDonald" del 2001, in seguito revisionati nel 2005, hanno come intento principale quello di velocizzare la diagnosi della SM senza comprometterne l'accuratezza e quindi rendere la conferma della diagnosi di SM più sicura.

### Sindrome clinicamente isolata (CIS)

Il primo sintomo ravvisabile dal paziente SM è noto come CIS, ossia sindrome clinicamente isolata. Può avere le caratteristiche tipiche e indicative di SM (della

durata di almeno 24 h) presentando delle anomalie all'esame neurologico. Poiché ci sono molte condizioni che possono mimare la SM, è fondamentale eseguire una diagnosi differenziale in tutti i pazienti che presentano una CIS. L'esordio presenta sintomi neurologici: la neurite ottica, di solito unilaterale e dolorosa; disturbi legati alla funzionalità del tronco cerebrale, come deficit di nervi cranici (nevralgia del trigemino); oftalmoplegia (unilaterale o bilaterale); problemi cerebellari; deficit di natura sensoriale. L'importanza del riconoscimento precoce della CIS è confermata dai risultati di sperimentazioni terapeutiche, i quali mostrano che è fondamentale introdurre con largo anticipo la terapia immunomodulante per allungare i tempi di possibili ricadute, per rallentare la progressione della disabilità e la compromissione cognitiva (Tintore, Rovira et al. 2006).

### **Recidivante remittente (SMRR)**

Rappresenta la forma più comune di SM (80%). Il sottotipo di malattia SMRR è caratterizzato da attacchi ricorrenti che variano in frequenza e gravità, che si alternano a periodi, anche molto lunghi, di remissione. Una ricaduta può tuttavia creare una disabilità residua nel paziente che non sarà più in grado di ritornare allo stato iniziale.

I criteri indicano chiaramente la necessità di una prova oggettiva, sia clinica sia strumentale, per dimostrare le fasi di recidiva e remissione nello spazio e nel tempo. Tali criteri utilizzando l'RM, sulla base dei criteri di Barkoff, hanno rivelato una precisione del 79% per la diffusione nello spazio e nel 82% per la diffusione nel tempo (Swanton, Rovira et al. 2007).

### **Primaria progressiva (SMPP)**

E' una forma meno frequente, rappresenta circa il 15% dei pazienti di SM (Ebers 2001). Solitamente porta a disabilità progressiva, senza né recidive né miglioramenti e tende a svilupparsi in età successiva rispetto agli altri tipi di SM. Provoca una disabilità progressiva fin dal primo sintomo, clinicamente la maggior parte dei pazienti presenta una mielopatia progressiva altamente invalidante. Secondo i criteri McDonald la diagnosi di SMPP si ottiene quando si verifica una progressione di malattia in un anno, con almeno due nuove lesione rilevabili in RM. (Barrie J, 2009; Nielson, 2007).

### **Secondaria progressiva (SMSP)**

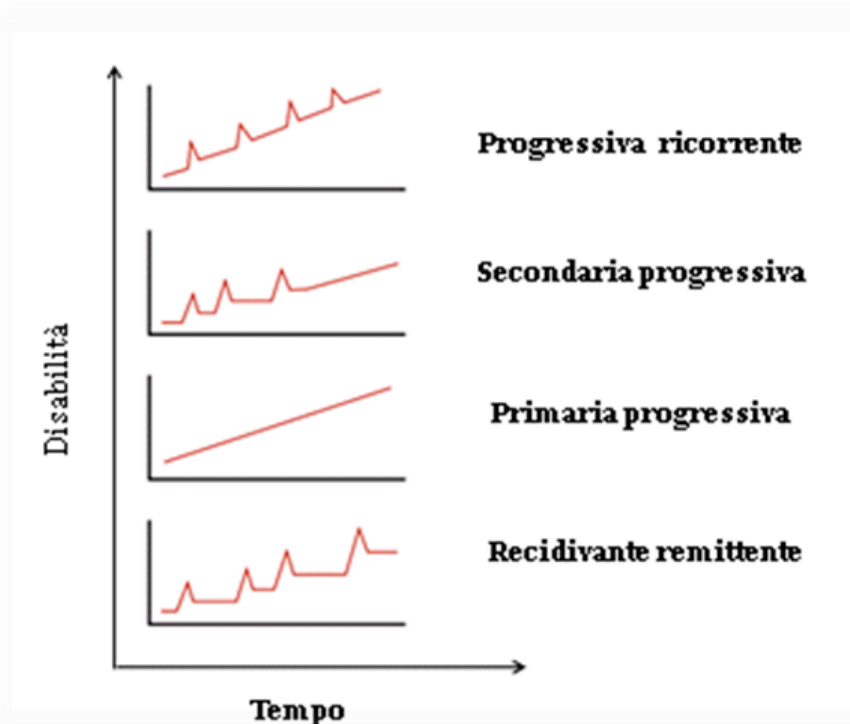
Questo sottotipo di patologia può svilupparsi lentamente in modo progressivo dopo un CIS iniziale, in realtà una SMRR solitamente ha come decorso clinico la SMSP. Il sottotipo SPMS può essere osservato 3-5 anni dopo il primo sintomo di malattia e nel 90% dei casi dei pazienti una SMRR diventa una SMSP dopo venticinque anni dal primo sintomo di malattia (Ebers GC, 2001).

### **Progressiva ricorrente (SMPR)**

La malattia risulta essere progressiva fin dal principio, con forti attacchi dei sintomi e deterioramento neurologico continuo. Ogni inasprimento della malattia è di solito seguito da un blando miglioramento delle condizioni del paziente, sebbene durante le fasi di attività della malattia i sintomi tendano ad aggravarsi significativamente.

## Benigna

È considerata come un ulteriore sottotipo di SMRR e comprende quei pazienti in cui le ricadute portano a delle piccole disabilità senza però alterare in modo significativo la funzionalità. Prove autoptiche hanno indicato elementi istologici tipici della malattia senza una storia clinica effettiva, questo dimostra che il sottotipo benigno è una patologia senza importanti sintomi clinici. Studi epidemiologici rivelano che pazienti con diagnosi di SM classificata come benigni dopo dieci anni, rimane ancora tale nel 55% dei pazienti nei successivi dieci anni (Hawkins and McDonnell 1999; Sayao, Devonshire et al. 2007).



**Schema E:** Dal punto di vista clinico, la sclerosi multipla è raggruppata in quattro tipi escludendo la forma benigna e la CIS. Nello schema sono riportati gli andamenti tipici di ciascun sottotipo di malattia in ordine di disabilità e in relazione al tempo di malattia.

## Trattamenti farmacologici

Le possibilità di trattamento della SM sono essenzialmente legate alla storia clinica del paziente in relazione anche al sottotipo di malattia.

Inoltre, due sono i potenziali target cellulari di terapia:

I linfociti T sono da ritenersi fondamentali nella patogenesi della SM, cloni di linfociti CD4 autoreattivi sono presenti nei pazienti;

La SM è caratterizzata dalla produzione intratecale di IgG oligoclonali e le plasmacellule si trovano accumulate nelle lesioni. Il linfocita B è evidentemente coinvolto.

Per molti anni i corticosteroidi sono stati il trattamento di prima scelta. I corticosteroidi riducono la durata della ricaduta e accelerano la ripresa, tuttavia, non vi sono prove convincenti che influenzino il grado complessivo di recupero o il corso a lungo termine della malattia. Il regime terapeutico più comunemente applicato è costituito da un breve corso di metilprednisolone ad alte dosi dato per via endovenosa (IVMP, 5-100 mg al giorno per 3/5 giorni).

In generale, l'obiettivo del trattamento nei pazienti con SM è quello di ridurre la frequenza e la gravità delle ricadute, nonché di prevenire o ritardare l'inizio della fase progressiva della malattia, in passato, sono stati utilizzati i comuni farmaci immunosoppressori, ma non hanno mai soddisfatto le aspettative.

Il primo farmaco ad hoc registrato prima dagli Stati Uniti e poi dalle autorità di regolamentazione europee per il trattamento della SM è stato l'interferone-beta. Ad oggi esistono due formulazioni del farmaco, una è l'interferone beta-1a (Avonex, Rebif) che è un prodotto ricombinante glicosilato prodotto da cellule di mammifero, con una sequenza di aminoacidi identica a quella dell'interferone beta naturale

mentre la seconda è l'interferone beta-1b (Betaferon; USA: Betaseron) che invece è un prodotto non glicosilato ricombinante prodotto da cellule batteriche in cui viene sostituita una serina con una cisteina in posizione 17. Il risultato più evidente di tutte le sperimentazioni cliniche che ha portato all'approvazione del farmaco è stata una netta diminuzione sia nella frequenza (di circa un terzo) sia nella gravità delle riacutizzazioni analizzata tramite la risonanza magnetica (Paty and Li 1993; Simon, Jacobs et al. 1998; Li and Paty 1999).

Dal punto di vista patogenetico l'interferone-beta agisce in periferia, modulando la risposta linfocitaria T. E' stata infatti dimostrata la variazione dell'equilibrio Th1/Th2 in senso Th2, con la produzione di diverse citochine come, IL-4 e IL-5, IL-10, IL-13. E' stata anche dimostrata una riduzione di espressione di molecole costimolatorie sia linfociti T che B specifiche, un blocco dell'up-regolazione delle molecole di adesione espresse dai linfociti T attivati e una riduzione della sintesi da parte dei linfociti T di metalloproteasi.

Il Glatiramer acetato (Copaxone) è un copolimero sintetico con alcune caratteristiche immunologiche simili alla proteina basica della mielina (MBP). Il trattamento giornaliero con iniezioni sottocutanee di 20 mg di glatiramer acetato ha portato a una riduzione del 29% del tasso annuale di ricadute di malattia in due trials clinici (Johnson, Brooks et al. 1995). Queste osservazioni cliniche sono state in seguito confermate dai risultati sulla risonanza magnetica (Comi, Martinelli et al. 2009). Gli effetti collaterali del glatiramer acetato sono generalmente lievi. Le indicazioni per l'uso del glatiramer acetato sono paragonabili a quelle per l'interferone beta, ma la maggior parte dei medici ritengono che sia un trattamento di seconda linea per la SM. Il glatiramer acetato agisce in periferia, come l'interferone, ma con un meccanismo di "depistaggio". Un meccanismo d'azione proposto del farmaco, ipotizza che i polimeri del farmaco, formati dalla

combinazione random di quattro amminoacidi in rapporto molare costante fra loro (L- alanina, L-acido glutammico, L-tirosina, L-lisina) competono con la MBP e le altre proteine mieliniche nel legame con l'MHC e successiva presentazione da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC) (Ziemssen, Kumpfel et al. 2005).

La migrazione delle cellule infiammatorie attraverso la barriera emato-encefalica dipende dall'interazione di molecole di adesione come VLA-4 (very late antigen-4) espressa sui linfociti attivati e sui monociti, con il suo ligando VCAM-1 (molecola di adesione di cellule vascolari-1) espresso sulle cellule cerebrovascolari endoteliali (Elices, Osborn et al. 1990).

Il Natalizumab (Tysabri, Biogen Idec) è un anticorpo monoclonale umanizzato IgG4 che lega al VLA-4. Come altri anticorpi IgG4 umanizzati, Natalizumab non attiva il complemento (quindi non lisa la sua cellula bersaglio) ma è stato studiato per impedire fisicamente l'interazione di VLA-4 con VCAM-1, in modo da impedire il traffico di cellule infiammatorie nel sistema nervoso centrale. In linea con questo concetto, natalizumab ha dimostrato di ridurre il numero di linfociti, in particolare cellule T CD4 +, risultando quindi efficace contro la malattia. Il farmaco è tuttora in una seconda fase di trial, poiché ha dimostrato diversi effetti collaterali, anche gravi (Stuve, Marra et al. 2006).

Il Fingolimod (FTY720) è un immunosoppressore per via orale in fase di valutazione come trattamento della SM. Si pensa possa essere utile per inibire la migrazione dei linfociti dal tessuto linfoide secondario nel CNS. Fingolimod raggiunge il suo effetto, agendo come un super-agonista del recettore sfingosina-1-fosfato, che è prevalentemente espresso sui linfociti e ne regola la migrazione dal tessuto linfoide. L'eccessiva stimolazione del recettore porta alla sua internalizzazione, privando così queste cellule di segnali di migrazione cruciali (Sawicka, Dubois et al. 2005; Daniel, Sartory et al. 2007).

Nell'ultimo decennio sono state sviluppate nuove terapie della SM, allo scopo di disattivare un componente del sistema immunitario o per prevenire la neurodegenerazione, come visto in forme progressive della malattia. Inibizione del sistema immunitario può essere realizzato in vari modi, tra cui:

- Inibire popolazioni di cellule immunitarie che si ritiene siano coinvolte nella patogenesi della malattia (ad esempio daclizumab per neutralizzare CD25 su tutte le cellule T);
- Bloccare la migrazione dei linfociti periferici nel sistema nervoso centrale (natalizumab e fingolimod)
- Ablazione del sistema immunitario tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali (Rituximab per i linfociti B, Alemtuzumab per tutti i linfociti) o dopo chemioterapia e ricostituzione, consentendo la rigenerazione da un pool di precursori di cellule ematopoietiche (trapianto di cellule staminali autologhe).

Nonostante un certo numero di questi approcci si sono dimostrati essere efficaci, un problema fondamentale è che riducono o inibiscono funzionalmente le cellule normali immunitarie così come le cellule patogene, compromettendo potenzialmente la protezione immunitaria.

IL-2 è un fattore di crescita fondamentale per l'espansione e la maturazione delle cellule T attivate. Daclizumab è un anticorpo monoclonale IgG1 umanizzato che si lega ai recettori della catena  $\alpha$  (CD25) dell'IL-2, espresso su cellule T attive e non a riposo, bloccando il legame con IL-2 senza attivare citolisi. Con l'intento di attivare specifici target, cellule T autoreattive, il daclizumab è stato sperimentato come trattamento nella SM (Waldmann 2007).

Alemtuzumab (noto formalmente come Campath-1H) è un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro CD52, una proteina presente sulla superficie dei linfociti



e dei monociti con una funzione ad oggi ancora sconosciuta. Il trattamento produce rapidamente una profonda linfopenia (Coles, Compston et al. 2008).

Ad oggi, nessun farmaco, immunomodulante o di altra natura, si è dimostrato in grado di prevenire o invertire la disabilità una volta che i pazienti sono entrati nella fase secondaria progressiva della malattia. Alcuni interpretano questo come prova che le fasi infiammatorie e degenerative siano indipendenti. Si crede che la neurodegenerazione avvenga attraverso meccanismi non infiammatori, ma costituiti e dipendenti da una precedente infiammazione. Se questo è il caso, allora terapie anti-infiammatorie potrebbero impedire il decorso della malattia se somministrate precocemente nel corso della malattia, prima della cascata di eventi che porta alla degenerazione assonale. Questi trattamenti costituiscono una base scientifica rivelando aspetti interessanti della patogenesi della SM e della complessità del sistema umano (Jones and Coles).

## ***Mielina***

La composizione della mielina è stata ampiamente studiata negli ultimi trenta anni, è il costituente essenziale della materia bianca del SNC. La mielina è una struttura scarsamente idratata contenente il 40% di acqua in contrasto con la materia grigia (80%); il suo peso a secco è composto al 70% da lipidi e al 30% da proteine.

La guaina mielinica che circonda la maggior parte degli assoni costituisce la membrana più abbondante nel sistema nervoso centrale dei vertebrati. La sua composizione unica (ricca di lipidi e basso contenuto d'acqua che permette l'isolamento elettrico degli assoni) e la sua struttura segmentale, è responsabile della conduzione saltatoria degli impulsi nervosi. La conduzione ad alta velocità, la fedeltà di trasferimento di segnalazione su lunghe distanze e l'economia dello spazio sono i tre principali vantaggi attribuiti al sistema nervoso dei vertebrati dalla

guaina mielinica, in contrasto con il sistema nervoso degli invertebrati, dove una rapida conduzione è accompagnata da un aumento del calibro assonale. L'importanza della mielina nello sviluppo umano è evidenziata dal suo coinvolgimento in una serie di diverse malattie neurologiche come appunto la SM nel sistema nervoso centrale e neuropatie periferiche del sistema nervoso periferico (PNS). La mielina, così chiamata da Virchow, è una struttura a spirale costituita da estensioni della membrana plasmatica di cellule gliali, mielinizzanti, gli oligodendrociti nel SNC (Peters 1964).

Queste cellule inviano estensioni di membrana citoplasmatica, ognuna delle quali costituisce un settore di guaina intorno a un assone. Diverse caratteristiche strutturali caratterizzano la mielina:

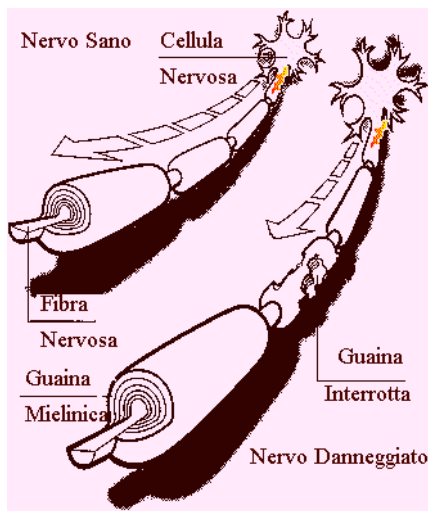
La sua struttura è periodica (Butt and Ransom 1989):

- È costituita da un'alternanza di strati concentrici elettroni-densi ed elettroni-trasparenti;
- La periodicità delle lamelle è di 12 nm;
- Ogni guaina mielinica o internodo sembra essere di 150-200 mm di lunghezza;
- Gli internodi sono separati da spazi in cui la mielina viene a mancare, i nodi di Ranvier.

La guaina mielinica è separata dalla membrana assonale da una stretta fessura extracellulare, lo spazio peri-assonale. La mielina risulta meno compatta, nella parte interna ed esterna della spirale, formando anelli interni ed esterni che trattengono una piccola quantità di citoplasma degli oligodendrociti. Le lamelle fini della mielina nei pressi del nodo di Ranvier contengono citoplasma.

I nodi di Ranvier svolgono un ruolo importante nella conduzione nervosa dell'impulso. Permettono la conduzione saltatoria veloce, l'impulso salta da un

nodo all'altro, piuttosto che avanzare lentamente lungo l'assone come in fibre non mielinizzate o demielinizzate (Bunge 1968; Baumann and Pham-Dinh 2001).



**Schema F:** La mielina costituisce la guaina che riveste parte del corpo dei neuroni permettendo la trasmissione rapida e integra degli impulsi nervosi. Se in uno stato di normalità le informazioni nelle fibre nervose sono trasmesse a 100 m/s, in un individuo affetto dalla sclerosi multipla la velocità scende gradualmente a 5 m/s. La diminuzione fino all'arresto della velocità di conduzione dell'impulso nervoso è responsabile dei sintomi e dei segni della malattia, progressivamente ingravescente.

## **Nerve-glia antigen 2 (NG2)**

Nerve-glia antigen 2 (NG2) è un proteoglicano condroitin solfato codificato dal gene umano CSPG4. Il proteoglicano è una macromolecola composta di un asse proteico (core) cui sono unite covalentemente lunghe catene di disaccaridi chiamati glicosamminoglicani (GAG). Il punto di attacco dei GAG al nucleo proteico si ha mediante un residuo di serina e un ponte trisaccaridico. Nel proteoglicano NG2 le catene di GAG sono legati covalentemente al dominio ammino-terminale del nucleo proteico sul lato extracellulare della membrana, possono interagire con ligandi extracellulari modulando i recettori specifici presenti

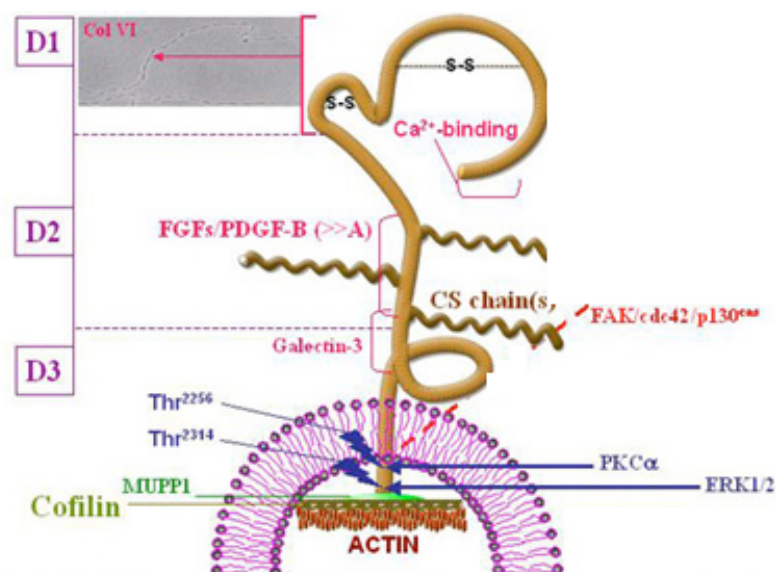
sulla membrana.

La struttura primaria del dominio esterno di NG2 può essere suddiviso in tre distinti sottodomini: una parte globulare N-terminale, D1, un segmento centrale flessibile, D2 e una porzione C-terminale, D3, che assume un'estesa conformazione globulare. Il subdominio D1 contiene quattro ripetizioni caderina-simili, leganti il calcio, filogeneticamente conservate, mentre quello prossimale alla membrana plasmatica contiene almeno due siti distinti per l'attacco proteolitico da parte delle metalloproteinasi, attacco in parte antagonizzato da TIMP2 e TIMP3. Questi enzimi contribuiscono in condizioni fisiologiche e patologiche al rilascio del dominio esterno dalla superficie della cellula in almeno due diversi frammenti di 290 KDa e 275 KDa, mediante un meccanismo di trasduzione del segnale dipendente dall'autonoma attività cellulare. La coda citoplasmatica di NG2, lunga settantasei aminoacidi, contiene due residui di treonina fosforilabili da due diversi enzimi, PCKalpha (Thr2256) e ERK1 (Thr2314), a seconda del coinvolgimento di NG2 in eventi di migrazione o di proliferazione. Mediante la coda citoplasmatica, NG2 si lega tenacemente al citoscheletro di actina mediante ancoraggio di proteine adattatrici, tipo-PDZ quali MUPP1 e synthenin-1, con associate ezrin e cofilin-1. Attraverso le connessioni al citoscheletro e i menzionati siti di fosforilazione su treonine di PCKalpha/ERK, il dominio citoplasmatico di NG2, attiva cascate di segnalazione che coinvolgono FAK, Rac1, cdc42, Ack1 e p130CAS, e questo suggerisce che esso contribuisca all'esecuzione dei complicati pattern di trasduzione del segnale che governano le dinamiche del citoscheletro. Il principale ligando di NG2 nella matrice extracellulare è il collagene tipo VI.

Nelle cellule precursori degli oligodendrociti (OPC), NG2 può formare complessi con proteine d'interazione con i recettori del glutammato AMPA e PDZ [GRIP]. La presenza di NG2 sulla superficie cellulare ha un forte impatto sulla crescita della

cellula e questa capacità di NG2 è garantita dalla presenza di un ben caratterizzato co-recettore del proteoglicano nelle cellule che rispondono al PDGF-AA. Legato al core proteico, a livello del D2 sono presenti delle piccole catene di zuccheri chiamati condroitin solfato.

La funzione di NG2 ad oggi è poco caratterizzata, si pensa possa essere coinvolto nella migrazione cellulare, nei processi di adesione sia cellula-cellula, che cellula-matrice extracellulare (Trotter 2005).



**Schema G.** Rappresentazione schematica del proteoglicano NG2. Sono presenti diversi siti di legame per fattori di crescita, come FGF e PDGF-AA e domini di affinità al calcio ( $Ca^{++}$ ). Nel versante intracellulare esiste il dominio di legame con la proteina citoscheletrica, actina.

### Attività funzionale di NG2

Il proteoglicano condroitin solfato NG2 è espresso in percentuale elevata da cellule del sistema nervoso centrale rispetto altri contesti ed identifica una classe distinta di cellule chiamata cellule precursori degli oligodendrociti (OPC). Durante lo

sviluppo, le cellule che esprimono NG2 si differenziano in oligodendrociti maturi e in piccola percentuale in astrociti così come nell'adulto. L'espressione di NG2 è equamente distribuita sia nella sostanza grigia come nella bianca e le cellule che lo esprimono hanno una morfologia ben distinta, caratterizzata da oligo-ramificazioni e piccoli corpi cellulari. (Nishiyama 2007).

Le prime evidenze sperimentali sull'attività di NG2 dimostravano che le cellule esprimenti il proteoglicano erano in grado di generare neuroni in vivo. Infatti, attraverso esperimenti di stimolazione neuronale nell'ippocampo adulto, si arrivava ad un coinvolgimento delle cellule esprimenti NG2, suggerendo un ruolo nella modulazione dell'attività sinaptica (Karram, Chatterjee et al. 2005). Ad oggi, attraverso le tecnologie di generazione di animali geneticamente modificati tramite la tecnica cre-lox si è dimostrato inequivocabilmente che le cellule del SNC parenchimali, che esprimono NG2, sono i precursori degli oligodendrociti. Il sistema cre-lox sfrutta delle particolari sequenze del DNA del batteriofago P1 chiamate "loxP", sequenze che il virus normalmente usa come segnale di escissione per il suo DNA da quello dell'ospite.

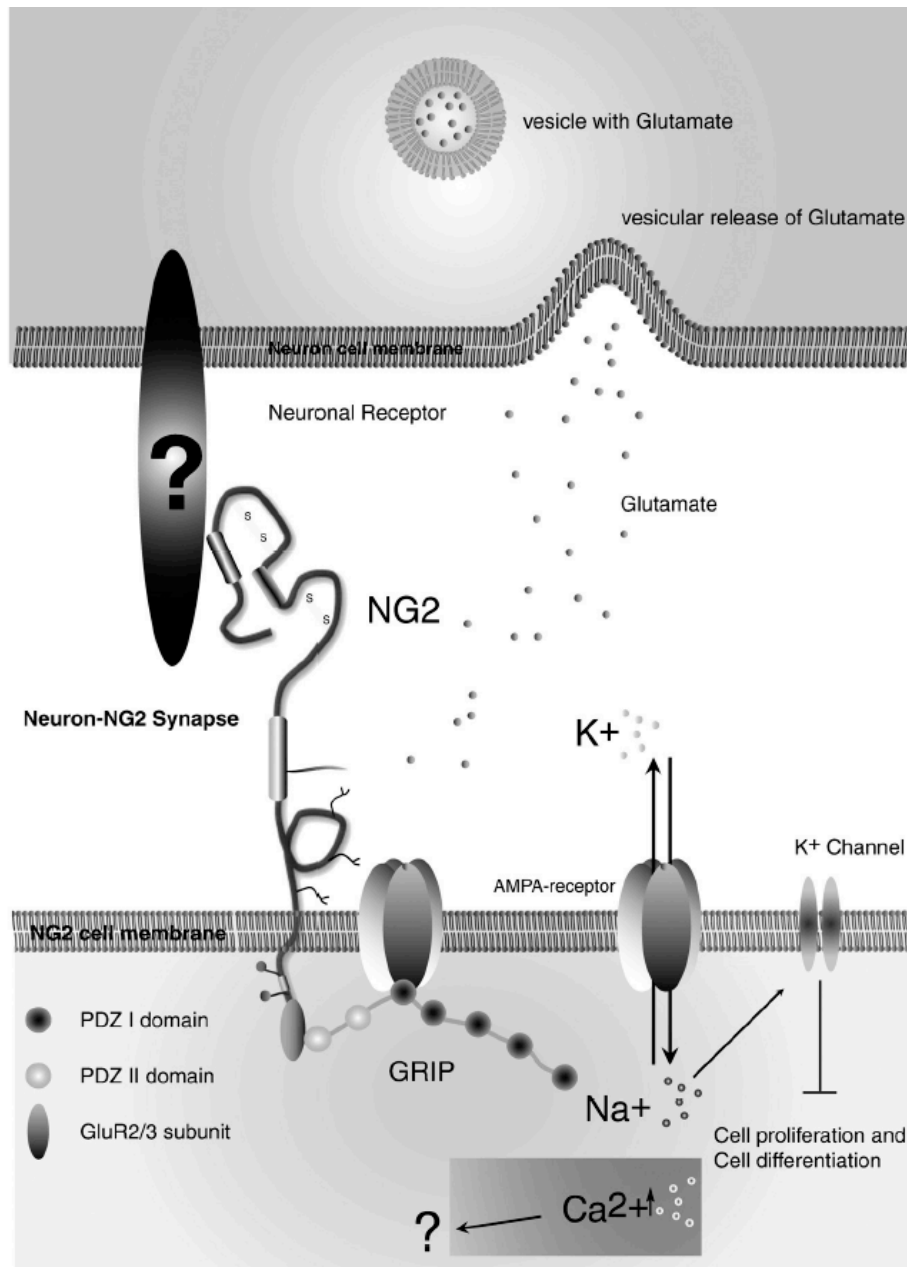
Cre è una ricombinasi in grado di riconoscere le sequenze loxP, e tagliare il DNA in questi siti rendendolo circolare. In questo modo è possibile creare un topo transgenico che abbia il gene d'interesse affiancato da sequenze loxP (---loxP-[GENE]-loxP---) e accoppiandolo con un altro topo transgenico che esprima Cre sotto il controllo di un promotore specifico per il tessuto d'interesse: la progenie esprimerà Cre nel tessuto di interesse e quindi in quel tessuto il gene sarà exciso (perché ha le sequenze loxP attorno). Negli altri tessuti le loxP ci sono, ma non c'è Cre, quindi il gene funziona normalmente.

In diversi modelli sperimentali in vivo, si è dimostrato che le cellule che esprimono NG2 adiacenti al sito di danno neurologico, vanno incontro a differenziamento e

proliferazione diventando quindi ipertrofiche (Karram, Chatterjee et al. 2005).

L'espressione di NG2 a livello delle cellule progenitrici suggerisce che il proteoglicano possa avere un ruolo nella migrazione. Infatti, attraverso l'utilizzo di anticorpi policlonali diretti contro NG2, il tasso di migrazione delle OPC si riduce, suggerendo appunto un coinvolgimento del proteoglicano nella migrazione cellulare. Recentemente, il laboratorio di W. Stallcup ha dimostrato in vitro, che NG2 è associato ad un complesso proteico formato da Integrina  $\alpha3\beta1$ , Ezrin e proteina chinasi C. Quest'ultima permette la fosforilazione di un residuo di treonina sulla coda citoplasmatica di NG2 promuovendo di fatto la migrazione cellulare (Trotter 2005).

L'espressione di NG2 sulla superficie delle cellule rafforza l'idea del suo coinvolgimento nella migrazione grazie soprattutto alla affinità di legame con il collagene di tipo VI espresso invece nella matrice extracellulare (Burg, Tillet et al. 1996). Inoltre, è stato dimostrato come anticorpi anti-NG2 siano in grado di inibire parte della risposta migratoria in cellule che portano mutanti NG2 con la delezione per il sito di legame con il collagene di tipo VI. Questi risultati suggeriscono che l'interazione tra NG2 e il collagene VI innesca una cascata di eventi che portano ad un aumento della motilità cellulare.



**Schema H:** Il complesso è formato da GRIP, NG2 e la classe di recettori AMPA del glutammato: NG2 agisce come una molecola di adesione e attraverso la proteina GRIP indirizza i recettori AMPA verso siti di rilascio del glutammato. Il glutammato è in grado di controllare i movimenti delle cellule NG2 positive verso le sinapsi determinando eventi precoci nella mielinizzazione, come il processo di formazione della guaina mielinica degli assoni.

Altri studi, hanno dimostrato un coinvolgimento del proteoglicano NG2 in altri processi, come ad esempio il legame alle proteine citoscheletriche, nella



fattispecie l'actina. Infatti, NG2 è grado di influenzare l'organizzazione citoscheletrica tramite il legame con l'actina, di conseguenza potrebbe svolgere un ulteriore ruolo nella trasduzione del segnale e nella modulazione di segnali extracellulari.

Ulteriori risultati, indicano che i singoli epitopi extracellulari di NG2 siano in grado di avviare specifici riarrangiamenti del citoscheletro di actina che portano alla migrazione delle cellule. Inoltre, la rilevanza delle porzioni del dominio citoplasmatico di NG2 suggeriscono la fondamentale importanza di NG2 come trasduttore del segnale tra il substrato e il citoscheletro (Fang, Burg et al. 1999).

### ***Cellule esprimenti NG2***

Storicamente la glia del SNC è sempre stata classificata in astrociti, oligodendrociti e microglia. Tuttavia, le osservazioni fatte nel corso degli ultimi due decenni hanno rivelato un'altra grande popolazione di cellule gliali, distribuita in tutto il SNC sia in via di sviluppo che nell'adulto. Queste cellule hanno processi più lunghi e sottili, anche se il numero e la lunghezza dei processi varia con l'età e la posizione anatomica e sono responsabili dell'espressione di NG2 a livello del parenchima del SNC (cellule non vascolari). Sono state classicamente nominate come cellule appartenenti alla "NG2-glia", ma sono altresì note come Ploidendrociti e Sinantociti (Nishiyama 2007). E' ormai ampiamente riconosciuto che i ploidendrociti siano OPC che generano gli oligodendrociti nel sistema nervoso centrale in via di sviluppo (Kang SH, Fukaya M, et al 2011) e servono come fonte primaria di rimielinizzazione nelle lesioni durante patologia demielinizzanti (Nishiyama, A., M. Komitova, et al. 2009).

Le OPC furono identificati nel 1980 utilizzando siero di coniglio contro cellule tumorali del cervello di ratto, le quali manifestavano proprietà che non erano né

neuronal né gliali. Dopo lunghi sforzi sperimentali si arrivò all' identificazione di uno degli epitopi riconosciuti dal siero ossia NG2, ne seguì un lungo dibattito sull'identità di queste cellule che esprimono NG2.

I polidendrociti, isolati e coltivati in terreno di differenziazione, si differenziano in oligodendrociti (Galattocerebroside positivi) con una sottoregolazione dell' espressione di NG2 durante la fase terminale di differenziazione (Levine and Stallcup 1987; Stallcup and Beasley 1987). Successivamente, la scoperta che le OPC dipendono dal fattore di crescita derivato dalle piastrine PDGF-AA per la loro sopravvivenza e proliferazione (Richardson, Pringle et al. 1988), ha portato alla identificazione che il recettore PDGFR $\alpha$  è espresso sulle OPC (Spassky, Olivier et al. 2000). Il ruolo delle cellule che esprimono il recettore PDGFR $\alpha$ , come la principale fonte di oligodendrociti è stato stabilito con la dimostrazione che il topo KO per PDGFR $\alpha$  esibisce una massiccia diminuzione di oligodendrociti e quindi danneggiamento della mielina (Nishiyama, Yu et al. 1997). L' espressione di NG2 sembra iniziare un po' più tardi dell'espressione di PDGFR $\alpha$ , infatti NG2 si trova espresso soprattutto nella zone germinale sub-ventricolare (ZSV).

### **Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs)**

Le OPC sono fortemente reattive e rispondono rapidamente in seguito al danno nell'SNC proliferando e maturando attraverso la creazione di nuovi processi citoplasmatici e partecipa così al processo di gliosi (formazione di una cicatrice gliale in seguito a lesione dell'SNC) assieme agli astrociti. È stato postulato che una funzione primaria delle OPC nel SNC adulto potrebbe essere quella di rispondere rapidamente ai cambiamenti nell'integrità cito-strutturale, sia per formare una cicatrice gliale, sia per generare nuovi oligodendrociti (Trotter, Karram

et al. 2010).

Le OPC sono cellule che formano mielina nell'adulto, sono attivate durante l'infiammazione e mediano la rimielinizzazione in pazienti con SM seppur in modo inefficace. La rimielinizzazione consente il ripristino della conduzione saltatoria e un ritorno della funzione normale persi durante la demielinizzazione. Purtroppo, la rimielinizzazione è spesso incompleta nel SNC e questa mancanza di rimielinizzazione è uno dei motivi principali per i deficit clinici in malattie demielinizzanti (Fancy SP, Kotter MR, et al. 2010) .

Anche se il potenziale di rimielinizzazione del sistema nervoso centrale adulto è stato ben definito, vi sono ancora controversie riguardo l'origine della popolazione di cellule rimielinizzanti. La letteratura scientifica riporta che oligodendrociti rimielinizzanti derivano dalla de-differenziazione e/o proliferazione di oligodendrociti maturi, o sono generati esclusivamente dalla proliferazione e differenziazione delle cellule progenitrici della glia.

Alcuni studi dimostrano che:

- gli oligodendrociti, che sopravvivono in uno spazio di demielinizzazione non contribuiscono alla rimielinizzazione,;
- la rimielinizzazione è svolta da cellule progenitrici degli oligodendrociti,
- l'assunzione di progenitori degli oligodendrociti in un'area di demielinizzazione è una risposta locale;
- la divisione di cellule progenitrici degli oligodendrociti è simmetrica e si traduce in deplezione cronica della popolazione OPC della sostanza bianca normale intorno ad una zona di rimielinizzazione (Franklin RJ, Ffrench-Constant C. et al. 2008).

Questi risultati suggeriscono che la mancanza di rimielinizzazione può essere dovuta a una deplezione di cellule progenitrici degli oligodendrociti in particolare

dopo ripetuti episodi di demielinizzazione.

## **Periciti**

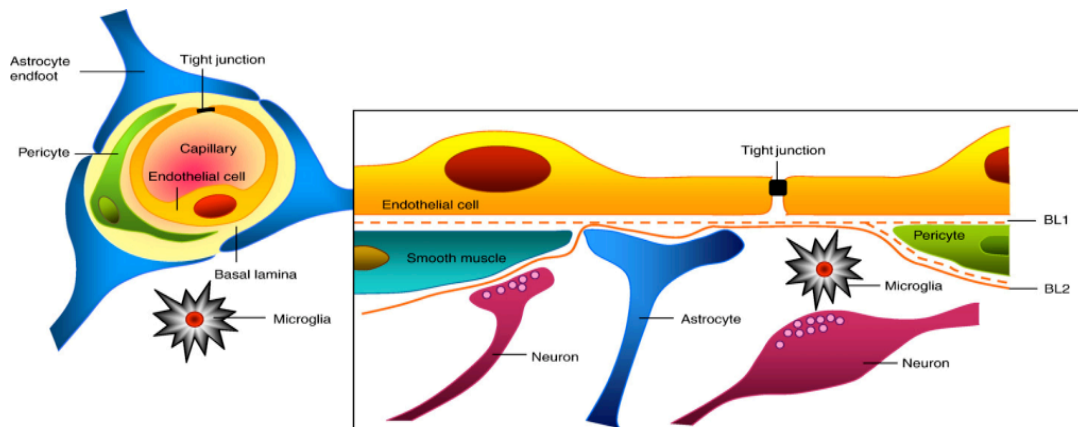
NG2 nel SNC è espresso a livello delle OPC e a livello di cellule vascolari murali chiamate periciti. I periciti sono cellule perivascolari contenute nella lamina basale dei vasi sanguigni e fanno parte dal punto di vista anatomico della Unità Neurovascolare (UNV) composta inoltre da pedicelli degli astrociti, cellule endoteliali, cellule muscolari associate ai vasi e barriera emato-encefalica (BEE), a sua volta formata da una serie di proteine organizzate in strutture di giunzioni (Hawkins BT, Davis TP. 2005, vedi schema I). I periciti, nello specifico, sono coinvolti nell'organizzazione strutturale della BEE e nella regolazione del traffico dei soluti e dell'infiltrato dal circolo sanguigno al parenchima del SNC. In base a stimoli esterni, si è pensato che i periciti siano in grado di dar luogo a VSMC (cellule della muscolatura liscia vascolare) e viceversa (Nehls, Denzer et al. 1992). Secondo questa idea i periciti agiscono da progenitori per vSMC in caso di ampliamento o rimodellamento del vaso (D'Amore 1992).

E' anche possibile che i periciti costituiscano una riserva cellulare per la formazione o riparazione del tessuto non vascolarizzato e per la formazione ossea. I periciti hanno un fenotipo intermedio tra vSMC e fibroblasti e sembrano avere la capacità di differenziarsi in fibroblasti. Nella guarigione delle ferite e dei processi infiammatori è stato suggerito che periciti si staccano dalla parete del vaso e si differenziano in collagene di tipo I producendo fibroblasti (Sundberg, Ivarsson et al. 1996). La copertura dei periciti sulla superficie endoteliale è solo parziale, e varia ampiamente tra i letti capillari dei vari tessuti così come la distribuzione dei periciti nella parete del vaso capillare non è casuale. I periciti

sono, per esempio, più diffusi nei punti di diramazione capillare, anche se la loro presenza su questo sito non è obbligatoria. Tipicamente, la parte di un vaso adibita al trasporto di gas e /o sostanze nutritive è priva di periciti, come si vede, per esempio, nei capillari della coroide e della pelle, dove i periciti si trovano sul lato distale del vaso rispetto alle cellule retiniche e cheratinociti.

Nel SNC il pericita dal punto di vista fisiologico, svolge una funzione essenziale nella regolazione, nella formazione e del mantenimento della BEE (Armulik, Genové et al 2009; Daneman, Zhou et al 2010).

In situazioni infiammatorie o di lesioni cerebrali traumatiche, migrano dalla parete del vaso al tessuto circostante dove intervengono nella risposta immunitaria presentando l'antigene tramite l'espressione del MHC di classe II (Balabanov, Beaumont et al. 1999). I periciti sono in grado di influenzare la barriera ematoencefalica a livello delle tight junction e della vescicolazione trans-endoteliale (Gerhardt and Betsholtz 2003) e durante la fasi di patologia EAE l'UNV subisce delle modificazione che sono in grado di determinare la gravita di patologia (Fabis, Scott, et al 2007; Bennett, Basivireddy. et al. 2010).



**Schema I:** Periciti sono cellule perivascolari contenute nella lamina basale dei vasi sanguigni; Implicati nella regolazione della permeabilità vascolare e coinvolti nel trasporto attraverso la BEE.

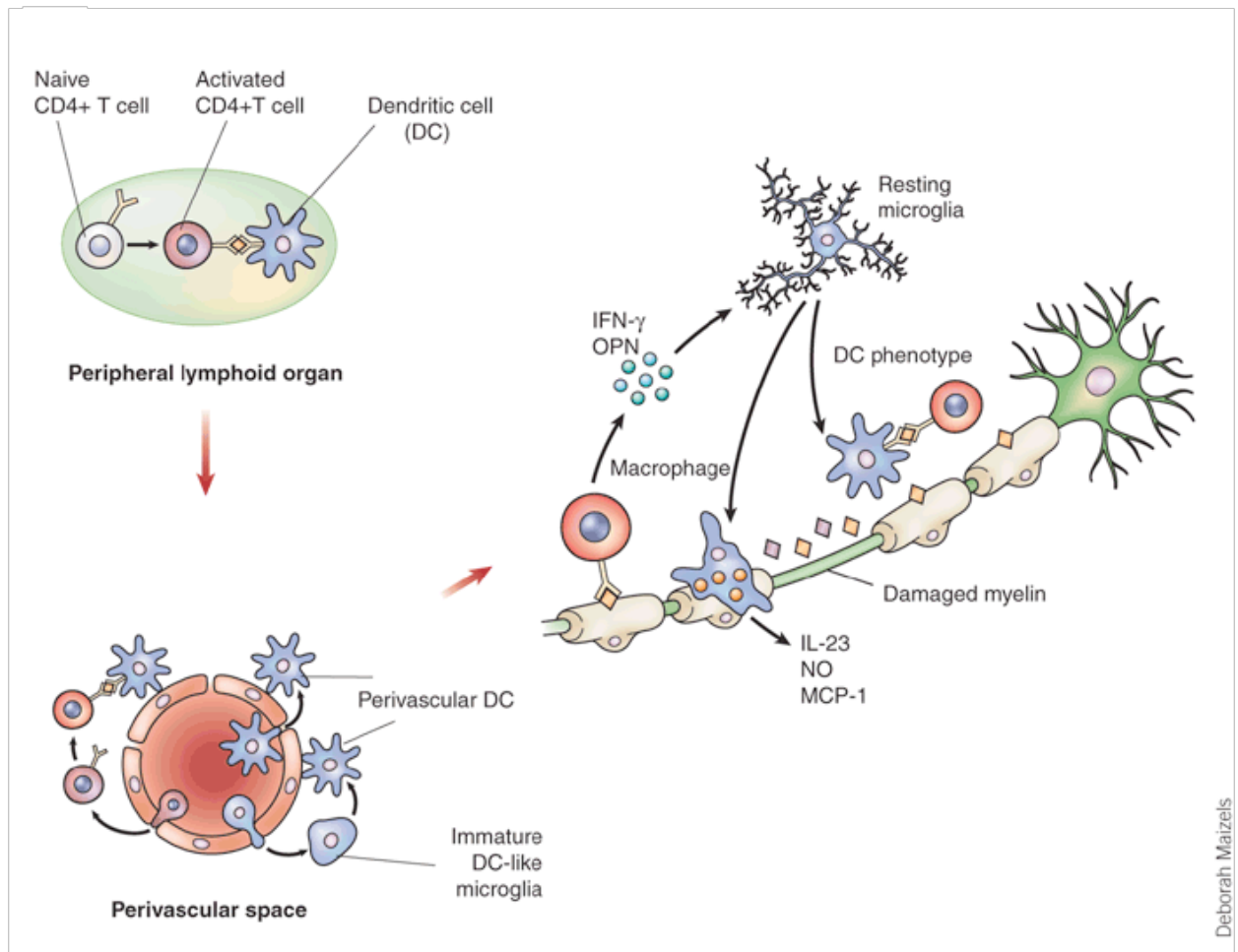
### **Encefalomielite allergica sperimentale (EAE)**

L'encefalomielite allergica sperimentale (EAE) è un modello animale di neuro-infiammazione. E' considerato un ottimo modello di studio di patologie come la SM e si basa sulla reazione antigene-anticorpo e risposta cellulo-mediata. Può essere indotta in molte specie animali (ratto, topo, coniglio, cavia e scimmia) tramite inoculazione con omogenato di midollo spinale o con diverse proteine o peptidi dello SNC emulsionate in adiuvante completo (o incompleto) di Freud (CFA) iniettate in presenza di micobatterio. Le proteine/peptidi comunemente usate per indurre EAE sono le proteine che compongono la mielina e includono la proteina basica della mielina (MBP), proteina proteolipide della mielina (PLP), e la glicoproteina oligodendrocita della mielina (MOG) (Tsunoda and Fujinami 1996). PLP si trova nel sistema nervoso centrale, ha una peso molecolare di 30 kDa, ed è altamente idrofoba. E' una proteina transmembrana che attraversa il doppio strato

lipidico della mielina quattro volte e, come tale, può agire come canale protonico. MBP è una proteina fosforilata importante del sistema nervoso centrale, ha un peso molecolare di 18,5 kDa, ed ha una bobina conformazione stabile in soluzione. MOG è una componente minore della guaina mielinica che comprende solo 0,05-0,1% delle proteine totali della mielina. Ha un peso molecolare di 25 kDa, e la sua funzione all'interno del sistema nervoso centrale rimane sconosciuta (Sedzik. 2008).

L'EAE è mediata principalmente da specifiche cellule T CD4 + autoreattive, che una volta attivate in periferia, migrano nel SNC e causano la risposta autoimmune infiammatoria. I linfociti T giocano un ruolo chiave, infatti iniziano e guidano la progressione della patologia, per cui l'EAE è definita come patologia mediata da linfociti Th1 CD4 (Gold, Linington, et al. 2006).

Nel modello EAE altre due cellule prendono parte all'innescamento e all'evoluzione di patologia, rispettivamente le cellule dendritiche (DC) e macrofagiche. Le DC sono cellule professionali che presentano l'antigene e sono in grado di attivare cellule T vergini. E' noto che le DC attivate verso un antigene encefalitogenico sono in grado di montare una risposta T nei linfonodi periferici e così indurre la patologia demielinizzante (Huang, Yang. et al 2000). Per quanto riguarda invece il ruolo dei macrofagi è ormai nota la loro funzione di cellulare direttamente coinvolta nel danno a carico del SNC attraverso la produzione di citochine proinfiammatorie, metalloproteinasi della matrice e radicali liberi, pertanto la cellula macrofagica esplica un'azione effettrice del danno (Platten, Steinman. et 2005).



Deborah Maizels

**Schema J:** Schema rappresentativo del meccanismo di immunopatogenesi dell'EAE. Gli autoantigeni sono presentati da DC ai linfociti T negli organi linfoidi. I linfociti T attivati penetrano nel SNC e rilasciano citochine pro-infiammatorie che sono in grado di attivare la fase effettrice mediata dai macrofagi.

Il decorso clinico di un topo EAE può essere variabile, come è il decorso clinico della SM. Nell' EAE, il decorso clinico dipende sia dalla specie dell' animale inoculato e in particolare dalla proteina/peptide utilizzato per l' inoculazione. I segni clinici comprendono la perdita di peso, atassia, incontinenza, e paralisi flaccida o spastica degli arti posteriori (Fujinami 2001). Le lesioni nel modello di EAE sono caratterizzati da infiammazione e demielinizzazione e sono prevalentemente osservate nel midollo spinale, mentre nella MS le lesioni sono più comuni nel cervello (Libbey and Fujinami).



## Scopo della tesi

Lo scopo della presente tesi è quello di capire se NG2 possa essere coinvolto nella SM, quale ruolo possa svolgere e quali cellule esprimenti NG2 possano essere cruciali nella evoluzione patologica.

Partendo da osservazioni sperimentali su campioni di liquor di pazienti affetti da SM, abbiamo in seguito sviluppato il progetto studiando e caratterizzando il modello murino di SM. Le ipotesi che hanno contraddistinto il progetto di tesi sono due principalmente:

- La complessa struttura molecolare di NG2 può, in determinate condizioni, svolgere un'attività antigenica. Per questo, in una patologia come la SM ad antigene ignoto, riteniamo che NG2 possa essere oggetto della risposta autoimmune tipica della patologia (mimetismo molecolare?);
- Le due caratteristiche fondamentali della SM (e del suo modello murino, EAE) sono la distruzione selettiva degli oligodendrociti e le modificazioni funzionali della UNV. NG2 è espresso selettivamente e in modo singolare su cellule che danno luogo agli oligodendrociti maturi (OPC) e su cellule che funzionalmente regolano la UNV (periciti). Ipotizziamo quindi un coinvolgimento diretto di NG2 nella progressione di malattia data la sua peculiare espressione cellulare nel SNC.

La tesi è strutturalmente suddivisa in due parti; 1) nella prima fase si è analizzato il ruolo di NG2 in campioni umani, attraverso la metodica ELISA abbiamo saggiato i liquor di pazienti SM alla ricerca di auto-anticorpi diretti contro NG2. Abbiamo quindi eseguito ulteriori esperimenti per validare i test ELISA e abbiamo correlato il

risultato con il dato clinico; II) nella seconda parte si è studiato il ruolo di NG2 nella progressione della malattia attraverso il modello animale di EAE utilizzando il topo NG2 KO.

## Materiali e metodi

### *Pazienti e raccolta liquor*

Abbiamo studiato campioni di liquido cefalo-rachidiano (liquor) derivanti da 43 pazienti affetti da SM (diagnosticata secondo i criteri di McDonald) all'esordio dei sintomi clinici e 30 campioni di liquor derivanti da pazienti con altre manifestazioni neurologiche, non SM (OND, *other neurological disease*). La disabilità del singolo paziente è stata valutata dal Neurologo in sede di esame obiettivo secondo la scala EDSS (*expanded disability status scale*) rapportata agli anni di malattia, determinando così l'indice diagnostico PI, *progression index*. I dati clinici dei pazienti SM erano completi.

I campioni di liquor sono stati prelevati in modo standardizzato, e conservati seguendo le procedure sotto elencate:

- Prelievo di almeno 12 ml di liquor in unica aliquota, per evitare il gradiente di concentrazione proteica rostro-caudale.
- Localizzazione del sito di prelievo tra la vertebra L3-L5.
- Rimozione del sangue dai campioni prelevati tramite centrifugazione prima dello stoccaggio.
- Utilizzo di ago non traumatico:
- Utilizzo di provette di polipropilene:
- Momento del prelievo:
- Mantenimento costante dell'ora del prelievo, per evitare le differenze del ritmo circadiano.
- Conservazione a temperatura ambiente del campione di liquor e

siero/plasma fino alla divisione in aliquote.

- Tempo dopo il prelievo non deve superare i 90 ( $\pm 30$ ) minuti.
- Aliquotare in volumi di 0.2, 0.5 e 1 ml in eppendorf di polipropilene e stoccare a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Database: annotare tutti i dati anagrafici e clinici dei pazienti in formato elettronico e cartaceo.

## **ELISA**

Per gli esperimenti di ELISA sono state utilizzate le piastre da novantasei pozzetti e come antigene coating è stata utilizzata la proteina ricombinante rNG2 (gentilmente fornita dal Prof. Roberto Perris, Università degli Studi di Parma) alla concentrazione di  $10\ \mu\text{g/ml}$  in PBS (pH 7,4). In seguito all'incubazione over night a  $4^{\circ}\text{C}$  abbiamo inibito il riconoscimento di siti aspecifici attraverso l'incubazione con BSA al 3% disciolta in PBS per 2 ore a  $37^{\circ}\text{C}$ . Dopo 3 brevi lavaggi con PBS, abbiamo incubato l'anticorpo di controllo (AB5320 Chemicon) e i liquor diluiti 1:1 i BSA 1% per 2 ore a RT. Dopo otto brevi lavaggi, abbiamo utilizzato gli opportuni anticorpi secondari (anti-rabbit per AB5320 e anti-human per i liquor) coniugati con horseradish peroxidase (HRP), che permette una reazione colorimetrica dopo l'aggiunta di un opportuno substrato, per un'ora a RT. Abbiamo quindi aggiunto il substrato TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina) e la reazione è stata arrestata con acido solforico al 10%. Infine, la reazione colorimetrica è stata quantificata attraverso l'assorbanza rilevata a 450 e 600 nm (Tecan).

## **Western Blot**

Per validare gli esperimenti di ELISA abbiamo compiuto un'elettroforesi con la proteina ricombinate rNG2, mentre per analizzare i livelli di espressione delle proteine della BEE (Claudina-5 e Occludina) abbiamo utilizzato un lisato proteico cerebrale. Il western blot è una metodica che permette di rilevare e quantificare una proteina contenuta in una miscela proteica (o sulla singola proteina), separata elettroforeticamente. La rilevazione è permessa da tecniche immunologiche basate sull'utilizzo di anticorpi specifici che riconoscono le proteine d'interesse.

Separazione elettroforetica delle proteine (SDS-page)

rNG2 (lo stesso utilizzato in ELISA) e le proteine cerebrali ottenute attraverso l'omogeneizzazione del tessuto (buffer di lisi; 50 mM Tris pH 7.5, 4 mM EDTA, 10% etilen glicole, 250 mM saccarosio, 1 mM DTT, PMSF) sono stati diluiti con un idoneo volume di Sample Buffer 4X così composto:

<b>Componente</b>	<b>Concentrazione</b>
Acqua	/
$\beta$ -mercaptoetanolo	4%
SDS	12%
Glicerolo anidro	40%
Tris-Hcl, pH 6,8	0.25 M
Blu di bromofenolo (10%)	0.05%

I campioni diluiti in Sample Buffer sono quindi denaturati tramite incubazione a

100°C per cinque minuti. La separazione delle proteine viene effettuata in base al peso molecolare tramite una corsa su gel di poliacrilammide a 10%-12%, in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). La corsa elettroforetica viene effettuata in un gel discontinuo, costituito da due porzioni:

- Stacking gel (4% acrilamide, 0,1% SDS, Tris 125 mM pH 6.8, 0,1% ammonio persolfato, 0,1% TEMED) che permette di concentrare le proteine in una stretta banda;
- Resolving gel (10% acrilamide, 0,1% SDS, Tris 375 mM pH 8.8, 0,1% ammonio persolfato, 0,1% TEMED), che permette la separazione in verticale delle diverse specie proteiche in bande singole e discrete.

La corsa viene effettuata a temperatura ambiente in Running Buffer:

- 100 mL Tris-glicina 10X (madre 10X: Tris 30,7 g/l, glicina 144,13 g/l, e H<sub>2</sub>O fino ad 1 L);
- 10 mL SDS 10%;
- Porto a volume con acqua distillata.

Viene applicato prima un voltaggio di 60 mA per circa 30 minuti e successivamente di 110 mA fino a termine corsa.

Trasferimento su membrana di nitrocellulosa

Le proteine separate tramite SDS-PAGE sono trasferite su una membrana di nitrocellulosa da 0.45 µm (Amersham Hybond; GE Healthcare, Germania) mediante elettroblotting, un processo di trasferimento che sfrutta un campo elettrico disposto perpendicolarmente rispetto al gel. Il protocollo prevede la preparazione di un sandwich (Figura 11) costituito nell'ordine da:

un supporto spugnoso,

foglio di carta assorbente,  
membrana,  
gel,  
foglio di carta assorbente,  
un supporto spugnoso.

Prima di essere inseriti nel sandwich la membrana di nitrocellulosa così come i supporti spugnosi e le carte assorbenti vengono imbevuti nella soluzione di Transfer buffer:

- 100 mL Tris-glicina 10X (madre 10X: Tris 30,7 g/l, glicina 144,13 g/l, e H<sub>2</sub>O fino ad 1 L)
- 3 mL SDS 10%
- 200 mL Metanolo(20% volume finale)
- Porto a volume con acqua distillata

La procedura di trasferimento viene condotta utilizzando un apparato “wet,” che prevede l’immersione del sandwich in una camera contenente il transfer buffer, con la membrana diretta verso l’anodo ed il gel verso il catodo. Le proteine, in ambiente basico ed in presenza di SDS, risultano cariche negativamente e quindi, quando sono sottoposte ad un campo elettrico, tendono a migrare verso l’anodo. Il trasferimento è effettuato tramite applicazione di una corrente a voltaggio costante per circa 1 ora (100 V) a 4°C.

Dopo il trasferimento, la membrana viene posta in agitazione in presenza di una soluzione di ponceau (100 mg di polvere ponceau disciolti in 100 mL di acido acetico al 5%) per evidenziare il trasferimento avvenuto di tutte le proteine sulla membrana di nitrocellulosa. La reazione di colorazione viene favorita con l’aggiunta di acido tricloroacetico (TCA) allo 0,3% e la membrana viene poi scansionata l’acquisizione delle bande.

## Immunoblotting

La membrana viene incubata per un'ora a temperatura ambiente in agitazione con una soluzione di blocking composta da 5% di latte scremato in polvere sciolto in TBS (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1% Tween 20) con l'aggiunta di tween allo 0,3% (TBS-T). Segue un'incubazione in agitazione a 4°C con l'anticorpo primario (in questo caso è stato utilizzato un pool di tre liquor di pazienti SM) diluito alla concentrazione 1:1 in latte al 3% in TBS-T. Lo stesso procedimento è stata effettuato con l'anticorpo commerciale anti-NG2 (1:3000).

Dopo tre lavaggi da 5 minuti in agitazione a temperatura ambiente con TBS-T, la membrana è incubata per 30 min con la soluzione di latte al 5% in TBS-T, successivamente dopo dei brevi lavaggi la membrana viene incubata un'ora a temperatura ambiente in agitazione con gli appropriati anticorpi secondari coniugati con horseradish peroxidase (HRP) diluito opportunamente in latte al 3% in TBS-T.

Dopo due lavaggi da 10 minuti in agitazione a temperatura ambiente con TBS-T ed uno con TBS da 10 minuti, viene effettuata la rivelazione delle bande specifiche per la proteina tramite kit ECL (Amersham Biosciences). Questo metodo di rivelazione per chemiluminescenza sfrutta l'ossidazione del luminolo presente nel reagente ECL mediante la HRP, in presenza di acqua ossigenata in ambiente basico. In seguito all'ossidazione, il luminolo si trova in uno stato eccitato dal quale decade attraverso l'emissione di luce con lunghezza d'onda a 428 nm.

La rivelazione dell'emissione della luce avviene tramite esposizione ad una lastra autoradiografica sensibile alla luce blu (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences).





## ***Preparazione materiale genetico***

### **Estrazione DNA genomico**

I frammenti di tessuto prelevati vengono digeriti *over-night* a 55°C con una soluzione contenente 4ml di proteinasi K (20 mg/ml) e 300 µl di Direct PCR Lysis Reagent. Al fine di disattivare la proteinasi K alla fine della digestione, successivamente i campioni sono incubati a 85°C per 45 minuti.

I campioni vengono poi centrifugati a 12000 giri per 5 minuti per facilitare il processo di eliminazione del surnatante. Il surnatante deve essere quantificato per aggiungere un egual volume di isopropanolo, che permette, dopo alcuni istanti, di visualizzare il filamento di DNA. Mediante l'utilizzo di una pipetta si preleva il filamento e lo si pone in una soluzione di ETOH al 70%. Si centrifuga per 1 minuto a 12000 giri e si elimina il surnatante per poi risospendere il DNA genomico in un volume noto di H<sub>2</sub>O (30-50 µL). I campioni vengono poi diluiti prima di essere amplificati mediante PCR.

### **Purificazione cDNA**

Per analizzare i livelli di espressione delle citochine in seguito a stimolazione cellulare, abbiamo analizzato ed estratto l'RNA totale. L'RNA è stato estratto con QIAzol Lysis Reagent (Qiagen), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Le cellule (linfociti T e DC), seminate in piastre da 12 pozzetti e sottoposte ai trattamenti di stimolazione previsti dal protocollo sperimentale, venivano omogeneizzate e trasferite in provette opportunamente filtrate. Successivamente, dopo centrifugazione a 12000 g per 15 minuti a 4° C, l'RNA si legava alla matrice del

filtro ed in seguito a i lavaggi per eliminare e le componente cellulare lisate, veniva eluito in 30  $\mu$ l di acqua RNAsi *free*. Per analizzare l'RNA maturo quindi pronto per la traduzione in proteina, abbiamo purificato l'RNA totale mediante colonnine magnetiche l'RNA *poly-A* (Invitrogen). Prima della retrotrascrizione abbiamo quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop l'RNA *poly-A* ed abbiamo processato 2 ug di RNA. Al volume di partenza, portato a 11  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O per soluzioni iniettabili, venivano aggiunti 1  $\mu$ l di random esameri (500 ng/ $\mu$ l) ed 1  $\mu$ l di dNTPs (10uM). I campioni venivano quindi scaldati a 65° C per cinque minuti e successivamente tenuti in ghiaccio per 5 minuti e si aggiungevano poi ad ognuno 7  $\mu$ l di un mix di reazione contenente:

Componente	Volume ( $\mu$ l)
SuperScriptTMIII Reverse Transcriptase	1
DTT 0.1 mM	1
First Strand Buffer 5 X (MgCl <sub>2</sub> 15mM, Tris HCl 250mM pH 8.3, KCl 375mM)	4
RNAsi inibitore (RNaseOUT 40U/ $\mu$ l)	1

Si scaldava quindi a 25° C per 5 minuti e si incubava a 55° C per 50 minuti. Successivamente la reazione era inattivata lasciando i campioni a 70° C per 15 minuti. I cDNA così ottenuti venivano poi trattati per 20 minuti con 0.5  $\mu$ l di RNAsi H

(5U/μl) a 37° C, in modo da distruggere nell'ibrido RNA-DNA il filamento di RNA stampo.

## ***Polymerase chain reaction (PCR)***

### **Genotipizzazione**

Per ottenere topi littermate confrontabili dal punto di vista sperimentale abbiamo incrociato la colonia originaria dei topi KO (C57Bl6N) con topi WT dello stesso ceppo (C57Bl6N) disponibili commercialmente. In questo modo si è voluto eliminare la deriva genetica tra topi di origine diversa, per ottenere dei topi che hanno la medesima origine e quindi paragonabili dal punto di vista sperimentale. Così facendo in generazione F2 abbiamo ottenuto topi littermate (“stessa nidiata”), sia WT che NG2-KO sui quali è stato condotto l'esperimento di EAE.

Il genotipo di ogni animale viene identificato tramite saggio di polymerase chain reaction (PCR) qualitativa eseguito su DNA genomico estratto da biopsie caudali o del padiglione auricolare prelevate dopo lo svezzamento, entro il ventunesimo giorno di età. La soluzione di amplificazione (mix) è così composta:

<b>Reagenti</b>	<b>Volume per campione (μl)</b>
Green Go-Taq Mix Buffer (Promega) (Buffer+dNTP+ Go-taq polimerasi)	12,5
Primer Fwd+Rev	2
H2O per preparazioni iniettabili	8,5

In ogni tubo contenente 23ml della mix sopra descritta vengono aggiunti 2 µl della soluzione contenente il DNA; i campioni vengono mantenuti a 4°C fino al posizionamento nel termociclatore (MJ Research).

Il termociclatore effettua un programma di amplificazione impostato con i seguenti parametri:

Funzione	Tempo	Temperatura (°C)
Attivazione della Polimerasi	10 minuti	95
Denaturazione del DNA	30 secondi	95
Annealing dei primers	30 secondi	58
Amplificazione	90 secondi	72
Elongazione finale	5 minuti	72
Mantenimento dei campioni	<i>Forever</i>	4

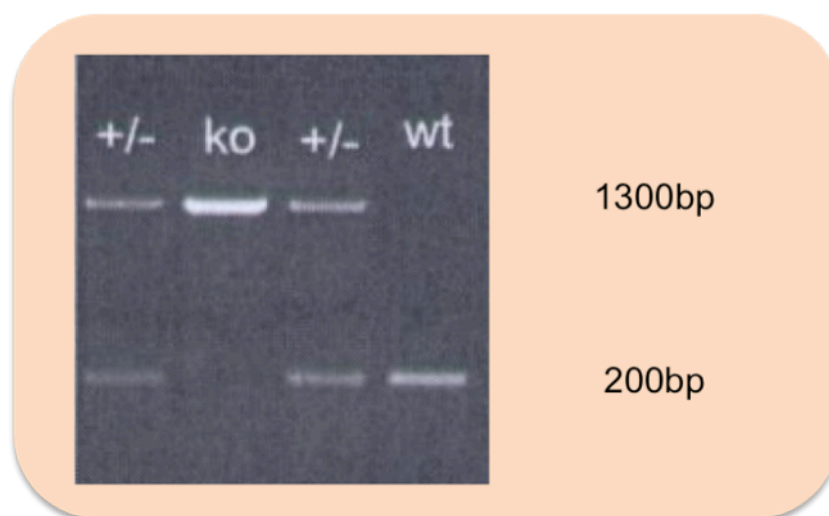
} 33 volte

Ogni saggio di PCR prevede la presenza di un controllo positivo, un controllo negativo ed un bianco per certificare la pulizia e l'efficienza del processo di amplificazione.

Verifica del saggio di PCR. Per valutare il risultato del saggio di PCR, il prodotto della reazione viene caricato su gel di agarosio (Euroclone) 1% sciolto in tampone acetato contenente EDTA (TAE 10X: Tris base 48,2 g/l, acetato di sodio 27,2 g/l, EDTA 7,4 g/l, acido acetico glaciale per portare a pH 7), a cui viene aggiunto etidio bromuro (Fluka) alla concentrazione di 1:20000. La rilevazione della presenza

della banda specifica per il DNA WT e NG2-KO viene effettuata ponendo il gel in un transilluminatore a raggi UV e confrontando le bande dei campioni con quelle del controllo positivo.

Per lo screening dei campioni di DNA ci siamo avvalsi dell'utilizzo di una sola coppia primer, che in modo analitico riesce ad amplificare bande dalle dimensioni diverse in funzione della condizione allelica: come rappresentato nello schema K nel caso di un topo WT, in presenza quindi del gene che codifica per NG2, si ha una banda del peso di 200 bp (base pair, paia di basi) nel caso di un topo delecto del gene che codifica per NG2 la banda è del peso di 1300 bp, mentre nel caso di un topo in eterozigosi si ottengono due bande a 200 e 1300 bp.



**Schema K:** *Rappresentazione schematica del risultato della genotipizzazione del DNA genomico del C57Bl6 WT e NG2-KO. Due sono le bande identificate dopo la PCR a 200 e 1300 bp, che indicano rispettivamente WT e NG2-KO, mentre l'eterozigosi è identificata dalla presenza contemporanea delle due bande.*

## Real-Time PCR

La Real-Time PCR si basa sulla rilevazione e quantificazione della fluorescenza emessa durante la reazione, come indicatore della quantità di amplificato prodotto in ogni ciclo. Nel nostro caso sono state utilizzate sonde TaqMan, cioè brevi sequenze nucleotidiche (circa 20 pb), specifiche per il gene d'interesse (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-12 e IL-17a) dotate di un fluoroforo all'estremo 5' (reporter) la cui fluorescenza è normalmente silenziata dal corrispondente quencer posto all'estremità 3'.

Abbiamo amplificato venti ng di cDNA a singolo filamento, ottenuto attraverso retrotrascrizione dell'mRNA estratto dalle cellule, venivano amplificati in un volume totale di 20  $\mu$ l con 2X Platinum SuperMix (Invitrogen, life-technologies), il primer mix (forward e reverse) e la sonda TaqMan specifica per i geni di interesse e per il gene house-keeping (actina).

Il protocollo di amplificazione realizzato con l'apparecchio Rotor Gene 3000 della Corbette Research, prevedeva un passaggio iniziale, a 95°C per 2 minuti, per denaturare le strutture del cDNA. La fase successiva consisteva di 50 cicli, comprendenti uno step di denaturazione a 95°C per 15 secondi e uno step unico di annealing/estensione a 60°C per 30 secondi.

I dati sono stati analizzati calcolando la fold induction rispetto al controllo interno normalizzato sul gene house-keeping. Ponendo come "1" i livelli basali di espressione della citochina incognita, abbiamo calcolato di quante volte la stimolazione facesse aumentare l'espressione della medesima citochina. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule derivanti da topi WT e da NG2 KO. Ogni esperimento di Real-Time PCR è stato effettuato su sei estrazioni (sei topi per gruppo) ripetuto tre volte. L'RNA *poly-A* ottenuto dai sei preparati veniva, raccolto in una unica aliquota e di questo venivano esaminati i livelli di espressione in real-Time PCR in triplica, per ridurre così la variabilità sperimentale.

## **Modelli animali utilizzati nello studio**

La fase sperimentale che prevede lo studio *in vivo*, è stata eseguita in modo da preservare il benessere dell'animale, riducendo al minimo le sofferenze, così come descritto dalle Leggi nazionali (D.L. n 116, G.U. suppl. 40, 18 febbraio 1992; circolare 8, G.U., 14 luglio 1994) e con gli Accordi internazionali (EEC Council directive 86/609, OJ L 358, 1 Dec. 12, 1987; NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council, 1996). Il numero di animali utilizzati è stato ridotto al minimo preservando attiva di una analisi statistica, e il protocollo sperimentale utilizzato nel progetto è stato rivisto e ed approvato da *Animal Care Unit* (ACU) dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri".

## **Condizioni di stabulazione**

Tutti gli animali sono stabulati in condizioni SPF (specific pathogen free) standard (temperatura  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidità  $55 \pm 10\%$ , ciclo luce/buio di 12 ore) con cibo e acqua forniti ad libitum. La nutrizione degli animali con difficoltà motorie è agevolata ponendo il cibo tritato sul fondo della gabbia in un apposito contenitore; l'accesso all'acqua è facilitato usando un biberon con beccuccio più lungo.

## **Topo C57BL/6**

Il ceppo murino C57BL/6, noto anche come C57 black 6, è uno dei più utilizzati nella ricerca e nello sviluppo di animali mutanti. E' classificato come inbred in quanto deriva dall'incrocio di almeno venti generazioni tra consanguinei. In questo



modo possiede uniformità genetica e fenotipica ed è utilizzato come background per topi geneticamente modificati. Infatti, le femmine vengono solitamente utilizzate come donatrici embrionali. La blastocisti del C57BL/6 è usata come recettrici delle cellule staminali embrionali quando viene creato un knock-out. In questo lavoro vengono utilizzati come wild type C57BL/6 del ceppo americano (J).

### **Topo NG2-KO**

Un gruppo di ricercatori americani dell'istituto Burnham è riuscito a creare un modello murino servendosi della tecnica del gene targeting (Grako et al, 1999). I topi knock-out, sono privi dei primi due esoni del gene, sono vitali e fertili e non presentano differenze fenotipiche evidenti rispetto ai C57BL/6. Il topo presenta una delezione dei primi due esoni e quindi della parte in cui è presente il promotore del gene che codifica per NG2 per questo motivo è inibita la sintesi proteica.

Numero di progenie, peso alla nascita, sviluppo postnatale, organogenesi sono comparabili. Gli animali knock-out per NG2 non mostrano modificazioni nella neurogenesi durante lo sviluppo dell'ippocampo (Thallmair, Ray et al. 2006),

### ***Encefalomielite allergica sperimentale (EAE)***

Il modello di malattia EAE, è stato indotto in topi femmina (di 6-8 settimane) C57BL/6 littermate, sui due gruppi sperimentali WT e NG2-KO littermate . La malattia è indotta attraverso immunizzazione per iniezione sottocutanea con 200 µg per topo del peptide MOG 35–55, per ottenere un modello di malattia

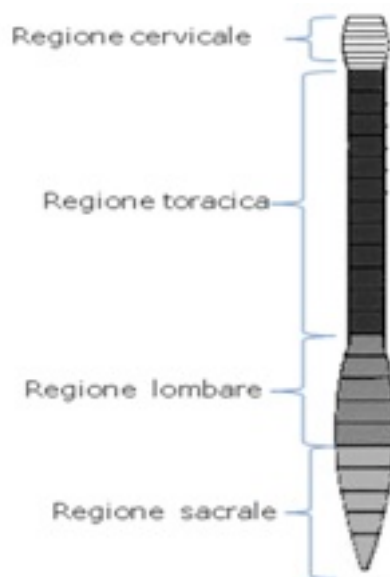
progressivo-cronico. L'antigene è stato somministrato in adiuvante incompleto di Freund (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplementato con 8 mg/ml di *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37RA; Difco, Detroit, MI, USA). Successivamente, è stata somministrata la Pertussin Toxin (List Biological), 300 ng/topo per via endovenosa al tempo della immunizzazione e 48 ore dopo.

Peso e valutazione clinica sono stati registrati quotidianamente (0 = assenza di malattia, 1 = coda flaccida, 2 = atassia e/o paresi degli arti posteriori, o lento riflesso di raddrizzamento 3 = paralisi arti posteriori e/o paresi arti anteriori, 4 = paraparesi 5 = moribondo o morto). Al settimo giorno dopo l'immunizzazione (dpi) i topi WT avevano sviluppato i primi sintomi clinici dell'EAE mentre i topi KO solo il giorno successivo. Quaranta giorni dopo l'esordio, i topi sono stati sacrificati e processati per la valutazioni istologiche.

Istologia

### ***Sacrificio di animali e prelievo tessuti***

I tessuti utilizzati in questo studio sono stati prelevati da topi WT e NG2-KO. Prima del prelievo dei tessuti, tutti gli animali sono stati anestetizzati profondamente con una dose elevata di Avertin (Tribromoetano), somministrato per via intraperitoneale. A seguito della perfusione intracardiaca è stato prelevato il midollo spinale e suddiviso nelle regioni cervicale, toracica e lombare (schema L).



**Schema L:** *Rappresentazione schematica dell'aspetto del midollo spinale e sua suddivisione in regioni cervicale, toracica, lombare.*

### **Perfusione intracardiaca**

Per le analisi istologiche si utilizzano tessuti fissati mediante perfusione intracardiaca con fissativo (2% paraformaldeide più 0,2% glutaraldeide) disciolto in PBS 0,1M. Questa tecnica permette la preservazione tissutale. L'animale, profondamente anestetizzato, viene posto supino su un tavolino da dissezione e fissato ad esso mediante cerotto adesivo a livello degli arti anteriori e posteriori. Dopo aver aperto la gabbia toracica ed esposto il cuore, si inserisce l'ago dell'apparato di perfusione alla base del ventricolo sinistro e si recide l'atrio destro per permettere il deflusso del sangue. Successivamente, dopo espianto dei tessuti oggetto di analisi, si effettua la post-fissazione per immersione con 50 ml del medesimo fissativo per 4 ore a 4°C. Successivamente i tessuti vengono lavati *over-night* in PBS 0,1M a 4°C e preparati per le fasi successive di analisi.

## Inclusione in paraffina

I tessuti già suddivisi nelle aree anatomiche di studio, sono state inserite nei blocchetti traforati di plastica e conservati in formalina. Il processamento dei tessuti per l'inclusione in paraffina, è stato effettuato mediante procedura automatica eseguita dallo strumento Tissue Tek, riassunta di seguito:

1. Etanolo 80° per 2 ore
2. Etanolo 90° per 2 ore
3. Etanolo 95° over night
4. I Etanolo 100° per almeno 30 minuti
5. II Etanolo 100° per almeno 30 minuti)
6. III Etanolo 100° per almeno 30 minuti
7. Etanolo 100°/Xilene 1:1 per 15 minuti
8. I Xilene da 2 a 5 minuti in relazione alla dimensione
9. II Xilene da 2 a 5 minuti in relazione alla dimensione
10. Xilene/Paraplast 1:1 per 15 minuti
11. I Paraplast per almeno 1 ora
12. II Paraplast per almeno 2 ore
13. Inclusione (5)

**Schema M: Cicli Tissue Tek:**

Al termine della procedura i tessuti sono inclusi in blocchetti di paraffina e preparati su appositi sostegni per il taglio. Le fettine ottenute sono poste prima in acqua fredda (cercando di eliminare più pieghe possibili), successivamente vengono posate su un vetrino da analisi microscopica (preventivamente gelatinizzato, per incrementare l'adesione del tessuto) e poste in acqua calda per favorire l'adesione del tessuto al vetro. Infine, vetrini vengono incubati *over-night* a 37°C in stufa per rimuovere l'eccesso di acqua.

## ***Istologia***

In questo lavoro di tesi sono stati studiati tessuti derivanti dal SNC. Ogni analisi di *imaging* è stata condotta su 5 animali per ogni gruppo sperimentale ed i tessuti sono stati serati. Il midollo spinale è stato analizzato nelle sezioni cervicali, toraciche e lombare. Ogni sezione è stata analizzata, studiando 5 fettine istologiche raccolte ogni 90µm di tessuto. Per quanto riguarda lo studio delle aree cerebrali, circa 200 sezioni per emisfero sono state raccolte e successivamente selezionate per lo studio di precise aree anatomiche.

## **Colorazione istologica**

Per valutare il danno di demielinizzazione nel topo immunizzato con la proteina MOG (EAE), abbiamo effettuato la colorazione istologica per mezzo di un agente, chimicamente derivato dalla tetrabenzotetrazo-porfirina, chiamato Luxol Fast Blue (LFB). Si tratta di una colorazione utilizzata per lo studio del SNC e serve ad evidenziare in modo selettivo i fasci di sostanza bianca attraverso una colorazione blu intensa, discriminabile dalla sostanza grigia in modo netto poichè debolmente reattiva. Si pensa che l'elettività del colorante per il SNC sia dovuta principalmente

ai legami che forma con strutture fosfolipidiche quali la lecitina e la sfingomieline.

Per effettuare una colorazione delle sezioni in paraffina, occorre effettuare la cosiddetta "sparaffinatura".

E' un procedimento atto ad assicurare che la paraffina, non miscibile con acqua ed alcool, venga eliminata ed il tessuto possa essere impregnato dal colorante. Quindi, è necessario utilizzare dei solventi della paraffina partendo dallo xilene per poi arrivare, attraverso una scala decrescente di alcoli, all'acqua distillata. In seguito, si effettua disidratazione delle fettine invertendo la scala di alcoli per poi immergere i campioni nel colorante Luxol Fast Blue ( 0,1 mg in 100 ml di Etanolo 95%) over-night a 60°C. Il giorno seguente si effettuano prima dei passaggi di reidratazione poi si lasciano le sezioni in una soluzione di litio carbonato per 10 min per differenziare la sostanza bianca dalla sostanza grigia. Dopo brevi lavaggi in acqua distillata si lasciano le sezioni in una soluzione di acido periodico per 8 min per poi rimmergere i vetrini in acqua distillata. Prima del processo di disidratazione finale occorre passare i vetrini in una soluzione solforosa per 3 minuti. Infine, le sezioni vengono disidratate, seguendo una scala di alcoli fino allo xilene, montate con vetrino e lasciate asciugare a 36° C.

### **Immuno-isto chimica**

I topi C57Bl6 sia WT che NG2 KO sono stati anestetizzati con Avertin e perfusi con 100 ml di fissativo (2% paraformaldeide più 0,2% glutaraldeide). Per l'analisi in fluorescenza, dopo la perfusione, i tessuti sono stati tagliati al vibratomo in sezioni di 20 um di spessore e preparate per l'analisi alla microscopia ottica o microscopia laser confocale, escluse le sezioni che sono state colorate con blu di toluidina microanatomia per l'analisi comparativa. I seguenti anticorpi primari sono stati

utilizzati per la rilevazione degli antigeni in fluorescenza:

- anti-A2B5;
- anti-NG2;
- anti-O4;
- anti-CD45;
- anti-Claudina 5
- anti-Occludina

Per l'analisi dell'infiltrato cellulare nel SNC, i tessuti, perfusi ed inclusi in paraffina, sono stato tagliati al microtomo in sezioni di 10 um ed seguenti anticorpi primari sono stati utilizzati per la rilevazione degli antigeni con metodi immunoenzimatici:

- anti-CD3;
- anti-IBA 1.

Le sezione marcate con gli anticorpi primari, sono poi state successivamente incubati con gli anticorpi secondari appropriati, specie-specifici. Per lo studio in fluorescenza nelle marcature eseguite con due anticorpi primari contemporaneamente, sono stati scelti anticorpi secondari marcati con fluorofori con diversa lunghezza d'onda in emissione, per evitare sovrapposizione del segnale di fluorescenza.

Le sezioni tissutali marcate sono state esaminate al microscopio confocale laser Leica SP5 laser (Leica Microsystems, Mannheim, Germania).

## **Colture cellule**

Per stabilire e discriminare dal contesto sistemico la funzione delle cellule immunitarie del topo NG2 KO, ci siamo avvalsi di modelli di studio *in vitro*.

### **Macrofagi e cellule dendritiche (DC)**

Le cellule macrofagiche e dendritiche (DC) utilizzate negli esperimenti *in vitro* sono di derivazione midollare (*BMDM*, *Bone Marrow-Derived Macrophages*; *BMDDCs*, *Bone Marrow-Derived Dendritic cells*). In seguito alla stimolazione con fattori di crescita appropriati, i precursori cellulari di derivazione midollare CD34 positivi una volta isolati, sono in grado di differenziare verso il fenotipo maturo di cellula immunitaria.

Abbiamo utilizzato come fonte cellulare topi C57Bl6 sia WT che NG2 KO di sesso maschile di 6-10 settimane. Immediatamente dopo il sacrificio, operando in modo asettico all'interno di una cappa sterile, sono stati prelevati tibia e femore di entrambe le zampe posteriori. I muscoli e i tessuti circostanti le ossa, sono stati eliminati ed attraverso una procedura di *flushing*, il midollo osseo contenuto in esse, è stato isolato e raccolto in eppendorf sterili. Le cellule così ottenute sono state trattate con un buffer di lisi (ACK, 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA , pH 7.2) per 5 minuti in ghiaccio, che elimina in modo selettivo i globuli rossi. Tipicamente per ogni preparazione cellulare da un singolo topo, si ottiene 40-50x10<sup>6</sup> di precursori midollari CD34 positivi. In seguito ad un lavaggio con soluzione fisiologica apirogena, le cellule sono state seminate ad una densità pari ad 1-3x10<sup>7</sup> in piastre Iwaki da 6 pozzetti. In seguito, come fattore di crescita per l'ottenimento dei macrofagi, è stata utilizzata IL-3 ad una concentrazione di 10ng/ml in terreno



DMEM completo al 10 % di siero (FCS, *Fetal Calf Serum*). Il terreno è stato cambiato ogni due giorni per mantenere lo stimolo proliferativo ed al decimo-dodicesimo giorno dopo la semina si è ottenuta una preparazione macrofagica a confluenza per la fase sperimentale.

I precursori midollari sono invece stati stimolati con GM-CSF (20ng/ml al primo giorno di semina ed in seguito a 5ng/ml) per ottenere DC mature. Le DC sono state seminate in DMEM completo addizionato di siero al 10% più  $\beta$ -mercaptoetanololo 50uM e dopo 9-11 giorni dalla semina, le DC mature erano pronte per la fase sperimentale. Per gli esperimenti di citometria a flusso le cellule sono stati utilizzate direttamente dopo la loro maturazione, mentre per l'analisi di produzione delle citochine e per lo studio di maturazione le DC sono state stimolate con LPS (10 ug/ml).

## **Linfociti T**

Le cellule linfocitarie T, CD3 positive, sono state preparate da una sospensione cellulare derivante da milza e linfonodi di topi C57Bl6 sia WT che NG2 KO di sesso maschile di 6-8 settimane. Immediatamente dopo il sacrificio, operando in modo asettico all'intero di una cappa sterile, sono stati prelevati milza e linfonodi (inguinali ed ascellari). In seguito gli organi immersi in terreno DMEM senza siero, sono stati sminuzzati in frammenti con l'ausilio di un bisturi ed immediatamente trasferiti su un filtro *cell-strainer* dai pori del diametro di 70  $\mu$ m. I frammenti sono stati poi dolcemente spinti sul filtro con un pistone di una siringa da 1,5ml e centrifugati a 200 g per 3 minuti 4°C. In seguito il pellet cellulare è stato trattato con il buffer di lisi (ACK) per eliminare i globuli rossi, dopo un lavaggio con soluzione fisiologica le cellule sono state utilizzate per la fase sperimentale. Per gli esperimenti di

citometria a flusso le cellule sono stati utilizzate direttamente dopo la loro preparazione, mentre per l'analisi di produzione delle citochine i linfociti T sono stati stimolati con anti-CD3 (10 µg/ml) ed eseguiti dopo 2 giorni di stimolazione. I saggi di proliferazione sono stati eseguiti dopo due giorni di stimolazione con anti-CD3 (10 µg/ml), dopodiché il tasso di proliferazione è stato misurato attraverso l'incorporazione cellulare di <sup>3</sup>[H]Timidina, incubata per 12 ore e contata, (CPM, conte per minuto) attraverso un β-counter.

### ***Citometria a flusso***

L'analisi di citometria a flusso è stata condotta con lo strumento FACS Calibur II munito di doppio laser. Il numero di cellule preparate per ogni analisi al citometro era pari a 500.000 per condizione, contate tramite l'utilizzo di un cell counter (Beckman Coulter) e gli eventi analizzati per ogni acquisizione era pari 20.000 per condizione. Le cellule derivanti da colture *in vitro* venivano staccate meccanicamente, mentre quelle derivanti da organi venivano utilizzate subito dopo l'estrazione. Per la marcatura il numero di cellule da venivano risospese in PBS, fissate in paraformaldeide al 4% per 10 minuti e permeabilizzate in PBS più Triton allo 0,2% per 4 minuti.

La percentuale di macrofagi, DC e linfociti T è stata calcolata utilizzando i rispettivi anticorpi direttamente coniugati, CD11b, CD11c e CD3. Le marcature doppie erano effettuate mediante l'utilizzo di un anticorpo anti-NG2 (AB5320 Chemicon) non coniugato il cui segnale in fluorescenza era rilevato tramite l'utilizzo di un anticorpo secondario marcato. Gli anticorpi primari (e il secondario nel caso diell'anti-NG2) venivano incubati per 30 minuti in ghiaccio.

## **Risultati**

### ***Screening in pazienti affetti da SM***

La sclerosi multipla è una patologia a carattere prevalentemente autoimmunitario che colpisce la sostanza bianca del sistema nervoso centrale. La fase effettrice dell'auto-immunità è di tipo cellulo-mediata, con attivazione incontrollata della risposta T-helper 1 (Th1 CD4+) e citotossica (linfociti T citotossici; LTC CD8+). Nell'ultima decade, la risposta umorale mediata dai linfociti B ha destato particolare interesse e fatto emergere sempre più evidenze a favore di un coinvolgimento dell'auto-immunità mediata da anticorpi. Infatti, una delle caratteristiche immunologiche più rilevanti descritte nei pazienti SM e utilizzata come elemento di natura diagnostica, è la sintesi intratecale d'immunoglobuline di tipo G (IgG). Queste IgG possono essere rivelate nel liquor e danno luogo alle cosiddette bande oligoclonali in seguito alla corsa elettroforetica. Il liquor è la sede ideale dove ricercare eventuali bio-marcatori clinici in patologie come la SM, sia per la prossimità al sistema nervoso centrale (CNS), ma soprattutto per la caratteristica di riflettere gli avvenimenti patologici del SNC. Data la composizione intrinsecamente eterogenea del liquor (proteine, glucosio, nutrienti, neurotrasmettitori), e la sua scarsa disponibilità analitica, diventa di estrema importanza poterlo analizzare e trattare nel modo più corretto possibile onde evitare errori pre-analitici.

Nella parte iniziale del progetto di tesi, abbiamo caratterizzato i liquor di pazienti affetti da SM, ricercando un bio-marcatore di malattia, ipotizzando che NG2 possa

essere coinvolto nei meccanismi patogenetici di malattia. Non esistono dati in letteratura a proposito della presenza di NG2 in liquor di pazienti SM, di conseguenza è stato fondamentale standardizzare il processo di analisi per rendere i risultati, ottenuti mediante tecnica ELISA, il più possibile corretti, studiando e analizzando tutti i fattori che avrebbero potuto in qualche modo inficiare l'analisi e l'interpretazione dei dati.

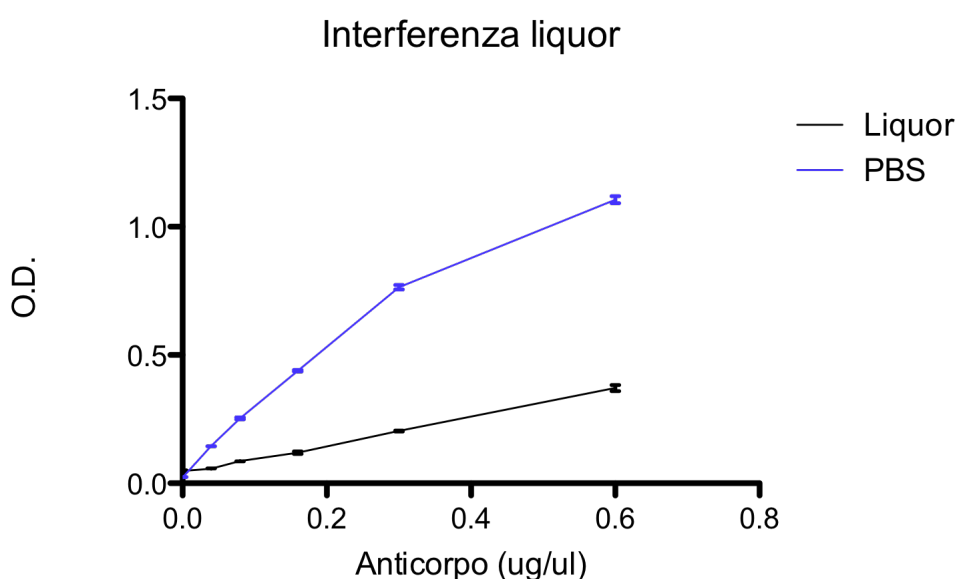
### **Test validazione sperimentale analisi liquor pazienti SM**

Tutti gli esperimenti elencati di seguito, sono stati effettuati con campioni di liquor controllo derivati da sospette patologie neurologiche, non confermate in diagnosi clinica. Il proteoglicano coating NG2 utilizzato negli esperimenti di ELISA (e in seguito in western blotting) è stato ottenuto mediante tecniche di biologia molecolare: in tutti gli esperimenti, è stato utilizzato il solo dominio extracellulare del peso di circa 270 KDa.

Come già descritto in precedenza, il liquor ha una composizione eterogenea, la nostra ipotesi è che questa eterogeneità possa in qualche modo inibire o influenzare il legame di eventuali auto-anticorpi con il proprio antigene. Per questo abbiamo effettuato un competition assay (saggio di competizione) per verificare se l'anticorpo di controllo è in grado di riconoscere il proprio antigene una volta diluito in un liquor, mentre come controllo sperimentale abbiamo invece diluito lo stesso anticorpo in soluzione PBS. In figura 14 viene mostrato il legame antigene-anticorpo dopo un'ora d'incubazione in funzione della concentrazione anticorpale. Le due curve hanno una buona correlazione assorbanza-concentrazione anticorpo (Pearson test; Liquor,  $r = 0.9989$ ,  $p < 0.0001$ . PBS  $r = 0.9819$ ,  $p < 0.0005$ .), al diminuire della concentrazione di anticorpo diminuisce il legame con la proteina

antigene. Le due curve sono differenti dal punto di vista statistico (t-Test;  $p < 0,05$ ), l'inibizione nel punto massimo delle due curve da una diminuzione del segnale pari al 26,7%.

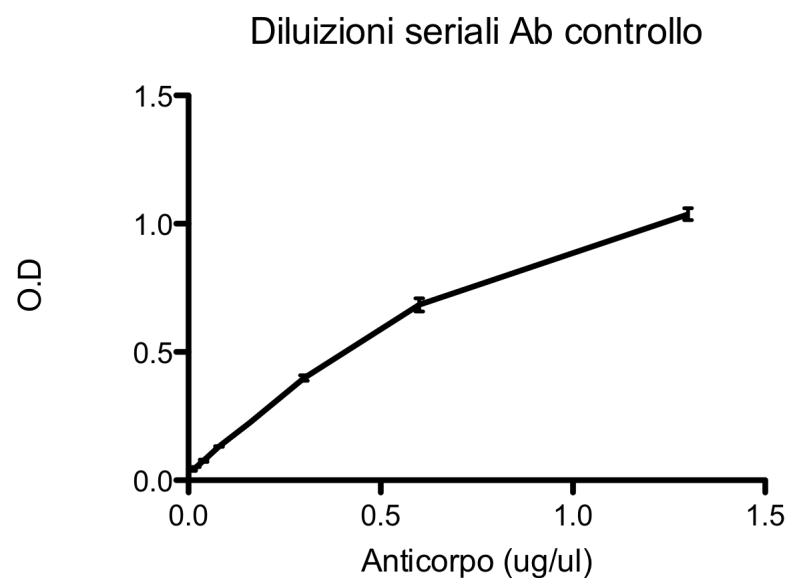
Questi risultati suggeriscono che la composizione del liquor è in grado di influenzare l'interazione antigene-anticorpo è che il liquor è in grado di influenzare i valori di assorbanza massima. In base alle nostre osservazioni l'analisi condotta sui liquor di pazienti SM sia quindi sottostimata.



**Figura 1:** Quantificazione effettuata tramite metodica ELISA. Le curve rappresentano l'assorbanza (densità ottica) dell'anticorpo anti-NG2 diluito in liquor di controllo (linea blu) e PBS (linea nera). Ogni punto rappresenta la media dell'assorbanza rivelata di tre replicati ( $M \pm DS$ ).

Come anticorpo di controllo per tutti i di validazione, abbiamo utilizzato l'anticorpo commerciale diretto contro la molecola NG2. In figura 15 è rappresentato l'andamento della curva in funzione della concentrazione di anticorpo. Sono state preparate diluizioni seriali dell'anticorpo, partendo da 1,3 ug/ul fino ad arrivare a

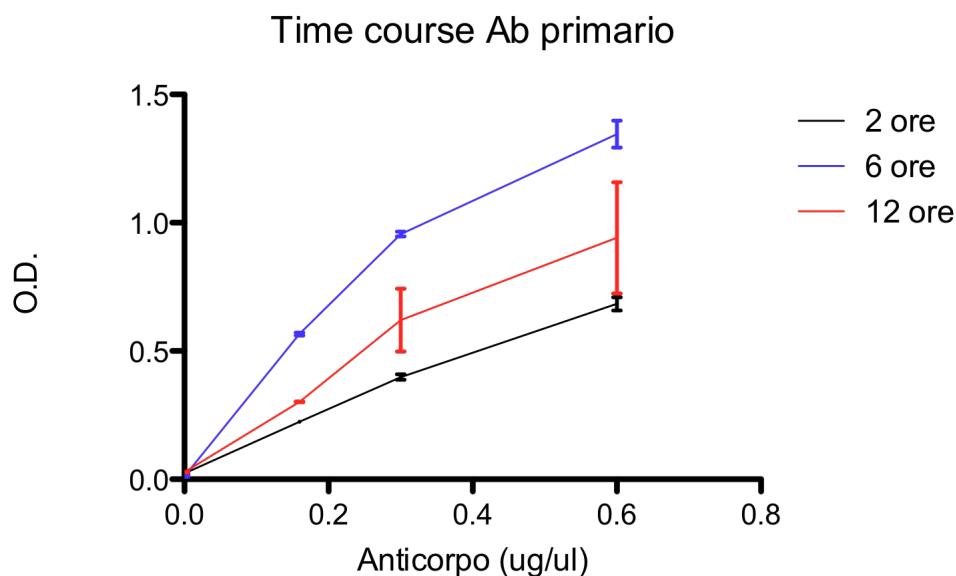
0,001 ug/ul. Il coefficiente di Regressione ( $R^2$ ) è pari a 0.9621 indicando una regressione statisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). L'indice di correlazione (Pearson) è pari a 0.9809 con un p value pari 0,0001. I risultati suggeriscono un riconoscimento specifico dell'anticorpo di controllo verso la proteina antigene e che questo riconoscimento è dose-risposta.



**Figura 2:** Quantificazione effettuata tramite metodica ELISA. La curva rappresenta l'andamento dei segnali di assorbanza in funzione delle diluizioni seriali dell'anticorpo di controllo commerciale anti-NG2. Ogni punto rappresenta la media dell'assorbanza rivelata di tre replicati ( $M \pm DS$ ).

Per ottimizzare il segnale in assorbanza abbiamo modificato i tempi di incubazione dell'anticorpo di controllo. Per stabilire i tempi d'incubazione ottimali di riconoscimento, abbiamo effettuato un test ELISA in time course. I risultati mostrati in figura 16, indicano l'incubazione dell'anticorpo di controllo a concentrazioni differenti (da 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a 0,15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) e tempi diversi (6 e 12 ore). Come si può osservare in figura, in modo sorprendente il segnale in assorbanza maggiore si è

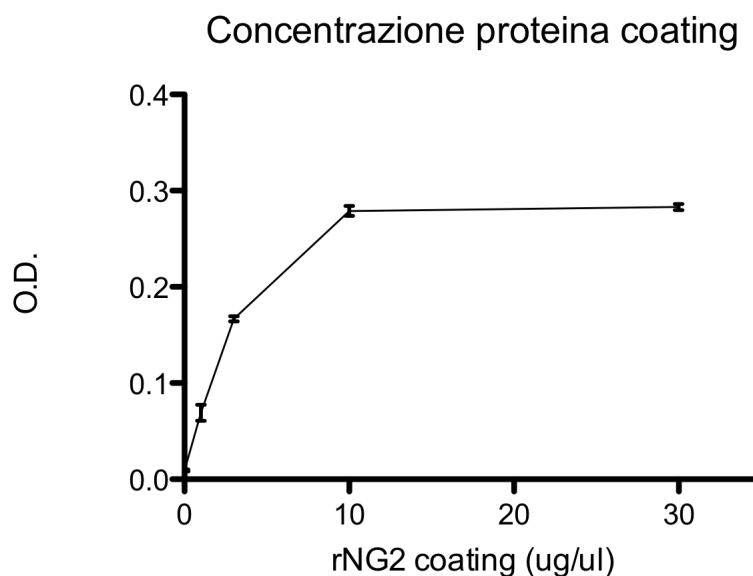
ottenuto dopo il tempo più breve, sei ore d'incubazione. La diminuzione del segnale di assorbanza anche in questo caso è dose-risposta.



**Figura 3:** Quantificazione effettuata tramite metodica ELISA. Nel grafico è riportato il time-course dell'anticorpo primario anti-NG2 commerciale incubato per 2 (linea nera), 6 (linea blu) e 12 (linea rossa) ore. Ogni punto rappresenta la media dell'assorbanza rivelata di tre replicati ( $M \pm DS$ ).

Per stabilire la concentrazione ottimale della proteina coating abbiamo effettuato un esperimento di diluizione dell'antigene. Come riferimento, abbiamo utilizzato una sola concentrazione dell'anticorpo di controllo ( $0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) e modificato le concentrazioni della proteina coating. In figura 17 è rappresentata la curva delle assorbanze riguardanti le concentrazioni dell'antigene, in cui le concentrazioni di  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  e  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  risultano avere una assorbanza simile, indicando l'inizio della saturazione del segnale già a  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ . La curva ha un andamento lineare a concentrazioni più basse (Pearson  $r=0,9544$ ), mentre a  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  si arriva a

saturazione. Questi dati indicano che la concentrazione di utilizzo della proteina coating è pari a 10 $\mu$ g/ml.

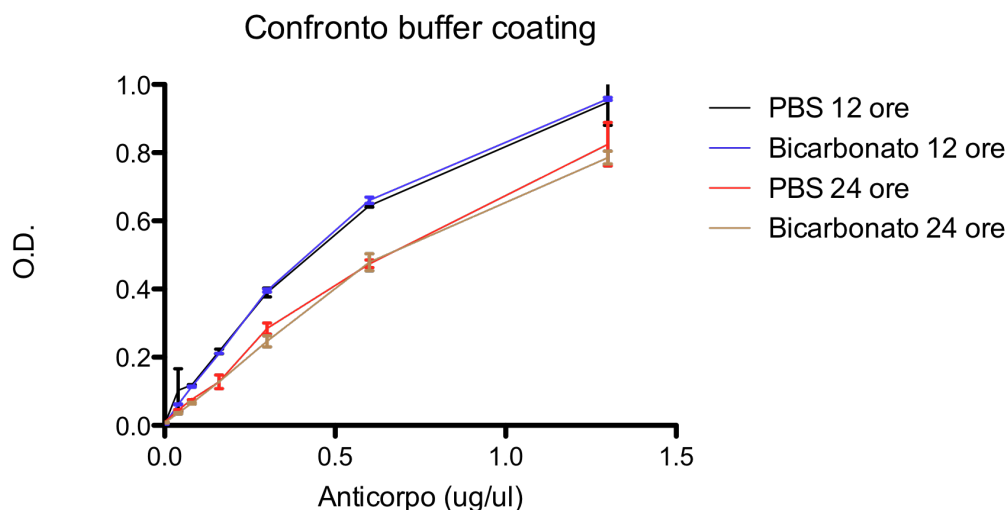


**Figura 4:** Il grafico mostra test ELISA nel quale viene utilizzata la proteina ricombinante rNG2 in concentrazioni crescenti (30, 10, 3, 1 e 0  $\mu$ g/ml ) come antigene coating per dodici ore a 4°C. Ogni punto, rappresenta la media dell'assorbanza rivelata di tre replicati ( $M\pm DS$ ).

Infine, per ottimizzare i valori di assorbanza, determinando quindi una migliore rilevazione del segnale, abbiamo modificato la soluzione coating per migliorare le interazioni della proteina coating. La proteina coating interagisce attraverso interazioni aspecifiche con la plastica della piastra ELISA, la soluzione coating può favorire questa interazione. Pertanto abbiamo sostituito la soluzione di PBS con la soluzione bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3+\text{NaHCO}_3+\text{NaN}_3$ , pH 9.6). In figura 18 sono raffigurate le curve relative alle soluzioni (PBS e Bicarbonato) in funzione del tempo. I risultati dimostrano che le due soluzioni favoriscono allo stesso modo l'interazione della proteina coating alla plastica, e che quindi la soluzione di



bicarbonato non determina un miglioramento dell'interazione proteina coating-plastica. All'aumentare del tempo d'incubazione (12 e 24 ore), non si evidenziano, altresì differenze.



**Figura 5:** Quantificazione effettuata tramite metodica ELISA. In grafico sono riportate le curve riguardanti la risposta anticorpale anti-NG2 commerciale, in funzione della diluizione seriale, del buffer e del tempo di coating. In nero ed in rosso sono rappresentate le curve relative al PBS in funzione dei due tempi sperimentali (12 e 24 ore), in blu e marrone le curve relative al bicarbonato. Ogni punto rappresenta la media dell'assorbanza rivelata di tre replicati ( $M \pm DS$ ).

In conclusione in base ai risultati ottenuti dai test di validazione, si sono stabilite le seguenti condizioni sperimentali da seguire negli esperimenti ELISA:

- L'anticorpo di controllo ha una curva dose-risposta, la concentrazione di utilizzo è pari a  $0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ed il tempo di incubazione è di sei ore;
- La concentrazione dell'antigene coating deve essere di  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ;
- La soluzione di coating è il PBS con incubazione di 12 ore.

Infine, i risultati riguardanti lo studio d'interferenza del liquor, indicano che esiste una inibizione parziale (26,7%) del riconoscimento antigene-anticorpo. In base alle

nostre osservazioni l'analisi condotta sui liquor di pazienti SM sarà quindi sottostimata.

## **Dosaggio anticorpi anti-NG2 in liquor di pazienti SM**

La ricerca e la standardizzazione del processo di valutazione di un bio-marcatore nella SM è ad oggi considerata una grossa sfida. La disponibilità di un marcatore che indichi, la diagnosi, la prognosi e l'effetto delle terapie è cruciale, per ottimizzare l'approccio terapeutico. La disponibilità di bio-marcatori affidabili potrebbe modificare radicalmente la gestione della patologia soprattutto nelle fasi più critiche. Molti studi hanno proposto molecole come citochine, chemochine, anticorpi, particolari stipiti (*subset*) cellulari come possibili bio-marcatori, ma ad oggi nessuno di questi è risultato essere un vero e proprio indicatore di malattia.

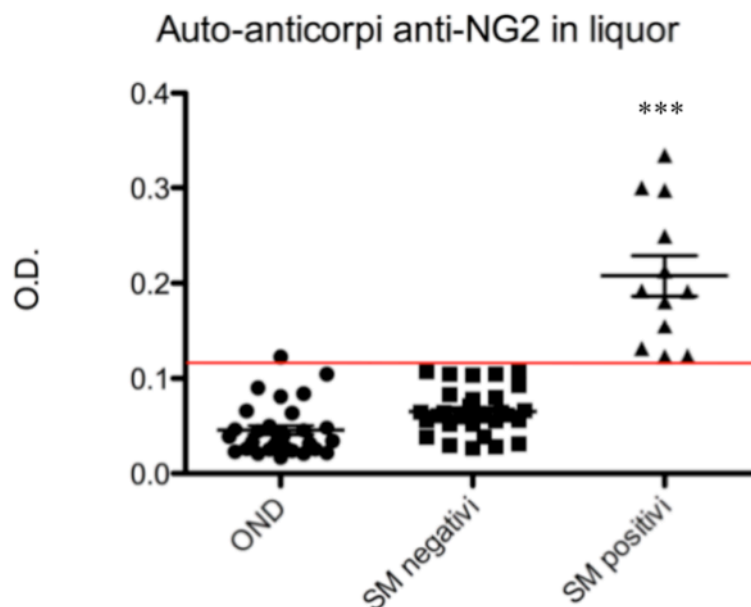
In questo progetto di tesi ci proponiamo di ricercare un bio-marcatore di malattia, ipotizzando un coinvolgimento di NG2 nella patogenesi autoimmune, di tipo umorale. Una volta standardizzato il processo di analisi dei liquor mediante test ELISA, ci siamo dedicati allo screening di auto-anticorpi diretti contro NG2 nel liquor di pazienti SM.

La liquorteca analizzata ci è stata gentilmente concessa dal Prof Franco Granella dell'università di Parma. Abbiamo analizzato 43 liquor appartenenti a pazienti SM e 30 liquor raccolti da pazienti con altre patologie di tipo nervoso (OND, other neurological disease). I liquor sono stati raccolti al momento della diagnosi, sono stati centrifugati per eliminare la componente cellulare e conservati immediatamente a -80°C.

I saggi ELISA condotti per lo screening degli auto-anticorpi diretti contro NG2, sono esperimenti di natura qualitativa, indicano la presenza (sì/no) degli anticorpi e

per determinare la soglia sopra la quale abbiamo considerato positiva la presenza, abbiamo calcolato il cut-off come la somma tra la media degli OND e due volte e mezza la deviazione standard. Il cut-off sperimentale così disegnato (0,1129 O.D.) da luogo a risultati con significatività pari al 95%. Facendo poi la differenza tra il cut-off e i valori di assorbanza relativi ad ogni liquor, abbiamo ottenuto le informazioni mostrate in figura 19.

Il nostro test ha quindi evidenziato due sottopopolazioni di pazienti SM, discriminabili per la presenza degli auto-anticorpi. I pazienti che mostrano un'attività auto-anticorpale sono pari al 28% del campione testato e la differenza tra le assorbanze medie dei pazienti positivi (0,2077 O.D.) verso i controlli (0,04561 O.D.) è statisticamente significativa ( $P < 0,0001$  One-way ANOVA). L'esperimento è stato ripetuto tre volte ed ogni campione è stato analizzato in triplicato. Gli esperimenti sono stati normalizzati sull'anticorpo di controllo positivo (anti-NG2).



**Figura 6:** In figura sono riportati i valori di assorbanza ottenute tramite test ELISA. Il

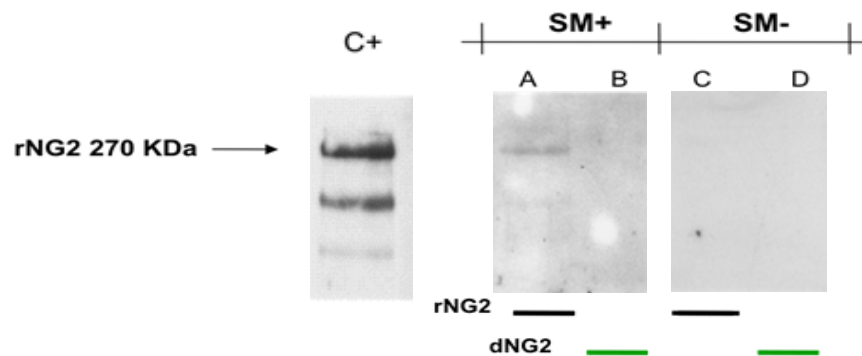
*cut-off è indicato in rosso (0,1129 O.D.). I campioni di liquor sono stati diluiti 1:1 PBS più BSA 1%. Gli OND (n=30) sono i controlli sperimentali, mentre SM negativi (n=31) e SM positivi (n=12) sono le assorbanze relative ai pazienti SM testati. Il grafico è rappresentativo di tre esperimenti normalizzati sull'anticorpo di controllo, ogni liquor è stato testato in triplicato. t-Test  $p < 0,0001$ .*

Per verificare il riconoscimento specifico degli auto-anticorpi presenti nei liquor dei pazienti SM risultati positivi nei test ELISA, abbiamo effettuato un esperimento di western blotting (WB) in condizioni denaturanti, caricando proteina rNG2 nel gel di poliacrilammide. In figura 20 è mostrato l'immagine delle bande relative agli esperimenti di WB. Dopo la corsa elettroforetica della proteina rNG2 abbiamo utilizzato come anticorpo primario il liquor di pazienti SM. L'incubazione con gli anticorpi primari è stata effettuata sulla membrana di nitrocellulosa opportunamente divisa in tre parti ognuna delle quali ibridata in modo diverso: utilizzando o l'anticorpo di controllo o il liquor di pazienti SM+ o SM-. Per quanto riguarda la scelta dei liquor da utilizzare abbiamo impiegato un pool di tre liquor di pazienti SM e per ogni gruppo (SM+, presenza di auto-anticorpi anti-NG2 nel liquor; SM- assenza di auto-anticorpi anti-NG2 nel liquor) sono stati scelti i liquor con i valori di assorbanza più alta. Come anticorpo secondario abbiamo utilizzato un anti-immunglobulina umana, coniugata all'enzima perossidasi di rafano (HRP), il quale sfrutta l'ossidazione del luminolo presente nel reagente ECL mediante la perossidasi di rafano, in presenza di acqua ossigenata in ambiente basico. In seguito all'ossidazione, il luminolo si trova in uno stato eccitato dal quale decade attraverso l'emissione di luce con lunghezza d'onda a 428 nm. La rivelazione dell'emissione della luce avviene tramite esposizione ad una lastra autoradiografica sensibile alla luce.

Per l'anticorpo di controllo è stato utilizzato un secondario che riconosce le immunoglobuline di coniglio. In figura 20 lane C+ è rappresentata la banda relativa

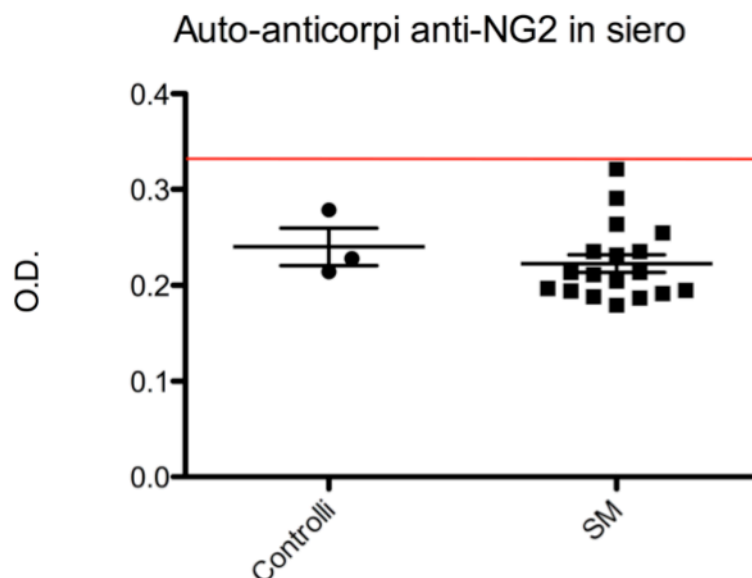
al riconoscimento di rNG2 da parte dell'anticorpo commerciale di controllo. Come si può osservare, l'anticorpo individua più bande, dovute probabilmente alla presenza di prodotti di degradazione della proteina stessa. I risultati in figura 20 lane A, dimostrano che i liquor di pazienti positivi individuano una banda del peso corrispondente ad NG2 (270 KDa, lane A) posta alla stessa altezza della banda individuata dall'anticorpo di controllo. Come il controllo positivo, anche i liquor dei pazienti SM positivi individuano più bande anche se di minore intensità. Per quanto riguarda l'ibridazione con i liquor dei pazienti SM negativi, non si evidenzia la presenza di alcuna banda in corrispondenza del peso di NG2, come si può osservare in figura 20 lane C.

Ogni condizione d'ibridazione dei liquor (sia SM positivi che SM negativi) è stata testata anche sulla proteina digerita. Abbiamo infatti, effettuato il blotting dei liquor sulla corsa elettroforetica della proteina rNG2 processata con lo 0.02% di tripsina per 15 minuti a 37°C. La tripsina è un enzima proteolitico in grado di catalizzare la reazione di digestione specifica per il sito di legame peptidico arginina-lisina. Così facendo abbiamo voluto dimostrare il riconoscimento sequenza-dipendente degli auto-anticorpi presenti nel liquor di pazienti SM. Come si può osservare in figura 20 lane B e D non vi è alcun riconoscimento specifico della proteina nè da parte degli SM positivi (lane B) e nè SM negativi (lane D).



**Figura 7:** Analisi in western blotting dei liquor di pazienti SM. Come anticorpo primario è stato utilizzato un pull di liquor di pazienti SM e come secondario un anticorpo che riconosce le immunoglobuline umane. C+) anticorpo anti-NG2 di controllo. A) pull di liquor SM positivi agli anticorpi ibridati con la proteina non processata. B) pull di liquor SM positivi agli anticorpi ibridati con la proteina digerita. C) pull di liquor SM negativi agli anticorpi ibridati con la proteina non processata. D) pull di liquor SM negativi agli anticorpi ibridati con la proteina digerita. Il peso di rNG2 dopo la corsa elettroforetica è pari a 270 KDa.

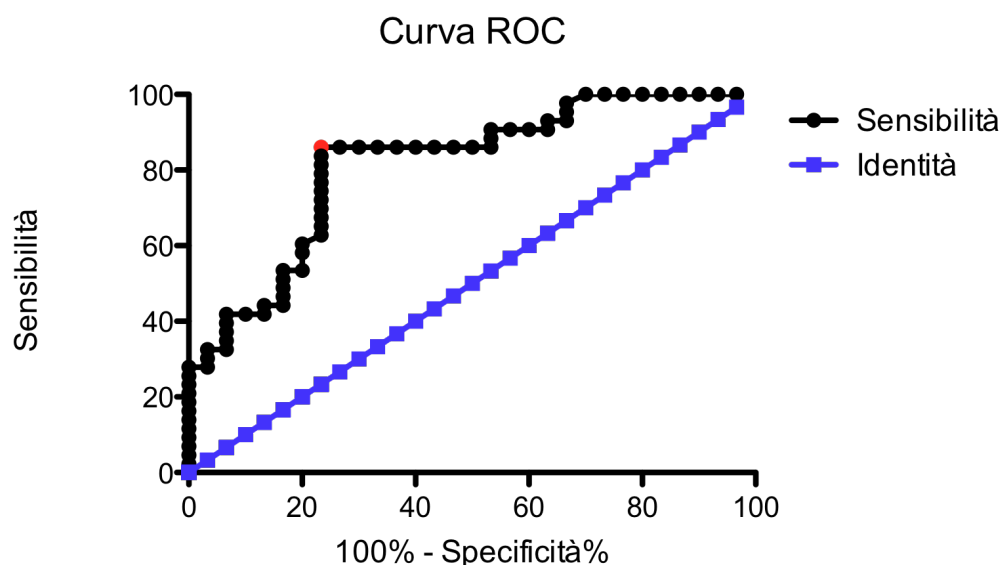
Per verificare se la produzione degli auto-anticorpi diretti contro il proteoglicano NG2 è di natura periferica, e quindi al di fuori del SNC, abbiamo effettuato dei test ELISA su siero di pazienti SM, non accoppiati ai liquor già analizzati. Il metodo del cut-off è stato calcolato come già indicato in precedenza (0,3247 O.D.) e come si può osservare in figura 21 non esiste alcuna differenza statistica tra il gruppo controllo e i pazienti SM. Questi risultati suggeriscono che la sintesi di anticorpi diretti contro NG2 è direttamente legata al SNC, ossia le cellule responsabili della produzione degli auto-anticorpi risiede direttamente nel parenchima cerebrale (sintesi intratecale).



**Figura 8:** In figura sono riportati i valori di assorbanza ottenute tramite test ELISA. I campioni di siero sono stati diluiti 1:200 in PBS più BSA 1%, in rosso è indicata la linea di cut-off (0,3247 O.D).

A seguito dei test ELISA e delle successive verifica in WB dei risultati ottenuti, abbiamo effettuato un test di natura statistica per evidenziare eventuali errori di valutazione e rafforzare il dato sperimentale. Abbiamo deciso di effettuare un'analisi attraverso l'utilizzo della matrice binaria, Receiver Operating Characteristic (curva ROC, M. Greiner, 2000). Questo test permette di analizzare attraverso uno schema grafico, la sensibilità in relazione alla specificità dell'osservazione sperimentale e permette inoltre di valutare la bontà del test sperimentale utilizzato. La curva ROC è in grado di discriminare il vero positivo dal falso positivo (specificità), e analizzando l'area sotto la curva (AUC) si può discriminare la presenza di due popolazioni statisticamente distinte. In figura 22 sono rappresentati i risultati dell'analisi mediante curva ROC degli esperimenti di ELISA considerando sia la popolazione controllo che quella SM. Riguardo alla sensibilità, abbiamo un test (ELISA) che è in grado di indicarci un risultato con la

specificità dell'81% circa (AUC, 0,8140). Quindi i risultati, relativi agli esperimenti in ELISA, hanno un alto grado di veridicità statistica ( $P < 0,0001$ ).



**Figura 9:** Analisi mediante curva ROC. Test statistico di tipo quantitativo che lega la probabilità di ottenere un risultato vero-positivo nella classe dei malati-veri (sensibilità) alla probabilità di ottenere un risultato falso-positivo nella classe dei falsi malati (specificità). La curva rappresenta i valori di assorbanza relativi ai controlli e pazienti SM. In tabella sono indicati i risultati statistici.

Area (AUC)	0.8140
Std. Error	0.05124
95% Confidence interval	0.7135 to 0.9144
P value	< 0.0001

Riguardo a questa parte di tesi, i dati suggeriscono che nei liquor di pazienti SM si possono identificare degli auto-anticorpi diretti contro il proteoglicano NG2. Il 28% del campione testato manifesta un'attività auto-anticorpale e gli anticorpi prodotti

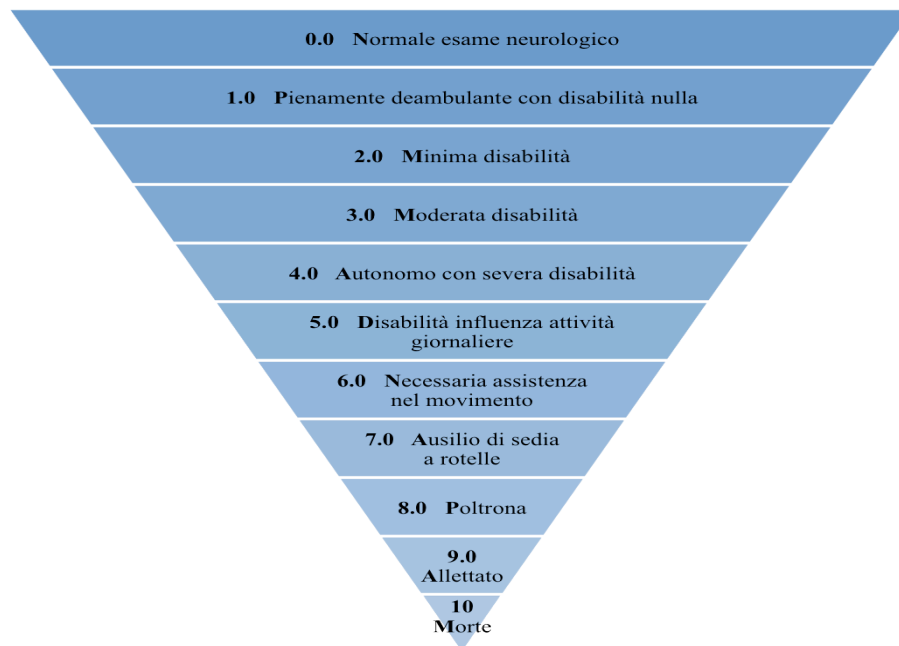


sono specifici per NG2. Infine, il sito di produzione degli auto-anticorpi non è periferico ma si tratta di sintesi intratecale e che tutto ciò che abbiamo descritto finora ha una validità statistica analizzata tramite curva ROC.

### **Analisi clinica dei pazienti positivi agli auto-anticorpi diretti contro NG2**

Per poter considerare una molecola come un bio-marcatore deve esistere una relazione tra l'oggettiva rilevabilità ed un determinato aspetto clinico. Il bio-marcatore deve essere in grado di soddisfare i requisiti minimi d'individuazione di una patologia o di uno stato clinico preciso che può variare in funzione della sua presenza, concentrazione o scomparsa, come ad esempio dopo un trattamento farmacologico.

In questa parte di tesi, abbiamo indagato se la presenza di auto-anticorpi nel liquor di pazienti SM potesse avere un significato clinico e se la loro rilevazione potesse essere utilizzata come un bio-marcatore. Abbiamo raccolto per ogni paziente SM i dati clinici relativi all'evoluzione di malattia ed abbiamo in particolare considerato un valore clinico chiamato EDSS. Il parametro clinico EDSS (Expanded Disability Status Scale), introdotta nella valutazione della SM nel 1893 per merito di John Kurtzke, descrive la sintomatologia clinica del paziente secondo una scala di dieci punti in relazione al danno neurologico (Encefalico, nervo ottico e spinale) l'entità del danno neurologico viene assegnata in seguito all'esame obiettivo del medico.



**Schema N:** *Expanded Disability Status Scale (EDSS). In tabella è rappresentata la scala di valutazione del danno neurologico del paziente SM.*

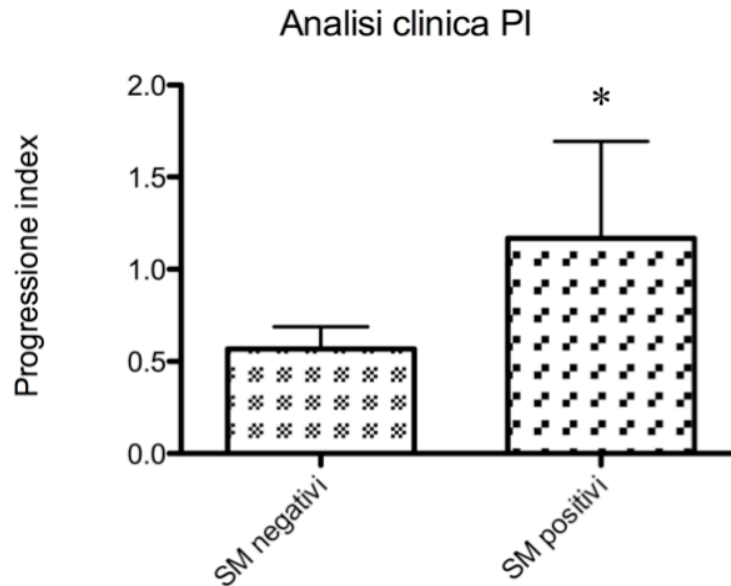
Per ovviare ad eventuali errori di valutazione oggettiva da parte del medico, il punteggio EDSS viene associato agli anni di malattia del paziente, calcolati dal momento della diagnosi fino al momento dell'esame obiettivo. L'associazione di questi due valori (EDSS e anni di malattia) identifica un parametro chiamato progression index (indice di progressione, PI). Il PI è quindi un parametro più affidabile che tiene conto dell'evoluzione di malattia, cambia di volta in volta in base al tempo trascorso e all'accumulo del danno neurologico. Quindi, in base al tempo e all'ultimo EDSS, maggiore sarà il PI, più grave sarà la patologia. In figura 23 sono rappresentati i dati clinici raccolti e catalogati, invece in figura 24 sono rappresentati i risultati relativi al confronto tra i PI dei pazienti positivi e quelli negativi agli anticorpi rilevati nel test ELISA.

Come mostrato in figura, la media dei PI dei pazienti con attività auto-anticorpale ( $1,168 \pm 0.5258$ ) è più alta di quella dei pazienti che non hanno attività auto-anticorpale ( $0,5678 \pm 0.1195$ ) la differenza è statisticamente rilevante (t-Test

P<0,05). Questi dati suggeriscono che i pazienti con PI più alto (28%) e quindi con patologia più grave presentano attività auto-anticorpale diretta contro NG2. In base a questo risultato proponiamo come la presenza di auto-anticorpi possa essere considerata indicatore di una patologia più grave, indicando quindi la risposta contro NG2 come un bio-marcatore prognostico negativo.

Numero	Ab anti-NG2	Assorbanze	esordio		Età	EDSS		Durata	Ricadute	relapse rate	progression index	EDSS ric	EDSS stab
			19	27		1,5	8						
1	1	-0,0613	19	27		1,5	8	2	0,25	0,188	2,0	1,5	
2	1	-0,0613	32	35		1,5	3	2	0,67	0,500	2,5	1,5	
4	2	0,0678	26	33		6,5	7	0	0,00	0,929	2,5	1,5	
6	1	-0,0083	33	58		3,5	25	0	0,00	0,140	2,5	1,5	
7	2	0,0420	22	25		1,0	3	2	0,67	0,333	3,0	1,5	
9	2	0,1873	27	31		2,0	4	3	0,75	0,500	1,5	1,5	
10	1	-0,0058	52	55		2,0	3	1	0,33	0,667	2,0	2,0	
13	1	-0,0490	25	35		1,0	10	2	0,20	0,100	3,0	1,5	
14	2	0,0998	31	34		3,5	3	2	0,67	1,167	3,5	2,5	
16	2	0,0787	36	39		6,0	3	6	2,00	2,000	6,0	5,0	
17	1	-0,0084	27	31		0,0	4	2	0,50	0,000	2,0	1,0	
18	1	-0,0532	27	31		1,0	4	1	0,25	0,250	3,5	0,0	
19	1	-0,0463	16	20		1,5	4	1	0,25	0,375	6,0	1,5	
20	1	-0,0819	19	29		4,0	10	5	0,50	0,400	2,5	2,5	
21	1	-0,0493	21	24		2,0	3	2	0,67	0,667	2,0	1,0	
22	1	-0,0848	38	41		1,5	3	1	0,33	0,500	3,0	0,0	
23	2	0,0795	39	42		2,5	3	2	0,67	0,833	2,0	1,5	
25	2	0,0104	35	39		1,0	4	1	0,25	0,250	2,0	1,0	
26	1	-0,0570	53	57		4,0	4	1	0,25	1,000	3,5	3,5	
27	1	-0,0482	31	37		0,0	6	3	0,50	0,000	1,5	1,0	
28	1	-0,0093	30	35		1,5	5	1	0,20	0,300	2,0	0,0	
29	1	-0,0483	38	41		4,0	3	3	1,00	1,333	5,5	4,0	
30	1	-0,0200	36	43		4,0	7	5	0,71	0,571	5,0	4,0	
31	2	0,0187	26	31		1,0	5	3	0,60	0,200	2,5	1,0	
32	2	0,1847	25	40		2,0	15	2	0,13	0,133	2,0	2,0	
33	1	-0,0746	39	41		1,0	2	2	1,00	0,500	1,5	1,5	
34	1	-0,0413	25	26		2,0	1	3	3,00	2,000	3,0	1,0	
35	1	-0,0512	32	34		2,0	2	3	1,50	1,000	1,5	1,5	
36	1	-0,0482	26	46		4,5	20	1	0,05	0,225	2,5	1,5	
38	1	-0,0744	22	24		1,5	2	2	1,00	0,750	2,0	1,0	
39	2	0,2215	54	58		4,0	4	0	0,00	1,000	2,5	1,5	
40	1	-0,0056	43	55		3,0	12	2	0,17	0,250	5,0	2,5	
41	1	-0,0574	30	31		1,5	1	4	4,00	1,500	2,0	1,5	
42	1	-0,0576	44	46		2,0	2	2	1,00	1,000	3,0	1,0	
43	1	-0,0865	36	37		3,0	1	1	1,00	3,000	3,0	3,0	
44	1	-0,0516	37	58		2,0	21	6	0,29	0,095	2,0	1,5	
45	1	-0,0832	30	36		0,0	6	2	0,33	0,000	1,0	0,0	
48	1	-0,0520	30	31		0,0	1	3	3,00	0,000	1,5	0,0	
49	1	-0,0295	19	20		0,0	1	3	3,00	0,000	1,0	0,0	
50	1	-0,0347	19	31		3,5	12	14	1,17	0,292	3,5	3,5	
51	1	-0,0327	31	35		0,0	4	2	0,50	0,000	2,0	0,0	
52	2	0,1365	27	29		0,0	2	1	0,50	0,000	2,0	0,0	
54	2	0,0109	23	23		4,0	0,6	3	5,00	6,667	4,0	4,0	

**Figura 10:** Tabella riassuntiva dei dati clinici dei pazienti SM. In giallo sono indicati i pazienti positivi agli auto-anticorpi anti-NG2. Il punteggio di EDSS (assegnati seconda la scala Kurtzke) e l'ultimo in ordine cronologico degli EDSS. I valori di PI sono calcolati sulla durata della malattia.



**Figura 11:** Confronto progression index. In figura sono rappresentate le media più DS dei valori di progression index (EDSS/ anni di malattia) relativi ai pazienti SM analizzati. SM negativi (n=31) sono i pazienti senza attività auto-anticorpale e SM positivi (n=12) sono i pazienti con attività auto-anticorpali t-test  $p < 0,05$ .

In base ai risultati ottenuti relativi allo studio dei campioni di liquor di pazienti SM, abbiamo ipotizzato un coinvolgimento di NG2 nella patologia. Abbiamo formulato due ipotesi principali per spiegare la presenza degli auto-anticorpi diretti contro NG2:

- Gli auto-anticorpi rilevati nel liquor di pazienti SM che riconoscono NG2, sono il risultato di un meccanismo patogenetico della malattia;
- Gli auto-anticorpi rilevati nel liquor di pazienti SM che riconoscono NG2, sono il risultato di una risposta di tipo compensatorio che sia attiva in seguito alla malattia.

Per verificare le ipotesi sopraelencate ed identificare quindi, il ruolo effettivo di NG2 nella SM, abbiamo dapprima studiato le cellule esponenti NG2 nel SNC, in seguito abbiamo studiato il topo NG2 KO ed infine abbiamo utilizzato un modello murino di malattia che riproduce le caratteristiche fondamentali della SM.

## ***Analisi del modello di EAE nel topo NG2 KO***

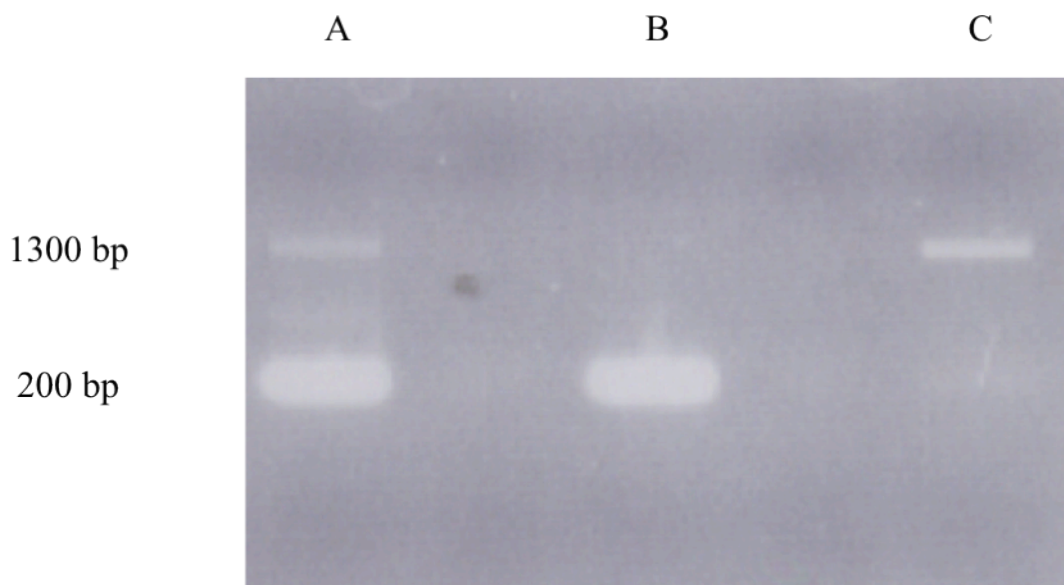
Come già in precedenza descritto, l'EAE è un modello animale di neuro-infiammazione che viene considerato un ottimo modello di SM, viene indotto nel topo C57Bl6 attraverso inoculazione di un antigene mielinico (MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein) in presenza di un adiuvante. I progressi scientifici volti a chiarire i meccanismi patogenetici della SM, si sono ottenuti per mezzo dell'utilizzo di questo modello e anche in questo progetto di dottorato l'EAE è stato utilizzato come modello cardine per caratterizzare al meglio il ruolo di NG2 nella patologia. Infatti, sono stati analizzati i seguenti aspetti;

- Caratterizzazione delle cellule esprimenti NG2 (OPC e periciti) nel SNC;
- Studio dell'evoluzione della patologia EAE nel topo NG2 KO;
- Analisi del sistema immunitario del topo NG2 KO.

## **Induzione del modello EAE nel topo NG2 KO**

Attraverso il modello di EAE abbiamo caratterizzato il ruolo di NG2 nella malattia utilizzando il topo geneticamente modificato che non esprime il proteoglicano (NG2 KO). Per poter immunizzare il topo NG2 KO verso l'antigene MOG e mantenere le stesse condizioni sperimentali, abbiamo incrociato il topo geneticamente modificato con topi dello stesso ceppo commercialmente disponibili, per ottenere topi littermate ("stessa nidiata"). Così facendo in generazione F2 abbiamo

ottenuto topi littermate sui quali è stato condotto l'esperimento di EAE. In figura 25 viene mostrata l'analisi del genotipo del DNA genomico delle generazioni F1 (eterozigoti) ed F2 (omozigoti). Nella lane A (due bande 1300 bp e 200 bp) è rappresentata la distribuzione delle bande di un topo eterozigote, ossia un topo che esprime solo un allele di NG2. In lane B invece viene mostrata la banda corrispondente al topo WT (200 bp), ossia un topo che esprime entrambi gli alleli di NG2, mentre in lane C la banda relativa al topo NG2 KO (1300 bp) ossia un topo che non esprime alcun allele di NG2.



**Figura 12:** Genotipizzazione DNA genomico dei topo littermate F2 (NG2-KO e WT). A) banda relativa al DNA genomico che presenta un solo allele di NG2; B) banda relativa al DNA genomico WT; C) banda relativa al DNA genomico che non esprime gli alleli di NG2.

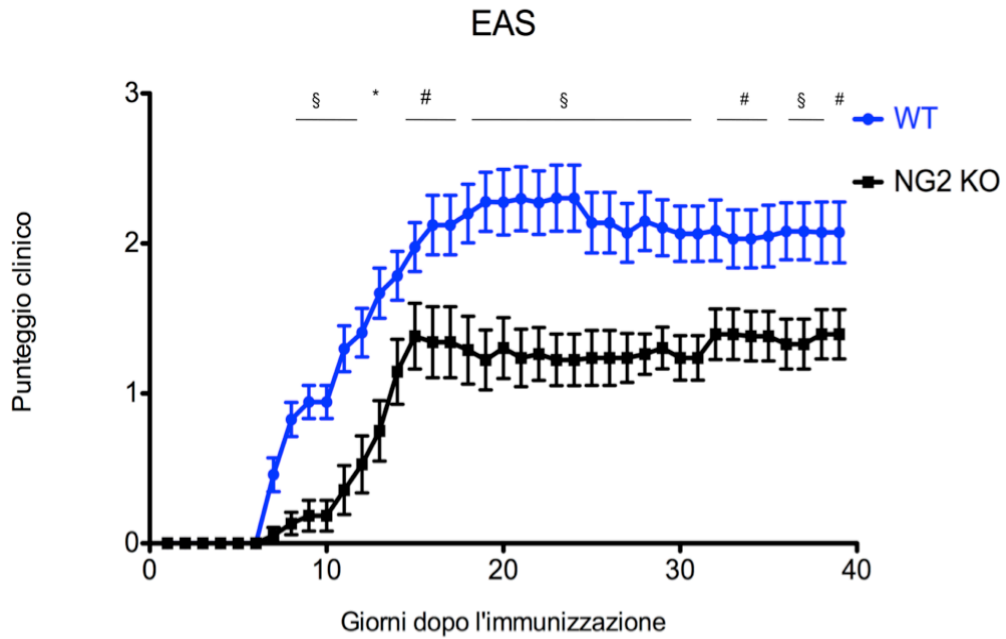
### Valutazione clinica del modello murino EAE nel topo NG2 KO

In figura 26 sono mostrati gli esperimenti di EAE, condotti sul topo NG2 KO e sul relativo controllo (WT) littermate. In figura sono rappresentate le medie dei

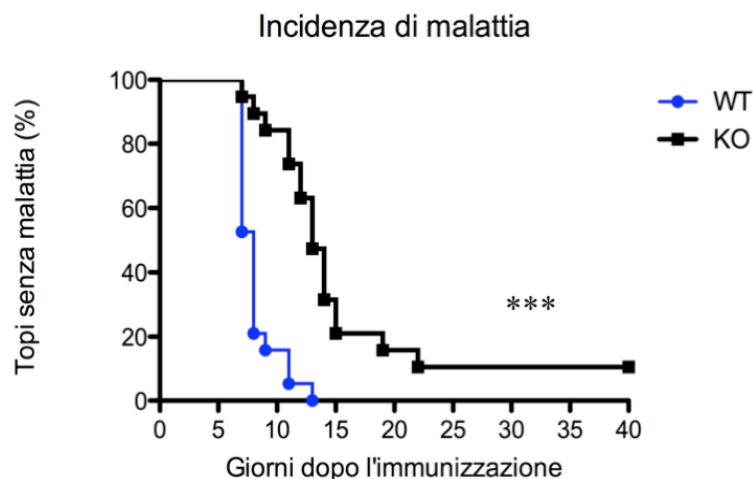
punteggi clinici assegnati ai topi quotidianamente per la durata dell'intero esperimento (40 giorni). L'esperimento è stato condotto in cieco su un numero sperimentale di topi uguale a 20, ed è stato ripetuto per tre volte. Come si può osservare, l'esordio e la progressione di malattia risultano essere differenti dal punto di vista statistico. Nel giorno di esordio di malattia ci sono 7 topi WT che presentano sintomi dell'EAE, mentre un solo topo NG2-KO presenta i sintomi riconducibili alla malattia. Al termine dell'esperimento la malattia risulta essere diversa, così come la progressione durante tutta la fase sperimentale (media  $\pm$  SE; NG2-KO=1,5 $\pm$ 0,165; WT=2,25 $\pm$ 0,180,  $p < 0,05$ - $p < 0,0001$  Mann-Whitney test). Inoltre, come è possibile osservare nel grafico della figura 26 dopo il 20° giorno dall'immunizzazione il gruppo WT ha il picco di di malattia mentre il gruppo NG2-KO ha il picco di malattia intorno al 15° giorno dopo l'immunizzazione. In seguito al picco entrambi i gruppi sperimentali mantengono lo stesso andamento identificando una condizione cronica di malattia.

In figura 27 viene mostrata invece l'analisi clinica dell'incidenza di malattia attraverso la curva di Kaplan-Meier. L'incidenza della curva EAE è statisticamente diversa tra i due gruppi, NG2-KO (89,5%) e WT (100%) (Log-rank, Mantel-Cox, test  $P < 0.0001$ ). NG2-KO.

Questi dati suggeriscono che l'assenza di NG2 dal punto di vista clinico può essere considerato un fattore protettivo. La malattia risulta essere meno aggressiva nel topo privo di NG2; l'esordio della malattia è ritardato e i sintomi sono meno gravi rispetto al controllo WT.



**Figura 13:** Valutazione del modello (media  $\pm$  DS) di EAE e confronto tra WT ed NG2-KO (n=20). Nella curva in blu è riportata la progressione della malattia del topo WT mentre con la curva in nero è rappresentata la curva relativa alla malattia del topo NG2-KO. Lo score clinico è stato così assegnato: (0 = assenza di malattia, 1 = coda flaccida, 2 = atassia e/o paresi degli arti posteriori, o lento riflesso di raddrizzamento 3 = paralisi arti posteriori e/o paresi arti anteriori, 4 = paraparesi 5 = moribondo o morto). Mann Whitney test effettuato sullo score clinico giornaliero, i valori di p sono così indicati: \*= 0,05, # = 0,01, § = 0,0001.



**Figura 14:** Incidenza di malattia. Il grafico mostra una curva Kaplan-Meier calcolata sui giorni di esordio vdi malattia. Log-rank (Mantel-Cox) Test. P value < 0,0001.

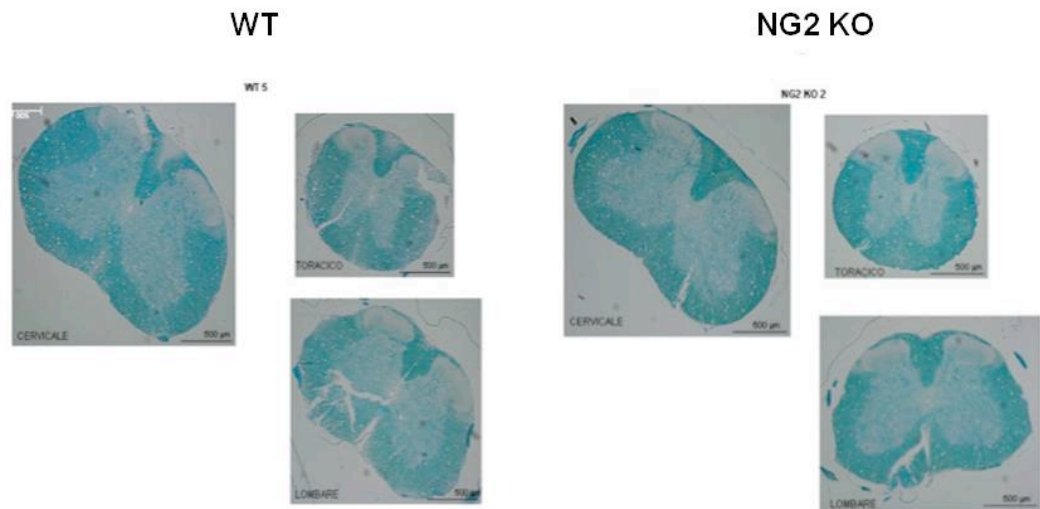


## **Danno di demielinizzazione e valutazione dell'infiltrato immunitario**

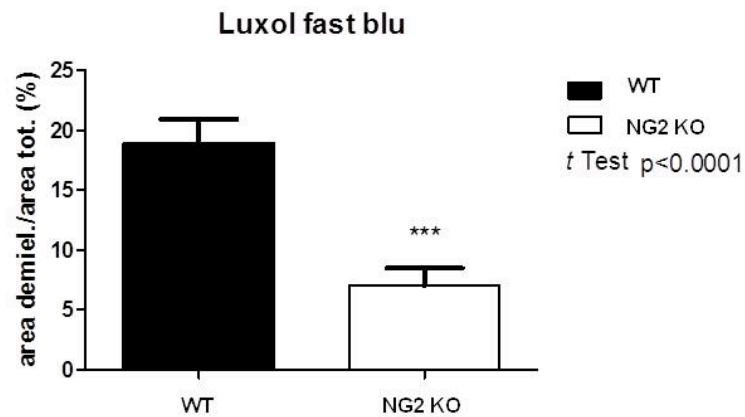
Per caratterizzare il meccanismo attraverso il quale l'assenza di NG2 possa essere considerato un fattore protettivo per il topo NG2-KO durante le fasi di malattia EAE, abbiamo analizzato il danno a carico della mielina e l'infiltrato immunitario cellulare (IBA-1 e CD3) nel parenchima nervoso. La mielina è la struttura bersaglio nel topo affetto da EAE ed il danno viene effettuato attraverso la funzione *helper* di linfociti CD3 positivi e attraverso la fase effettrice mediata dai macrofagi IBA-1 positivi. Abbiamo analizzato fettine seriali dello spessore di 10µm di midollo spinale di 5 topi per gruppo (WT-EAE e NG2 KO-EAE) analizzando le sezioni cervicali, toraciche e lombari per ogni valutazione istologica. La colorazione istologica per la valutazione del danno di demielinizzazione è stata effettuata mediante colorante, luxol fast blue (LFB), il quale risulta avere affinità esclusiva per la mielina. In figura 28 sono riportate le immagine rappresentative delle tre sezioni analizzate e le relative reattività tissutali. Analizzando le aree demielinizzate (assenza/riduzione di blu) sull'area totale della sezione midollare, abbiamo potuto quantificare il danno mielinico. Come si può osservare in figura 28 B il topo NG2-KO risulta avere un danno mielinico minore (mmq  $3,63 \pm 1,04$ ) rispetto al controllo WT (mmq  $11,80 \pm 5,28$ ) statisticamente significativo (t-Test  $p < 0,0001$ ).

Questi risultati suggeriscono che l'assenza di NG2 protegge il topo NG2-KO nella fasi di malattia grazie ad una minore demielinizzazione a carico del SNC.

A



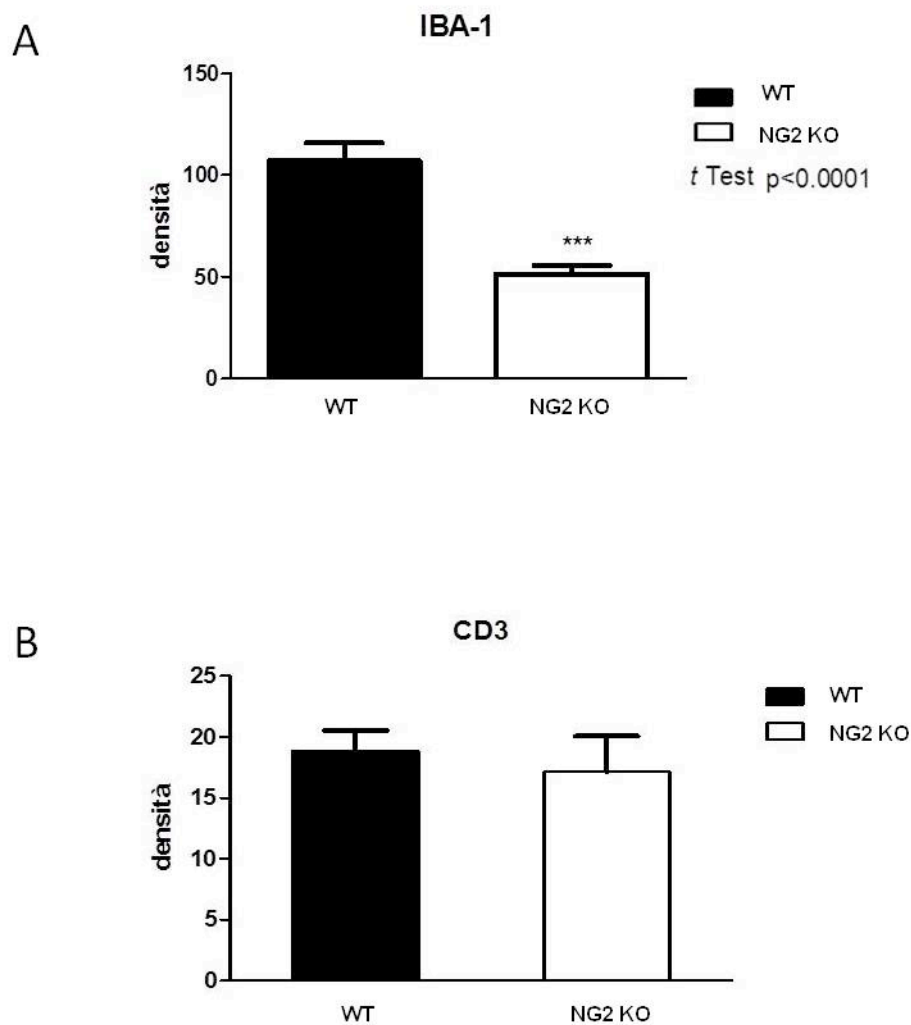
B



**Figura 15:** Demyelinizzazione spinale: A) Immagini rappresentative microscopia ottica 10X delle sezioni spinali cervicali, toraciche, lombari del topo WT ed NG2-KO, colorazione luxol fast blue. B) quantificazione del danno di demielinizzazione, calcolato dal rapporto di area demielinizzata su area totale. t-Test  $p < 0,0001$ .

Per quanto riguarda l'analisi del infiltrato cellulare immunitario abbiamo utilizzato l'anticorpo diretto contro la proteina IBA-1 e contro la proteina CD3 per evidenziare la presenza nel midollo spinale di macrofagi e linfociti T rispettivamente. In seguito alla colorazione ottenuta mediante tecnica immunoenzimatica, abbiamo potuto contare l'infiltrato cellulare. Come mostrato in figura X, le cellule effettrici di

malattia (macrofagi) invadono in misura minore IL parenchima del midollo spinale del topo NG2 KO-EAE rispetto al controllo, mentre l'infiltrato cellulare CD3 positivo (linfociti T) è di uguale entità tra il topo WT-EAE ed NG2 KO-EAE.



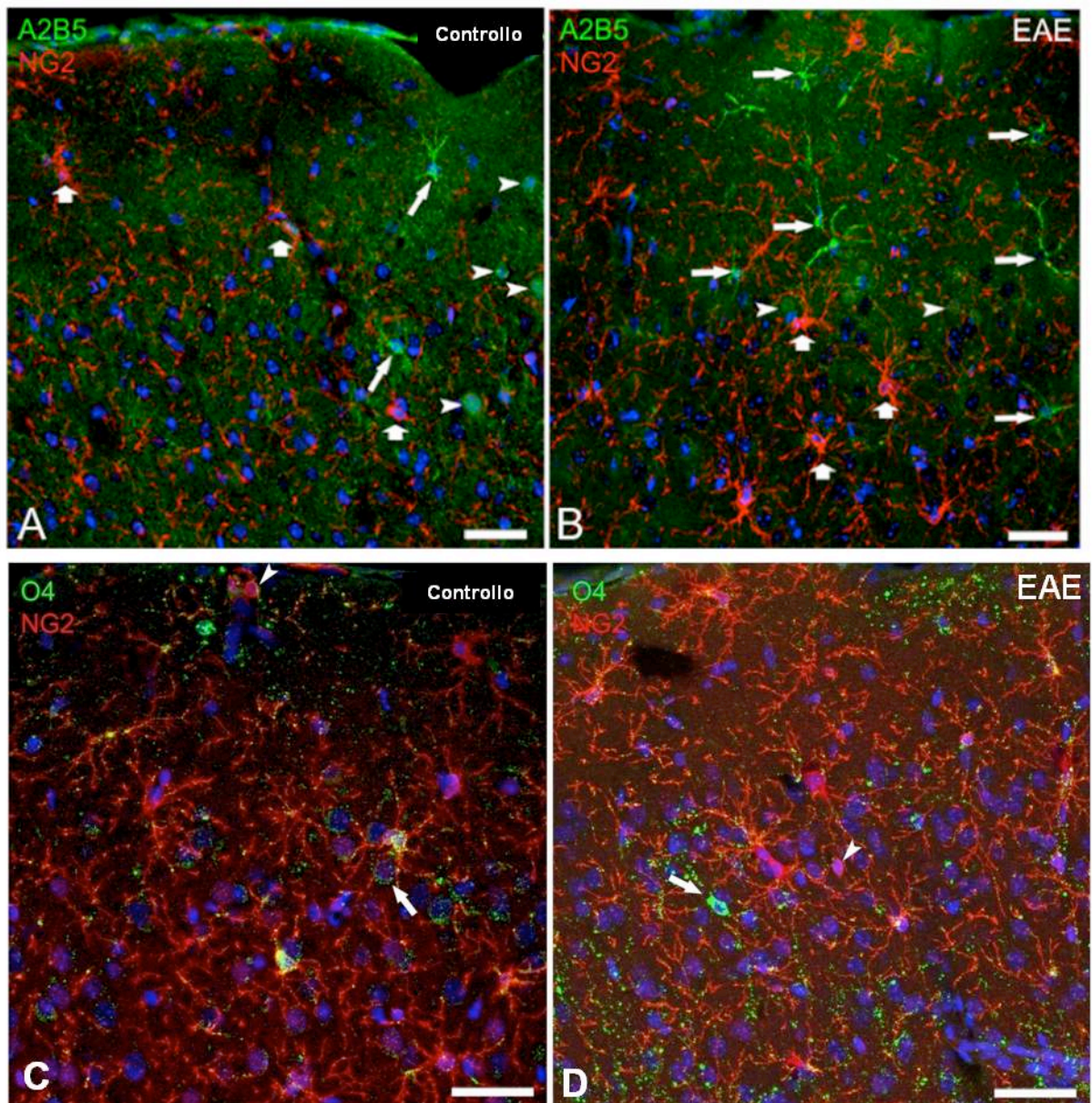
**Figura 16:** Valutazione dell'infiltrato cellulare immunitario; A) Quantificazione dell'infiltrato macrofagico IBA-1 positivo; B) Quantificazione dell'infiltrato linfocitario T CD3 positivo. La quantificazione si basa su il numero di cellule infiltranti per unità di area. delle sezioni spinali cervicali, toraciche e lombari del topo WT ed NG2 KO affetti da EAE. t-Test  $p < 0,0001$ .

## **Valutazione delle OPC nel modello murino EAE**

All'epoca della scoperta e ancor di più dopo le prime caratterizzazioni funzionali delle OPC (Nishiyama, A., M. Yu, et al. 1997), si appalesava la loro intrinseca potenzialità terapeutica. Nel corso dell'ultimo decennio, lo studio delle OPC ha destato particolare interesse e riveste un aspetto intrigante per quanto riguarda l'azione delle OPC durante la patologia. Pertanto, in questo progetto di tesi lo studio delle OPC risulta essere centrale. Abbiamo quindi voluto caratterizzare durante il decorso di patologia EAE lo stato numerico e la reattività cellulare delle OPC l'utilizzo di un anticorpo diretto contro NG2, considerato marcatore cellulare. I distretti di analisi sono stati localizzati a livello della corteccia cerebrale e nelle aree corticali, poiché le aree midollari spinali, di minore entità superficiale, mostravano difficoltà descrittive maggiori rispetto appunto a quelle encefaliche. Inoltre, per valutare la differenza morfologica e numerica delle OPC ci siamo avvalsi dell'utilizzo di altri due marcatori, che indentificavano popolazioni cellulari differenti dalle OPC, come A2B5, che identifica una popolazione di cellule immature denominata GRPs (glia-restricted precursors) ed O4 che identificata gli oligodendrociti pre-mielinizzanti.

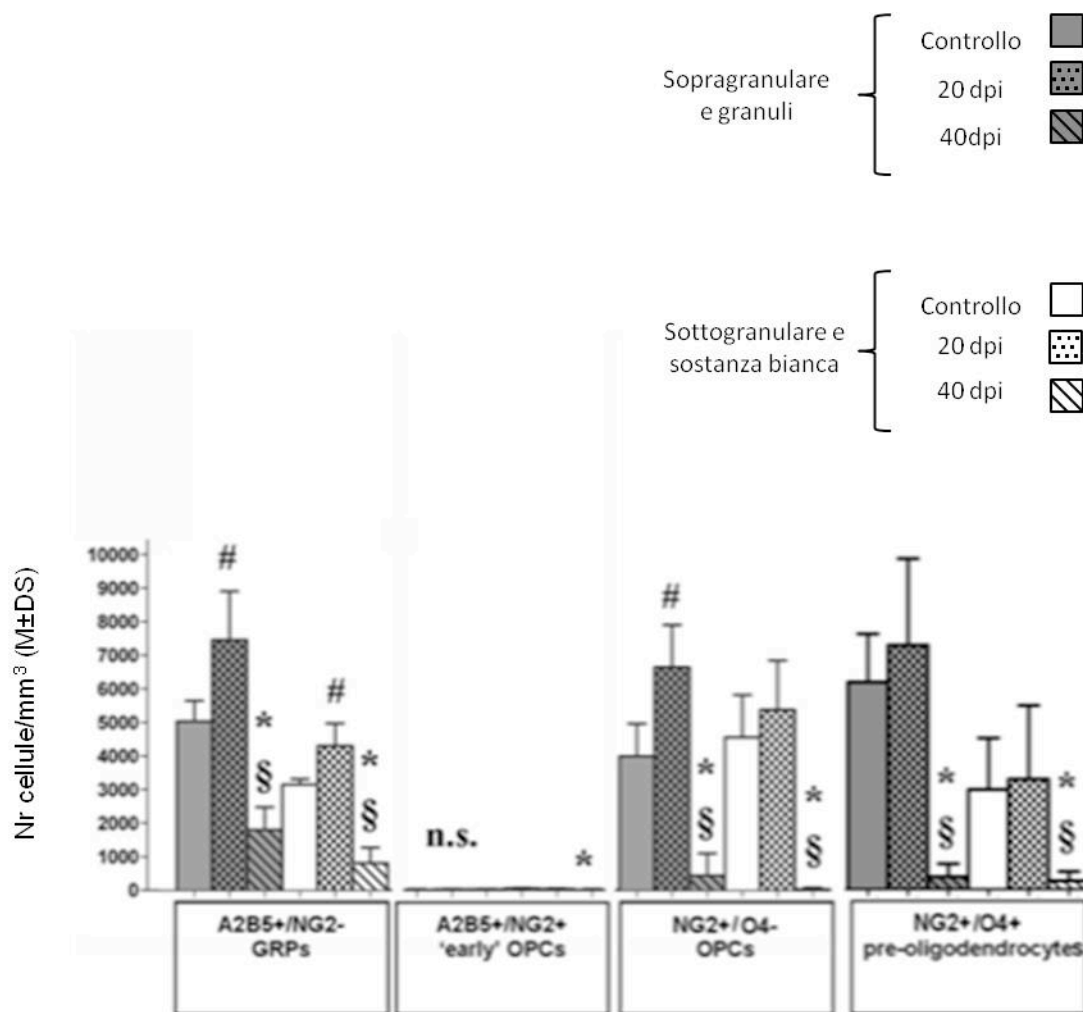
Come rappresentato in figura 17, nel topo controllo, WT senza immunizzazione verso MOG, le cellule OPC marcate con anti-NG2, sono morfologicamente distinte dalle altre cellule marcate per A2B5 (figura 17A) ed O4 (figura 17C) e sono caratterizzabili per la presenza di ramificazioni che tendono a formazione delle strutture simili a reti. Una piccola quota di OPC, esibisce una doppia marcatura di NG2 e O4. Durante la patologia EAE, analizzata a 20 giorni (patologia precoce, vedi tabella II) le cellule OPC aumento di numero, esprimono più proteina NG2 e si evidenzia un incremento delle ramificazioni. In una fase di patologia avanzata, a

39 giorni (patologia tardiva), come rappresentato in figura 17B e 17D, si osserva una drastica riduzione del numero di cellule OPC. Le conte cellulari numeriche nel topo controllo e affetto da EAE e le relative localizzazioni tissutali in base all'età di patologia, sono elencato in tabella II.



**Figura 17:** Immagini rappresentative di tessuto corticale cerebrale murino marcato con A2B5, NG2 ed O4; A) topo controllo (in assenza di patologia EAE) marcato con A2B5 (verde) ed NG2 (rosso) e B) 20 giorni dopo l'immunizzazione con MOG (patologia EAE). C) topo controllo marcato con O4 (verde) ed NG2 (rosso) e d) 20 giorni dopo l'immunizzazione con MOG. Le frecce, sia larghe che a corpo stretto indicano i tipi cellulari, con le rispettive marcature, che sono stati considerate nelle

conte per la quantificazione, mentre le frecce a punta indicano co-staining con neuroni corticali. Barre di scala: 50 $\mu$ m.



**Tabella II:** Analisi quantitativa in strati della corteccia cerebrale, sostanza supragranulare, granulare, strati sottogranulari e sostanza bianca in topi controllo ed in topi affetti da EAE a 20 e 39 giorni di patologia (dpi). Conta cellulare per i marcatori A2B5, NG2 e O4, come numero di cellule per mm<sup>3</sup> M ± DS. L'analisi relativa alle conte è stata condotta su cinque animali per gruppo (WT, WT-EAE) One way Anova e Bonferroni post-test p<0,05. Legenda: #, controllo e 20 dpi; \*, controllo e 39 dpi; §, 20 dpi e 39 dpi.

Quindi, per quanto riguarda l'analisi istologica delle cellule OPC, possiamo affermare che:

- In seguito allo studio durante le fasi patologia, troviamo un incremento del

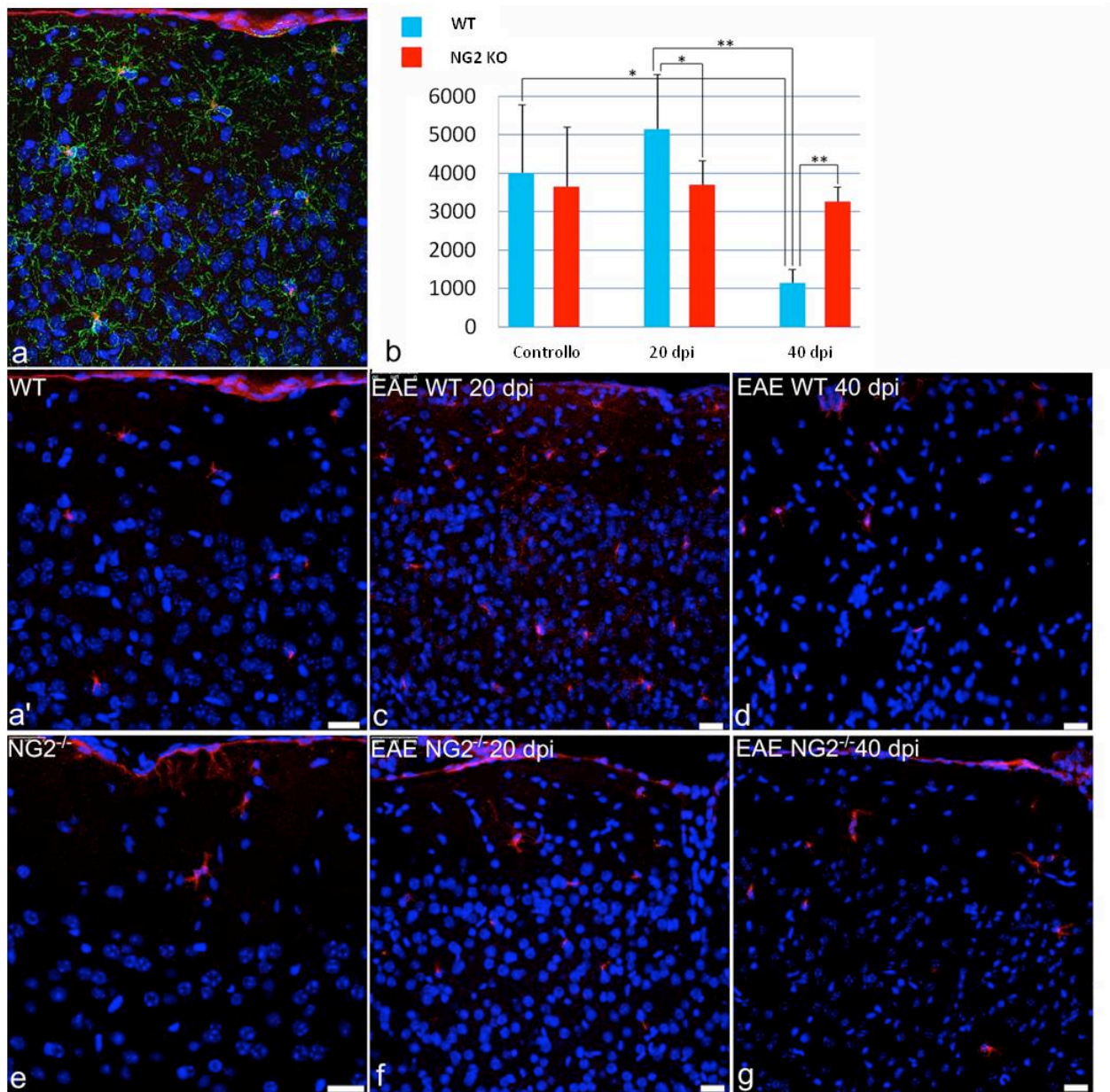
numero di OPC durante le fasi di patologia negli stadi iniziali;

- Successivamente, con l'avanzare della patologia la presenza delle OPC subisce un calo drastico.

Da sottolineare che, una quota di OPC esprime anche il marcatore O4, probabilmente questa popolazione di cellule di OPC è in fase di maturazione.

A questo punto ci siamo chiesti se la protezione osservata nel topo NG2 KO affetto da EAE fosse mediata da una modificazione dell'attività cellulare delle OPC. Non potendo studiare la presenza di NG2 in un topo geneticamente modificato, abbiamo utilizzato un marcatore alternativo, PDGFr $\alpha$  (Spassky, Olivier et al. 2000). In figura 18 è rappresentata l'analisi istologica nel topo NG2 KO senza patologia (figura 18E) ed affetto da EAE (figura 18F 20 dpi e figura 18G 40 dpi) ed il suo controllo (WT senza patologia ed affetta da EAE, 18A',C e D). Come rappresentato nella quantificazione in figura 18B, anche il marcatore PDGFr $\alpha$  nel topo WT individua le stesse fluttuazione di numero di OPC nella patologia precoce e tardiva, come rappresentato in precedenza (tabella II e figura 17). Infatti, le OPC a 20 dpi nel topo WT affetto da EAE aumentano di numero per poi ridursi in modo drastico a 40 dpi. Nel topo NG2 KO affetto da EAE sia a 20 che a 40 dpi il numero di OPC, in modo sorprendente, non si modifica rispetto al topo NG2 non affetto da patologia (figura 18E-G). Il numero delle cellule OPC pertanto rimane invariato durante tutta la durata e progressione della patologia.

Questi esperimenti volti a chiarire il destino delle cellule OPC in assenza ed in presenza di NG2 nel modello di patologia EAE, indicano che l'assenza di NG2 può essere considerata un fattore protettivo per la sopravvivenza cellulare delle OPC. Un numero maggiore di OPC può proteggere il topo EAE dal punto di vista clinico, promuovendo di fatto una patologia meno aggressiva.



**Figura 18:** Immagini rappresentative di tessuto corticale cerebrale murino marcato con PDGFr $\alpha$  e NG2; A) topo controllo (in assenza di patologia EAE) marcato con NG2 per la localizzazione morfologica delle OPC (verde) B) quantificazione; Conta cellulare per il marcatore PDGFr $\alpha$ , come numero di cellule per mm<sup>3</sup> M  $\pm$  DS. One way Anova e Bonferroni post-test \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ . A') topo controllo marcato con PDGFr $\alpha$  (rosso) a C) 20 giorni dopo l'immunizzazione con MOG e D) a 40 giorni dopo l'immunizzazione. E) topo NG2 KO marcato con PDGFr $\alpha$  (rosso) a F) 20 giorni dopo l'immunizzazione con MOG e G) a 40 giorni dopo l'immunizzazione con MOG. Barre di scala: 50  $\mu$ m.

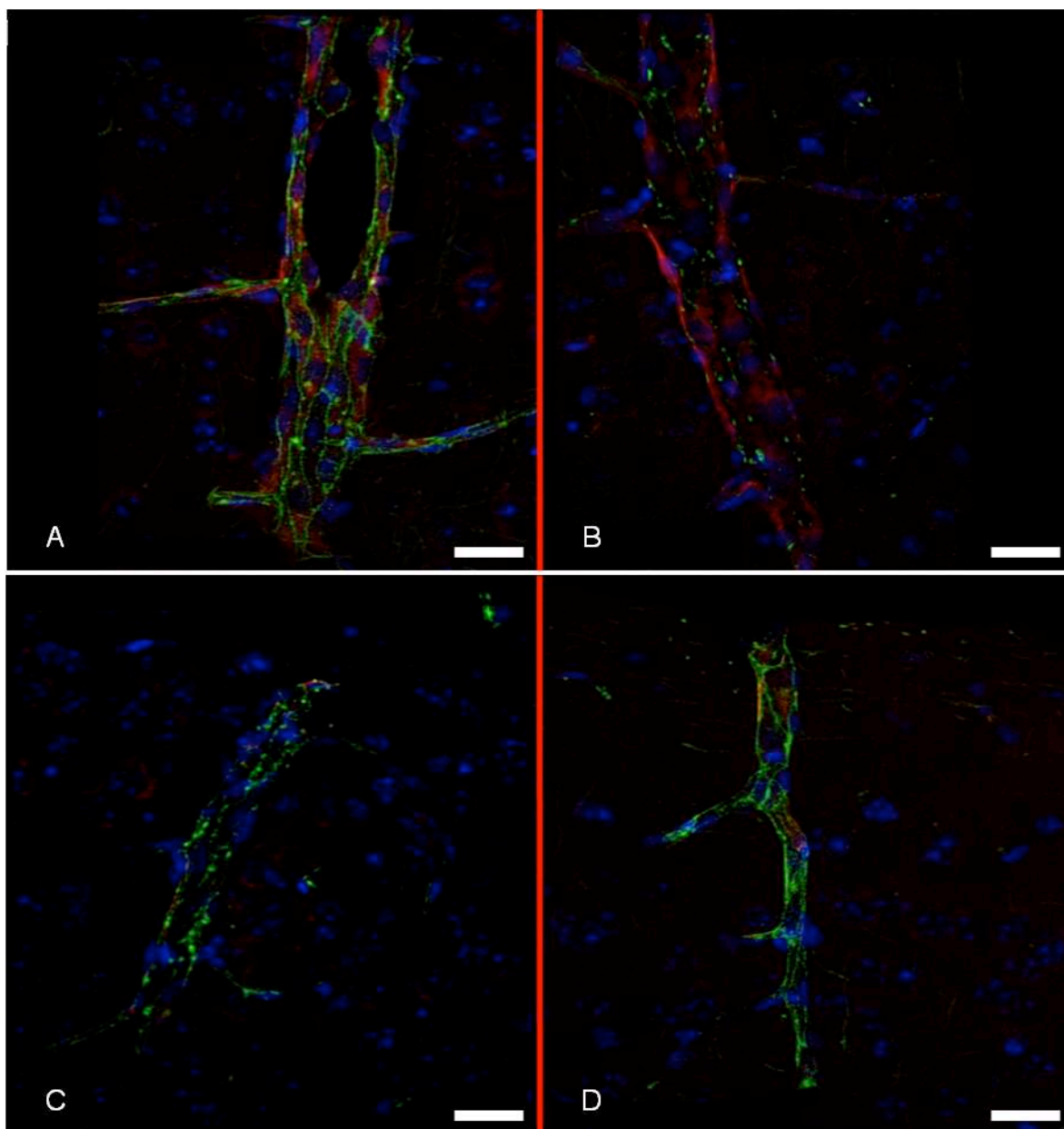


## **Valutazione della Unità Neuro-Vascolare nel modello murino EAE**

La valutazione del numero e dello stato morfologico durante le fasi di patologia dei periciti si è rivelata non eseguibile in esperimenti di immuno-istochimica, come già riportato in letteratura. Dato che il pericita prende parte alla formazione della UNV e quindi della BEE, ci siamo avvalsi dell'utilizzo di due marcatori, la Claudina-5 e l'Occludina. Queste due proteine prendono parte alla formazione delle giunzioni *Tight*, che si vengono a formare tra due cellule endoteliali adiacenti nel SNC, permettendo quindi la formazione della struttura di barriera. In questo progetto di tesi, abbiamo quindi studiato tessuti di corteccia cerebrale andando a localizzare la distribuzione di questi due marcatori. Come evidenziato in figura 19A, il segnale in fluorescenza relativo all'espressione della Claudina-5 nel topo controllo (senza immunizzazione con l'antigene MOG) evidenzia una regolare formazione della BEE, delineando la morfologia tipica della cellule endoteliale dando luogo quindi al classico pattern lineare di distribuzione della Claudina-5. Per delineare la struttura anatomica di un vaso cerebrale, abbiamo associato alla immuno-localizzazione della Claudina-5 un marcatore endoteliale, Caveolina-1. Il tessuto cerebrale affetto da EAE nel topo WT esibisce una diversa distribuzione del segnale descrivendo di fatto una massiccia diminuzione della fluorescenza relativa alla Claudina-5. Questa caratterizzazione, delinea di fatto un danno di BEE.

Per quanto riguarda invece il topo NG2 KO in assenza di patologia, in modo singolare il segnale in fluorescenza della Claudina-5 risulta essere di minore intensità, irregolare, non lineare e delinea il vaso attraverso formazioni puntiformi ripetute, come è possibile apprezzare in figura 19C. Nel topo NG2 KO affetto da patologia EAE (figura 19D), la Claudina-5 torna ad organizzarsi come nel topo WT

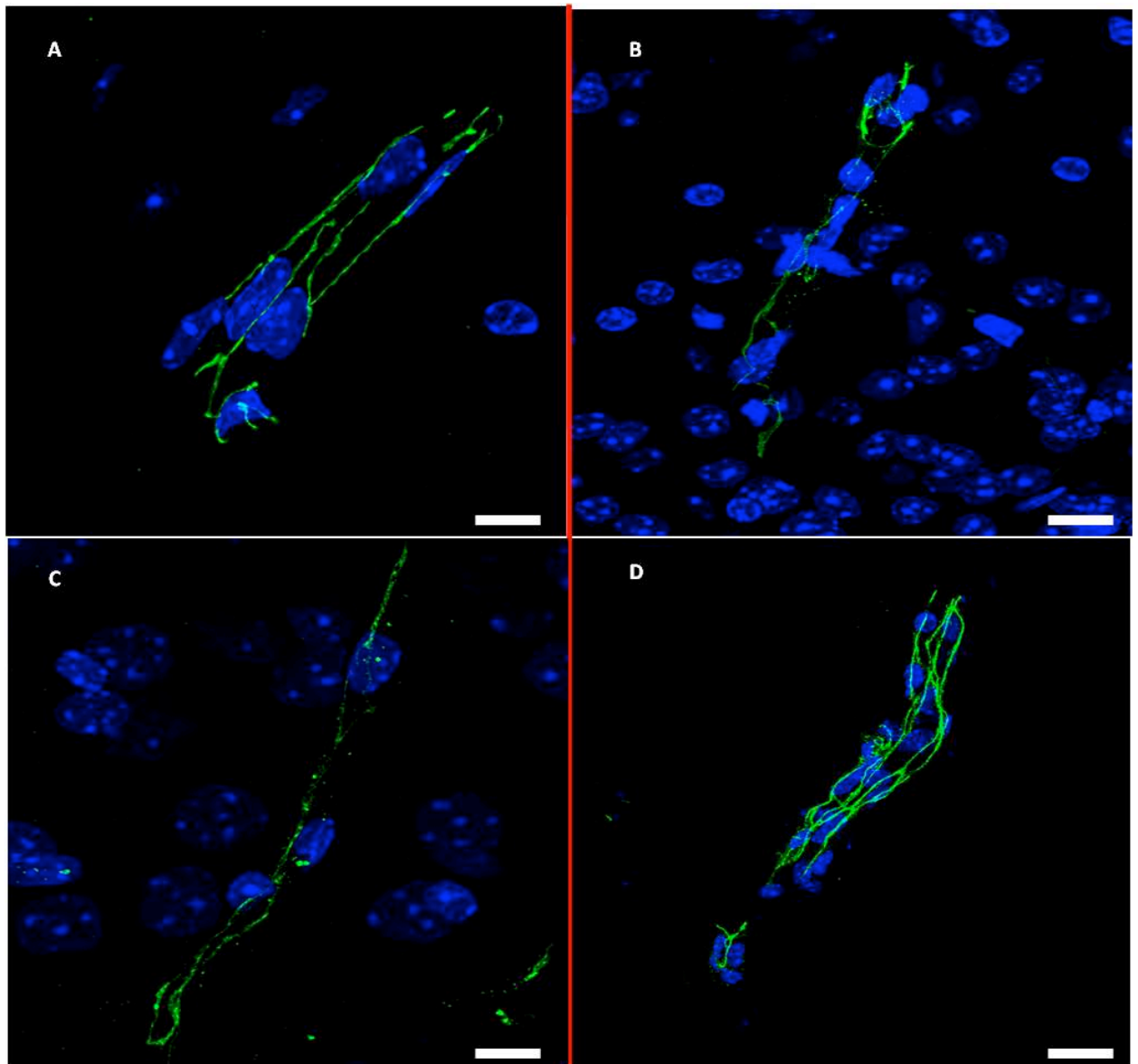
in assenza di patologia, organizzando quindi una BEE perfettamente strutturata.



**Figura 19:** Valutazione qualitativa istologica in fluorescenza della Unità Neuro-Vascolare, in corteccia cerebrale murina. Marcatura: Claudina-5 (verde), giunzioni tight della BEE; Caveolina-1 (rosso) cellula endoteliale del vaso sanguigno. A) Segnale in fluorescenza di un vaso cerebrale nel topo WT in assenza di patologia e B) affetto da EAE. C) Segnale in fluorescenza di un vaso cerebrale nel topo NG2 KO in assenza di patologia e D) affetto da EAE. L'analisi relativa ai due marcatori di BEE è stata condotta su cinque animali per gruppo (WT, WT-EAE, NG2 KO e NG2 KO-EAE) Immagini ad alto ingrandimento, barre di scala: 20  $\mu$ m.

Per quanto riguarda invece l'Occludina, nel topo WT in assenza di malattia (figura

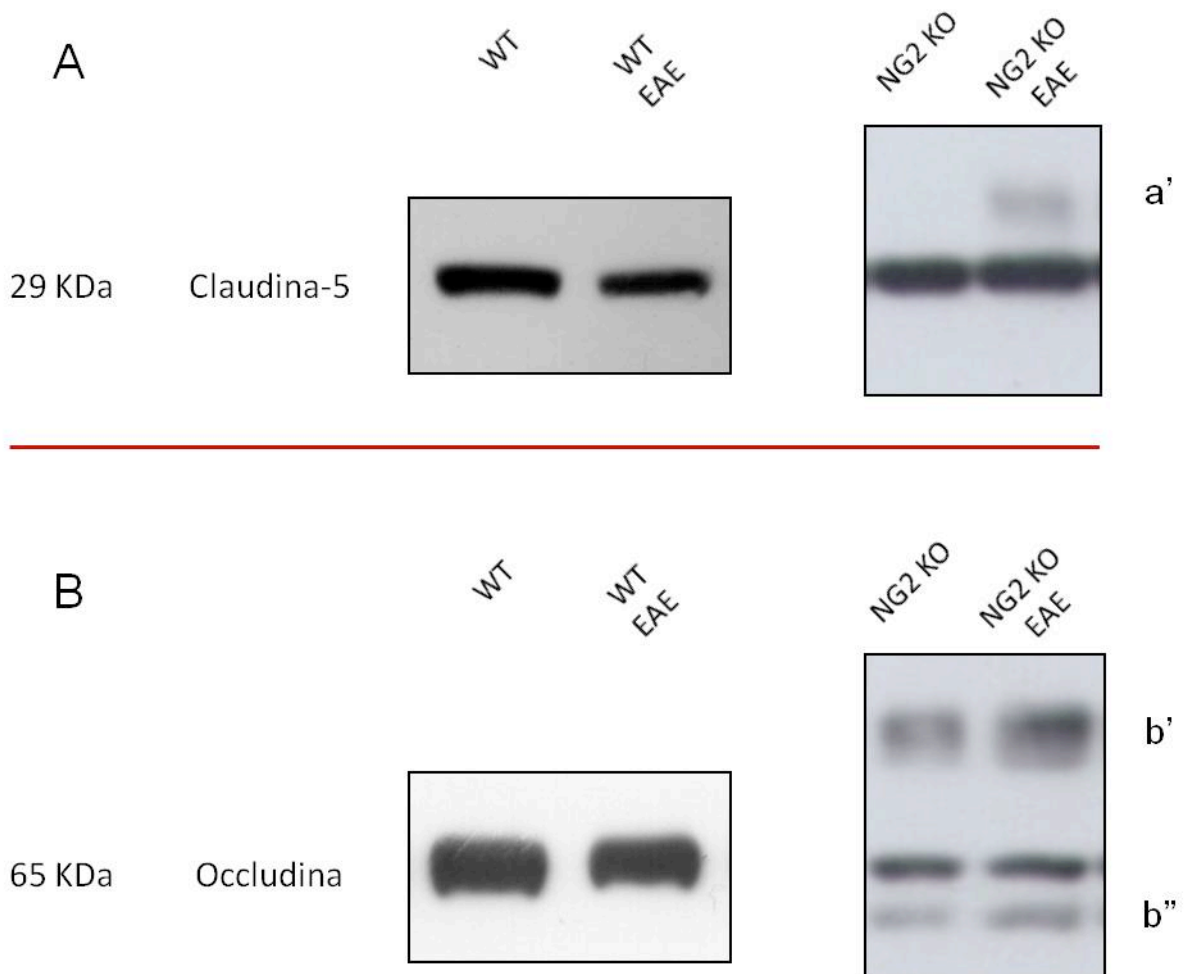
20A) ritroviamo una distribuzione lineare, simile alla Claudina-5, che identifica una corretta formazione delle giunzioni *tight* della BEE. Durante le fasi di patologia, come si può osservare in figura 20B, nel topo WT il segnale relativo alla distribuzione dell'Occludina risulta essere perturbato e disorganizzato replicando lo stesso dato relativo alla Claudina-5. Analizzando invece, il tessuto cerebrale del topo NG2 KO, si osserva la stessa distribuzione del segnale già descritta dalla Claudina-5: il topo NG2 KO in assenza di patologia, identifica una distribuzione dell'Occludina, non lineare e puntiforme, mentre durante l'EAE l'Occludina torna a riorganizzarsi correttamente come nel topo WT in assenza di patologia. L'analisi relativa ai due marcatori di BEE è stata condotta su cinque animali per gruppo (WT, WT-EAE, NG2 KO e NG2 KO-EAE). Questi risultati, studiando due marcatori di BEE, suggeriscono che l'assenza di NG2 durante la patologia preserva la struttura fisiologica della UNV, normalmente danneggiata durante la patologia EAE.



**Figura 20:** Valutazione qualitativa istologica in fluorescenza della Unità Neuro-Vascolare, in corteccia cerebrale murina. Marcatura: Occludina (verde),. A) Segnale in fluorescenza di un vaso cerebrale nel topo WT in assenza di patologia e B) affetto da EAE. C) Segnale in fluorescenza di un vaso cerebrale nel topo NG2 KO in assenza di patologia e D) affetto da EAE. Immagini ad alto ingrandimento, barre di scala: 20  $\mu\text{m}$ .

Data la particolare conformazione della Claudina-5 e dell'Occludina descritta nel topo NG2 KO in assenza di patologia (figura 19C) e nel topo WT affetto da EAE, ci siamo chiesti se la perturbazione dei segnali osservati in fluorescenza erano dovuti a variazione di espressione dei due marcatori. Per capire se ci fosse una diversa espressione delle proteine delle giunzioni tight, abbiamo condotto degli esperimenti di western blot su tessuti corticali cerebrali derivanti da topi WT ed NG2 KO in assenza ed in presenza di patologia EAE. In figura 21 sono mostrati i blot rappresentativi, relativi all'espressione della Claudina-5 (29 KDa) e all'Occludina (65KDa). Il pannello 21A, mostra le bande relative all'espressione della Claudina e come si può notare i livelli corticali di Claudina-5 nel topo WT sano (lane WT) e nel topo WT affetto da EAE (lane WT-EAE) sono simili. E' possibile fare la medesima descrizione per quanto riguarda l'Occludina, dove la patologia EAE (figura 21B, lane WT-EAE) non inficia i livelli di espressione della proteina rispetto al suo controllo (figura 21B, lane WT). Modificazioni intercorrono invece, quando si analizza il topo NG2 KO. Se i livelli della banda principale, localizzata al peso corretto della Claudina-5, sono sostanzialmente identici (figura 21A, lane NG2 KO e lane NG2 KO-EAE), l'anticorpo anti-Claudina-5 individua una ulteriore banda (figura 21°, a') a più alto peso molecolare (31-33 KDa). Questo spostamento di banda può essere dovuto a modificazioni post-traduzionali che interessano la Claudina-5 nel topo NG2 KO affetto da patologia. Situazione ancora più complessa se si analizza il blot relativo alla Occludina nel topo NG2 KO (figura 21B, lane NG2 KO e lane NG2 KO-EAE): infatti, sia nel topo NG2 KO sano che affetto da patologia, non si visualizza una unica banda relativa al peso della Occludina (65KDa), ma altre due bande (figura 21B, b' e b''). La banda b', è stimata avere un peso di 70-71 KDa, mentre la banda b'', 62-63 KDa. Nel complesso, possiamo concludere che nel topo NG2 KO ci sono delle variazioni di espressione delle proteine delle giunzioni *tight*

durante le fasi di patologia EAE (aumento intensità delle somma delle bande), nello specifico se la Claudina-5 subisce una modificazione in seguito alla patologia, nella Occludina esistono già dapprima della patologia delle modificazione della proteina. Pertanto, ciò che l'analisi in immunohistochimica ci ha dimostrato nel topo WT e WT-EAE per la Claudina-5, così come per l'Occludina, è riconducibile non ad una diminuita espressione della proteina, ma ad una sua disorganizzazione ed alla formazione di aggregati proteici. Nel topo NG2 KO i livelli di espressione della Claudina-5, non variano durante l'EAE considerando i livelli della banda principale, ma abbiamo una modificazione della proteina. L'Occludina, di per se nel topo NG2 KO è modificata, queste modificazioni si perpetuano durante la patologia, ma possibile apprezzare un aumentata espressione della proteina nel topo NG2 KO affetto da EAE.



**Figura 21:** Immunoblot rappresentativi della Claudina-5 e Occludina, in tessuto corticale cerebrale murino. A) Claudina-5 (29KDa); a'- modificazione del peso molecolare (31-33 KDa). B) Occludina (65KDa); b'- modificazione del peso (70-71 KDa); b''- modificazione del peso dell'Occludina (62-63 KDa). L'esperimento è stato condotto analizzando tre topi per condizione, in triplicato, analizzando 20 $\mu$ g/lane di proteina.

### **Valutazione della risposta immunitaria nel topo NG2 KO**

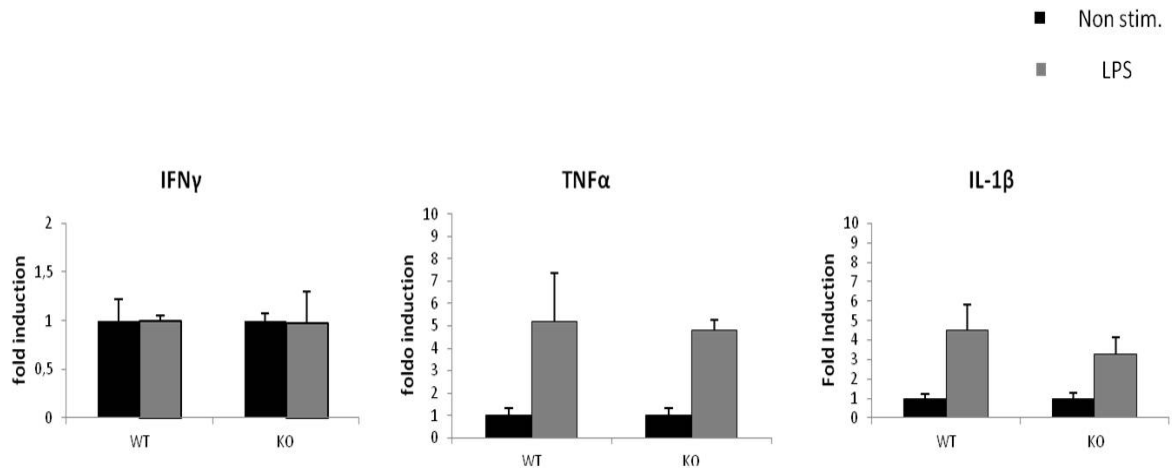
Riguardo ai risultati ottenuti in seguito all'analisi dell'infiltrato cellulare del topo NG2 KO-EAE dove si evidenziava una minore presenza di cellule effettrici (macrofagi) nel parenchima del midollo spinale, ci siamo chiesti come fosse regolato il sistema immunitario del topo NG2KO ed in generale la sua risposta

infiammatoria. Pertanto abbiamo effettuato una serie di esperimenti volti a chiarire la funzionalità della risposta immunitaria, sia *in vivo* che *in vitro*

### **Valutazione dei parametri infiammatori nel topo NG2 KO *in vivo***

Nel modello di EAE, il danno a carico della mielina è mediato da una serie intricata di reazioni che portano non solo ad una attività cellulare dannosa, ma anche ad una risposta infiammatoria in grado di mediare una reazione negativa verso l'ospite. Per discriminare il contributo della reazione infiammatoria innescata durante l'EAE nella progressione di patologia ed escludere quindi una risposta di per se anomala del topo NG2 KO, abbiamo valutato la produzione di citochine pro-infiammatorie sistemica in seguito ad uno stimolo aspecifico come il Lipopolisaccaride (LPS). Come si può osservare in figura 22, abbiamo valutato la produzione di citochine infiammatorie, quali Tumor Necrosis Factor-alfa ( $TNF\alpha$ ), Interferon-gamma ( $INF\gamma$ ) ed Interleuchina-1b (IL-1b), paragonato i livelli di mRNA (estratti da milza e linfonodi) di queste citochine tra il topo WT ed il topo NG2. Dopo 12 ore dallo stimolo, abbiamo analizzato l'espressione delle citochine e non emerse significative differenze, ne nell'espressione basale delle citochine, ne in seguito allo stimolo pro-infiammatorio. Pertanto possiamo concludere, che in seguito ad uno stimolo con LPS il topo NG2 KO risponde allo stesso modo del topo WT, quindi ciò che osserviamo durante la patologia EAE non è una conseguenza di una risposta infiammatoria anomala del topo NG2 KO.





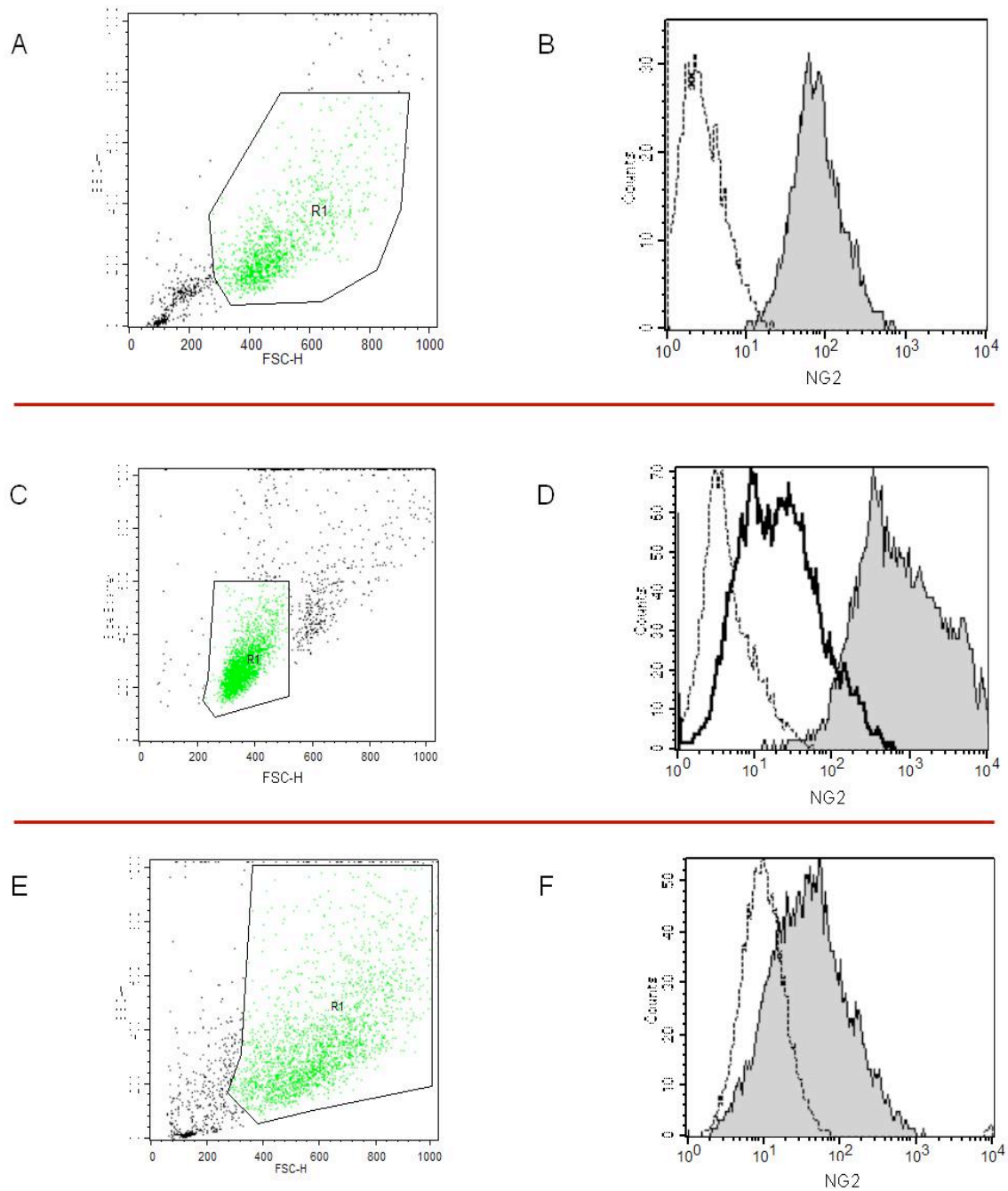
**Figura 22:** Grafici rappresentativi dei livelli di produzione di mRNA di TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL-1B da milza e linfonodi. I livelli di espressione delle citochine sono indicati in fold induction rispetto alla condizione non stimolata. L'esperimento è stato ripetuto tre volte, con tre topi per gruppo, le barre in nero rappresentano i livelli di mRNA di un topo senza l'iniezione sistemica di LPS, mentre le barre in grigio sono relative all'espressione di mRNA di un topo trattato con LPS (50 $\mu$ g/topo a 2h dall'iniezione). M $\pm$ DS.

## Analisi dell'espressione di NG2 sulle cellule immunitarie

Per chiarire se la diversa progressione di patologia nel topo NG2 KO fosse legata direttamente alle cellule immunitarie, ci siamo chiesti se l'espressione di NG2 potesse essere presente in quelle cellule che determinano, nel loro insieme, la risposta patologica nel modello di EAE, come i linfociti CD3, i macrofagi CD11b e le DC contraddistinte dall'espressione di CD11c.

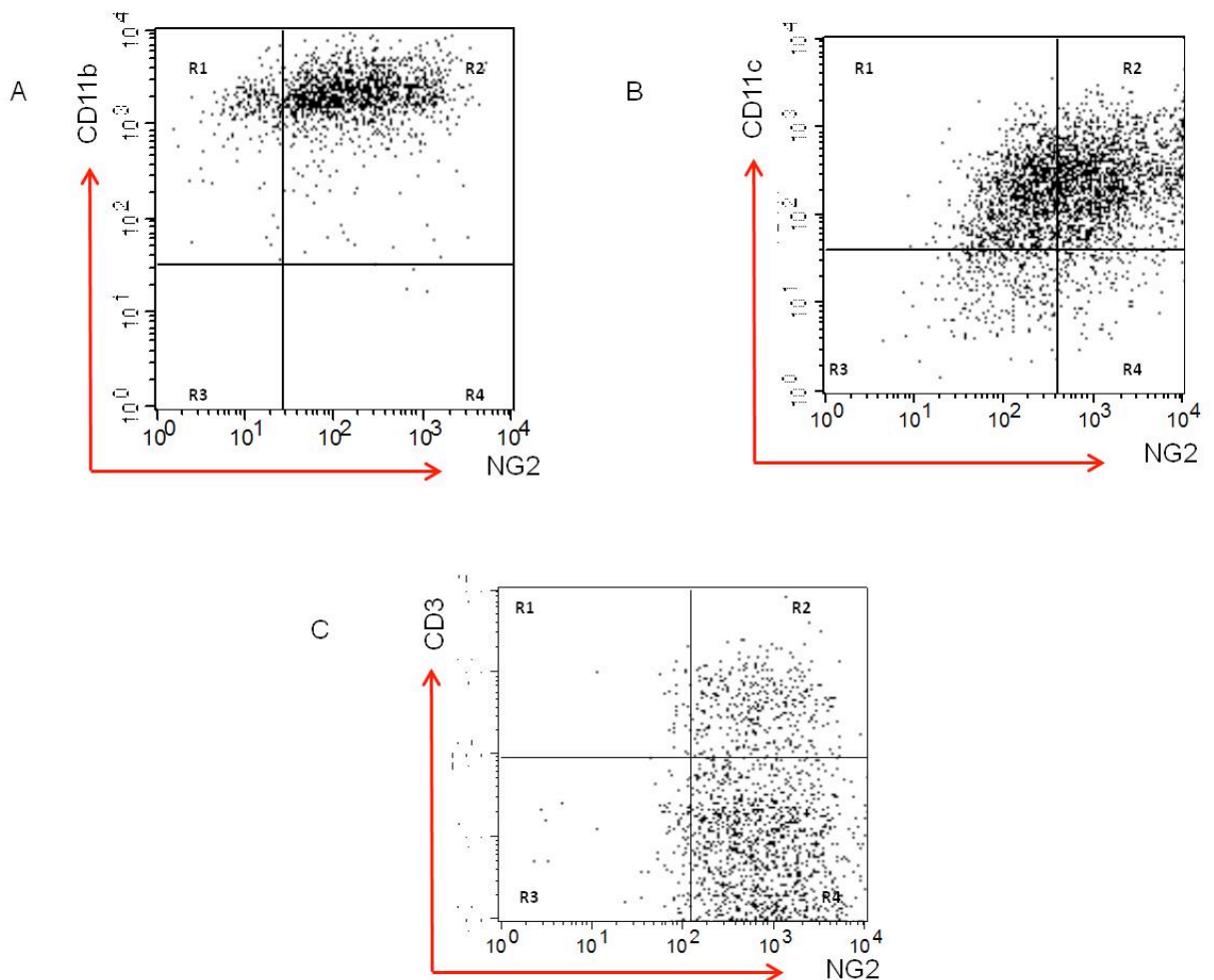
Avendo a disposizione un anticorpo primario diretto contro NG2 non coniugato con fluorofori, ci siamo avvalsi del contributo di un anticorpo secondario coniugato, pertanto per evitare problemi di valutazione, individuando la sola fluorescenza del secondario, abbiamo effettuato una prima serie di esperimenti per saggiare la bontà del metodo. Infatti, come mostrato in figura 23, abbiamo utilizzato come controllo positivo una linea cellulare murina che esprime in modo costitutivo NG2

(S180, figura 23A-B), una sospensione cellulare splenica derivante dal topo NG2 KO (figura 23C-D) e una preparazione primaria di cellule purificate astrocitarie nota per la mancanza di espressione di NG2 (figura 23E-F). Tutti i preparati cellulari sono stati marcati con l'anticorpo anti-NG2 ed il relativo anticorpo secondario coniugato con un fluoroforo e in modo parallelo (come controllo negativo) con il solo anticorpo secondario coniugato. Come mostrato in figura 23B le curve di intensità di fluorescenza relative al solo anticorpo secondario e (curva tratteggiata sfondo bianco) la marcatura completa (curva a tratto intero, sfondo grigio) esibiscono delle intensità media di fluorescenza diversa. L'anticorpo primario riconosce l'antigene in modo specifico rispetto al controllo. Nel caso invece della marcatura del preparato splenico (quindi in assenza dell'antigene NG2) sia il controllo solo secondario (curva tratteggiata, sfondo bianco) che la condizione di marcatura (primario più secondario, curva a tratto intero, sfondo bianco) le intensità media di fluorescenza sono praticamente sovrapponibili e distanti dal controllo positivo (curva tratto pieno, sfondo grigio, inserito come paradigma nel grafico). Analizzando la marcatura degli astrociti (figura 3F) l'intensità di fluorescenza della marcatura completa (curva a tratto pieno, sfondo grigio) e del solo anticorpo secondario (curva tratteggiata, sfondo bianco) è sovrapponibile, così come nel caso del preparato splenico. In figura 23°, C e D sono rappresentati i relativi scatter plot. Pertanto l'anticorpo anti-NG2 utilizzato riconosce in modo specifico l'antigene NG2.



**Figura 23:** Analisi al citometro dell'anticorpo anti-NG2 in differenti preparati cellulari.

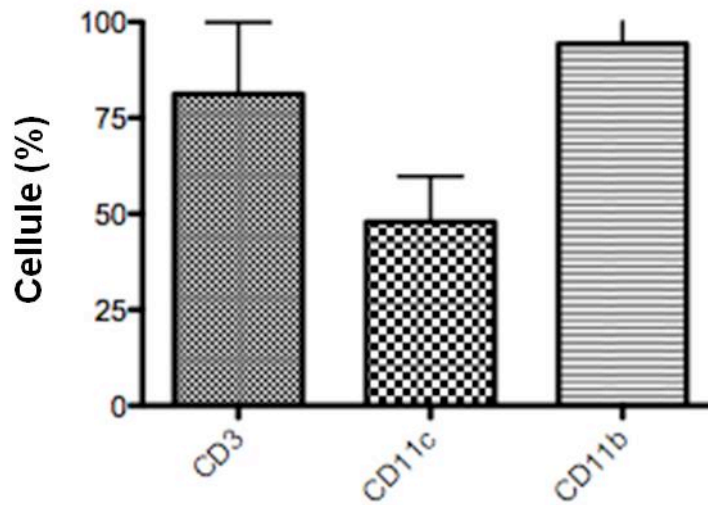
Una volta settata la parte sperimentale, ci siamo dedicati all'analisi delle cellule immunitarie. Come indicato in figura 24 i macrofagi, le DC e i linfociti T in coltura, esprimono NG2.



**Figura 24:** Dot plot relativi all'analisi dell'espressione di NG2 sulle cellule immunitarie, macrofagi (CD11b), cellule dendritiche (CD11c) e linfociti T (CD3). A) Macrofagi. B) DC. C) Linfociti T. Esperimenti rappresentativi eseguiti quattro volte per tipo cellulare.

In figura 25 è rappresentata la percentuale di cellule studiate attraverso una doppia marcatura; il 94% di cellule che CD11b co-esprimono NG2. In egual modo abbiamo analizzato l'espressione di NG2 su DC (CD11c) e linfociti T (CD3) ed abbiamo ottenuto una popolazione pari al 47% ed 81% rispettivamente di cellule che esprimono entrambi gli antigeni.

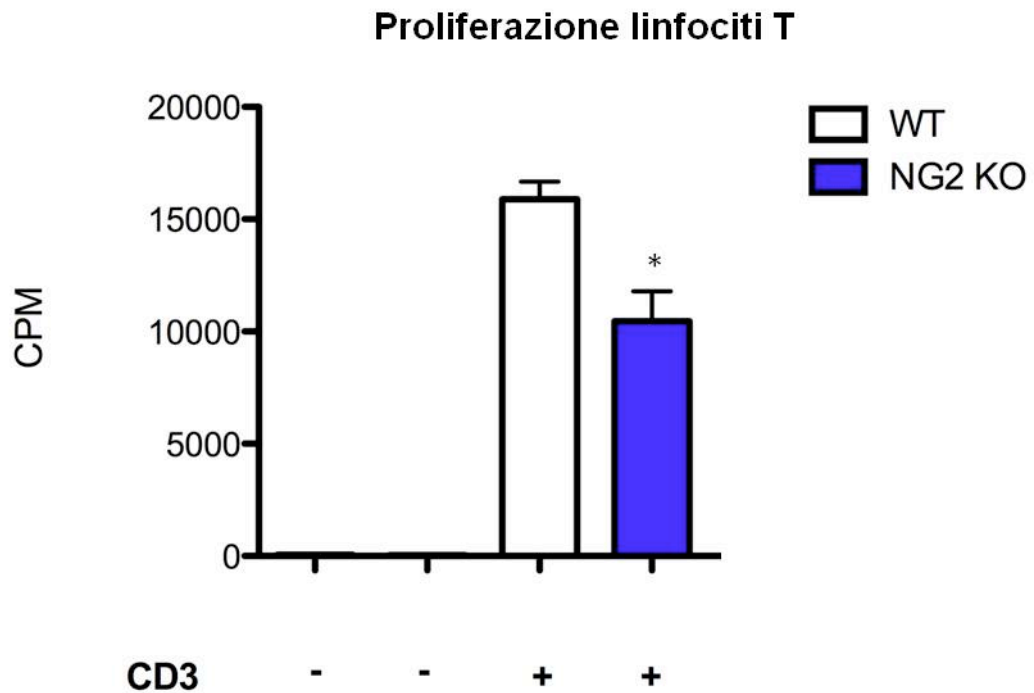
## Espressione di NG2



**Figura 25:** Valutazione in percentuale dell'espressione di NG2 sulle cellule immunitarie. Il 94% di cellule CD11b, il 47% di cellule CD11c e 81% di CD3 co-esprimono NG2.  $M \pm DS$ .

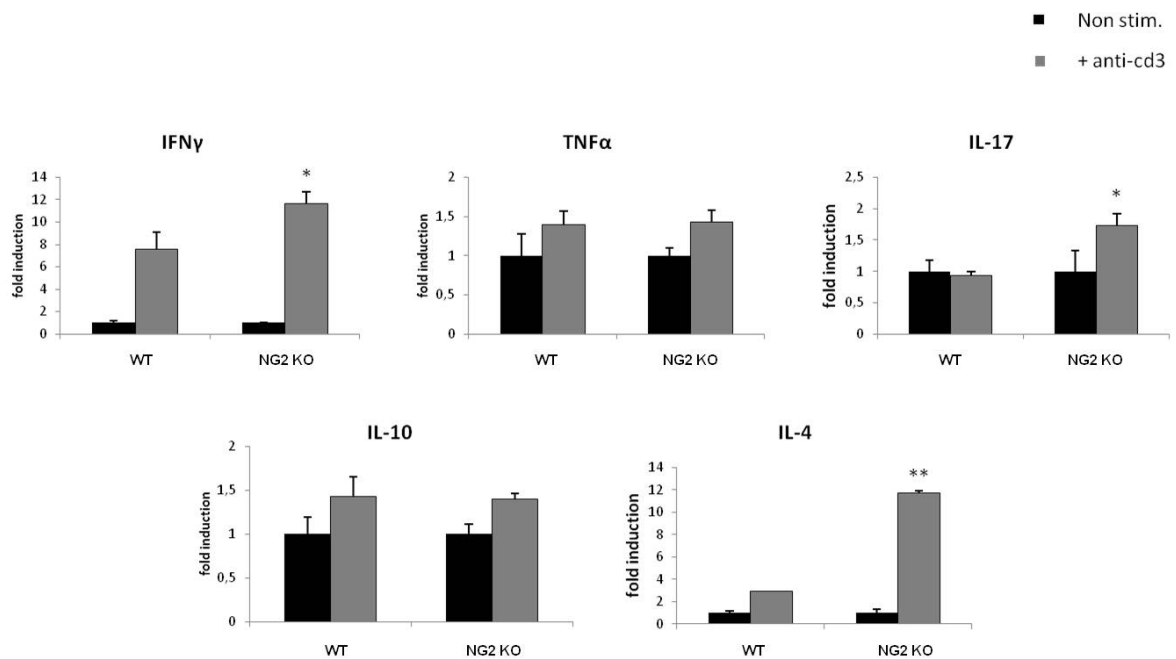
### Studio in vitro dei linfociti T

In funzione del risultato emerso in sede di analisi dell'infiltrato cellulare nel parenchima del SNC del topo NG2 KO affetto da EAE, ci siamo chiesti quale fosse la risposta immunitaria dei linfociti T del topo NG2 KO. Come primo esperimento abbiamo effettuato un saggio di proliferazione di linfociti T (splenici e linfonodali) derivanti dal topo NG2 KO in seguito ad uno stimolo proliferativo. Come si può osservare in figura 26 in seguito a stimolazione con anti-CD3, i linfociti T del topo NG2 KO proliferano meno (CPM,  $1 \times 10^3$ ) rispetto ai linfociti estratti dal topo WT (CPM,  $1,6 \times 10^3$ ) e stimolati con anti-CD3.



**Figura 26:** *Esperimento rappresentativo della misurazione della proliferazione dei linfociti T. Stimolazione con anti-CD3 (10 $\mu$ g/ml) e misurazione dell'incorporazione di timidina triziata  $^3$ [H] dei linfociti WT (barra bianca) e linfociti NG2 KO (barra blu). In assenza di stimolazione CD3, la timidina triziata non viene incorporata e quindi rilevata. L'esperimento è stato condotto 4 volte.  $p < 0,05$ , t Student.  $M \pm DS$ .*

Successivamente, ci siamo chiesti quale meccanismo fosse alla base della differente proliferazione appurata tra i linfociti T del topo WT ed NG2 KO, pertanto abbiamo analizzato la produzione di citochine in linfociti T opportunamente stimolati. Come rappresentato in figura X i livelli delle citochine, IFN $\gamma$ , IL-17a e IL-4 prodotte dai linfociti T stimolati con anti-CD3 del topo NG2 KO, sono aumentati rispetto ai linfociti T dei topi WT stimolati. Mentre le citochine TNF $\alpha$  e IL-10 non mostrano differenze apprezzabili.



**Figura 27:** Esperimenti rappresentativi di misurazione della produzione di citochine (mRNA) in linfociti T stimolati. Barre in nero, linfociti T non stimolati; barre in grigio linfociti T stimolati. Linfociti T del topo NG2 KO e WT stimolati con anti-CD3 (10 $\mu$ g/ml). Valori di espressione misurati in fold induction, rispetto al non stimolato. L'esperimento è stato ripetuto su 6 estrazioni totali di mRNA. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,001$ , calcolati sui confronti tra linfociti T stimolati del topo WT e NG2 KO; t Student.  $M \pm DS$ .

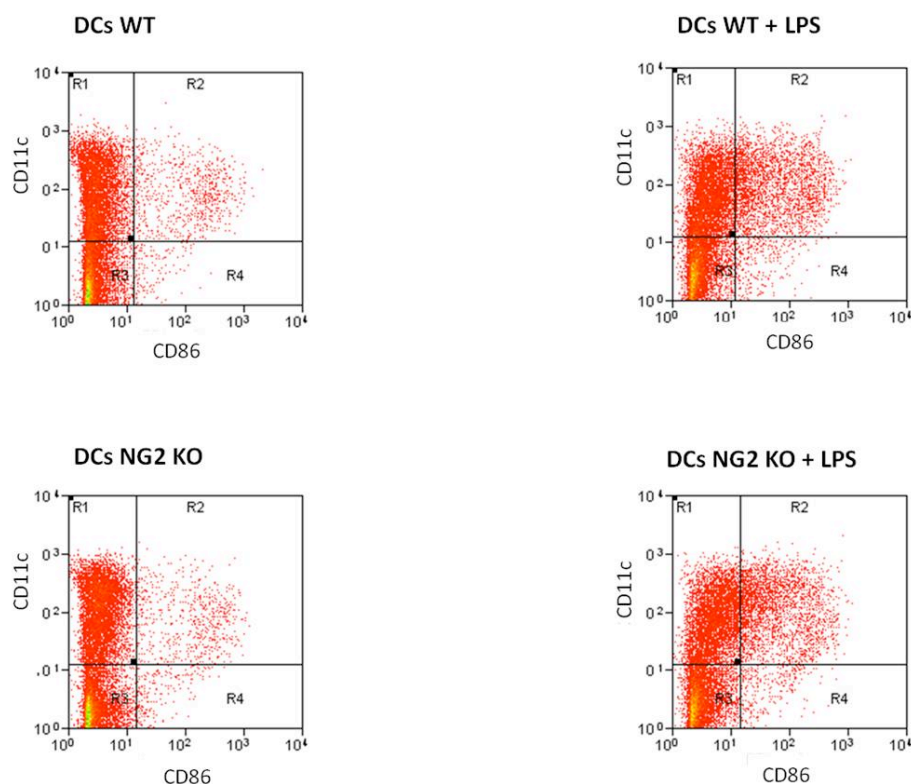
### Studio in vitro delle cellule dendritiche (DC)

Le DC sono delle APC (*Antigen Presenting Cell*) professionali che svolgono l'azione di *priming* (sensibilizzazione) della reazione immunitaria, anche nella patologia EAE, come già in precedenza descritto. Questa reazione di per se è in grado di influenzare e di attivare quelle cellule che sono in grado di "dialogare" con le DC, come i linfociti T che a loro volta montano la risposta immunitaria attivando risposte cellulari effettrici attraverso la produzione di mediatori citochinici. Dato che la presenza macrofagica nel SNC del topo NG2 KO risulta essere minore ed i linfociti T del topo NG2 KO sembrano rispondere in modo inefficiente dal punto di vista proliferativo verso uno stimolo, ci siamo chiesti se le DC potessero avere un'azione deficitaria. Nello specifico, se le DC del topo NG2 KO potessero di fatto maturare

differentemente rispetto al WT e se potesse produrre un pannello di citochine differenti rispetto al WT.

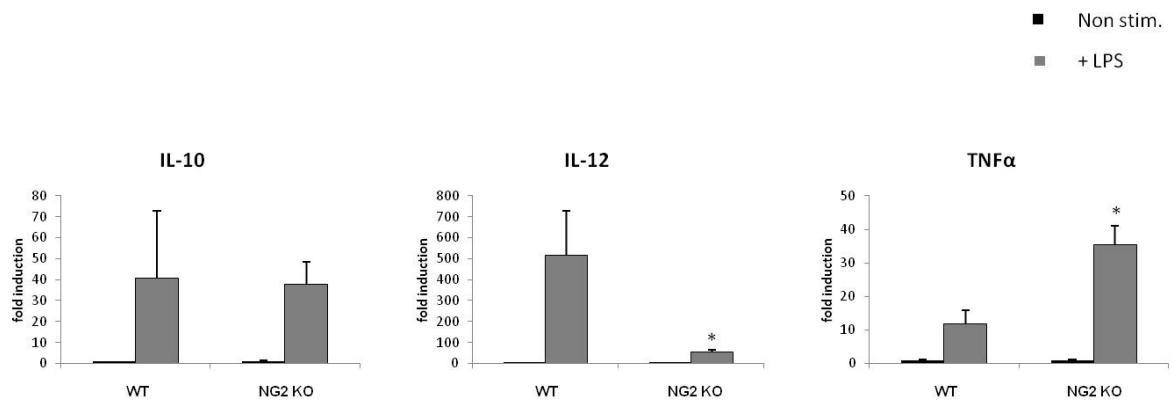
Come primo esperimento abbiamo verificato la corretta maturazione delle DC a seguito di un stimolo proinfiammatorio aspecifico, come LPS. Quando le DC si attivano, esprimono un numero maggiore di molecole di superficie CD86. In figura 28, attraverso esperimenti condotti al citometro, abbiamo valutato la presenza in percentuale di CD86 su DC del topo NG2 KO paragonandole al WT, in presenza di LPS ed in sua assenza e come si può osservare, non vi è differenza di attivazione delle DC tra i due topi. Infatti, a seguito del trattamento con LPS nel topo WT, si riscontra un incremento di percentuale (14,94%) di DC che esprimono CD86 rispetto al livello basale pari a 3,92%. Nel topo NG2 KO, la differenza di variazione tra la percentuale di DC stimulate che esprimono CD86 (18,03%) e l'espressione basale (3,46%) di CD86 sulle DC non stimulate è praticamente sovrapponibile al topo WT. Quindi possiamo dire che non ci sono differenze di maturazione delle DC del topo NG2 KO, rispetto al topo WT.





**Figura 28:** Valutazione percentuale di maturazione delle DC in seguito a stimolo. Le DC del topo WT ed NG2 KO in seguito a stimolazione (LPS, 10 $\mu$ g/ml) e marcate con anti-CD11c ed anti-CD86, esibiscono un aumento di espressione del CD86, ma non ci son differenze tra il topo WT ed NG2 KO.

Le DC in seguito al riconoscimento di un antigene si attivano e producono una serie di citochine che sono in grado di influenzare le risposte cellulo-mediate. Le citochine più studiate da questo punto di vista, sono la IL-10, IL-12 e TNF $\alpha$ , pertanto ci siamo chiesti se le DC del topo NG2 KO potessero produrre in modo differente queste citochine in seguito ad uno stimolo attivatore. Come è possibile osservare in figura X, nel topo NG2 KO l'mRNA della IL-12 relativo alle DC stimulate, risulta essere down-regolato rispetto al WT. Di contro, il TNF $\alpha$  prodotto dalle DC del topo NG2 KO stimulate risulta essere più espresso rispetto al WT. Nessuna differenza apprezzabile per quanto riguarda IL-10 tra il topo NG2 KO ed il WT.



**Figura 29:** *Esperimenti rappresentativi di misurazione della produzione di citochine (mRNA) in DC stimulate. Barre in nero, DC non stimulate; barre in grigio DC stimulate. DC del topo NG2 KO e WT stimulate con LPS (10 $\mu$ g/ml). Valori di espressione misurati in fold induction, rispetto al non stimolato. L'esperimento è stato ripetuto su 5 estrazioni totali di mRNA.  $p < 0,05$ ; calcolati sui confronti tra DC stimulate del topo WT e NG2 KO; t Student.  $M \pm DS$ .*

## Discussione

La Sclerosi Multipla (SM) è una patologia demielinizzante, cronica ed autoimmune che colpisce la mielina del sistema nervoso centrale (SNC). La mielina è la maggiore componente della sostanza bianca del SNC ed è una struttura multi-lamellare compatta che avvolge in modo concentrico l'assone dei neuroni. In natura, la mielina è la membrana cellulare più abbondante nel SNC dei vertebrati e, una classe particolare di cellule gliali, gli oligodendrociti, è deputata alla sua produzione ed alla sua organizzazione. Le cause della SM ad oggi sono ancora sconosciute, tuttavia è considerata come una complessa patologia di natura multifattoriale. Diverse sono le ipotesi, ma l'ipotesi più accreditata rimane la reazione anomala del sistema immunitario, determinando quindi una malattia auto-immunitaria (Olson, Ercolini et al. 2005). L'auto-immunità nella SM è stata per anni considerata un dogma non ha trovato dimostrazioni inequivocabili, ma solo indicazioni empiriche. Diversi sono stati gli antigeni proposti come fattore scatenante la patologia, ma nessuno di questi si è dimostrato fondamentale.

Grazie ai progressi scientifici degli ultimi venti anni e al modello sperimentale di SM, EAE, il ruolo delle cellule del sistema immunitario è stato caratterizzato: i linfociti T sono ormai considerati come le principali cellule che guidano la risposta autoimmune nella patologia. L'EAE, infatti, viene denominata una patologia *Th-1 driven*, e queste cellule sono in grado di attivare la fase effettrice fagocitica (mediata principalmente dai macrofagi) arrivando quindi alla distruzione della mielina. Da alcuni anni il ruolo delle DC è ormai stato caratterizzato, infatti, si pensa a una presentazione delle DC ai linfociti T per l'innescamento di malattia

encefalitogenica.

E' altresì chiaro il ruolo dei linfociti B, attraverso osservazioni cliniche nei pazienti affetti da SM (bande oligoclonali di immunoglobuline nel liquor) e indirette quali l'utilizzo in clinica di un anticorpo monoclonale contro la proteina CD20 ed una risposta efficace al trattamento (Waldmann 2007).

In questo lavoro di tesi ci siamo posti l'obiettivo di studiare una molecola, NG2, mai associata in precedenza all'autoimmunità in generale e relativamente poco caratterizzata nello studio della SM. Noi ipotizziamo che la struttura di NG2, costituita da un core proteico e da lunghe catene laterali di glicosamminoglicani, possa essere in grado di indurre una risposta immunitaria. Lo studio di NG2 come antigene di malattia scaturisce dalla sua particolare espressione condivisa da OPC e dai periciti. Queste cellule nel SNC identificano due componenti fondamentali per la SM; le OPC generano gli oligodendrociti e quindi la mielina, mentre i periciti regolano la funzionalità della UNV, unità neuro-vascolare, (Nishiyama, Watanabe et al. 2002; Abbott, Patabendige et al. 2010). Le capacità proliferative e il livello non del tutto differenziato di maturazione cellulare, sono le altre caratteristiche fondamentali che accomunano queste cellule. Pertanto, in base alla risposta immunitaria anomala, ipotizziamo un coinvolgimento diretto delle cellule esprimenti NG2 nella malattia. Gli scopi principali di questo lavoro di tesi sono stati quelli di dimostrare che NG2 sia coinvolto nel quadro patogenetico di malattia e in particolare che il proteoglicano sia oggetto della risposta *self* nella malattia. In seguito, si è cercato di caratterizzare il diretto coinvolgimento di NG2 nella progressione della malattia studiando il modello animale di SM utilizzando il topo KO per NG2.

Nella prima fase sperimentale abbiamo dimostrato che nel liquor di una sottopopolazione di pazienti SM (28%) sono presenti auto-anticorpi diretti contro la

proteina ricombinante rNG2 (porzione extracellulare). Abbiamo effettuato validazioni tecniche e statistiche del metodo e alternative al metodo stesso di ELISA con esperimenti di western blot. La presenza di questi anticorpi individua una sottopopolazione di pazienti con una patologia clinicamente rilevabile più grave. La dimostrazione della presenza di auto-anticorpi contro NG2 nei liquor esaminati ed il fatto che individuino una popolazione di pazienti SM con una disabilità clinicamente rilevabile più alta, suggerisce che questi auto-anticorpi possano essere considerati un fattore prognostico negativo e quindi gli anticorpi anti-NG2 possano essere considerati un possibile bio-marcatore di SM.

Diversi studi esaminano il contributo delle cellule che producono anticorpi, linfociti B, nella SM e studi recenti dimostrano in pazienti affetti da SM, la presenza di follicoli intratecali di linfociti B attivati che secernono quantità rilevabili d'immunoglobuline il cui antigene non è ancora stato identificato (Bar-Or, Fawaz et al.; Eggert, Zettl et al.; Hawker 2009). La caratteristica fondamentale di questi anticorpi è la loro rilevabilità nel solo distretto nervoso centrale (liquor) e non in periferia (siero). I nostri risultati sono in analogia con queste osservazioni, la presenza di auto-anticorpi è rilevabile solo nel liquor ma non nel siero, quindi possiamo parlare di sintesi intratecale d'immunoglobuline dirette contro NG2.

Successivamente, ci siamo chiesti se la presenza degli anticorpi nel liquor di pazienti SM, fossero una risposta compensatoria alla malattia o se potessero essere considerati uno dei meccanismi immunopatogenitici. Per rispondere a questa domanda, abbiamo elaborato un piano di studio per la caratterizzazione del modello murino di EAE, utilizzando il topo KO per NG2 confrontandolo con il topo WT.

Il letteratura esistono diversi esempio riguardo lo sviluppo dei sintomi di EAE in topi KO (Okuda, Sakoda. et al. 1998; Ferber, Brocke, et al. 1996; Liblau,

Steinman. et al 1997), con effetti diversi e opposti sull'evoluzione di patologia, nel nostro caso l'immunizzazione con il peptide MOG nel topo NG2 KO, sviluppa una patologia meno aggressiva, dal punto vista clinico, rispetto al topo controllo WT affetto da EAE. Per capire il motivo attraverso il quale l'assenza di NG2, possa favorire una patologia meno aggressiva nel topo KO, abbiamo investigato il ruolo delle cellule che esprimono NG2 nel SNC, le OPC e, indirettamente, i periciti, in più ci siamo chiesti come il sistema immunitario e nello specifico la risposta cellulo-mediata potesse funzionare nel topo NG2 KO.

E' ormai consolidato che le OPC durante la progressione di EAE, si attivano, proliferano ed esprimono in membrana più NG2 (Trotter, Karram et al. 2010), ma non sono in grado di mediare il danno in modo inefficace (Fancy, Kotter, et al. 2010). E' appurato che le OPC durante le fasi precoci di EAE, proliferano ed esprimono maggiormente NG2 sulla membrana cellulare e in seguito, durante le fasi tardive di malattia, le cellule NG2 diminuiscono di numero, per arrivare addirittura a livelli inferiori rispetto al WT non malato (Girolamo, Ferrara et al 2011). Lo studio e la caratterizzazione da noi condotti nel topo NG2 KO indica che nel SNC il numero di OPC nel parenchima risulta essere paragonabile al topo WT in assenza di patologia e che durante l'EAE, sia precoce che tardiva, il numero di OPC rimane invariato rispetto al topo NG2 KO senza patologia. Si assiste invece, a una fase dinamica nel topo WT, aumento del numero di OPC nella fase precoce di malattia e drastica diminuzione in una fase tardiva di malattia. Possiamo quindi concludere che l'assenza di NG2 mantenga invariato il numero di OPC durante la patologia, o per rimpiazzo del pool di OPC che nel topo WT in fase tardiva diminuiscono di numero o per mancata deplezione della quota di OPC nel SNC del topo NG2 KO. Possiamo affermare che l'assenza di NG2 a livello delle OPC è in grado di influenzare in senso positivo l'evoluzione di patologia.

Le modificazioni strutturali dell'UNV durante la patologia EAE e il grado di severità di malattia in funzione del danno dell'UNV sono fenomeni ben caratterizzati che sono in grado di indirizzare il destino della patologia (Fabis, Scott, et al 2007; Bennett, Basivireddy. et al. 2010). Non avendo la possibilità di analizzare direttamente i periciti (Winkler, Bell. et al 2010) ma sapendo che essi prendono parte alla formazione e alla funzione della BEE (Armulik, Genové. et al 2010), abbiamo studiato due proteine cardini della BEE, la Claudina-5 e l'Occludina entrambi facenti parte delle giunzioni *tight*. I nostri risultati, emersi dalla caratterizzazione istologica del topo WT e WT-EAE, hanno evidenziato un danno di BEE in senso strutturale durante la patologia. Difatti, durante l'EAE appare chiara la disorganizzazione tissutale dei due marcatori e la perdita di una distribuzione lineare, poiché non si tratta di una minore espressione delle due proteine di BEE. In questo modo, nel topo WT abbiamo un danno di barriera che determina l'evoluzione di patologia, come già d'altronde descritto, in letteratura. Risultato sorprendente invece si ottiene se si analizza il topo NG2 KO. La caratterizzazione istologica evidenzia durante la patologia EAE un rinforzo della BEE, infatti i due marcatori esibiscono una distribuzione praticamente simile ad un topo WT senza patologia. Sostanzialmente si assiste ad riorganizzazione della BEE, probabilmente grazie ad un'aumentata sintesi dei due marcatori e quindi un ripristino della normale funzionalità di UNV, che si identifica in una patologia EAE meno aggressiva. Concludendo questa parte, nel topo NG2 KO, l'UNV sembra essere meno suscettibile al danno mediato dalla patologia, ancora una volta l'assenza di NG2 a livello della UNV, conferisce resistenza alla progressione di patologia e può essere considerata un elemento positivo.

Attraverso esperimenti di citometria, abbiamo evidenziato, in percentuale variabile l'espressione di NG2 sulle cellule del sistema immunitario, su DC, linfociti T e

macrofagi e abbiamo dimostrato che queste cellule in assenza di NG2 si comportano diversamente dal topo WT in seguito ad uno stimolo attivatore. Lo studio selettivo dei linfociti T e delle DC in vitro, permette di caratterizzare queste cellule in seguito ad uno stimolo, in modo indipendente. Non possiamo quindi interpretare la differente risposta agli stimoli sperimentali come una reciproca influenza. Sappiamo anche che le citochine mostrano una funzione pleiotropica e che su cellule differenti possono scatenare risposte differenti, ma sappiamo inoltre che in un contesto sistemico, l'equilibrio, dato dai diversi livelli di citochine, determina poi la risposta immunitaria (Baggiolini M. 1998). Pertanto, considerando inoltre una risposta immunitaria classica, riconoscimento delle APC professionali, presentazione dell'antigene attivazione delle cellule T (Th1 e Th2) e inizio della risposta, possiamo interpretare i nostri risultati sulla base dell'evento iniziale mediato dall'attivazione delle DC (Huang, Yang. et al 2000).

IL-12 è una citochina formata da due sub-unità, p35, sintetizzata da molti tipi cellulari, mentre la p40 può essere sintetizzata solo dalle APC professionali, quali appunto le DC, che quindi sono in grado di far produrre il dimero biologicamente attivo. In seguito, l'espressione di citochine come IL-12 (p40) da parte delle DC, determina l'attivazione dei linfociti T in senso CD4<sup>+</sup>, Th1 capaci di attivare poi le risposte cellulo-mediate (Gately, Renzetti et al 1998). Le DC del topo NG2 KO, maturano in modo efficiente (il CD86 si attiva correttamente sulle DC in seguito al trattamento con LPS) suggerendo una presentazione dell'antigene efficace, ma la produzione della citochina IL-12 è minore rispetto al controllo WT, possiamo pensare quindi a uno spostamento dell'equilibrio Th1/Th2 dei linfociti T verso un fenotipo Th2 e quindi ad una modificazione a valle dell'attivazione dei fagociti, come i macrofagi. Sappiamo che l'EAE è una patologia Th1-mediata, per cui possiamo suggerire che i livelli di IL-12 prodotti dal topo NG2 non sono in grado di



mediare un'attivazione di quelle cellule che determinano la patologia, come appunto i linfociti Th1.

I livelli di  $TNF\alpha$  nelle DC del topo NG2 KO sono molto maggiori rispetto al WT, in seguito a stimolazione. E' noto che il  $TNF\alpha$  induce nell'endotelio l'espressione di molecole di adesione necessarie alla migrazione dei leucociti (Beutler. 1995). Sugeriamo quindi che l'espressione di  $TNF\alpha$  da parte delle DC permetta una corretta migrazione nel sito di danno di linfociti T, ma di natura differente (Th2) in grado di attivare solo parzialmente una risposta macrofagica nel sito di danno (Romagnani. 1997).

Per quanto riguarda i linfociti T del topo NG2 KO, la produzione di citochine in seguito ad un stimolo, fa pensare ancora, ad uno spostamento dell'equilibrio Th1/Th2 verso il Th2. Infatti, se è vero che le variazioni di  $INF\gamma$  e IL-17a prodotte dai T del topo NG2 KO sono aumentati e che queste citochine in letteratura sono note dar luogo a Th1 (Ding, Shevach. 1998), è anche vero che i livelli di IL-4 sono molto più elevati rispetto al WT e sono in grado di polarizzare la maturazione dei linfociti T verso il fenotipo Th2.

Concludendo, diversi sono i lavori che studiano il ruolo di NG2 nel sistema nervoso centrale, evidenziando ruoli differenti e a volte contrastanti della molecola, nella migrazione, nell'adesione cellulare, come recettore e nel contesto della SM durante i fenomeni di rimielinizzazione. Noi in questo progetto di tesi attraverso lo studio del modello di malattia, abbiamo dimostrato che l'assenza dell'espressione di NG2 nel topo KO sia sulle OPC e sia sui periciti conferisce resistenza alla malattia. In più l'assenza di NG2 sulle cellule immunitarie favorisce una risposta verso lo stimolo *self* meno aggressiva grazie alla polarizzazione Th2 dei linfociti. In base alle nostre osservazioni sperimentali, suggeriamo quindi che l'assenza di

NG2 possa essere considerato un fattore positivo. Possiamo ipotizzare che le cellule OPC prive di NG2 possano essere in grado di mediare più efficientemente il danno di demielinizzazione dovuto all'EAE, portando così a una protezione per maggiore presenza di mielina nel topo KO per NG2 rispetto al topo WT. L'assenza di NG2 conferisce una maggiore resistenza al danno dell'UNV mediato dalla patologia EAE. Per quanto riguarda il sistema immunitario la nostra ipotesi è che l'assenza di NG2 possa mediare risposte differenti rispetto al controllo, conferendo di fatto una funzione recettoriale, attiva attraverso l'interazione di molecole prodotte durante le risposte immunitarie (citochine), di NG2 su queste cellule. Infine, analizzando i dati ottenuti nell'uomo e nel modello animale di SM, suggeriamo che il ruolo degli auto-anticorpi possa essere considerato protettivo, in quanto la loro presenza può essere interpretata come un tentativo di risposta alla patologia. Questo tentativo di risposta potrebbe, di fatto, inibire l'attività cellulare mediante il blocco dell'attività di NG2. Pertanto, per rispondere alla domanda di quale sia il ruolo degli auto-anticorpi diretti contro NG2 rilevati nei liquor di pazienti SM, i nostri risultati fanno ipotizzare che la loro presenza sia dovuta ad una risposta compensatoria.

## Bibliografia

- Abbott, N. J., A. A. Patabendige, et al. (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." *Neurobiol Dis* 37(1): 13-25.
- Acheson, E. D., C. A. Bachrach, et al. (1960). "Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables." *Acta Psychiatr Scand Suppl* 35(147): 132-47.
- Ascherio, A. and K. L. Munger (2007). "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection." *Ann Neurol* 61(4): 288-99.
- Armulik A, Genové G et I. (2010). "Pericytes regulate the blood-brain barrier." *Nature*;468(7323):557-61.
- Baggiolini M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." *J Biol Chem* 273(10):565-8.
- Balabanov, R., T. Beaumont, et al. (1999). "Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes." *J Neurosci Res* 55(5): 578-87.
- Bar-Or, A., L. Fawaz, et al. "Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?" *Ann Neurol* 67(4): 452-61.
- Barcellos, L. F., S. Sawcer, et al. (2006). "Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis." *Hum Mol Genet* 15(18): 2813-24.
- Baumann, N. and D. Pham-Dinh (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." *Physiol Rev* 81(2): 871-927.
- Bennett J, Basivireddy J. et al. (2010). "Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE." *J Neuroimmunol*;229(1-2):180-91.
- Beutler B. (1995). "TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade." *J Investig Med* 43(3):227-35.
- Bielekova, B., B. Goodwin, et al. (2000). "Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand." *Nat Med* 6(10): 1167-75.
- Bunge, R. P. (1968). "Glial cells and the central myelin sheath." *Physiol Rev* 48(1): 197-251.
- Burg, M. A., E. Tillet, et al. (1996). "Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules." *J Biol Chem* 271(42): 26110-6.
- Butt, A. M. and B. R. Ransom (1989). "Visualization of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of lucifer yellow and horseradish peroxidase." *Glia* 2(6): 470-5.
- Coles, A. J., D. A. Compston, et al. (2008). "Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis." *N Engl J Med* 359(17): 1786-801.
- Comi, G., V. Martinelli, et al. (2009). "Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Lancet* 374(9700): 1503-11.
- D'Amore, P. A. (1992). "Capillary growth: a two-cell system." *Semin Cancer Biol* 3(2): 49-56.
- Daneman R, Zhou L et al (2009). "Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis." *Nature*. 2010 Nov 25;468(7323):562-6.
- Daniel, C., N. Sartory, et al. (2007). "FTY720 ameliorates Th1-mediated colitis in mice by directly affecting the functional activity of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* 178(4): 2458-68.

Ding L, Shevach EM (1998). "Differential effects of CD28 engagement and IL-12 on T cell activation by altered peptide ligands." *J Immunol.*15;161(12):6614-21.

Dyment, D. A., B. M. Herrera, et al. (2005). "Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance." *Hum Mol Genet* 14(14): 2019-26.

Ebers, G. C. (2001). "Natural history of multiple sclerosis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71 Suppl 2: ii16-9.

Eggert, M., U. K. Zettl, et al. "Autoantibodies in autoimmune diseases." *Curr Pharm Des* 16(14): 1634-43.

Elices, M. J., L. Osborn, et al. (1990). "VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site." *Cell* 60(4): 577-84.

Fabis MJ, Scott GS, et al (2007). "Loss of blood-brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models." *Proc Natl Acad Sci U S A.*;104(13):5656-61.

Fancy SP, Kotter MR, et al. (2010). "Overcoming remyelination failure in multiple sclerosis and other myelin disorders." *Exp Neurol.* 2010 Sep;225(1):18-23

Fang, X., M. A. Burg, et al. (1999). "Cytoskeletal reorganization induced by engagement of the NG2 proteoglycan leads to cell spreading and migration." *Mol Biol Cell* 10(10): 3373-87.

Ferber IA, Brocke S, et al. (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." *J Immunol*;156(1):5-7.

Franklin RJ, Ffrench-Constant C. et al. (2008). "Remyelination in the CNS: from biology to therapy." *Nat Rev Neurosci.*;9(11):839-55.

Fujinami, R. S. (2001). "Can virus infections trigger autoimmune disEAEe?" *J Autoimmun* 16(3): 229-34.

Gately MK, Renzetti LM et al (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses". *Annu Rev Immunol*;16:495-521.

Gerhardt, H. and C. Betsholtz (2003). "Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis." *Cell Tissue Res* 314(1): 15-23.

Girolamo F, **Ferrara G**, Strippoli M, Rizzi M, Errede M, Trojano M, Perris R, Roncali L, Svelto M, Mennini T, Virgintino D. Cerebral cortex demyelination and oligodendrocyte precursor response to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis.* 2011 Jun 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21679768.

Gold, R., C. Lington, et al. (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." *Brain* 129(Pt 8): 1953-71.

Harris, V. K. and S. A. Sadiq (2009). "Disease biomarkers in multiple sclerosis: potential for use in therapeutic decision making." *Mol Diagn Ther* 13(4): 225-44.

Hawker, K. (2009). "B cells as a target of immune modulation." *Ann Indian Acad Neurol* 12(4): 221-5.

Hawkins, S. A. and G. V. McDonnell (1999). "Benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67(2): 148-52.

Hawkins BT, Davis TP. (2005). "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*;57(2):173-85.

Huang YM, Yang JS. Et al (2000). "Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats." *Clin Exp*

Immunol;122(3):437-44.

Johnson, K. P., B. R. Brooks, et al. (1995). "Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group." *Neurology* 45(7): 1268-76.

Jones, J. L. and A. J. Coles "New treatment strategies in multiple sclerosis." *Exp Neurol* 225(1): 34-9.

Kang SH, Fukaya M, et al (2011). "NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration." *Neuron*. 2010 Nov 18;68(4):668-81.

Karram, K., N. Chatterjee, et al. (2005). "NG2-expressing cells in the nervous system: role of the proteoglycan in migration and glial-neuron interaction." *J Anat* 207(6): 735-44.

Koch-Henriksen, N. and P. S. Sorensen "The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology." *Lancet Neurol* 9(5): 520-32.

Kucharova, K. and W. B. Stallcup "The NG2 proteoglycan promotes oligodendrocyte progenitor proliferation and developmental myelination." *Neuroscience* 166(1): 185-94.

Kurtzke, J. F., G. W. Beebe, et al. (1979). "Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution." *Neurology* 29(9 Pt 1): 1228-35.

Lang, H. L., H. Jacobsen, et al. (2002). "A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis." *Nat Immunol* 3(10): 940-3.

Levin, L. I., K. L. Munger, et al. (2005). "Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis." *JAMA* 293(20): 2496-500.

Levine, J. M. and W. B. Stallcup (1987). "Plasticity of developing cerebellar cells in vitro studied with antibodies against the NG2 antigen." *J Neurosci* 7(9): 2721-31.

Li, D. K. and D. W. Paty (1999). "Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon-beta1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. Prevention of Relapses and Disability by Interferon-beta1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis." *Ann Neurol* 46(2): 197-206.

Libbey, J. E. and R. S. Fujinami "Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines." *Vaccine* 29(17): 3356-62.

Libbey, J. E., L. L. McCoy, et al. (2007). "Molecular mimicry in multiple sclerosis." *Int Rev Neurobiol* 79: 127-47.

Liblau R, Steinman L. et al (1997). "Experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-4-deficient mice." *Int Immunol*;9(5):799-803

Lucchinetti, C., W. Bruck, et al. (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." *Ann Neurol* 47(6): 707-17.

Markovic-Plese, S., C. Pinilla, et al. (2004). "The initiation of the autoimmune response in multiple sclerosis." *Clin Neurol Neurosurg* 106(3): 218-22.

Marrosu, M. G., R. Murru, et al. (2001). "Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia." *Hum Mol Genet* 10(25): 2907-16.

Masterman, T., A. Ligers, et al. (2000). "HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis." *Ann Neurol* 48(2): 211-9.

McDonald, W. I., A. Compston, et al. (2001). "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis." *Ann Neurol* 50(1): 121-7.

Munger, K. L., L. I. Levin, et al. (2006). "Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis." *JAMA* 296(23): 2832-8.

Nehls, V., K. Denzer, et al. (1992). "Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ." *Cell Tissue Res* 270(3): 469-74.

Nielsen, T. R., K. Rostgaard, et al. (2007). "Multiple sclerosis after infectious mononucleosis." *Arch Neurol* 64(1): 72-5.

Nishiyama, A. (2007). "Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS." *Neuroscientist* 13(1): 62-76.

Nishiyama, A., M. Komitova, et al. (2009). "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity." *Nat Rev Neurosci* 10(1): 9-22.

Nishiyama, A., M. Watanabe, et al. (2002). "Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells." *J Neurocytol* 31(6-7): 437-55.

Nishiyama, A., M. Yu, et al. (1997). "Normal and reactive NG2+ glial cells are distinct from resting and activated microglia." *J Neurosci Res* 48(4): 299-312.

Okuda Y, Sakoda S. et al. (1998). "IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein." *Int Immunol*;10(5):703-8.

Olson, J. K., A. M. Ercolini, et al. (2005). "A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis." *Curr Top Microbiol Immunol* 296: 39-53.

Olson, J. K., J. Ludovic Croxford, et al. (2004). "Innate and adaptive immune requirements for induction of autoimmune demyelinating disease by molecular mimicry." *Mol Immunol* 40(14-15): 1103-8.

Orton, S. M., B. M. Herrera, et al. (2006). "Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study." *Lancet Neurol* 5(11): 932-6.

Paty, D. W. and D. K. Li (1993). "Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group." *Neurology* 43(4): 662-7.

Peters, A. (1964). "Observations on the Connexions between Myelin Sheaths and Glial Cells in the Optic Nerves of Young Rats." *J Anat* 98: 125-34.

Pette, M., K. Fujita, et al. (1990). "Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals." *Neurology* 40(11): 1770-6.

Platten M, Steinman L. (2005). "Multiple sclerosis: trapped in deadly glue." *Nat Med*;11(3):252-3.

Polman, C. H., S. C. Reingold, et al. (2005). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria"." *Ann Neurol* 58(6): 840-6.

Poser, C. M., D. W. Paty, et al. (1983). "New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols." *Ann Neurol* 13(3): 227-31.

Prinz, M., F. Garbe, et al. (2006). "Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis." *J Clin Invest* 116(2): 456-64.

Ramagopalan, S. V., J. K. Byrnes, et al. "Sex ratio of multiple sclerosis and clinical phenotype." *Eur J Neurol* 17(4): 634-7.

Ramagopalan, S. V., A. P. Morris, et al. (2007). "The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis." *PLoS Genet* 3(9): 1607-13.

Richardson, W. D., N. Pringle, et al. (1988). "A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system." *Cell* 53(2): 309-19.

Rolak, L. A. (2009). *The History of MS*. N. M. S. Society.

Romagnani S. (1997). "The Th1/Th2 paradigm." *Immunol Today*. Jun;18(6):263-6.

Sawicka, E., G. Dubois, et al. (2005). "The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 differentially affects the sequestration of CD4+/CD25+ T-

regulatory cells and enhances their functional activity." *J Immunol* 175(12): 7973-80.

Sayao, A. L., V. Devonshire, et al. (2007). "Longitudinal follow-up of "benign" multiple sclerosis at 20 years." *Neurology* 68(7): 496-500.

Sedzik, J. (2008). "Myelin sheaths and autoimmune response induced by myelin proteins and alphaviruses. I. Physicochemical background." *Curr Med Chem* 15(19): 1899-910.

Simon, J. H., L. D. Jacobs, et al. (1998). "Magnetic resonance studies of intramuscular interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group." *Ann Neurol* 43(1): 79-87.

Spassky, N., C. Olivier, et al. (2000). "Single or multiple oligodendroglial lineages: a controversy." *Glia* 29(2): 143-8.

Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." *Cell* 76(2): 301-14.

Stallcup, W. B. and L. BEAEley (1987). "Bipotential glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan." *J Neurosci* 7(9): 2737-44.

Stuve, O., C. M. Marra, et al. (2006). "Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab." *Ann Neurol* 59(5): 743-7.

Sundberg, C., M. Ivarsson, et al. (1996). "Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring." *Lab Invest* 74(2): 452-66.

Sundstrom, P., P. Juto, et al. (2004). "An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study." *Neurology* 62(12): 2277-82.

Swanton, J. K., A. Rovira, et al. (2007). "MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study." *Lancet Neurol* 6(8): 677-86.

Thallmair, M., J. Ray, et al. (2006). "Functional and morphological effects of NG2 proteoglycan deletion on hippocampal neurogenesis." *Exp Neurol* 202(1): 167-78.

Tintore, M., A. Rovira, et al. (2006). "Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes." *Neurology* 67(6): 968-72.

Trotter, J. (2005). "NG2-positive cells in CNS function and the pathological role of antibodies against NG2 in demyelinating diseases." *J Neurol Sci* 233(1-2): 37-42.

Trotter, J., K. Karram, (2010). "NG2 cells: Properties, progeny and origin." *Brain Res Rev* 63(1-2): 72-82.

Tsunoda, I. and R. S. Fujinami (1996). "Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus." *J Neuropathol Exp Neurol* 55(6): 673-86.

van der Mei, I. A., A. L. Ponsonby, et al. (2003). "Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study." *BMJ* 327(7410): 316.

Viglietta, V., C. Baecher-Allan, et al. (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." *J Exp Med* 199(7): 971-9.

Waldmann, T. A. (2007). "Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune disease, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey." *J Clin Immunol* 27(1): 1-18.

Winkler EA, Bell RD. et al (2010). "Central nervous system pericytes in health and disease." *Nat Neurosci.* 26;14(11):1398-405. doi: 10.1038/nn.2946

Wucherpfennig, K. W. (2004). "Presentation of a self-peptide in two distinct conformations by a disease-associated HLA-B27 subtype." *J Exp Med* 199(2): 151-4.

Ziemssen, T., T. Kumpfel, et al. (2005). "Secretion of brain-derived neurotrophic factor by glatiramer acetate-reactive T-helper cell lines: Implications for multiple

sclerosis therapy." J Neurol Sci 233(1-2): 109-12.



## Indice delle figure

- FIGURA 1: QUANTIFICAZIONE EFFETTUATA TRAMITE METODICA ELISA. LE CURVE RAPPRESENTANO L'ASSORBANZA (DENSITÀ OTTICA) DELL'ANTICORPO ANTI-NG2 DILUITO IN LIQUOR DI CONTROLLO (LINEA BLU) E PBS (LINEA NERA). OGNI PUNTO RAPPRESENTA LA MEDIA DELL'ASSORBANZA RIVELATA DI TRE REPLICATI ( $M \pm DS$ ). .....81**
- FIGURA 2: QUANTIFICAZIONE EFFETTUATA TRAMITE METODICA ELISA. LA CURVA RAPPRESENTA L'ANDAMENTO DEI SEGNALI DI ASSORBANZA IN FUNZIONE DELLE DILUIZIONI SERIALI DELL'ANTICORPO DI CONTROLLO COMMERCIALE ANTI-NG2. OGNI PUNTO RAPPRESENTA LA MEDIA DELL'ASSORBANZA RIVELATA DI TRE REPLICATI ( $M \pm DS$ ). .....82**
- FIGURA 3: QUANTIFICAZIONE EFFETTUATA TRAMITE METODICA ELISA. NEL GRAFICO È RIPOSTATO IL TIME-COURSE DELL'ANTICORPO PRIMARIO ANTI-NG2 COMMERCIALE INCUBATO PER 2 (LINEA NERA), 6 (LINEA BLU) E 12 (LINEA ROSSA) ORE. OGNI PUNTO RAPPRESENTA LA MEDIA DELL'ASSORBANZA RIVELATA DI TRE REPLICATI ( $M \pm DS$ ). .....83**
- FIGURA 4: IL GRAFICO MOSTRA TEST ELISA NEL QUALE VIENE UTILIZZATA LA PROTEINA RICOMBINANTE RNG2 IN CONCENTRAZIONI CRESCENTI (30, 10, 3, 1 E 0  $\mu$ G/ML ) COME ANTIGENE COATING PER 12 ORE A 4°C. OGNI PUNTO RAPPRESENTA LA MEDIA DELL'ASSORBANZA RIVELATA DI TRE REPLICATI ( $M \pm DS$ ). .....84**
- FIGURA 5: QUANTIFICAZIONE EFFETTUATA TRAMITE METODICA ELISA. IN GRAFICO SONO RIPOSTATE LE CURVE RELATIVE ALLA RISPOSTA ANTICORPALE ANTI-NG2 COMMERCIALE, IN FUNZIONE DELLA DILUIZIONE SERIALE, DEL BUFFER E DEL TEMPO DI COATING. IN NERO ED IN ROSSO SONO RAPPRESENTATE LE CURVE RELATIVE AL PBS IN FUNZIONE DEI DUE TEMPI SPERIMENTALI (12 E 24 ORE), IN BLU E MARRONE LE CURVE RELATIVE AL BICARBONATO. OGNI PUNTO RAPPRESENTA LA MEDIA DELL'ASSORBANZA RIVELATA DI TRE REPLICATI ( $M \pm DS$ ). .....85**
- FIGURA 6: IN FIGURA SONO RIPOSTATI I VALORI DI ASSORBANZA OTTENUTE TRAMITE TEST ELISA. IL CUT-OFF È INDICATO IN ROSSO (0,1129 O.D.). I CAMPIONI DI LIQUOR SONO STATI DILUITI 1:1 PBS PIÙ BSA 1%. GLI OND (N=30) SONO I CONTROLLI SPERIMENTALI, MENTRE SM NEGATIVI (N=31) E SM POSITIVI (N=12) SONO LE ASSORBANZA RELATIVE AI PAZIENTI SM TESTATI. SONO GRAFICATI TRE ESPERIMENTI NORMALIZZATI SULL'ANTICORPO DI CONTROLLO, OGNI LIQUOR È STATO TESTATO IN TRIPLICATO. T-TEST  $P < 0,0001$ . .....87**
- FIGURA 7: ANALISI IN WESTERN BLOTTING DEI LIQUOR DI PAZIENTI SM. COME ANTICORPO PRIMARIO È STATO UTILIZZATO UN PULL DI LIQUOR DI PAZIENTI**

SM E COME SECONDARIO UN ANTICORPO CHE RICONOSCE LE IMMUNOGLOBULINE UMANE. C+) ANTICORPO ANTI-NG2 DI CONTROLLO. A) PULL DI LIQUOR SM POSITIVI AGLI ANTICORPI IBRIDATI CON LA PROTEINA NON PROCESSATA. B) PULL DI LIQUOR SM POSITIVI AGLI ANTICORPI IBRIDATI CON LA PROTEINA DIGERITA. C) PULL DI LIQUOR SM NEGATIVI AGLI ANTICORPI IBRIDATI CON LA PROTEINA NON PROCESSATA. D) PULL DI LIQUOR SM NEGATIVI AGLI ANTICORPI IBRIDATI CON LA PROTEINA DIGERITA. IL PESO DI RNG2 DOPO LA CORSA ELETTROFORETICA È PARI A 270 KDA. ....90

FIGURA 8: IN FIGURA SONO RIPORTATI I VALORI DI ASSORBANZA OTTENUTE TRAMITE TEST ELISA. I CAMPIONI DI SIERO SONO STATI DILUITI 1:200 IN PBS PIÙ BSA 1%, IN ROSSO È INDICATA LA LINEA DI CUT-OFF (0,3247 O.D). ....91

FIGURA 9: ANALISI MEDIANTE CURVA ROC. TEST STATISTICO DI TIPO QUANTITATIVO CHE LEGA LA PROBABILITÀ DI OTTENERE UN RISULTATO VERO-POSITIVO NELLA CLASSE DEI MALATI-VERI (SENSIBILITÀ) ALLA PROBABILITÀ DI OTTENERE UN RISULTATO FALSO-POSITIVO NELLA CLASSE DEI FALSI MALATI (SPECIFICITÀ). LA CURVA RAPPRESENTA I VALORI DI ASSORBANZA RELATIVI AI CONTROLLI E PAZIENTI SM. IN TABELLA SONO INDICATI I RISULTATI STATISTICI. ....92

FIGURA 10: TABELLA RIASSUNTIVA DEI DATI CLINICI DEI PAZIENTI SM. IN GIALLO SONO INDICATI I PAZIENTI POSITIVI AGLI AUTO-ANTICORPI ANTI-NG2. IL PUNTEGGIO DI EDSS (ASSEGNATI SECONDA LA SCALA KURTZKE) E L'ULTIMO IN ORDINE CRONOLOGICO DEGLI EDSS. I VALORI DI PI SONO CALCOLATI SULLA DURATA DELLA MALATTIA. ....95

FIGURA 11: CONFRONTO PROGRESSION INDEX. IN FIGURA SONO RAPPRESENTATE LE MEDIA PIÙ DS DEI VALORI DI PROGRESSION INDEX (EDSS/ ANNI DI MLATTIA) RELATIVI AI PAZIENTI SM ANALIZZATI. SM NEGATIVI (N=31) SONO I PAZIENTI SENZA ATTIVITÀ AUTO-ANTICORPALE E SM POSITIVI (N=12) SONO I PAZIENTI CON ATTIVITÀ AUTO-ANTICORPALI T-TEST P< 0,05. ....96

FIGURA 12: GENOTIPIZZAZIONE DNA GENOMICO DEI TOPO LITTERMATE F2 (NG2-KO E WT). A) BANDA RELATIVA AL DNA GENOMICO CHE PRESENTA UN SOLO ALLELE DI NG2; B) BANDA RELATIVA AL DNA GENOMICO WT; C) BANDA RELATIVA AL DNA GENOMICO CHE NON ESPRIME GLI ALLELI DI NG2. ....98

FIGURA 13: VALUTAZIONE DEL MODELLO (MEDIA ± DS) DI EAE E CONFRONTO TRA WT ED NG2-KO (N=20). NELLA CURVA IN BLU È RIPORTATA LA PROGRESSIONE DELLA MALATTIA DEL TOPO WT MENTRE CON LA CURVA IN NERO È RAPPRESENTATA LA CURVA RELATIVA ALLA MALATTIA DEL TOPO NG2-KO. LO SCORE CLINICO È STATO COSÌ ASSEGNATO: (0 = ASSENZA DI MALATTIA, 1 = CODA FLACCIDA, 2 = ATASSIA E/O PARESI DEGLI ARTI POSTERIORI, O LENTO RIFLESSO DI RADDRIZZAMENTO 3 = PARALISI ARTI POSTERIORI E/O PARESI ARTI ANTERIORI, 4 = PARAPARESI 5 = MORIBONDO O MORTO). MANN WHITNEY TEST EFFETTUATO SULLO SCORE CLINICO GIORNALIERO, I VALORI DI P SONO COSÌ INDICATI: \*= 0,05, #= 0,01, §= 0,0001...100

**FIGURA 14: INCIDENZA DI MALATTIA. IL GRAFICO MOSTRA UNA CURVA KAPLAN-MEIER CALCOLATA SUI GIORNI DI ESORDIO VDI MALATTIA. LOG-RANK (MANTEL-COX) TEST. P VALUE < 0,0001. .... 100**

**FIGURA 15: DEMIELINIZZAZIONE SPINALE: A) IMMAGINI RAPPRESENTATIVE MICROSCOPIA OTTICA 10X DELLE SEZIONI SPINALI CERVICALI, TORACICHE. LOMBARI DEL TOPO WT ED NG2-KO, COLORAZIONE LUXOL FAST BLUE. B) QUANTIFICAZIONE DEL DANNO DI DEMIELINIZZAZIONE, CALCOLATO DAL RAPPORTO DI AREA DEMIELINIZZATA SU AREA TOTALE. T-TEST P<0,0001. .... 102**

**FIGURA 16: VALUTAZIONE DELL'INFILTRATO CELLULARE IMMUNITARIO; A) QUANTIFICAZIONE DELL'INFILTRATO MACROFAGICO IBA-1 POSITIVO; B) QUANTIFICAZIONE DELL'INFILTRATO LINFOCITARIO T CD3 POSITIVO. LA QUANTIFICAZIONE SI BASA SU IL NUMERO DI CELLULE INFILTRANTI PER UNITÀ DI AREA. DELLE SEZIONI SPINALI CERVICALI, TORACICHE E LOMBARI DEL TOPO WT ED NG2 KO AFFETTI DA EAE. T-TEST P<0,0001..... 103**

**FIGURA 17: IMMAGINI RAPPRESENTATIVE DI TESSUTO CORTICALE CEREBRALE MURINO MARCATO CON A2B5, NG2 ED O4; A) TOPO CONTROLLO (IN ASSENZA DI PATOLOGIA EAE) MARCATO CON A2B5 (VERDE) ED NG2 (ROSSO) E B) 20 GIORNI DOPO L'IMMUNIZZAZIONE CON MOG (PATOLOGIA EAE). C) TOPO CONTROLLO MARCATO CON O4 (VERDE) ED NG2 (ROSSO) E D) 20 GIORNI DOPO L'IMMUNIZZAZIONE CON MOG. LE FRECCHE, SIA LARGHE CHE A CORPO STRETTO INDICANO I TIPI CELLULARI, CON LE RISPETTIVE MARCATURE, CHE SONO STATI CONSIDERATE NELLE CONTE PER LA QUANTIFICAZIONE, MENTRE LE FRECCHE A PUNTA INDICANO CO-STAINING CON NEURONI CORTICALI. BARRE DI SCALA: 50µM. .... 105**

**FIGURA 18: IMMAGINI RAPPRESENTATIVE DI TESSUTO CORTICALE CEREBRALE MURINO MARCATO CON PDGFR $\alpha$  ED NG2; A) TOPO CONTROLLO (IN ASSENZA DI PATOLOGIA EAE) MARCATO CON NG2 PER LA LOCALIZZAZIONE MORFOLOGICA DELLE OPC (VERDE) B) QUANTIFICAZIONE; CONTA CELLULARE PER IL MARCATORE PDGFR $\alpha$ , COME NUMERO DI CELLULE PER MM3 M  $\pm$  DS. ONE WAY ANOVA E BONFERRONI POST-TEST \*=P<0,05; \*\*= P<0,01. A') TOPO CONTROLLO MARCATO CON PDGFR $\alpha$  (ROSSO) A C) 20 GIORNI DOPO L'IMMUNIZZAZIONE CON MOG E D) A 40 GIORNI DOPO L'IMMUNIZZAZIONE. E) TOPO NG2 KO MARCATO CON PDGFR $\alpha$  (ROSSO) A F) 20 GIORNI DOPO L'IMMUNIZZAZIONE CON MOG E G) A 40 GIORNI DOPO L'IMMUNIZZAZIONE CON MOG. BARRE DI SCALA: 50 µM. .... 108**

**FIGURA 19: VALUTAZIONE QUALITATIVA ISTOLOGICA IN FLUORESCENZA DELLA UNITÀ NEURO-VASCOLARE, IN CORTECCIA CEREBRALE MURINA. MARCATURA: CLAUDINA-5 (VERDE), GIUNZIONI TIGHT DELLA BEE; CAVEOLINA-1 (ROSSO) CELLULA ENDOTELIALE DEL VASO SANGUIGNO. A) SEGNALE IN FLUORESCENZA DI UN VASO CEREBRALE NEL TOPO WT IN ASSENZA DI PATOLOGIA E B) AFFETTO DA EAE. C) SEGNALE IN FLUORESCENZA DI UN VASO CEREBRALE NEL TOPO NG2 KO IN ASSENZA DI PATOLOGIA E D) AFFETTO DA EAE. L'ANALISI RELATIVA AI DUE MARCATORI DI BEE È STATA CONDOTTA SU CINQUE ANIMALI PER GRUPPO (WT, WT-EAE,**

**NG2 KO E NG2 KO-EAE) IMMAGINI AD ALTO INGRANDIMENTO, BARRE DI SCALA: 20  $\mu$ M. .... 110**

**FIGURA 20: VALUTAZIONE QUALITATIVA ISTOLOGICA IN FLUORESCENZA DELLA UNITÀ NEURO-VASCOLARE, IN CORTECCIA CEREBRALE MURINA. MARCATURA: OCCLUDINA (VERDE),. A) SEGNALE IN FLUORESCENZA DI UN VASO CEREBRALE NEL TOPO WT IN ASSENZA DI PATOLOGIA E B) AFFETTO DA EAE. C) SEGNALE IN FLUORESCENZA DI UN VASO CEREBRALE NEL TOPO NG2 KO IN ASSENZA DI PATOLOGIA E D) AFFETTO DA EAE. IMMAGINI AD ALTO INGRANDIMENTO, BARRE DI SCALA: 20  $\mu$ M. .... 112**

**FIGURA 21: IMMUNOBLOT RAPPRESENTATIVI DELLA CLAUDINA-5 E OCCLUDINA, IN TESSUTO CORTICALE CEREBRALE MURINO. A) CLAUDINA-5 (29KDA); A'- MODIFICAZIONE DEL PESO MOLECOLARE (31-33 KDA). B) OCCLUDINA (65KDA); B'- MODIFICAZIONE DEL PESO (70-71 KDA); B''- MODIFICAZIONE DEL PESO DELL'OCCLUDINA (62-63 KDA). L'ESPERIMENTO È STATO CONDOTTO ANALIZZANDO TRE TOPI PER CONDIZIONE, IN TRIPLICATO, ANALIZZANDO 20 $\mu$ G/LANE DI PROTEINA. .... 115**

**FIGURA 22: GRAFICI RAPPRESENTATIVI DEI LIVELLI DI PRODUZIONE DI MRNA DI TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  E IL-1B DA MILZA E LINFONODI. I LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE CITOCHINE SONO INDICATI IN FOLD INDUCTION RISPETTO ALLA CONDIZIONE NON STIMOLATA. L'ESPERIMENTO È STATO RIPETUTO TRE VOLTE, CON TRE TOPI PER GRUPPO, LE BARRE IN NERO RAPPRESENTANO I LIVELLI DI MRNA DI UN TOPO SENZA L'INIEZIONE SISTEMICA DI LPS, MENTRE LE BARRE IN GRIGIO SONO RELATIVE ALL'ESPRESSIONE DI MRNA DI UN TOPO TRATTATO CON LPS (50 $\mu$ G/TOPO A 2H DALL'INIEZIONE). M $\pm$ DS. .... 117**

**FIGURA 23: ANALISI AL CITOMETRO DELL'ANTICORPO ANTI-NG2 IN DIFFERENTI PREPARATI CELLULARI. .... 119**

**FIGURA 24: DOT PLOT RELATIVI ALL'ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI NG2 SULLE CELLULE IMMUNITARIE, MACROFAGI (CD11B), CELLULE DENDRITICHE (CD11C) E LINFOCITI T (CD3). A) MACROFAGI. B) DC. C) LINFOCITI T. ESPERIMENTI RAPPRESENTATIVI ESEGUITI QUATTRO VOLTE PER TIPO CELLULARE. .... 120**

**FIGURA 25: VALUTAZIONE IN PERCENTUALE DELL'ESPRESSIONE DI NG2 SULLE CELLULE IMMUNITARIE. IL 94% DI CELLULE CD11B, IL 47% DI CELLULE CD11C E 81% DI CD3 CO-ESPRIMONO NG2. M $\pm$ DS. .... 121**

**FIGURA 26: ESPERIMENTO RAPPRESENTATIVO DELLA MISURAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE DEI LINFOCITI T. STIMOLAZIONE CON ANTI-CD3 (10 $\mu$ G/ML) E MISURAZIONE DELL'INCORPORAZIONE DI TIMIDINA TRIZIATA 3[H] DEI LINFOCITI WT (BARRA BIANCA) E LINFOCITI NG2 KO (BARRA BLU). IN ASSENZA DI STIMOLAZIONE CD3, LA TIMIDINA TRIZIATA NON VIENE INCORPORATA E QUINDI RILEVATA. L'ESPERIMENTO È STATO CONDOTTO 4 VOLTE. P<0,05, T STUDENT. M $\pm$ DS. .... 122**

**FIGURA 27: ESPERIMENTI RAPPRESENTATIVI DI MISURAZIONE DELLA PRODUZIONE DI CITOCHINE (MRNA) IN LINFOCITI T STIMOLATI. BARRE IN NERO, LINFOCITI T NON STIMOLATI; BARRE IN GRIGIO LINFOCITI T STIMOLATI. LINFOCITI T DEL TOPO NG2 KO E WT STIMOLATI CON ANTI-CD3 (10 $\mu$ G/ML). VALORI DI ESPRESSIONE MISURATI IN FOLD INDUCTION, RISPETTO AL NON STIMOLATO. L'ESPERIMENTO È STATO RIPETUTO SU 6 ESTRAZIONI TOTALI DI MRNA. \*=P<0,05; \*\*=P<0,001, CALCOLATI SUI CONFRONTI TRA LINFOCITI T STIMOLATI DEL TOPO WT E NG2 KO; T STUDENT. M $\pm$ DS..... 123**

**FIGURA 28: VALUTAZIONE PERCENTUALE DI MATURAZIONE DELLE DC IN SEGUITO A STIMOLO. LE DC DEL TOPO WT ED NG2 KO IN SEGUITO A STIMOLAZIONE (LPS, 10 $\mu$ G/ML) E MARCATE CON ANTI-CD11C ED ANTI-CD86, ESIBISCONO UN AUMENTO DI ESPRESSIONE DEL CD86, MA NON CI SONO DIFFERENZE TRA IL TOPO WT ED NG2 KO. .... 125**

**FIGURA 29: ESPERIMENTI RAPPRESENTATIVI DI MISURAZIONE DELLA PRODUZIONE DI CITOCHINE (MRNA) IN DC STIMOLATE. BARRE IN NERO, DC NON STIMOLATE; BARRE IN GRIGIO DC STIMOLATE. DC DEL TOPO NG2 KO E WT STIMOLATE CON LPS (10 $\mu$ G/ML). VALORI DI ESPRESSIONE MISURATI IN FOLD INDUCTION, RISPETTO AL NON STIMOLATO. L'ESPERIMENTO È STATO RIPETUTO SU 5 ESTRAZIONI TOTALI DI MRNA. P<0,05; CALCOLATI SUI CONFRONTI TRA DC STIMOLATE DEL TOPO WT E NG2 KO; T STUDENT. M $\pm$ DS. 126**