



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "SAPIENZA"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI FISIOLOGIA UMANA E FARMACOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA

in

FARMACOLOGIA

I recettori metabotropici per il glutammato
nel
sistema immunitario

Relatore Prof.ssa
Daniela Melchiorri

Correlatore Prof.
Ferdinando Nicoletti

Candidato:
Francesco Fazio

Matricola:
1186175

INTRODUZIONE

1.1 Sclerosi Multipla

La Sclerosi Multipla (SM) è la più frequente malattia infiammatoria cronica demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) e costituisce, se si escludono i traumi, la più frequente causa d'invalidità neurologica nei giovani adulti. Il nome della patologia deriva dalle molteplici aree "sclerotiche" visibili all'esame macroscopico del cervello.

La sclerosi multipla è caratterizzata da un processo di degenerazione della mielina, causata da fenomeni di autoimmunità. L'eziologia di questa patologia, così come alcuni aspetti patogenetici, rimangono, tuttavia, ad oggi ancora da comprendere.

La guaina mielinica che si avvolge a spirale attorno agli assoni dei neuroni del SNC, è costituita da estese propaggini della membrana plasmatica degli oligodendrociti. Ogni oligodendrocita fornisce la mielina per un solo segmento di più assoni e ogni assone è avvolto da segmenti mielinici forniti da oligodendrociti diversi.

La guaina mielinica non è continua, infatti, lungo l'assone ci sono delle interruzioni della guaina, tra un segmento e l'altro, definite nodi di Ranvier, in cui la membrana assonale eccitabile, ricca di canali per il sodio, è esposta al liquido extracellulare.

La mielina, in vivo, ha un contenuto di acqua di circa il 40%. La massa secca è costituita per il 70-85% da lipidi e per il restante 15-30% da proteine.

Non ci sono lipidi specifici della mielina, ma il cerebroside è il lipide più tipico. Le proteine maggiormente rappresentate nella mielina sono la proteina basica della mielina (MBP, 30%), la proteina proteolipidica (PLP, 50%), la 2',3'-nucleotide ciclico 3'-fosfodiesterasi (CNPasi), e costituenti minori ma di importante significato funzionale, la glicoproteina associata alla mielina (MAG) e la glicoproteina oligodendrocitaria della mielina (MOG).

Studi immunocitochimici hanno evidenziato la localizzazione delle maggiori proteine della mielina (Brunner e coll, 1989).

La PLP è una proteina integrale di membrana, con numerosi domini idrofobici che attraversano il doppio strato lipidico.

La MBP è una proteina estrinseca, localizzata esclusivamente nella superficie citoplasmatica della membrana. Entrambe le proteine sembrano stabilizzare la struttura multilamellare della mielina.

La CNPasi è localizzata prevalentemente nell'interfaccia mielina-assone.

La MAG è una glicoproteina che viene espressa precocemente nei processi periferici delle cellule mielinizzanti; è una componente minore della guaina mielinica compatta matura. Si localizza principalmente sulla faccia della guaina mielinica ad immediato contatto con l'assone.

La sua espressione precoce, la localizzazione subcellulare e la somiglianza strutturale con i componenti della superfamiglia delle Immunoglobuline, suggeriscono che questa proteina abbia un ruolo nelle fasi precoci della mielinizzazione, promuovendo l'adesione tra la cellula mielinizzante e l'assone.

La MOG è stata originariamente identificata come una glicoproteina minore specifica del SNC (Linington e coll, 1988) .

Con la microscopia elettronica la MOG è stata localizzata nei processi degli oligodendrociti e nella superficie esterna della guaina mielinica del SNC del ratto adulto (Linington e coll, 1988).

Gli studi di Brunner e coll, del 1989, hanno confermato la localizzazione esterna della MOG.

Nei ratti e nei topi l'espressione di mRNA che codifica per la MOG è massima durante il picco di mielinizzazione, rimane ad alti livelli durante tutto lo sviluppo e si riduce nel periodo di vita successivo.

L'espressione tardiva e la localizzazione esterna nella superficie mielinica, suggeriscono che la glicoproteina possa trasdurre il segnale di arresto della mielinizzazione partecipando al mantenimento e al completamento della guaina mielinica.

1.2 Epidemiologia

Storicamente la sclerosi multipla è stata descritta per la prima volta da Cruveilhier e Carswell nel 1835.

Dal punto di vista epidemiologico la SM colpisce le donne con una frequenza doppia rispetto agli uomini, ed ha un'incidenza che, dall'adolescenza, aumenta progressivamente fino ai trentacinque anni, per poi diminuire gradualmente. Colpisce oltre 1 milione di persone in tutto il mondo, di cui 450.000 nella sola Europa.

La SM è una malattia a diffusione ubiquitaria che si manifesta più frequentemente alle latitudini sopra il 40° parallelo; nella distribuzione della SM sono stati identificati alcuni focolai "grappoli" (aree geografiche ristrette o popolazioni circoscritte con tasso molto elevato di malattia).

Ciò suggerisce che un fattore ambientale, ad esempio un virus, possa essere implicato nel determinare la malattia; inoltre, particolari caratteristiche genetiche sono state riscontrate in popolazioni, o gruppi familiari, in cui la frequenza della malattia è più elevata, rispetto a popolazioni che non esprimono lo stesso marker genetico.

Questi e altri studi hanno contribuito all'elaborazione della teoria patogenetica, secondo la quale un'esposizione precoce ad un agente ambientale potrebbe essere un fattore scatenante lo sviluppo della SM in persone geneticamente predisposte.

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che la patogenesi della malattia sia dovuta ad una risposta autoimmune (Martin e McFarland, 1995), forse scatenata da un'infezione virale, ma l'antigene in grado di scatenare tale risposta rimane tuttora sconosciuto.

Statisticamente, l'8-15% delle persone affette da SM presenta un quadro grave fin dall'esordio che tende a peggiorare rapidamente: questa è la forma chiamata " primaria progressiva".

Il restante 85-92% è costituito dalla forma cosiddetta "relapsing/remitting", cioè con alternanza di fasi di remissione e riacutizzazione.

Una buona metà di questi pazienti è inizialmente autonoma, ma col tempo peggiora, mentre il restante 30-40% di essi riesce in qualche modo a mantenere una sufficiente autonomia per tutta la vita con periodiche e transitorie fasi di aggravamento.

Esiste inoltre una forma “fulminante” o “rapidamente progressiva”, fortunatamente molto rara, che porta l'individuo colpito sin dall'esordio ad un'immediata invalidità, unitamente ai sintomi caratteristici della malattia.

1.3 Eziopatogenesi

L'eziologia della sclerosi multipla è ad oggi ancora sconosciuta, ma la peculiare distribuzione geografica (che prevede di individuare zone ad alto rischio, zone a medio rischio e zone a basso rischio) ha indotto a ipotizzare che un fattore ambientale, a sua volta correlato alle condizioni climatiche, sia coinvolto nella induzione della patologia.

Tra i vari fattori di rischio possibili, il più importante sembra consistere nell'esposizione del SNC a infezioni sostenute da alcuni virus largamente diffusi come gli Herpes virus, i virus delle malattie infettive infantili (morbillo, parotite ecc.) e il virus EBV. Queste infezioni risulterebbero rischiose soprattutto se contratte nel periodo della pubertà.

Secondo alcuni studi la SM potrebbe dipendere da una risposta immunitaria abnorme, da parte di individui geneticamente predisposti, a virus che possono persistere a lungo nel sistema nervoso.

Sebbene non vi siano attualmente prove di una causa virale specifica, è chiaro che infezioni virali o di altro tipo stimolano una risposta immune anormale in pazienti con SM.

Altri studi sostengono che le placche di demielinizzazione possono dipendere dalla morte cellulare rapida degli oligodendrociti, le cellule nervose che producono e mantengono la mielina nel SNC. La morte può essere provocata da mediatori chimici rilasciati in un processo infiammatorio a carico del SNC e potrebbe avvenire per intossicazione cellulare o per apoptosi.

Nota è anche il papovavirus JC che provoca demielinizzazione in una malattia chiamata leucoencefalopatia multifocale progressiva (LMP).

Altri studi ancora sostengono che nella SM la mielina potrebbe presentare anomalie strutturali tali da renderla chimicamente simile alla mielina immatura infantile e quindi sensibile all'attacco di antigeni patogeni esterni.

Indipendentemente dal fattore scatenante, la maggior parte dei ricercatori concordano che la SM e in particolare il processo di distruzione della guaina mielinica dipendono da fenomeni di autoimmunità. Questo fenomeno può dipendere da una sensibilizzazione abnorme contro antigeni cerebrali specifici, in particolare quelli associati a alle proteine della guaina mielinica.

Poiché alcuni isomeri della MBP vengono sintetizzati nel tessuto linfatico si è pensato che la sensibilizzazione dei linfociti possa aver luogo al di fuori del SNC, ma essa viene amplificata all'interno del cervello a causa delle stimolazioni di altri linfociti e cellule gliali da parte delle citochine.

1.4 Il sistema immunitario nella patogenesi della SM

La reazione immunitaria nella patogenesi della Sclerosi Multipla mette in risalto diverse osservazioni cliniche che possono essere riassunte come segue: - evidenze istopatologiche con infiammazione organo- specifica e distruzione selettiva della mielina, con conseguente aumento dei livelli di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ e di cellule microgliari esprimenti l'MHC classe II nelle lesioni del cervello.

- aumento sistemico e a livello del fluido cerebro spinale (CSF) di IFN- γ .
- pronunciata risposta dei linfociti B a livello del SNC e riflessa nel fluido cerebrospinale da un elevato numero di cellule mononucleari e da un aumento della produzione di IgG.

- stretta correlazione tra espressione dei geni HLA di classe II e aumento del rischio di induzione della malattia.

- un decorso clinico e una istopatologia “MS-LIKE”, provocata dall’immunizzazione di animali con inoculo di antigeni della mielina o mediante trasferimento passivo di cellule T specifiche per la mielina.

1.5 Funzioni della guaina mielinica

Quando la fibra nervosa viene eccitata in un punto, si creano circuiti di depolarizzazione che si propagano passivamente lungo il decorso dell'assone; con la sola propagazione passiva dell'impulso, il potenziale avrebbe ampiezze diverse, decrescenti dal punto di origine, e si esaurirebbe in un breve spazio.

I circuiti di depolarizzazione sono degli anelli di corrente che attraversano la membrana cellulare; se l'ampiezza della corrente in uscita supera un determinato valore soglia, si evoca la produzione attiva di un potenziale d'azione (PdA), mediante apertura di canali ionici voltaggio-dipendenti.

Con l'attiva evocazione del PdA, l'impulso propagato ha ampiezza costante, essendo generato ex novo in frammenti adiacenti di membrana, e può essere propagato per uno spazio indefinito, ma la velocità di conduzione viene rallentata del tempo necessario a creare attivamente la depolarizzazione di membrana.

La guaina mielinica aumenta la resistenza elettrica di membrana e, quindi, aumenta la costante di spazio (distanza alla quale l'ampiezza del potenziale elettrico si riduce ad un terzo del potenziale di partenza); in questo modo il PdA, propagato passivamente lungo gli internodi, rimane sopra alla soglia di depolarizzazione per uno spazio maggiore.

Il PdA viene attivamente evocato solo a livello dei nodi di Ranvier, dove la resistenza di membrana è minima, essendo dovuta solo alla resistenza della membrana dell'assone stesso. Tale meccanismo, definito conduzione saltatoria, aumenta la velocità di conduzione, riducendo i punti in cui il potenziale deve essere creato ex novo.

Le fibre mieliniche hanno quindi una velocità di conduzione maggiore delle fibre prive di guaina mielinica e le lesioni demielinizzanti provocano un rallentamento della conduzione, fino al blocco.

Dal punto di vista patogenetico (patologico) la reazione auto-immune potrebbe essere scatenata da uno o più antigeni proteici contenuti nella mielina, come la proteina basica della mielina (MBP), la glicoproteina associata alla mielina (MAG), la glicoproteina della mielina oligodendrocitaria (MOG) e la proteina proteolitica (PLP).

1.6 Caratteristiche istologiche

Le caratteristiche istologiche mostrano lesioni a livello del sistema nervoso centrale, soprattutto a carico della sostanza bianca, con infiltrati infiammatori, demielizzazione, astrogliosi e danno assonale.

Le lesioni anatomo-patologiche, dette placche, disseminate a livello della sostanza bianca dell'encefalo e del midollo spinale, sono caratterizzate da infiltrati cellulari, aree di demielinizzazione e gliosi.

Istologicamente le lesioni alle fibre nervose sono classificate in acute e croniche, attive ed inattive: le prime acute attive mostrano una distruzione della guaina mielinica con risparmio assonale, in una zona formata dalla confluenza di piccoli foci di infiltrato perivenoso (cellule mononucleate). L'assetto più importante delle lesioni in fase attiva è la presenza di un focolaio edematoso e di un infiltrato perivascolare contenente leucociti mononucleati comprendenti

linfociti T, linfociti B, plasmacellule e macrofagi che esercitano il loro potenziale patogenico attraverso meccanismi di citotossicità e rilascio di citochine proinfiammatorie di tipo 1 (Th1) quali IL-1 (interleuchina-1), IL-2, IL-12, IL-18, IFN- γ (interferon gamma), TNF- α (tumor necrosis factor), coinvolti nel danneggiamento della guaina mielinica.

Si ritiene che la causa diretta della formazione di infiltrato perivascolare, nonché il primo evento riconoscibile nella sequenza che porta alla demielinizzazione, consista in un danno alla barriera emato-encefalica con conseguente aumento della permeabilità della stessa barriera all'acqua e alle proteine plasmatiche.

Segni e sintomi clinici sono molto variabili e dipendono da quale parte del SNC viene interessata e induce una disabilità motoria, sensitiva e cognitiva.

1.7 Fisiopatologia

Le caratteristiche sintomatologiche sclerosi multipla sono dovute alle anomalie mieliniche delle vie centrali.

Durante la fase acuta dell'attacco si sviluppa un'area focale di infiammazione con alterazione della barriera emato-encefalica ed edema, che provoca un blocco di conduzione locale degli impulsi lungo i fasci di fibre. Ne risultano sintomi negativi.

Col tempo vi è una risoluzione della fase acuta nella quale il recupero della funzione coincide con la rimozione delle citochine infiammatorie dannose e la regressione dell'edema.

La demielinizzazione è una componente attiva della lesione, mentre gli assoni sono largamente risparmiati.

La distruzione e la rimozione della guaina mielinica risulta in una perdita della conduzione rapida saltatoria degli impulsi.

Inoltre l'assone denudato va incontro a modificazioni nella distribuzione dei canali sodio e potassio con conseguente perdita dell'efficienza della conduzione e un'incapacità a propagare lo stimolo. Gli assoni demielinizzati sono particolarmente sensibili all'aumento di temperatura (febbre, elevata temperatura ambiente) e alle variazioni dei livelli di calcio ed altri elettroliti, con conseguenti possibili fluttuazioni temporanee nell'espressione dei sintomi.

Nella fase precoce della malattia, gli attacchi si presentano tipicamente come una semplice perdita di funzione, come cecità monocolare (neurite ottica), debolezza, parestesia, atassia o diplopia, a seconda della via colpita.

Vi possono essere anche sintomi positivi, specialmente con la progressione della malattia. Questi possono manifestarsi con semplici parestesie con formicolio al volto alle mani o ai piedi o come una fascia in corrispondenza di un dermatomero toracico o essere piuttosto intensi come nel caso di dolori facciali parossistici simili ad una nevralgia trigeminale, di spasmi tonici in estensione degli arti inferiori o del segno di Lhermitte. Si pensa che questi brevi segni positivi siano dovuti all'insorgenza abnorme e alla diffusione efastica locale di scariche lungo gli assoni demielinizzati delle vie sensitive o motorie.

Il segno di Lhermitte si presenta come una sensazione di scarica "elettrica" lungo il dorso e fino agli arti inferiori in seguito alla flessione del collo; probabilmente a causa della trazione locale sul midollo e sui cordoni posteriori che provocano la comparsa di scariche dalla lesione locale. Questo è un segno frequente ma non specifico della SM e si ritrova anche in presenza di altre cause di danno locale come nella spondilosi cervicale.

Le manifestazioni cliniche della SM, come quelle delle altre malattie infiammatorie croniche, sono variabili da una forma benigna ad una varietà rapidamente progressiva ed invalidante.

I sintomi della SM possono essere molteplici, in quanto sono il risultato di una demielinizzazione diffusa nel sistema nervoso centrale che porta ad una trasmissione elettrica deteriorata degli impulsi nervosi dalle diverse zone cerebrali.

I sistemi comunemente colpiti includono:

- la visione (offuscamento visivo, diplopia, neurite ottica, movimenti oculari rapidi involontari, raramente totale perdita della vista)
- la coordinazione (perdita dell'equilibrio, tremore, atassia, vertigini, mancanza di sensibilità ad un arto, mancanza di coordinazione)
- debolezza
- spasticità
- alterazioni della sensibilità (formicolii, parestesie, sensazioni di bruciore in un'area del corpo, nevralgia del trigemino)
- la parola (rallentamento della parola, pronuncia difettosa delle parole, cambiamenti del ritmo dell'eloquio)
- il controllo delle vescica urinaria (minzione frequente, sensazione di svuotamento incompleto)
- la sessualità (impotenza, eccitazione sessuale)
- le funzioni cognitive (problemi di memoria a breve termine, di concentrazione, di giudizio e ragionamento)

Non vi è una SM tipica: molti pazienti affetti da SM presentano più di un sintomo e, sebbene vi siano sintomi che sono comuni a molti pazienti, nessuno di loro presenta tutti i sintomi rilevati nel quadro morboso.

1.8 Forme di sclerosi multipla

Nella maggior parte dei pazienti con sclerosi multipla i segni ed i sintomi tendono a comparire e a scomparire, soprattutto nella fase iniziale della malattia, cioè nei primi anni. La comparsa dei sintomi viene definita “recidiva” o “poussées”, con la quale si intende una situazione di fase attiva della sclerosi multipla; essa si manifesta con la comparsa di nuovi sintomi o con l'aggravarsi di sintomi preesistenti. La scomparsa completa o incompleta dei sintomi viene

invece indicata con il termine di “remissione”. Ad una ricadiva, nella forma recidivante-remittente, segue un periodo di remissione.

L’intervallo che intercorre tra due ricadute non è un dato costante nella sclerosi multipla, poiché può variare da un periodo di settimane ad alcuni anni. Nel primo periodo della malattia le ricadute sono seguite da una completa ripresa del paziente; tuttavia, col trascorrere del tempo la regressione, che segue alla ricaduta, tende a farsi sempre meno completa. La forma recidivante-remittente è caratterizzata da assenza di progressione tra una ricaduta e l'altra. Dai 5 ai 10 anni in media dal suo esordio, la forma recidivante-remittente può evolvere in una forma secondariamente progressiva. Oggi non è possibile prevedere quando, né in che forma la malattia si esprimerà alla prossima ricaduta. Non si è in grado di conoscere quale area del sistema nervoso centrale verrà colpita, con che intensità, o in quali tempi. In questo sta l’alta imprevedibilità della sclerosi multipla. Si è tuttavia riscontrato che a seguito di un’infezione virale (ad esempio dopo un episodio influenzale) e in periodi di particolare stress, vi è un’alta probabilità di incorrere in una ricadiva. Rimane comunque difficile generalizzare sugli eventi scatenanti, di fronte ad una malattia così mutevole, polimorfa e ampiamente imprevedibile.

1.8.a Fase transizionale

La forma recidivante-remittente, in alcuni pazienti, dopo alcuni anni può entrare in una fase di transizione. In questo caso gli attacchi si ripetono a frequenza ravvicinata senza entrare, quasi mai, nello stato di quiescenza. L’intervallo che intercorre tra una ricaduta e l’altra è molto breve e solitamente gli attacchi tendono ad avere lo stesso bersaglio. Questo stadio rappresenta la condizione più difficile e più impegnativa poiché corrisponde ad un peggioramento costante

delle condizioni del paziente che è ad alto rischio di sviluppare sclerosi multipla secondaria progressiva.

1.8.b Forma progressivo-secondaria

La forma secondaria progressiva ha un andamento iniziale di tipo recidivante-remittente cui fa seguito una forma secondariamente progressiva che si presenta con o senza recidive superimposte e con possibili fasi di relativa remissione e stabilizzazione. Nel caso in cui si verificano delle ricadute, i recuperi sono incompleti e si assiste ad una progressione dei deficit anche nei periodi che intercorrono tra una ricaduta e l'altra.

1.8.c Forma progressiva-primaria

In alcuni casi la malattia evolve fin dall'esordio con un andamento progressivo caratterizzato da possibili fasi di relativo miglioramento e stabilizzazione.

1.8.d Forma progressivo-recidivante

La forma progressivo-recidivante è caratterizzata da un decorso progressivo fin dall'esordio, con recidive seguite o meno da recupero. Gli intervalli tra una ricaduta e l'altra sono caratterizzati da una continua progressione della malattia, a differenza della forma recidivante-remittente dove l'intervallo che intercorre tra due ricadute è privo di progressione.

1.8.e Forma benigna.

La forma benigna della sclerosi multipla è caratterizzata, da un recupero completo dopo uno o due recidive e dall'assenza di deficit permanenti. La diagnosi di sclerosi di tipo benigno è molto difficile e può avvenire solo dopo 10-15 anni dall'esordio dei primi sintomi. Tale forma è associata a sintomi meno severi generalmente legati ad una alterazione della sensibilità.

1.8 Decorso e prognosi

La più importante caratteristica clinica della SM consiste nell'intermittenza delle manifestazioni cliniche, con un tipo di progressione della malattia caratterizzato da una serie di attacchi, ognuno dei quali lascia un certo grado di invalidità.

Kurtzke aveva segnalato che la caratteristica più importante nella prognosi dell'invalidità a lungo termine, era rappresentata dal grado di invalidità presente a 5 anni dal primo sintomo. Dopo un certo numero di anni, il paziente mostra una maggiore tendenza ad entrare in una fase di deterioramento lento, costante o fluttuante, delle funzioni neurologiche, attribuibile all'aumento numerico delle lesioni.

Al contrario di quanto si ritiene comunemente, la gravidanza non ha un effetto negativo sulla SM. La gravidanza è piuttosto associata a stabilità clinica o addirittura a miglioramento del quadro, come per molte malattie autoimmuni. La frequenza delle riesacerbazioni diminuisce ad ogni trimestre, fino ad arrivare, nel terzo trimestre, a meno di un terzo di quella attesa. Vi è però un probabile aumento del rischio di riesacerbazioni (fino al doppio) nei primi mesi dopo il parto.

La durata della malattia può essere estremamente variabile. Si presume che duri fino al raggiungimento dell'andropausa per i maschi e della menopausa per le donne. In ogni caso, la durata della vita di un paziente con SM non differisce da quella di un non affetto.

1.9 Terapia

La maggior parte dei trattamenti disponibili sono farmaci "sintomatici", incapaci, quindi, di modificare i meccanismi alla base della malattia e l'andamento della malattia stessa. I farmaci d'elezione sono: i corticosteroidi, gli immunosoppressori, gli antispastici, gli antidolorifici ed i farmaci per l'incontinenza urinaria. Occorre includere in questa categoria anche la riabilitazione, che consente di migliorare la qualità di vita del paziente. Abbandonato l'approccio sintomatico iniziale, negli ultimi decenni la ricerca si è focalizzata sulla cosiddetta disease-modifying therapy (DMT), ossia un intervento farmacologico mirato a contrastare i meccanismi di neuroinfiammazione che stanno alla base della sintomatologia clinica. Un trattamento ottimale dei processi patologici richiede un'attenta considerazione delle molte forme in cui la malattia può presentarsi ed un monitoraggio accurato del paziente durante tale periodo. Farmaci che vengono adoperati per una forma RRMS potrebbero, ad esempio, rivelarsi inadeguati per una CIS (Clinically isolated Syndrome). L'utilizzo di alcuni strumenti farmacologici inizialmente efficaci potrebbe, inoltre, risultare inadeguato col progredire della malattia a causa di una perdita di efficacia degli stessi. Altri farmaci con effetti collaterali potenzialmente gravi possono risultare essenziali qualora sia impossibile o inefficace l'utilizzo di altri. Pur essendo varie le forme di progressione della malattia, l'IFN- β rappresenta il farmaco d'elezione nella terapia iniziale della Sclerosi Multipla ed in particolare nelle RRMS. Questo è un polipeptide, normalmente prodotto dai fibroblasti, che possiede effetti antivirali ed antiproliferativi. Il legame dell'IFN- β al suo recettore induce una complessa risposta trascrizionale. Nelle cellule del

sistema immunitario, il polipeptide riduce la presentazione dell'antigene, la proliferazione delle cellule T, il loro passaggio dalla periferia al SNC ed induce un cambiamento nella produzione di citochine. Studi recenti evidenziano il ripristino di una funzione soppressiva, che sembra essere deficitaria in pazienti affetti da SM. In terapia vengono adoperate due forme di IFN- β 1b (Betaferon/Betaferon) ed IFN- β 1a (Avonex, Rebif) somministrabili sc o im. Le differenze tra le due forme di IFN- β non sono di carattere farmacodinamico, ma, piuttosto farmacocinetico, essendo l'IFN- β 1a SC e l'IFN- β 1a IM somministrabili rispettivamente settimanalmente ed ogni tre giorni, mentre l'IFN- β 1b deve essere somministrato giornalmente. Tale divergenza nel profilo farmacocinetico plausibilmente è ascrivibile alla glicosilazione dell'IFN- β 1a, essendo questo prodotto in linee di cellule eucariote, ciò comporterebbe una diminuita formazione di aggregati ed immunogenicità (l'IFN- β 1b viene prodotto in linee batteriche). Durante il trattamento con IFN- β è possibile che il paziente sviluppi anticorpi neutralizzanti (NAbs). Sebbene l'influenza che un tale evento possa avere sull'efficacia del trattamento sia tuttora oggetto di pareri contrastanti, è da considerare come in paziente con un alto titolo anticorpale sia riscontrabile un peggioramento sia nelle fasi di riacutizzazione che nei parametri MRI, pur non assistendo ad un declino nel livello di disabilità dell'individuo. Un altro farmaco adoperato per le RRMS è il Glatiramer, un polipeptide costituito da quattro aminoacidi (alanina, lisina, glutammato e tirosina). Somministrato per via sottocutanea, riduce il di 1/3 le riacutizzazioni e previene la comparsa di nuove lesioni evidenziabili attraverso MRI (Magnetic Risonance Imaging). Sebbene sia dimostrato spostare il bilancio della popolazione di cellule T da infiammatorio (Th1) a "regolatorio" (Th2) e vista la sua relazione strutturale con tratti della proteina basica della mielina (MBP), tale da giustificarne una possibile funzione decoy, il reale meccanismo d'azione non è ben compreso. Il glatiramer può essere causa nelle donne di lipotrofia, evento che porta spesso le pazienti ad abbandonare tale terapia. Per le forme refrattarie di RRMS e nelle SPMS ad altri immunomodulatori il Mitoxantrone (Novantrone) rappresenta il

farmaco di scelta, riducendo le riacutizzazioni fin al 67% e diminuendo la progressione nella scala di disabilità (E DSS). Agisce come intercalante del DNA, sopprimendo la risposta umorale e cellulare del sistema immunitario. Viene somministrato iv (quattro infusioni ogni tre mesi). Tipici degli altri antitumorali sono gli effetti avversi, anche gravi, quali: mielosoppressione, nausea e vomito, che ne limitano l'utilizzo. L'anticorpo umanizzato anti-alfa(4) integrina Natalizumab rappresenta un trattamento efficace per le RRMS, sebbene l'elevato rischio di leucoencefalopatie multifocali restringe il campo di applicazione ai soggetti refrattari alle terapie comuni. Impedendo il contatto delle cellule del sistema immunitario con la barriera ematoencefalica, rallenta il processo infiammatorio. Negli attacchi acuti si preferiscono i glucocorticoidi (1g/die di metil-prednisolone e.v. 3-5 giorni). Come farmaco di ultima generazione l'FTY720 (Fingolimod), un analogo strutturale della sfingosina-1-fosfato (S1P), adoperato sia nelle RR che nelle forme progressive di Sclerosi multipla, presenta tra i suoi vantaggi, la somministrazione orale. Le sue proprietà immunomodulatorie sono principalmente correlate alla sua abilità nell'intrappolare i linfociti negli organi linfoidi secondari, riducendo la loro disponibilità per le risposte immunitarie cellulo-mediate. La sua capacità di attraversare la barriera ematoencefalica, contrariamente agli altri immunomodulatori, ne favorisce un'ulteriore azione a livello del SNC, essendo i suoi recettori presenti in cellule quali: astrociti, microglia, progenitrici degli oligodendrociti, oligodendrociti e neuroni.

2.1 L'encefalomielite allergica sperimentale (EAE)

L'encefalomielite allergica sperimentale (EAE) è considerata il modello animale più fedele alla SM umana. Grazie allo studio di animali con EAE oggi possiamo avvalorare la nostra conoscenza sulla patogenesi della SM. Essa è una sindrome autoimmune demielinizzante mediata dai linfociti T che riconoscono specificamente alcune componenti della mielina. L'EAE può essere indotta sperimentalmente, in animali sensibili, mediante vari antigeni (da cui i diversi modelli): materiale cerebrale in toto, sostanza bianca intera, midollo spinale, mielina purificata o suo epitopo encefalitogeno (MBP, PLP, MOG), oligodendrociti purificati e con trapianto di linfociti precedentemente attivati contro la mielina. La malattia può avere un decorso recidivo/remittente o cronico a seconda del ceppo animale e dei protocolli di immunizzazione. L'induzione di EAE viene effettuata seguendo due metodiche:

Immunizzazione attiva: indotta tramite iniezione, generalmente intradermica, di estratti cerebrali, di MBP o del sito encefalitogeno emulsionati in adiuvanti (sostanze che, somministrate con un antigene, ne aumentano l'immunogenicità), questi ultimi spesso costituiti da un olio minerale e micobatteri (adiuvante completo di Freund); **Immunizzazione passiva** (transfer passivo; immunizzazione passiva; transfer adottivo) vengono trasferite sospensioni di cellule linfoide, isolate da animali precedentemente immunizzati, in animali riceventi singenici (individui dello stesso ceppo che hanno una costituzione genetica pressoché identica) o in ospiti a cui il sistema immunitario è stato distrutto con una dose sub letale di radiazioni. Le cellule effettrici responsabili del trasferimento dell'EAE sono state identificate come linfociti T CD4⁺.

Le indagini analitiche hanno rivelato che il principale antigene implicato nell'induzione dell'EAE è rappresentato dalla MBP o antigene M1, denominato anche proteina basica encefalitogena. Questa proteina costituisce il 30% circa del contenuto proteico totale della mielina ed è rappresentata anche nel citoplasma degli oligodendrociti (cellule sintetizzanti la mielina).

2.2 Decorso clinico dell'EAE

L'EAE è caratterizzata da un decorso clinico evidenziabile da paresi ascendente degli arti, con conseguente difficoltà alla deambulazione, perdita di peso, disturbi della minzione e delle funzioni intestinali. Tali manifestazioni cliniche e anatomo-patologiche dell'EAE sono correlate non soltanto alla specie ed al ceppo, ma anche ai protocolli di immunizzazione. Si riconoscono almeno sei forme di EAE, due delle quali rivestono maggiore importanza ai fini della correlazione EAE/SM.

Nell'EAE monofasica, indotta nei ratti Lewis, i deficit neurologici compaiono fra il 9° e l'11° giorno dall'induzione, raggiungendo un picco massimo intorno al 13° giorno. Gli animali presentano un decorso della patologia di tipo monofasico con completa "restitutio ad integrum" (90% dei casi) intorno al 21-27 giorno rispetto al giorno di immunizzazione. Gli animali, raggiunta la guarigione, risultano resistenti a nuovi tentativi di re-induzione della patologia (EAE). Nella forma acuta generalizzata o monofasica, la demielinizzazione è preceduta da un'invasione del tessuto cerebrale da parte di piccoli linfociti. Questi linfociti, identificati come cellule T CD4⁺, già al quinto giorno dopo l'immunizzazione cominciano ad attraversare (diapedesi) l'endotelio dei piccoli vasi nel SNC e ad indurre alterazioni infiammatorie della mielina. Più tardivamente, cioè immediatamente prima della comparsa delle manifestazioni cliniche, compaiono, in prossimità degli spazi perivascolari, cellule B e macrofagi. La forma monofasica può essere indotta sia per immunizzazione attiva che per trasporto passivo di linfociti CD4⁺.

La forma cronica o cronicorricorrente è stata inizialmente segnalata da Stone e Lerner in alcuni ceppi di cavie, preferibilmente di sesso maschile (le femmine sono più suscettibili e presentano maggior tasso di mortalità), immunizzate in età precoce (1-2 settimane di vita) con una singola

dose di midollo spinale singenico in adiuvante completo di Freund, iniettato nella regione della nuca. Con tale protocollo, dopo un lungo periodo di latenza (da 8 a 12 settimane) insorge una malattia a basso quoziente di mortalità che perdura, con fasi di riacutizzazione e fasi di remissione, per tutta la vita dell'animale. Modelli analoghi sono oggi disponibili nel coniglio e nel ratto. In queste forme di EAE il meccanismo di demielinizzazione è essenzialmente simile a quello delle forme monofasiche: ad ogni fase di riacutizzazione clinica corrispondono nuove ondate, a livello del SNC, di linfociti T e di macrofagi, e nuove lesioni demielinizzanti vanno ad aggiungersi a quelle preesistenti; parallelamente il numero dei linfociti T attivati del sangue periferico decresce. Nelle fasi croniche o in quelle di remissione sono evidenziabili fenomeni di astrogliosi fibrosa a livello della sostanza bianca demielinizzata, e ciò conferisce al parenchima cerebrale un aspetto simile a quello delle placche riscontrabili nella SM dell'uomo. In questo stadio sono presenti numerose plasmacellule e può verificarsi un certo grado di remielinizzazione. Le lesioni più piccole possono andare incontro a remielinizzazione completa, mentre le aree più estese quasi invariabilmente rimangono demielinizzate al centro.

Lo studio delle varie forme di EAE è di rilevante importanza ai fini della comprensione dei disordini demielinizzanti nell'uomo. La forma monofasica di EAE, ad esempio, è quella che più si avvicina alla variante acuta, tipo Marburg, della SM (rara), mentre la forma cronica o, meglio, cronico-ricorrente di EAE è il modello animale che, pur con molte dissimilitudini, rispecchia fedelmente la SM umana nella sua tipica e frequente forma cronica attiva.

2.3 Il sistema immunitario nella EAE

2.3a Linfociti T

I linfociti T, che esprimono il marcatore di membrana CD4⁺, sono coinvolti nel meccanismo patogenetico dell'EAE. Di recente è stato osservato che anche nei topi mutanti PL/J CD4⁻ può

essere indotta l'EAE. Anche se i linfociti T CD4⁺ sono le prime cellule effettrici nell'EAE, altri linfociti possono stare alla base delle funzioni helper effettrici, nei topi geneticamente modificati per CD4. E' stato dimostrato *in vitro* che le cellule T CD4⁺ encefalitogeniche possiedono distinte proprietà citotossiche verso gli astrociti, mentre i linfociti T non encefalitogeni non mostrano la stessa capacità citotossica, a tal proposito possiamo classificarle in due famiglie: cellule encefalitogeniche (citotossiche) e cellule non-encefalitogeniche (non citotossiche). Distinte proprietà funzionali dei cloni dei linfociti T di indurre l'EAE dipendono dalla loro capacità di produrre differenti classi di molecole effettrici (citochine). Così, i cloni dei linfociti T encefalitogeni producono IFN- γ e TNF- α , mentre i cloni non encefalitogeni producono IL-4. Alla luce dei più recenti studi sui cloni di linfociti T CD4⁺ murini, si è proposta la classificazione in due differenti sottopopolazioni in base alle caratteristiche funzionali e di secrezione di citochine.

Le cellule T helper 1 (T_{H1}) secernono IL-2, IFN- γ e TNF- α o linfotossine e inducono la risposta immune, mentre i T helper 2 (T_{H2}) secernono IL-4, 5, 6, 10 e 13 e regolano i linfociti B. Diversi studi affermano che queste sottopopolazioni sono presenti anche nell'uomo, per i quali è stata proposta la definizione come linfociti T infiammatori ed helper. A queste due distinte sottopopolazioni è stato aggiunto un altro clone di cellule T (T_{H0}) secernente entrambi i tipi di citochine T_{H1} e T_{H2}, il quale può rappresentare il precursore dei fenotipi polarizzati T_{H1} e T_{H2}. Le sottopopolazioni T_{H1} e T_{H2} interagiscono mutualmente e spesso le citochine secrete da un clone, contrastano gli effetti e l'attivazione delle citochine secrete dall'altro clone.

Nell'EAE il ruolo delle cellule CD8⁺ è poco chiaro. Alcuni studi suggeriscono il loro coinvolgimento nei meccanismi di tolleranza nonché di soppressione dell'EAE. Possono secernere entrambi modelli di citochine, T_{H1}-like (Tc1) e T_{H2}-like (Tc2), e possono contribuire ad attivare i linfociti B. Recentemente è stato proposto di denominare le cellule che secernono prevalentemente TGF- β come T_{H3}. I linfociti CD4⁺/CD8⁺, producendo prevalentemente TGF- β ,

hanno dimostrato che questa sottoclasse è coinvolta nella protezione dall'EAE inducendo tolleranza orale alla MBP, rispettivamente nei ratti LEWIS e nei topi SJL/J.

2.3.b Linfociti B

I linfociti B hanno la capacità di produrre anticorpi diretti contro differenti antigeni mielinici e sono facilmente distinguibili negli infiltrati infiammatori del SNC. Il ruolo cruciale che si conferisce a queste cellule nell'influenzare l'EAE, appare evidente se si considera il loro coinvolgimento nel processo di stimolazione della risposta immune iniziale mediata da cellule T e nel processo di demielinizzazione. Nel primo caso agiscono da APCs o secernono anticorpi anti-MBP, i quali formano complessi con le proteine ematiche e che, dopo trasporto ai linfonodi, possono condurre ad un efficiente innesco dei linfociti T. Nel secondo caso, gli anticorpi espressi sulla superficie della mielina nel tessuto danneggiato possono essere attivati mediante distruzione operata dal complemento o mediante opsonizzazione per attacco di macrofagi.

2.4 Cellule presentanti l'antigene (APCs)

Tra le principali cellule presentanti l'antigene coinvolte nel processo infiammatorio si annoverano le cellule dendritiche, i macrofagi e i linfociti B attivati. I macrofagi attivati giocano un ruolo nella fase effettrice della malattia non solo nella presentazione dell'antigene, ma anche nella produzione di mediatori proinfiammatori non specifici, che con un aumento della permeabilità vascolare favoriscono l'edema e spesso la degradazione della mielina. Queste molecole includono citochine come IL-1 e TNF- α , ammine vasoattive, proteasi. Inoltre, le

citochine prodotte dalle APCs, come IL-2 e IL-10 costituiscono importanti fattori che partecipano all'instaurarsi della risposta immunitaria.

3.1 Recettori metabotropici per il glutammato

Il glutammato è il maggiore neurotrasmettitore eccitatorio del SNC ed agisce attraverso due classi di recettori: i recettori ionotropici ed i recettori metabotropici. Una attivazione eccessiva dei recettori ionotropici del glutammato, che sono normalmente coinvolti nella trasmissione sinaptica eccitatoria, attraverso una eccessiva entrata di calcio nei neuroni o negli oligodendrociti, ha come conseguenza una degenerazione neuronale, chiamata eccitotossicità, che è implicata nella patogenesi di molte malattie degenerative sia acute che croniche inclusa la SM.

I recettori metabotropici del glutammato, invece, sono recettori accoppiati a proteine G, che grazie alla loro localizzazione presinaptica e postsinaptica e alla loro presenza nelle cellule gliali, modulano la trasmissione sinaptica eccitatoria e rappresentano targets importanti per farmaci rivolti alla modulazione dell'attività dei neuroni glutamatergici e, quindi ad una possibile riduzione del danno eccitotossico. Sin dalla loro scoperta negli anni '80, i recettori metabotropici del glutammato (mGlu) hanno rivestito un ruolo importante nelle neuroscienze per la loro importanza nella trasmissione glutamatergica. I mGluR formano una famiglia di 8 sottogruppi, suddivisi in tre gruppi sulla base dell'omologia di sequenza, dei meccanismi di trasduzione e dei profili farmacologici. In particolare, i recettori metabotropici vengono divisi in: gruppo I, gruppo II e gruppo III.

Il gruppo I include i recettori mGlu1 e mGlu5 che sono recettori accoppiati a Gq/G11. L'attivazione di entrambi i sottotipi in cellule ricombinanti stimola l'idrolisi di PI (fosfoinositolo) con la formazione di due secondi messaggeri intracellulari, inositolo-1,4,5-trifosfato e diacilglicerolo (DAG). Ins 1,4,5-P3 rilascia calcio (Ca^{2+}) da compartimenti intracellulari, mentre il DAG attiva la proteina chinasi C (PKC). L'attivazione dei recettori mGlu del gruppo I, inoltre, stimola la formazione di cAMP, il rilascio di acido arachidonico,

l'attivazione della via delle MAP-chinasi (MAPK) e quella via del fosfatodiinositolo-3-chinasi (PI-3-K).

Il recettore mGlu1, a livello subcellulare, si ritrova in elementi postsinaptici, cellule del Purkinje e nella corteccia cerebrale, dove partecipa all'induzione della long-term depression (LTD) importante per l'apprendimento motorio.

Questo recettore è anche presente nel bulbo olfattivo, nella pars compacta della sostanza nera, nell'ippocampo e nei nuclei talamici.

L'attivazione dei recettori mGlu5, induce un aumento oscillatorio nel rilascio di calcio intracellulare. Come il recettore mGlu1, il recettore mGlu5 è localizzato negli elementi postsinaptici, dove è legato fisicamente ai recettori NMDA. L'attivazione del mGluR5 facilita l'apertura dei canali ionici NMDA dipendenti e l'attivazione dei recettori NMDA amplifica le funzioni dei recettori mGlu5 attraverso l'inibizione dei recettori desensibilizzati (LTD mgluR1). L'mGluR5 sembra coinvolto nell'apprendimento associativo.

Del gruppo II dei recettori metabotropici del glutammato fanno parte i recettori mGlu2 e mGlu3, che sono accoppiati a proteine Gi/Go. La loro attivazione inibisce la formazione di cAMP, inibisce i canali voltaggio dipendenti del Ca^{2+} , attiva i canali al K^+ , e stimola la via delle MAPK e PI-3-K. I recettori mGlu2 e mGlu3 sono omologhi e hanno funzioni e profilo farmacologico simile. Questi recettori sono maggiormente localizzati nelle regioni pre-terminali degli assoni, gli mGluR3 si trovano anche negli astrociti e microglia dove partecipano alla produzione di fattori trofici.

Il gruppo III dei recettori mGlu include i recettori mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8 che sono tutti accoppiati a proteine Gi/Go. L'attivazione del mGlu4, mGlu7, mGlu8 inibisce la formazione di cAMP, e i canali voltaggio dipendenti del Ca^{2+} ; questi tre sottotipi recettoriali sono localizzati nelle regioni terminali degli assoni e hanno l'abilità di inibire il rilascio di neurotrasmettitori in varie sinapsi nel SNC. La loro localizzazione in prossimità della zona attiva del rilascio dei neurotrasmettitori rendono questi sottotipi degli autorecettori del glutammato.

Il recettore mGlu6 ha delle caratteristiche peculiari in quanto è localizzato esclusivamente nei dendriti delle cellule bipolari della retina. L'attivazione di questo recettore crea una iperpolarizzazione delle cellule bipolari attraverso la chiusura dei canali cationici cGMP-dipendenti. Al contrario la luce riduce la stimolazione di mGluR6, lasciando aperti i canali cationici e depolarizzando le cellule bipolari.

3.2 Farmacologia dei recettori mGlu

3.2.a Caratteristiche farmacologiche generali

I recettori mGlu sono insensibili ai ligandi prototipici dei recettori ionotropici del glutammato, e cioè all'acido N-metil-D-aspartico (NMDA), all'acido alfa-amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolopropionico (AMPA) ed all'acido kainico. Essi invece vengono attivati dall'isomero 1S,3R dell'acido 1-aminociclopentan-1,3-dicarbossilico (ACPD), che non esibisce alcuna affinità di legame nei confronti dei recettori ionotropici. L'1S,3R-ACPD non è tuttavia in grado di distinguere tra i vari sottotipi dei recettori mGlu, mostrando un'elevata affinità nei confronti dei sottotipi del primo e del secondo gruppo (Schoepp et al., 1999). I primi antagonisti dei recettori metabotropici sono stati identificati negli acidi 2-amino-4-fosfonobutanoico (L-AP4) e 2-amino-3-fosfonopropionico (L-AP3). Entrambe le sostanze si sono rivelate in grado di inibire la stimolazione dell'idrolisi dei polifosfoinositidi (PI) da parte di agonisti dei recettori mGlu in fettine di aree cerebrali (Nicoletti et al., 1986; Schoepp et al., 1990; 1993). È oggi noto che tali molecole si comportano da inibitori non-competitivi, e non sono attive in cellule ricombinanti nell'inibire i recettori mGlu1 ed mGlu5. Il loro impiego nello studio dei sottotipi del primo gruppo non è dunque di grande rilevanza.

3.2.b Farmacologia dei recettori mGlu del primo gruppo

I recettori mGlu1 e -5 sono attivati selettivamente dalla 3,5-diidrossifenilglicina (DHPG). L'acido quisqualico esibisce un'elevata potenza nell'attivare entrambi i sottotipi del gruppo I (con un'affinità preferenziale nei confronti dei recettori mGlu5) ma è anche in grado di attivare i recettori mGlu3 a concentrazioni superiori a 10 μM ed è anche un classico agonista dei recettori AMPA. L'impiego dell'acido quisqualico come agonista dei recettori mGluR deve dunque essere sempre associato all'impiego di antagonisti dei recettori AMPA, quali il DNQX od il GYKI 52466. L'unico agonista in grado di discriminare tra recettori mGlu1 ed mGlu5 è la cloroidrossifenilglicina (CHPG) che, tuttavia, mostra una bassa potenza nell'attivare il recettore mGlu5. Tra gli antagonisti, una serie di derivati della 4-carbossifenilglicina, tra cui la 4-carbossi-3-idrossifenilglicina e la α -metil-4-carbossifenilglicina (MCPG) mostrano un'affinità preferenziale nei confronti dei recettori mGlu1 e solo ad alte concentrazioni sono in grado di legare i recettori mGlu5. Tali antagonisti, tuttavia, si presentano a spettro misto d'azione e sono in grado di interagire con i sottotipi del gruppo 2. Il derivato 4-carbossi-2-metilfenilglicina (LY367385) mostra affinità micromolare nei confronti dei recettori mGlu1 e non è in grado di interagire con i recettori mGlu5 (Clark et al., 1997). Un comportamento simile è esibito da un derivato aminoindolico, denominato AIDA (acido aminoindan dicarbossilico), prodotto dal prof. Pellicciari dell'Univeristà di Perugia. Di recente sono state introdotte alcune molecole in grado di interagire con i recettori mGlu1 ed mGlu5 su siti diversi da quello occupato dall'acido glutammico e di comportarsi dunque da antagonisti non-competitivi. Tali farmaci sono di grande utilità nello studio dei recettori del primo gruppo poiché possono svelarne la funzione indipendentemente dai livelli di acido glutammico presenti nello spazio extracellulare. Il composto CPCCOEt (etilestere dell'acido ciclopropancromencarbossilico) agisce come antagonista non-competitivo selettivo per i recettori mGlu1 ed è attivo a concentrazioni tra 1 e 10 μM (Annoura et al., 1996; Casabona et al., 1997). Più di recente alcuni composti caratterizzati

dalla presenza di un gruppo fenilico e di una piridina sono stati introdotti come antagonisti selettivi non-competitivi dei recettori mGlu5. Tali composti sono l'MPEP (2-metil-6-feniletinil-piridina), sintetizzato dal Dr. Fabrizio Gasparini nei laboratori Novartis di Basilea, ed i composti SIB-1757 (6-metil-2-fenilazo-piridin-3-olo) e SIB-1893 (E-2-metil-6-stiril-piridina) sintetizzati nei laboratori della SIBIA a San Diego (Varney et al., 1999).

3.2.c Farmacologia dei recettori del secondo gruppo

I recettori del secondo gruppo rappresentano un target preferenziale per il drug design da parte dei laboratori Eli Lilly ad Indianapolis. Uno dei farmaci prodotti (il derivato LY354740) è sottoposto a trials clinici come farmaco ansiolitico. Inizialmente, i migliori tools farmacologici utilizzati per attivare selettivamente i recettori mGlu2 e mGlu3 sono stati rappresentati da alcuni derivati della ciclopropilglicina, ed in particolare dai composti (2S,1'S,2'S)-2-(carbossiciclopropil)glicina (L-CCG-I), e dal suo derivato carbossilato (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarbossiciclopropil)glicina (DCG-IV), introdotti da Ishida e Shinozaki (1992) come agonisti dei recettori metabotropici. Tuttavia, i composti L-CCG-I e DCG-IV non esibiscono una grande selettività, in quanto l'L-CCG-I è in grado di attivare i sottotipi del primo gruppo mentre il DCG-IV attiva i recettori NMDA a concentrazioni superiori a 5 μ M (Hayashi et al., 1992). Una maggiore selettività è stata realizzata con il composto (2S,1'S,2'R,3'S)-2-(2-carbossi-3-metossimetilciclopropil)glicina (trans-MCG-I). Tuttavia, sono oggi disponibili composti in grado di attivare i recettori del secondo gruppo con grande potenza e selettività. Tra questi, il composto più selettivo è l'acido 2R,4R-4-aminopirrolidin-2,4-dicarbossilico (2R,4R-APDC), che non esibisce alcuna attività nei confronti di altri sottotipi. I più potenti (ma non i più selettivi) tra gli agonisti del secondo gruppo sono invece alcuni derivati del ciclopropano in cui la rotazione del ciclopropano è impedita dalla ciclizzazione con il carbonio alfa, di cui fanno parte l'acido (-)-2-

oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]esan-4,6-dicarbossilico (LY379268) e l'acido (1S,2S,5R,6S)-(+)-2-aminobicyclo[3.1.0]esan-2,6-dicarbossilico (LY354740). Tali composti hanno il considerevole vantaggio di attraversare la barriera ematoencefalica e di essere biodisponibili per via orale (Schoepp et al., 1999). L'unico agonista in grado di discriminare tra i recettori mGlu2 e mGlu3 è l'acido N-acetilaspartilglutammico (NAAG), che si comporta come agonista selettivo (ma non potente) dei recettori mGlu3 (Wroblewska et al., 1997). Quasi tutti gli antagonisti dei recettori mGlu2 e mGlu3 appartengono alla categoria dei derivati del ciclopropano o della fenilglicina. Tra i derivati del ciclopropano, le molecole più rappresentative sono il PCCG-IV (2S,1'S,2'S,3'R)-2-(2'-carbossi-3'-fenilciclopropil)glicina, che però è in grado di attivare i recettori mGlu4 ad alte concentrazioni (Thomsen et al., 1996) ed il composto Lilly LY341495 (2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carbossiciclopropan-1-il)-3-xant-9-il)propionato). Tra i derivati della fenilglicina, l'R,S- α -metil-4-tetrazolilfenilglicina (MTPG) si comporta come antagonista dotato di moderata affinità e selettività (Schoepp et al., 1999).

3.2.d Farmacologia dei recettori mGlu del terzo gruppo

I recettori del terzo gruppo (mGlu4, -6, -7 ed -8) sono selettivamente attivati dall'L-AP4, dalla L-serina-O-fosfato (L-SOP) e dal derivato fosfonato della fenilglicina (4-fosfonofenilglicina o PPG). L'attività del PPG risiede nell'isomero (+) (Schoepp et al., 1999; Gasparini et al., 1999). La L-SOP è una sostanza endogena, prodotta probabilmente per idrolisi della fosfatidilserina, i cui livelli aumentano nel cervello dei malati di demenza di Alzheimer. Benché gli agonisti non interagiscano con altri sottotipi in sistemi di espressione eterologa, l'AP4 ed il PPG sono in grado di interagire con il trasportatore Ca^{2+}/Cl -dipendente per il glutammato, e l'AP4 e l'L-SOP inibiscono in modo non competitivo la stimolazione dell'idrolisi dei polifosfoinositidi indotta

dagli aminoacidi eccitatori in fettine di ippocampo (Nicoletti et al., 1986). L'antagonista più selettivo dei recettori del terzo gruppo è il derivato alfa-metilico della L-SOP (MSOP).

3.2.e Ligandi ortosterici e modulatori allosterici dei recettori mGluR

Un modulatore allosterico positivo (PAM) o “enhancer” è, per definizione, un composto che amplifica la funzione del recettore agendo ad un sito distinto da quello di riconoscimento dei ligandi ortosterici. Nel caso del recettore mGlu4R, l'enhancer N-phenyl-7-(hydroxyimino)ciclopropano[b]chromen-1a-carboxamide (PHCCC) si lega ad un sito putativo localizzato nel dominio extracellulare N-terminale. L'enhancer amplifica la funzione in una maniera attività-dipendente, ciò significa che l'enhancer recluta solo quei recettori che sono attivati da agonisti endogeni o esogeni. Il meccanismo d'azione dei modulatori allosterici comporta diversi vantaggi rispetto ai tradizionali agonisti/antagonisti ortosterici. In prima istanza, i modulatori allosterici specifici (quelli privi di attività intrinseca) inducono effetti che sono contingenti alla copresenza dei ligandi endogeni. E', inoltre, possibile osservare una maggiore selettività dovuta alla divergenza nei siti allosterici di legame. Considerando, ad esempio, la molecola L-AP4, si nota come non abbia selettività per il recettore mGlu4 e sia in grado di attivare sia mGluR6, mGluR7 che mGluR8.

4.1 Il triptofano

Il triptofano, insieme ad altri amminoacidi quali: fenilalanina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, treonina e valina, è un amminoacido essenziale, non essendo l'organismo in grado di sintetizzarlo; deve quindi essere assunto in quantità sufficienti attraverso la dieta. Il fabbisogno giornaliero di triptofano è di circa 5 mg/Kg di peso corporeo. La dieta media di un paese industrializzato apporta circa 400-600 mg di triptofano. Studi sperimentali condotti sull'uomo hanno evidenziato che, con un regime dietetico a basso contenuto di triptofano, l'escrezione urinaria dei suoi metaboliti raggiunge i livelli minimi dopo 1-2 mesi. Le manifestazioni cliniche del deficit comprendono: fotosensibilità cutanea, dermatiti, stomatiti, glossite, disturbi gastroenterici e depressione mentale. La carenza cronica conduce alla pellagra, malattia cronica debilitante caratterizzata dalla presenza di dermatiti eritemato-desquamative, diarrea, alterazioni neurologiche e disturbi psichici di natura demenziale. La pellagra può essere anche una rara manifestazione secondaria di due patologie che riguardano strettamente il metabolismo del triptofano: i tumori carcinoidi e la malattia di Hartnup. I carcinoidi sono tumori endocrini che secernono grandi quantità di serotonina. In caso di tumore carcinoide il deficit di niacina dipende dalla riduzione della disponibilità di triptofano che viene utilizzato in gran parte per la formazione di serotonina. La malattia di Hartnup è invece un'alterazione ereditaria caratterizzata da uno scarso assorbimento di diversi aminoacidi con la dieta, tra cui il triptofano. In entrambi i casi la pellagra è determinata da una carenza del precursore della niacina e può essere curata con la somministrazione di dosi elevate di vitamina.

4.2 Il metabolismo del triptofano

Dal punto di vista strutturale L-Triptofano presenta un anello aromatico fuso ad un anello indolico, quest'ultimo unito ad una catena laterale comprendente un gruppo amminico ed uno

carbossilico. Tale aminoacido svolge nell'organismo umano funzioni biologiche fondamentali in quanto precursore di: serotonina, melatonina ed acido xantinico; il triptofano è inoltre indispensabile per la sintesi della niacina (vitamina B3). La via catabolica principale della serotonina prevede la sua ossidazione a 5-idrossiindoloacetaldeide da parte della monoaminossidasi (MAO) e l'ossidazione di quest'ultima in acido 5-idrossi-indolacetico per opera di un'aldeide deidrogenasi. Nei mammiferi, la serotonina si trova nelle cellule enterocromaffini del tratto gastrointestinale, nei neuroni serotoninergici del Sistema Nervoso Centrale (SNC) e Periferico (SNP) e nelle piastrine. Queste ultime sono ricche di serotonina ma, al contrario delle cellule enterocromaffini e dei neuroni serotoninergici, non sono in grado di sintetizzarla e devono captarla direttamente dal sangue. Durante l'aggregazione, le piastrine liberano la serotonina contenuta nei loro granuli, permettendole di partecipare al processo emostatico producendo, tra l'altro, vasocostrizione locale. Il triptofano viene trasportato all'interno delle cellule dal trasportatore degli aminoacidi neutri. Dal momento che esiste competizione tra tutti gli aminoacidi neutri per questo trasportatore, la biodisponibilità di L-triptofano è strettamente legata al tipo di dieta. La normale sintesi di serotonina nel cervello umano dipende dalla disponibilità plasmatica del suo precursore L-Triptofano. L'ingestione di alimenti ricchi di L-Triptofano aumenta il suo rapporto plasmatico con gli altri aminoacidi neutri e favorisce di conseguenza il trasporto di questo attraverso la barriera emato-encefalica (BEE). La melatonina presente in tutte le forme viventi viene sintetizzata e secreta durante la notte dalla ghiandola pineale (epifisi); ad una diminuita quantità di luce si associa un rapido aumento delle sue concentrazioni nel sangue, con un picco intorno alle 2-4 del mattino per poi ridursi gradualmente. L'esposizione alla luce inibisce la produzione della melatonina in misura dose-dipendente. Questa molecola pare risincronizzare l'organismo, mantenendo integri sistema neuroendocrino, ormoni e sistema immunitario; a dosi farmacologiche la melatonina sembra risincronizzare l'orologio biologico interno in caso di variazioni indotte da repentini cambi di fuso orario. La principale funzione biologica della niacina (impropriamente detta acido

nicotinico) è quella di essere un componente, insieme anche alla nicotinammide, di due coenzimi che intervengono in molte reazioni di ossidoriduzione, la nicotinammide adenina dinucleotide (NAD) e la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADP). La scoperta di tali composti risale alle ricerche svolte sulle cause della pellagra. Si scoprì, infatti, che tale patologia è causata da un apporto insufficiente di niacina, che aveva la proprietà di guarire una malattia del cane nota come "black tongue" (lingua nera) e considerata equivalente alla pellagra umana. Il NAD viene sintetizzato, nell'organismo, da tre diverse vie che coinvolgono, rispettivamente, la niacina, la nicotinammide e l'acido chinolinico. Il NADP, invece, viene ottenuto attraverso il legame tra un gruppo fosfato ed il gruppo OH del NAD. Sia il NAD che il NADP vengono coinvolti in molteplici reazioni di ossidoriduzione in vie enzimatiche sia cataboliche che anaboliche, fungendo da accettori di uno ione idruro (H⁻). Il NAD viene utilizzato anche come substrato da tre classi enzimatiche, due delle quali sono capaci di scindere il legame tra la nicotinammide ed il ribosio e di trasferire il ribosio adenosindifosfato alle proteine, rispettivamente la mono-ADP-ribosiltrasferasi e la poli-ADP ribosio polimerasi, mentre la terza è in grado di generare ADP-ribosio ciclico, usato come secondo messaggero da parte delle cellule.

4.3 La via delle chinurenine

Il metabolismo di L-triptofano segue diverse strade, una di queste porta alla produzione di importanti composti neuroattivi, come la 5-idrossitriptamina (5-HT o serotonina) e la N-acetil-5-metossitriptamina (melatonina), rispettivamente un neurotrasmettitore ed un neuormone (Grahame-Smith DG., 1967; Axelrod and Wurtman, 1968). La percentuale maggiore del catabolismo di L-triptofano all'interno del Sistema Nervoso Centrale dipende dalla cosiddetta "via delle chinurenine" (kynurenine pathway, KP), che conduce alla biosintesi di nicotinamide adenin dinucleotide (NAD⁺) e di nicotinammide adenin di nucleotide fosfato (NADP) (Nishizuka

& Hayaishi, 1963). Oltre a questi metaboliti della via, altri risultano biologicamente attivi a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC) e del Sistema Immunitario. Il catabolismo del triptofano proveniente dalla dieta inizia da membri della famiglia della pirrolo diossigenasi. Il membro più importante di tale famiglia è l'indoleamina-2,3-diossigenasi (IDO) (Gal and Sherman 1980; Fukui et al. 1991; Muller A.J., Prendergast G.C., 2007), un enzima eme-dipendente, di cui sono conosciute fino ad ora due isoforme (IDO-1 e IDO-2) (Kwidzinski E., Bechmman I., 2007), caratterizzate da un'elevata specificità di substrato. L'altro membro di tale famiglia è il triptofano-2,3-diossigenasi (TDO) (Dang Y., Dale W.E., Brown O.R., 2000), un enzima epato-specifico caratterizzato da una ristretta specificità di substrato. Le scoperte degli ultimi 50 anni, ed in particolare quelle effettuate negli ultimi 15, hanno dimostrato l'esistenza di metaboliti della via delle chinurenine implicati nella patogenesi di disordini neurodegenerativi gravi (Stone and Darlington, 2002). Sulla base di questi studi è stato dimostrato come tale via sia elemento centrale di una intrigata e complessa rete che regola reazioni immuno/infiammatorie che avvengono nel corso di malattie a patogenesi acuta e cronica. Pertanto oggi, tale via metabolica viene considerata, da molti, un possibile target terapeutico per la scoperta di nuovi farmaci. In particolare IDO è riconosciuto come protagonista di rilievo nei processi di immunotolleranza, inclusa l'immuno-soppressione da cui deriva la tolleranza del feto (Honig A., Rieger L., Kapp M., et. 2004) ed i meccanismi di immuno-evasione tipici di alcuni tumori (Prendergast G.C., 2008). Tra le altre molecole generate lungo la via delle chinurenine, la 3-idrossi-chinurenina (3-HK) e l'acido 3-idrossi-antranilico (3-HANA) presentano caratteristiche pro-eccitotossiche e generano radicali liberi (Guidetti P., Schwarcz R., 1999; Goldstrein I. F., Leopold M.C., 2000). Il primo passaggio, l'ossidazione, catalizzata dalla indoleamina-2,3-diossigenasi (IDO), o dalla triptofano-2,3-diossigenasi (TDO) a livello epatico, porta alla formazione della N-formilchinurenina. L'azione dell'enzima formamidasi, genera la chinurenina (KYN), il substrato da cui si dipartono i vari rami della via. Il primo di questi rami si diparte dall'azione di una famiglia di transaminasi, conosciute come chinurenine-

aminotransferasi (KAT) che producono l'acido chinurenico (KYNA). Esistono, in realtà, tre tipi di chinurenina-aminotransferasi, KAT-1, KAT-2 e aspartato mitocondriale aminotransferasi (mitAAT), di questi la KAT-2 è la più abbondante nel cervello umano. Il secondo ramo, derivante dall'enzima chinurenina-3-idrossilasi (o chinurenina monossigenasi, KMO), produce 3-idrossi-chinurenina (3HK). La 3-idrossi chinurenina può essere nuovamente soggetta all'enzima KAT a dare l'acido xanturenico (Xa). Alternativamente, la 3-HK può fungere da substrato per un altro enzima, la chinureninasi, così da essere trasformata in acido 3-idrossiantranilico (3-HANA). Le chinureninasi possono anche direttamente usare la chinurenina come substrato per produrre acido antranilico (Aa), il quale può ulteriormente essere idrossilato dalla KMO a dare acido 3-idrossiantranilico (3-HANA). L'acido 3-idrossiantranilico così prodotto diviene il substrato per un estradiolo diossigenasi (3-HAD), il quale ne catalizza l'apertura ossidativa a semialdeide 2-ammino-3-carbossimuconico, che, in un processo non enzimatico (Colabroy K.L., Begley T.P., 2005), riarrangia attraverso una reazione periciclica in acido chinolinico (QUIN). Il meccanismo a valle della via delle chinurenine è abbondantemente espresso in periferia, incluso fegato, sangue, macrofagi e, in misura minore, cervello. In particolare, gli enzimi della via delle chinurenine si trovano negli astrociti e nella microglia, e solo sporadicamente nei neuroni. Benché le cellule del cervello siano in grado di sintetizzare KYN, la maggior parte di questo non viene sintetizzato dalle cellule cerebrali ma arriva al SNC attraverso la BEE, dove un carrier per gli amminoacidi neutri, lo trasporta dentro gli astrociti e la microglia. Gli astrociti non esprimono KMO (Guillemin G.J., Kerr S.J., Smythe G.A., et. 1999), così mancano dell'abilità di sintetizzare il QUIN. Perciò, gli enzimi della via del ramo del KYNA sono principalmente espressi negli astrociti, mentre quelli che regolano il ramo del QUIN sono prevalentemente presenti nella microglia (Amori L., Guidetti P., Pellicciari R. et. 2009). Tuttavia, i macrofagi producono 20-30 volte più QUIN che la microglia (Heyes et al., 1989; 1991), così avvalorano l'ipotesi che l'infiltrazione dei macrofagi può essere il carrier centrale del QUIN al di sotto di condizioni neuroinfiammatorie.

Tra i metaboliti generati alcuni risultano neuro-attivi:

- l'acido chinolinico (QUIN), un agonista recettoriale debole del recettore ionotropico per il glutammato NMDA (Stone, TW, Perkins, MN. 1981; Perkins M.N., Stone T.W., 1982);

- l'acido chinurenico (KYNA), un'antagonista non competitivo per lo stesso recettore NMDA, che interagisce con il sito per il co-agonista glicina (GlyB) (Kesler M., Terramani T., Lynch G., 1989; Perkins M. N., Stone T. W., 1982) che funge anche da antagonista del recettore nicotinico $\alpha 7$ (Hilmas C., Pereira E.F., Alkondon M., 2001), ed attiva, a concentrazioni fisiologiche, il GPR35, un recettore orfano accoppiato a proteina G (Wang J., Simonavicius N., 2006);

– L'acido xanturenico (Xa) è un altro intermedio della via delle chinurenine, ottenuto dalla chinurenina (KYN), mediante una reazione di idrossilazione che coinvolge la kynurenina-3-idrossilasi, con formazione di 3-idrossi-chinurenina, la quale viene transaminata, mediante chinurenina-amminotransferasi (KAT), ad acido xanturenico. Quest'ultima via è generalmente considerata parte di un processo di detossificazione, poiché riduce la concentrazione della 3-idrossi-chinurenina, inducendo la sua spontanea ossidazione generazione di radicali liberi ed apoptosi. Tuttavia, una transaminasi specifica per la 3-idrossi-chinurenina non è stata ancora identificata nell'uomo. Nei mammiferi, si sa che la 3-idrossichinurenina è trasformata in Xa da un isoenzima, la chinurenina transaminasi. Recentemente è stata provata la presenza (in quantità micromolari) di acido xanturenico in diverse regioni del cervello di ratto, con una distribuzione eterogenea ed un meccanismo di accumulo vescicolare pre-sinaptico. Un ulteriore trasporto neuronale, in parte dipendente da adenosina 5'-trifosfato (ATP), da sodio e da ioni cloruro è stato dimostrato in neuroni BCN-20; tale meccanismo potrebbe partecipare alla clearance dell'acido xanturenico extracellulare. Entrambe i trasporti (neuronale e vescicolare) sono rafforzati dalla presenza di quantità micromolare di ioni di zinco. Infine, si è registrato un aumento dei livelli di Xa nella corteccia prefrontale di ratto. Questi risultati sostengono

fortemente l'idea di un ruolo dello Xa nella neurotrasmissione/neuromodulazione nel cervello di ratto, fornendo in tal modo la prova dell'esistenza di specifici recettori per l'acido xanturenico. (Gobailie S., Kemmel V., Brumaru D., et. 2008). L'acido chinurenico, l'acido 3-idrossiantranilico e l'acido chinolinico, presenti nel cervello dei mammiferi in concentrazioni nanomolari, possono essere coinvolti in processi fisiologici anche se finora erano conosciuti per il loro possibile ruolo in patofisiologie neurologiche e disordini psichiatrici. In particolare, aumenti nel cervello dei livelli di KYNA, a causa della capacità di questo di antagonizzare due recettori che collegano funzioni vicine come la conoscenza e la memoria ($\alpha 7$ nicotin-acetilcolina e NMDA recettore), può essere la causa di un deficit cognitivo (Chess and Bucci 2006; et Chess et al. 2007) ma può anche determinare un aumento della resistenza a insulti eccitotossici (Schwarcz et al. 1984). Sono stati condotti degli studi che hanno dimostrato che bloccando la KAT-2 si ha una notevole diminuzione di KYNA nel cervello e che questo può migliorare le funzioni cognitive (Pellicciari et al. 2006) mentre gli inibitori della KMO determinano una riduzione di 3-HK e di QUIN nel cervello, che può fornire benefici in disordini neurodegenerativi (Carpenedo et al. 1994., Miranda et al. 1997., Moroni et al. 1999., Richter and Hamann 2003., Clark et al. 2005., Ceresoli-Borroni et al. 2007., Gregoire et al. 2008).

5.1 La sinapsi immunologica

Il sistema immunitario, a seguito dell'incontro con un agente patogeno monta una serie di risposte sia di tipo aspecifico o innato che di tipo specifico o adattativo. Due caratteristiche, in particolare, rendono le risposte adattative estremamente efficienti nel rimuovere l'elemento estraneo dall'organismo, la specificità e la memoria. Se un individuo viene, ad esempio, infettato una prima volta da un determinato batterio, un eventuale secondo incontro con lo stesso vedrà (nella maggior parte dei casi) determinerà una risposta più veloce e specifica del proprio sistema immunitario (Abbas, 2009).

Alla base di una tale efficienza nei meccanismi che regolano queste risposte è l'intenso scambio di informazioni tra i vari componenti del sistema immunitario. La cellula che ha incontrato e “processato” l'elemento estraneo dovrà comunicarlo ad altre, le quali avranno il compito di rimuoverlo o di avvisare altre cellule affinché mettano in atto degli ulteriori meccanismi perché il pericolo sia eliminato. Sarà, inoltre, necessario l'intervento di cellule che porranno un freno al processo infiammatorio una volta rimossi gli elementi che lo hanno attivato.

La sinapsi immunologica è l'unità funzionale che permette il passaggio d' informazioni tra cellule immunocompetenti in varie fasi risposta immunitaria adattativa.

Sebbene la parola sinapsi, termine greco che indica un contatto, fosse stata inizialmente adottata in ambito scientifico per descrivere la fase della meiosi, nel ciclo cellulare, in cui due cromosomi si uniscono, fu nel 1897 che Sherrington e Foster (textbook of Physiology) la introdussero con l'accezione con cui è stata adoperata per circa un secolo nel descrivere il meccanismo mediante il quale una cellula del sistema nervoso centrale trasmette un messaggio ad un'altra (non necessariamente un'altra cellula nervosa).

Nel 1966, alcuni dati prodotti in un laboratorio da un gruppo di tre scienziati confermarono “l'ipotesi di un interazione tra cellule del timo e del midollo, sebbene la natura di questa

interazione fosse oscura”... e sebbene in quegli anni non si sapesse dell'esistenza di linfociti T, linfociti B e delle APC, quella scoperta avrebbe svelato, nel giro di pochi anni, uno dei fondamentali meccanismi mediante il quale cellule del sistema immunitario comunicano tra loro.

Il primo resoconto scientifico in cui compare l'ipotesi su una vera e propria area di contatto tra cellule del sistema immunitario, definita “sinapsi linfocitaria” risale ai primi anni 80 (Norcross 1984) e, a differenza di quanto inconsapevolmente descritto da Claman e colleghi, la sinapsi in questione non era quella tra cellule T e cellule B, ma quella tra una APC ed un linfocita T. Bisogna aspettare il 1994 per imbattersi nella definizione di “sinapsi immunologica”, adoperata per descrivere l'interazione tra un linfocita T helper ed una cellula B (Paul and Sedar, 1994), sebbene lo stesso studio muovesse da un'evidenza (*in vitro*) del 1988 (Poo et al. 1988)

5.2 Sindesma tra sinapsi immunologica e neuronale

“You enquire about the introduction of the term synapse, it happened thus...I felt the need of same name to call the junction between nerve-cell & nerve-cell (because that place of junction now entered physiology as carrying functional importance)...I suggested using syndesm.” (from a letter of J. Fulton to Mr. Sherrington).

La sinapsi immunologica tra un linfocita T ed un'altra cellula, una APC, un linfocita B o una cellula bersaglio da lisare, ha un decorso temporale che, per quanto variabile a seconda del tipo delle cellule coinvolte (minuti oppure ore) (...), risulta limitato, mentre la sinapsi classica ha un architettura fissa. Le cellule contraenti una sinapsi immunologica sono mobili e separate prima del contatto. Tuttavia, non il solo aspetto funzionale permette di considerare le due sinapsi (considereremo a tal proposito anche la giunzione neuro-muscolare una sinapsi di

tipo classico) dei corrispettivi di evoluzione. L' agrina, ad esempio, svolge un ruolo simile sia a livello della giunzione neuro-muscolare, che a livello della sinapsi neuronale ed anche nel contesto della sinapsi immunologica (Rupp et al. 2001).

Cambio d'espressione dei recettori metabotropici del gruppo I nel cervelletto di topi che sviluppano encefalite autoimmune sperimentale ed in tessuti cerebellari autoptici di pazienti con sclerosi multipla

6.1 Scopo dello studio

Nella Sclerosi Multipla i sintomi cerebellari come atassia, disartria e tremore intenzionale, ricorrono con alta frequenza in pazienti con sclerosi multipla e sono considerati marcatori della malattia. La fisiopatologia di questi sintomi è complessa e solo parzialmente compresa (Giovannoni and Ebers, 2007). Oltre alla demielinizzazione cronica e al danno assonale, le anomalie funzionali delle cellule del Purkinje possono contribuire ai sintomi cerebellari nei pazienti con SM (Kutzerlnigg et al, 2007). Capire la natura molecolare di queste anomalie potrebbe portare a nuove conoscenze nella patofisiologia della SM, e portare all'identificazione di nuovi bersagli per trattamenti sintomatici. L'Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAE) nei roditori è un modello animale consolidato di neuroinfiammazione che condivide aspetti istopatologici e sintomatici con la SM (Goverman and Brabb, 1996; Martin and McFarland, 1995; Schmidt, 1999; Wekerle et al 1994; Lassmann and Wiesniewski 1979; Lassman and Ransohoff, 2004). Recenti evidenze suggeriscono che l'uso del modello EAE può essere esteso alla caratterizzazione degli eventi molecolari che sottostanno alla disfunzione neuronale causata da neuroinfiammazione. Ad esempio, Nav1.8, una subunità dei canali del sodio a attivazione sensibile che non è presente nel cervelletto sano, viene espressa nelle cellule del Purkinje di topi con EAE e individui con SM progressiva (Craner et al., 2003). L'espressione ectopica di Nav1.8 può perturbare il quadro di risposta delle cellule del Purkinje, causando una incoordinazione motoria (Gu et al., 2001). Abbiamo esaminato se le anomalie nell'espressione dei recettori metabotropici del glutammato (mGlu) sono riscontrate nel cervelletto di topi con

EAE e pazienti con SM. L'espressione dei recettori mGlu1 nel cervelletto è elevata nelle cellule del Purkinje (Martin et al., 1992; Baude et al., 1993; Fotuhi et al., 1993), e aumenta progressivamente lungo lo sviluppo postnatale (Casabona et al., 1997). Diversamente, i recettori mGlu5 sono presenti inizialmente nel cervelletto postnatale (Casabona et al., 1997), ed assenti nelle cellule del Purkinje adulte. L'attivazione dei recettori mGlu1 è essenziale per l'induzione della depressione a lungo termine (LTD) mediata dai recettori AMPA sia a livello delle sinapsi cellulari delle fibre del Purkinje rampicanti (Linde et al., 1991) che alle sinapsi cellulari delle fibre del Purkinje parallele (Hansel and Linde, 2000; Shigemoto et al., 1994). Inoltre, cambiamenti plastici nelle EPSCs (Correnti PostSinaptiche Eccitatorie) dipendenti dal recettore mGlu1 e dalle concentrazioni di Ca^{2+} transienti nelle cellule del Purkinje sono indotte da stimolazioni ripetitive delle fibre rampicanti (Kim et al., 2007). La delezione genetica dei recettori mGlu1 causa una incompleta regressione delle innervazioni della fibra rampicante multipla delle cellule cerebellari del Purkinje e una grave compromissione della coordinazione motoria nei topi (Aiba et al., 1994; Levenes et al., 1997; Kano et al., 1997). Tutti questi cambiamenti sono evitati tramite l'introduzione di un transgene mGlu1 controllato da un promotore specifico delle cellule del Purkinje nei topi knockout per il recettore mGlu1 (Ichise et al., 2000). In aggiunta, pazienti con la malattia di Hodgkin che sviluppano atassia paraneoplastica producono autoanticorpi che reagiscono con i recettori mGlu1 causando anomalie nell'eccitabilità e nella plasticità delle cellule del Purkinje (Sillevis Smith et al., 2000; Coesmans et al., 2003). Riportiamo ora che topi con EAE e pazienti con SM mostrano un'espressione ridotta dei recettori mGlu1 e un'aberrante espressione dei recettori mGlu5 nelle cellule cerebellari del Purkinje e che il trattamento di topi con un enhancer del recettore mGlu1 migliora i sintomi motori associati all'EAE.

6.2 Materiali e metodi

Sono stati forniti dai Laboratori Roche (Basel, Switzerland): 9H-Xanthene-9-carboxylic acid (4-trifluoromethyl-oxazol-2-yl)-amide (RO0711401) 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) (3-4-dihydro-2H-pyranol [2,3-b]quinolin-7-yl) (cis-4-methoxycyclohexyl) methanone (JNJ16259685), 6-methyl-2-(phenylazo)-3-pyridinol (SIB-1757); MOG35-55 peptide (myelin oligodendrocyte glycoprotein fragment MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) e l'adiuvante incompleto di Freund sono stati acquistati da Sigma, St. Louis, MO, USA; la tossina della pertosse è stata acquistata da Calbiochem, La Jolla, CA, USA; il Mycobacterium tuberculosis (ceppo H37Ra) è stato purificato dai Laboratori Difco, Detroit, MI, USA.

6.3 Animali

Topi maschi C57BL/6 di 6-7 settimane, di peso corporeo 22-24 g, sono stati acquistati da Charles River (Calco, Italy). I topi sono stati tenuti sotto condizioni ambientali controllate (temperatura ambiente, 22 °C; umidità, 40 %) in un ciclo luce/buio di 12 h con cibo e acqua ad libitum. Gli esperimenti sono stati effettuati seguendo la Guidelines for Animal Care and Use del National Institutes of Health.

6.4 Induzione dell'EAE

L'encefalomelite autoimmune sperimentale è stata indotta in topi C57BLN/6 (6-7 settimane), tramite iniezione sottocutanea a livello degli arti inferiori, con una emulsione contenente, per animale, 200 µg di glicoproteina oligodendrocitica della mielina MOG frammento 35-55

(MOG₃₅₋₅₅)(Sigma Aldrich) emulsionato in 0.1 ml di adiuvante incompleto di Freund (FCA) contenente 2 mg di *Mycobacterium tuberculosis*. In seguito, gli animali vengono trattati intraperitonealmente con 200 ng di tossina della pertosse al giorno 0 e al giorno 2 dopo l'immunizzazione. Gli animali di controllo hanno ricevuto adiuvante incompleto di Freund (FCA) contenente 2 mg di *Mycobacterium tuberculosis* senza MOG₃₅₋₅₅ e l'iniezione a giorno 0 e 2 dall'immunizzazione della tossina della pertosse. Gli animali vengono monitorati giornalmente per osservare il decorso clinico della malattia che sarà valutato in modo oggettivo.

6.5 Quantificazione della malattia e del grado di disabilità

La valutazione clinica è stata effettuata misurando giornalmente il peso corporeo di ciascun animale e i deficit neurologici sono stati monitorati attraverso i seguenti criteri: 0 = nessun segno di malattia; 1 = coda flaccida; 2 = paraparesi moderata; 3 = paraparesi grave; 4 = tetraparesi (stato moribondo); 5 = morte.

Tutte le procedure sperimentali sono state autorizzate in accordo con il comitato etico in riferimento alla legislazione Italiana, per questo animali in stato moribondo sono stati eutanizzati tramite inalazione di CO₂.

6.6 L'espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 in topi con EAE

Per valutare i cambiamenti dell'espressione dei recettori metabotropici del glutammato durante il decorso dell'EAE gli animali sono stati sacrificati a diversi giorni dopo l'immunizzazione con

MOG (frammento 35-55) in particolare: giorno 0, giorno 15, giorno 25 e giorno 45. I cervelletti, che saranno utili per effettuare l'analisi qualitativa tramite immunistochemica, verranno fissati in Carnoi e incorporati in paraffina, o conservati a -20°C per l'analisi quali-quantitativa mediante Western-blot .

6.7 Analisi Western Blot dei recettori mGlu1a e mGlu5

I cervelletti sono stati prelevati da animali C57BIN6 immunizzati a diversi giorni dall'induzione della malattia: giorno 0, 15, 25, 45. I cervelletti sono stati omogeneizzati a 4°C in tampone Tris-HCl (pH 7.4; contenente 1mM di PMS). Gli omogeneizzati sono stati risospesi in un tampone SDS blu-bromofenolo riducente, contenente 40mM di DTT per limitare la formazione di aggregati dei recettori mGlu.

L'analisi Western blot è stata eseguita utilizzando gels di poliacrilamide all' 8% con SDS fatti correre su un apparato di minigel (Biorad, Mini Protean II Cell). Le proteine sono state trasferite per elettroblot su membrane PVDF Immunoblot (Biorad, Milano) per 1 h utilizzando un sistema Trans blot SD della Biorad, ed i filtri sono stati incubati per una notte in tampone TTBS (100mM Tris-HCl; 0,9% NaCl, 1% Tween 20, pH 7,4) contenente il 5% di latte privo di grassi. I blots sono stati incubati, quindi, per 1 h a T ambiente con un anticorpo primario policlonale per mGluR5 (1,2 $\mu\text{l/ml}$ Upstate Biotechnology; DBA, Milano), per l'mGluR1a (2 $\mu\text{l/ml}$ Upstate Biotechnology; DBA, Milano). I blots sono stati lavati tre volte in tampone TTBS e quindi incubati per 1 h con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi (anti-rabbit o anti-mouse, Amersham) diluito rispettivamente 1:7000 e 1:10000 con TTBS. L'immunoreattività è stata rilevata per ECL ("enhanced chemiluminescence", Amersham). L'intensità delle bande viene

quantificata dall'analisi dell'immagine e le bande vengono normalizzate dai livelli (0.5µg/ml) dell'anticorpo β -actina.

6.8 Immunoistochimica

Gli animali vengono sacrificati mediante dislocazione cervicale. I tessuti vengono prelevati e fissati mediante immersione O/N a 4°C in Carnoi (miscela di Etanolo/ Acido.acetico/ Cloroformio, 6:1:3). I campioni fissati vengono disidratati attraverso passaggi seriali in Et-OH a concentrazioni crescenti, immersi in xylene e successivamente inclusi in paraffina. Ultimato tale processo, si procede al taglio del campione mediante microtomo, ottenendo sezioni di 10µm di spessore. Le sezioni vengono montate su vetrini portaoggetto carichi e processati come segue per la colorazione immunoistochimica. La prima fase consiste nella sparaffinatura mediante immersione per 40 minuti in xylene. Le sezioni sparaffinate vengono reidratate mediante passaggi seriali in etanolo a concentrazioni decrescenti e quindi sciacquate in acqua corrente per 5 minuti, segue: (a) lo smascheramento dell'antigene eseguito per bollitura in tampone citrato (10 mM, pH 6), (b) il blocco dell'attività delle perossidasi endogene mediante perossido di idrogeno al 3% per 10 min, (c) lavaggi in TBS (2×2 min); (d) il blocco dei siti aspecifici incubando il tessuto con siero di capra (NGS al 10%) per 1 h; (e) incubazione con l'anticorpo secondario anti-rabbit mGluR1 e mGluR5 biotinilato (Vector Laboratoires, Burlingame, CA 1:200 per 1 h a T ambiente). Come sistema di detenzione viene usato il metodo perossidasi e a tal fine le sezioni vengono incubate con un complesso Biotina-Avidina (Vectastain elite ABC) per 1 h a temperatura ambiente. Lo sviluppo viene eseguito mediante incubazione con il substrato cromogeno diamminobenzidina (DAB) (ABC Elite kit; Vector Laboratoires). La reazione viene bloccata con H₂O distillata.

6.9 Valutazione della coordinazione motoria in topi con EAE

6.9.a Rota-rod test

Il rota-rod è formato da un cilindro orizzontale rotatorio (30mm) e da un'unità guida del controllo motorio (Ugo Basile, Varese, Italia). Il cilindro è diviso in 5 compartimenti rotativi separati e completamente chiusi per evitare che i topi cadano al di fuori di questa area. I topi vengono posti sul rota-rod, che gira ad una velocità di accelerazione che va da 5 a 15 giri per minuti. Un timer automatico registra il tempo (sec) che il topo rimane sul rota-rod.

I topi con EAE sono stati testati per 10 minuti sul rota-rod durante tutto il tempo della malattia iniziando dal primo giorno dell'immunizzazione. I topi sono stati posizionati sull'apparato del rota-rod due volte, prima e 30 minuti dopo l'iniezione intraperitoneale di salina. Nel corso dei vari esperimenti al posto della salina è stato somministrato MPEP, SIB-1757, RO0711401 o JNJ16259685.

6.9b Footprinting test

Le impronte delle zampe sono state fatte con inchiostro su carta bianca. L'inchiostro è stato applicato sulle zampe posteriori di ogni singolo animale, e sono stati indotti a camminare lasciando i segni della camminata sul foglio (Aiba et al.,1994). Il test è stato effettuato durante il decorso dell'EAE subito dopo il test del rota-rod. I risultati sono stati quantificati calcolando il coefficiente di variazione (il rapporto tra la deviazione standard e il valore medio) di 5 passi consecutivi dell'impronta sinistra.

6.10 Espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 nel cervelletto autoptico di pazienti con e senza Sclerosi Multipla

6.10a Pazienti e tessuti

Sono stati usati tessuti da 9 pazienti con sclerosi multipla e 9 casi di controllo che sono stati ottenuti, per questo studio dalla banca dei cervelli olandese (NBB) e un controllo addizionale è stato ottenuto dal dipartimento di Neuropatologia dell'università di Amsterdam. Il consenso informato è stato ottenuto per l'uso del tessuto dei cervelli e per l'accesso alle cartelle mediche per scopi di ricerche. Tutti i casi sono stati revisionati indipendentemente da due neuropatologi. I segni clinici (derivati dalle cartelle cliniche dei pazienti) dei soggetti con sclerosi multipla e i controlli sono schematizzati nella **tabella 1**.

6.10b Preparazione dei tessuti

I tessuti sono stati fissati in una soluzione al 10% di formalina e inclusi in paraffina. I tessuti inclusi in paraffina sono stati sezionati a 6 μm , montati su vetrini con "organosilano" (Sigma, St. Louis, MO) e usati per reazioni istologiche e immunocitochimiche come descritto in seguito.

6.10c Immunocitochimica

L'immunocitochimica è stata fatta come descritto (Aronica et al., 2001; 2003). Come gruppo cromogeno è stato usato il 3,3 Diaminobenzidina. Le sezioni sono state contrastate con ematossilina. Per visualizzare i recettori del gruppo mGlu1 sono stati usati anticorpi specifici per i sottotipi recettoriali: mGlu1a (polyclonal rabbit, Chemicon, Temecula, CA; 1:100) e 5 (polyclonal rabbit, Upstate Biotech, Lake Placid, NY, USA, 1:100). Le caratteristiche di questi anticorpi in tessuti di cervelli umani sono state già documentate (Aronica et al., 2001b,c; Geurts et al., 2003). Tutte le sezioni dei tessuti sono state valutate da 2 osservatori indipendenti, per la presenza o l'assenza di vari parametri istopatologici e immunoreattività specifica. Due sezioni in paraffina rappresentative per caso sono state valutate per ciascun anticorpo. L'intensità immunoreattiva dei recettori mGlu è stata valutata usando una scala a 4 punti in cui l'immunoreattività è stata definita come (0), negativa; (1) moderata; (2) forte; (3), molto forte.

6.11 RISULTATI

6.11a Induzione dell'EAE nei topi

L'EAE è stata indotta in topi C57BL/6 tramite iniezione sottocutanea del peptide MOG₃₅₋₅₅ (200 µg) emulsionato in adiuvante incompleto di Freund contenente *Mycobacterium tuberculosis*, seguita da due iniezioni intraperitoneali di 200 ng di tossina per tossica (a giorno "0" e "2" di malattia dall'immunizzazione) come descritto da Mendel et al., (1995). I segni oggettivi dell'EAE, inclusa la perdita di peso e la paralisi ascendente progressiva sono stati monitorati giornalmente. I segni neurologici iniziano nei giorni 10-12, mentre il picco di malattia si ha

intorno al giorno 30 con un valore massimo di score tra 2 e 3 (**Fig. 1**). Alcuni topi con EAE in ogni gruppo mostrano difficoltà nella coordinazione motoria a giorno 30, come si evince dal footprint e dal test del rota-rod. Questo scompensamento di coordinazione non viene correlato con la misura di disabilità (ad es., nella **Fig. 4A** solo il 50-60 % dei topi malati mostrano una scarsa performance al test del rotarod a giorno 30, anche se tutti i topi hanno una disabilità con score tra 2 e 3).

6.11b Cambiamento dell'espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 nelle cellule cerebellari del Purkinje di topi con EAE

Abbiamo esaminato l'espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 nel cervelletto di topi sacrificati ai giorni 15, 25 o 45 seguenti l'induzione dell'EAE. L'analisi Western Blot dei recettori mGlu1a e mGlu5 ha rivelato una banda maggiore a circa 140 kDa, corrispondente ai monomeri del recettore. Abbiamo trovato una riduzione progressiva nell'espressione dei recettori mGlu1a associata con un'aumentata espressione dei recettori mGlu5 nel cervelletto di topi EAE (**Fig. 2A, C**).

L'analisi immunostochimica ha mostrato che questi cambiamenti si verificavano nelle cellule del Purkinje. Nei topi di controllo, l'immunoreattività di mGlu1a era marcata nell'arborizzazione dendritica delle cellule del Purkinje, sebbene l'immunoreattività di mGlu5 fosse bassa o virtualmente assente nelle cellule del Purkinje. Nei topi EAE ai giorni 25-45, l'immunoreattività di mGlu1a era sostanzialmente ridotta nello strato molecolare delle cellule del Purkinje della corteccia cerebellare, sebbene il recettore mGlu5 fosse ectopicamente espresso nelle cellule del Purkinje (**Fig. 2B, D**).

6.11c Espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 nel cervelletto di pazienti con sclerosi multipla

Esaminando l'espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 in tessuti cerebellari autoptici di 9 pazienti con sclerosi multipla e 9 di pazienti non malati. Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riportate nella Tabella 1. L'immunoreattività del recettore mGlu1a era prominente nelle cellule del Purkinje di tutti i pazienti di controllo (grado 3) ed era marcatamente ridotta in 5 dei 9 (grado 1) pazienti con sclerosi multipla. Una leggera riduzione dell'espressione del recettore mGlu1a è stata trovata in 2 pazienti con sclerosi multipla (**Tabella 1; Fig. 3**). Come aspettato, non c'era alcuna detettabile immunoreattività del recettore mGlu5 nello strato molecolare delle cellule del Purkinje nella corteccia cerebellare di tutti e 9 i pazienti di controllo. Da notare che l'immunocolorazione del recettore mGlu5 poteva essere riscontrata nelle cellule del Purkinje di 8 pazienti con sclerosi multipla, ed era considerevole in 4 pazienti (grado 3) (**Tabella 1; Fig. 3**). Sia nei pazienti con sclerosi multipla che nei controlli l'immunoreattività per i recettori mGlu1a e mGlu5 è stata localizzata nella parte nucleare delle cellule del Purkinje (casi rappresentativi in **Fig. 3**). Quest'ultimo dato non è inatteso poiché entrambi i sottotipi recettoriali sono stati ritrovati nel nucleo delle cellule (Jong et al., 2005; Jong et al., 2007; O'Malley et al., 2003).

6.11d Il trattamento in acuto con RO0711401 migliora la coordinazione in topi con EAE

Per esaminare la relazione tra il cambio dell'espressione del recettore mGlu1a e mGlu5 nelle cellule del Purkinje e i sintomi motori cerebellari associati con l'EAE, noi abbiamo trattato gli animali o con RO0711401 o con MPEP. RO0711401 si comporta come un modulatore allosterico positivo selettivo dei recettori mGlu1a (vedi Knoflach et al., questo volume), sebbene MPEP è un modulatore allosterico negativo riconosciuto dei recettori mGlu5 (Gasparini et al., 1999). La coordinazione motoria in topi con EAE è stata verificata con il test footprinting o con il test del rota-rod. Per minimizzare tutti gli errori collegati allo stress da iniezione e abitudine al test, i topi sono stati sottoposti al test del rota-rod tutti i giorni, iniziando dal secondo giorno dopo l'immunizzazione, sia prima e 30 minuti dopo l'iniezione intraperitoneale di salina. La salina è stata sostituita o con RO0711401 (10 mg/kg, i.p.) o con MPEP (10 mg/kg, i.p.) al giorno 15 o 30 dopo l'immunizzazione. Il test del footprinting è stato fatto solo a 30 giorni subito dopo il test del rota-rod. Tutti i topi hanno avuto una buona prestazione al test del rota-rod a 15 giorni, mentre 5 topi su 9 del gruppo con MPEP e 6 topi su 9 del gruppo con RO0711401 hanno mostrato un miglioramento della coordinazione motoria a 30 giorni. Un'iniezione acuta con RO0711401 migliora significativamente la coordinazione motoria a 30 giorni mentre il trattamento con MPEP è stato inefficace (**Fig. 4A**). Il miglioramento motorio con RO0711401 è stato confermato dal test del footprinting (mostrato nella **Fig. 4B**). Ne RO0711401 e ne MPEP hanno comportato cambiamenti nel test del rota-rod a 15 giorni (**Fig. 4A**).

6.12 DISCUSSIONE

Abbiamo usato il modello EAE da MOG nei topi (Mendel et al., 1995) per esaminare la relazione tra i cambiamenti nell'espressione dei recettori mGlu1/mGlu5 e le disfunzioni motorie

cerebellari associate con la patologia autoimmune del sistema nervoso centrale. La topologia dell'infiammazione del sistema nervoso centrale coinvolge fortemente il cervelletto nel modello da MOG, ma non in altri modelli murini di EAE (Kuerten et al., 2007). Abbiamo mostrato che lo sviluppo dell'EAE era associato con una progressiva perdita dei recettori mGlu1a e un aumento del recettore mGlu5 nel cervelletto di topi immunizzati con MOG₃₃₋₅₅. Questi cambiamenti sono prominenti nelle cellule del Purkinje, che fisiologicamente esprimono alti livelli dei recettori mGlu1a (Martin et al., 1992; Baude et al., 1993; Fotuhi, 1993), ma normalmente mancano dei recettori mGlu5. E' rilevante che simili cambiamenti sono stati trovati nelle cellule cerebellari del Purkinje di pazienti affetti da sclerosi multipla che esprimevano più basse quantità dei recettori mGlu1a e mostravano un'espressione ectopica dei recettori mGlu5. Queste scoperte davano vita ad un vasto numero di quesiti, che includono la natura dell'inversione nell'espressione da recettori mGlu1a a mGlu5 e l'importanza di questi cambiamenti all'insorgere dei sintomi cerebellari motori associati con la sclerosi multipla e con altre malattie neuroinfiammatorie. Un'ipotesi interessante è che i cambiamenti nell'espressione dei recettori mGlu nelle cellule del Purkinje siano guidati da citochine o chemiochine che sono prodotte da cellule infiammatorie e o residenti nel cervelletto di topi con EAE e pazienti con sclerosi multipla. Un potenziale candidato è l'interleukin-6 (IL-6), che svolge un ruolo basilare nella patofisiologia dell'EAE indotta da MOG (Gijbels et al., 1995; Mendel et al., 1998; Okuda et al., 1998, 1999, 2000; Eugster et al., 1998, 2001; Samoilova et al., 1998) e induce cambiamenti nell'espressione e nell'attività dei recettori metabotropici del glutammato del gruppo 1 in colture di cellule cerebellari del Purkinje (Gruol and Nelson, 2005). L'identificazione dei meccanismi che sottostanno ai cambiamenti dell'espressione dei recettori mGlu1 e mGlu5 nel cervelletto di topi con EAE richiede ulteriori chiarimenti.

Ci siamo proposti di esaminare una possibile relazione causale tra i cambiamenti dei recettori mGlu1 e mGlu5 nelle cellule del Purkinje ed i sintomi motori cerebellari associati con l'EAE tramite trattamento sintomatico dei topi con : RO0711401, MPEP o SIB-1757.

RO0711401 è un nuovo modulatore allosterico positivo del recettore mGlu1, mentre l' MPEP e il SIB-1757 si comportano da modulatori allosterici negativi del recettore mGlu5 (Gasparini et al. 1999; Varney et al. 1999).

Per testare la coordinazione motoria nei topi abbiamo usato il test del rota-rod e il paw print test. L'uso del rota-rod è nuovo nel modello di EAE; per questa ragione abbiamo prima esaminato come i cambiamenti nella prestazione motoria al rota-rod erano associati allo sviluppo dell'EAE. I topi sono stati a lungo abituati al test, che è stato effettuato quotidianamente per tutti i 30-45 giorni durante lo sviluppo dell' EAE. Inoltre, il test del rota-rod è stato effettuato 2 volte al giorno prima e 30 min. dopo un'iniezione di salina i.p.

Solo in due tempi, approssimativamente all'onset e al picco dei segni neurologici, la salina è stata sostituita con i ligandi del recettore mGlu1 o mGlu5. Abbiamo trovato un quadro multifasico nella prova motoria nel test rotarod in ambedue i gruppi di esperimenti. Gli animali con l'EAE miglioravano la loro prestazione durante i primi 5-6 giorni di test, e dopo raggiungevano un breve plateau che ragionevolmente riflette un processo di apprendimento motorio.

La prestazione al rota-rod declinava progressivamente dal settimo-decimo giorno e dopo migliorava parzialmente grazie all'apprendimento motorio.

Un alto grado di variabilità, non dipendente solo dal decorso della malattia, veniva riscontrato nella prestazione al test del rota-rod. Ad esempio, alcuni topi con uno score 2 mostravano una buona prestazione al rota-rod, mentre altri mostravano un chiaro declino nella coordinazione motoria.

Nei due set di esperimenti all'insorgere dei segni neurologici, una singola iniezione con MPEP ,SIB-1757, RO0711401 non migliorava la coordinazione motoria (i.e. al giorno 15 per l'esperimento 1 e al giorno 10 per l'esperimento 2), quando la prestazione di base al rota-rod era eccellente. L'unica eccezione era l'antagonista del recettore mGlu1, JNJ16259685, il quale, a

dosi attive nel comportamento, (2.5 mg/kg; Steckler et al. 2005) peggiorava la prestazione motoria.

Quando testati al picco dello score di disabilità, MPEP e SIB-1757 fallivano nel migliorare la prestazione motoria al test del rota-rod. E' da notare che l'MPEP è stato iniettato alla dose di 10 mg/kg, che è attiva a livello comportamentale, ma non ha effetti sulla normale locomozione (Herzig and Schmidt, 2004). In contrasto, il trattamento con RO0711401 migliorava la prestazione motoria al test del rota-rod al picco di disabilità nei topi con EAE.

Dati simili sono stati ottenuti usando il paw print test come metodo alternativo per saggiare la coordinazione motoria.

Insieme tali dati, suggeriscono (ma non provano) che un'attivazione dei recettori mGlu1 residui sulle cellule del Purkinje può parzialmente correggere i sintomi motori nei topi con l'EAE. Questo è del tutto in linea con il ruolo fondamentale svolto dai recettori mGlu1a cerebellari nell'apprendimento motorio e nella coordinazione motoria, ruolo che, in un secondo momento, viene confermato dal peggioramento nell'apprendimento motorio osservato nei topi trattati con JNJ16259685.

Se l'espressione ectopica dei recettori mGlu5 nelle cellule del Purkinje rappresenti un meccanismo adattativo deputato alla compensazione della perdita del recettore mGlu1a o contribuisca alla patofisiopatologia delle disfunzioni cerebellari nell'EAE/MS non è noto. Sarebbe interessante esaminare come topi knockout per il recettore mGlu5 reagiscano all'induzione dell'EAE in termini di espressione del recettore mGlu1a e di sintomi motori cerebellari.

In conclusione, i nostri dati mostrano gli enhancers del recettore mGlu1 migliorano i sintomi motori associati con l'EAE e danno vita all'interessante possibilità che questi farmaci possano essere utilizzati per il trattamento sintomatico dei pazienti con Sclerosi Multipla.

Il recettore metabotropico per il glutammato mGlu4 modula l'immunità adattativa e frena la neuroinfiammazione

7.1 Scopo dello studio

Sebbene normalmente siano anatomicamente indipendenti, il sistema nervoso centrale e il sistema immunitario danno vita ad una varietà di risposte coordinate al pericolo attraverso comuni messaggeri chimici. Ad esempio, il sistema nervoso simpatico può alterare l'equilibrio Th1\Th2 attraverso la stimolazione dei recettori β adrenergici, mentre l'istamina può essere modulata dalla produzione di citochine Th1 e Th2 attraverso una differente espressione di recettori H1 e H2.

La recente scoperta di cellule T CD4+ caratterizzate dalla secrezione di interleuchina 17 (Th17) e di cellule T CD4+ CD25+ Foxp3 (Treg) ha avuto un notevole impatto sulla conoscenza dei processi immuni non spiegati, in un primo momento, dal paradigma Th1\Th2. Le cellule Th17 e T_{reg} sono state implicate nella patogenesi di varie malattie umane autoimmuni, comprese le neuro infiammazioni.

Nessuna evidenza ha provato finora una possibile interferenza nell'equilibrio tra Th17 e Treg dovuto a neurotrasmettitori.

Il glutammato rappresenta in messaggero chimico comune sia alle cellule nervose che alle cellule immunitarie e per questo potrebbe essere implicato in un tale contesto.

Recenti evidenze suggeriscono che il glutammato, il maggior neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale, possa essere implicato nella cosiddetta "sinapsi immunologica". Nella sinapsi immunologica, le informazioni che si hanno sui recettori metabotropici del glutammato riguardano le cellule T. I linfociti T umani, infatti, esprimono costitutivamente il recettore mGlu5, il quale sembra mediare un effetto soppressivo sulla proliferazione delle cellule T, contrariamente al recettore mGluR1, la cui espressione è inducibile e media effetti costimolatori (Franco R. 2007).

I recettori mGlu del gruppo I e del gruppo II nel topo sono presenti nel timo e sono differentemente espressi nei timociti e nelle cellule stromali timiche (Storto 2000). Nessuna informazione è al momento disponibile sull'espressione dei recettori mGlu nelle cellule

dendritiche (DCs) anche se queste cellule possono rilasciare alti livelli di glutammato attraverso il sistema di antiporto cisteina\glutammato (Franco 2007).

Tuttavia, ad oggi, manca un quadro più ampio sul profilo d'espressione, sulle vie di segnalazione e sull'effetto risultante da un'attivazione di tali recettori nelle cellule del sistema immunitario. Nell'immunoterapia sperimentale è stato dimostrato che la somministrazione dell'agonista specifico per i recettori mGlu del gruppo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) L-2-amino-4-phono-butanoate (L-AP-4), è in grado di abbreviare i tempi di guarigione nell'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) in ratti Lewis (Bensong 2002).

La disponibilità di topi knockout ($Grm4^{-/-}$) per il recettore mGlu4 e il possibile utilizzo di N-phenyl-7-(hydroxyimino)ciclopropano[b]chromen-1a-carboxamide (PHCCC), un modulatore allosterico positivo (PAM) per mGluR4, ci ha spinto ad investigare il possibile coinvolgimento dei recettori metabotropici del gruppo III nell'encefalomielite autoimmune sperimentale ed una loro funzione nella neuroinfiammazione in genere.

7.2 Materiali e metodi

7.3 Animali

Topi $Grm4^{-/-}$ (B6.129- $Grm4^{tm1Hpn}/J$) su un background C57\BL6 sono stati purificati da The Jackson Laboratory. Topi maschi C57BL/6 di 8-10 settimane, di peso corporeo 22-24 g, sono stati acquistati da Charles River (Calco, Italy) e sono stati utilizzati come ceppo di controllo durante l'esperimento. I topi sono stati tenuti sotto condizioni ambientali controllate (temperatura ambiente, 22° C; umidità, 40%, con un ciclo luce/buio di 12 h; cibo e acqua ad libitum). Gli esperimenti sono stati effettuati in accordo alla normativa nazionale sulla sperimentazione animale e tutte le procedure sperimentali sono state autorizzate dal comitato

etico in riferimento alla Legislazione Italiana, per tale ragione gli animali in stato moribondo sono stati eutanizzati tramite inalazione di CO₂.

I topi Grm4^{-/-} sono stati analizzati in termini di fenotipo immunologico tramite citofluorimetria come percentuale di cellule CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ ⁺, B220⁺, CD11b⁺ e CD11c⁺ nella milza, nei linfonodi totali e nei leucociti infiltranti il cervello (BIL). È stata effettuata anche una doppia immunoreattività per i linfociti T CD4⁺ purificati dai linfonodi totali con anticorpi anti-CD25 e anti-Foxp3. Non sono state trovate differenze significative tra Grm4^{-/-} e i loro controlli (WT), se non una riduzione delle cellule CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ nei linfonodi totali.

7.4 Induzione dell'EAE e trattamento *in vivo* con PHCCC

L'immunizzazione attiva è stata indotta negli animali tramite una iniezione sottocutanea, a livello degli arti inferiori, di 200 μ g di MOG₃₅₋₅₅ (glicoproteina oligodendrocitaria della mielina) peptide 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) per animale emulsionato in 0.1 ml di adiuvante incompleto di Freund (FCA) contenente 2 mg di *Mycobacterium tuberculosis*.

In seguito, i topi sono stati trattati intraperitonealmente con 200 ng di tossina della pertosse in 100 μ l di PBS il giorno dell'immunizzazione (giorno 0) e due giorni dopo (giorno 2). Gli animali di controllo hanno ricevuto adiuvante incompleto di Freund (FCA) contenente 2 mg di *Mycobacterium tuberculosis* senza MOG₃₅₋₅₅ e l'iniezione a giorno 0 e 2 dall'immunizzazione della tossina della pertosse. Gli animali sono stati trattati con PHCCC alla dose di 3 mg/kg tramite iniezione sottocutanea per 40 giorni in regime profilattico. Gli animali di controllo hanno ricevuto il solo veicolo. In un altro set di topi, il farmaco è stato somministrato in regime terapeutico, ai primi sintomi di malattia (17-19 giorno).

Per l'immunizzazione passiva, un gruppo di topi è stato sottoposto ad EAE attiva ed adoperato come fonte di linfociti T CD4⁺ patogenetici, i quali sono stati purificati dalla milza e dai

linfonodi, per poi essere incubati (48 h) con: anti-CD3 γ (145-2C11; 1 μ g/ml) e anti-CD28 (PV-;1 μ g/ml) in presenza di MOG₃₅₋₅₅ (25 μ g/ml). Circa 20 x 10⁶ di cellule CD4⁺/topo sono state trasferite tramite iniezione sottocutanea in topi WT riceventi, i quali 18 ore prima stati irradiati con una dose sub-letale di 450 rad, al fine di distruggere il loro sistema immunitario. In un altro gruppo sperimentale di topi anch'essi sottoposti ad EAE passiva, le cellule T CD4⁺ trasferite sono state depletate del subset di cellule T CD4⁺ CD25⁺ (Treg) (Milteny Biotec). Gli animali sono stati monitorati con gli stessi parametri adottati per valutare l'immunizzazione attiva.

7.5 Quantificazione della malattia e del grado di disabilità (Vedi 6.5)

7.6 Istopatologia ed immunoistochimica

Per l'analisi istologica, è stato prelevato il cervello ed il midollo spinale 14 giorni dopo la stimolazione con MOG₃₅₋₅₅ e fissato con una soluzione composta da alcol etilico (60%), acido acetico (10%) e cloroformio (30%). Venti ore dopo, i tessuti sono stati trasferiti in etanolo al 70% fino all'inclusione in paraffina. Sono state effettuate sezioni seriali di 10 μ m di cervello e midollo spinale per la colorazione con tionina (colorazione Nissl) per la valutazione istologica dei cambiamenti patologici e dell'infiltrazione delle cellule infiammatorie. Le sezioni private di paraffina sono state impregnate di perossido di idrogeno (H₂O₂) al 3% per il blocco endogeno dell'attività della perossidasi. Le sezioni sono state incubate in maniera seriale con anti-rabbit policlonale anti-MBP (Chemicon) e anti-mouse monoclonale anti-MHCII (Chemicon) seguiti da anticorpi biotinilati anti-rabbit anti-mouse e streptavidina-HRP (Zimed). L'immuno-reattività per CD8 è stata valutata trattando le sezioni con tampone citrato (10mM, pH 6.0), scaldandoli per 10 min per rilevare l'antigene prima dell'incubazione con anticorpo anti-rabbit policlonale anti-CD8

(Santa Cruz Biotechnology). Per il rilevamento è stato usato 3,3-Diaminobenzidine tetrachloride (ABC Elite kit; Vector Laboratories). Per l'immunoistochimica in fluorescenza di CD4, le sezioni sono state incubate per 72 ore con anticorpo monoclonale anti-CD4 e successivamente con anticorpo anti-rat IgG coniugato con FOTC (Vector Laboratories). I controlli sono stati effettuati senza l'utilizzo degli anticorpi primari.

7.7 Isolamento e stimolazione di leucociti

La purificazione delle cellule T CD4⁺, CD4⁺ CD25⁻ e CD4⁺ CD25⁺ da un pool di linfonodi periferici, è stata condotta come descritto da Puccetti et al. (2006). Per l'induzione delle citochine, le cellule CD4⁺ (1x10⁶/ml) sono state messe in coltura in presenza di cellule T depletate di Treg derivanti da campioni di cellule spleniche (cellule presentanti l'antigene, APCs) e 10µM del peptide MOG₃₅₋₅₅ per 3 giorni. Per la differenziazione *in vitro* cellule T CD4 naïve sono state attivate per 72 ore con 1µg/ml di anti-CD3 in presenza di APCs stimulate con una combinazione di varie citochine ricombinanti e anticorpi: anti-IL-4, anti-IFN-γ, IL-6 e TGF-β.

Per il saggio di soppressione delle T_{reg}, è stata allestita una cocoltura di cellule CD4⁺ CD25⁻ in combinazione con cellule T depletate di T_{reg} ed irradiate e cellule CD4⁺ CD25⁺ per tre giorni in presenza di anti-CD3 solubile. La proliferazione è stata misurata tramite incorporazione di [³H]Timidina in accordo con le procedure standard. Per isolare le cellule infiltranti il cervello, l'organo è stato trattato con l'inibitore delle proteasi (complete mini protease inhibitors Roche Applied Science) ed in seguito digerito con collagenasi di tipo IV (Sigma Aldrich) in presenza di DNAasi pancreatica di bovino (Sigma Aldrich) per 30 min a 37°C.

Il cervello così digerito, è stato delicatamente passato su un setaccio di nylon ed i leucociti infiltranti il cervello sono stati separati su un gradiente di percoll (Sigma). Le cellule DCs

spleniche sono state purificate tramite colonne magnetiche usando CD11c MicroBeads e MidiMacs (Miltenyi Biotec), in presenza di EDTA per distruggere il complesso DC-T (Puccetti et al. 2002). La produzione di citochine da leucociti derivanti dal cervello e da DCs provenienti dalla milza è stata misurata nel sovranatante delle colture raccolto dopo l'incubazione delle cellule per 24 ore con il solo mezzo. Per la purificazione di cellule plasmacitoidi DCs (pDCs), cellule CD11c⁺ sono state ulteriormente frazionate usando una MicroBeads mPDCA-1 (Miltenyi Biotec) (Puccetti et al.2007). Per il trattamento delle cellule in vitro, il PHCCC è stato utilizzato ad una concentrazione 40 µM.

7.8 Citofluorimetria

In tutte le analisi al FACS le cellule sono state trattate con rat anti.CD16/32 (2.4G2) per 30 minuti a 4°C per il blocco del recettore Fc prima dell'analisi mediante citofluorimetro EPICS usando un software EXPO 32 ADC (Beckman Coulter). L'espressione di CD4, CD25, CTLA-4 e GITR è stata effettuata come descritto da Puccetti e al. (2007). Per la determinazione delle cellule Foxp3⁺, i linfociti sono stati marcati con anti-CD4(GK1.5)-PE (BD Pharmingen), fissati, permeabilizzati e marcati con Alexa Fluor 488 anti-mouse Foxp3 (MF-14; Biolegend) o tramite l'isotopo di controllo Alexa Fluor 488 rat IgG2b. Inoltre, sono stati adoperati anticorpi FITC anti-mouse CD45R/B220 (clone RA3-6B2, BD Pharmingen), anti-mouse CD11c (clone N418 eBioscience) e anti mouse CD11b (clone M1/70).

7.9 RISULTATI

7.9.a L'EAE viene esacerbata dall'assenza di mGluR4

Topi knockout per il recettore mGluR4 (*Grm4*^{-/-}) ed i loro equivalenti wild-type (WT) sono stati immunizzati con la glicoproteina oligodendrocitaria della mielina (MOG₃₅₋₅₅) e l'andamento della malattia è stato monitorato giornalmente per un periodo di 40 giorni. La mancanza del recettore mGluR4 era associata ad una più precoce ($P < 0.005$) e severa malattia, fatale nel 40% degli animali (**Fig.5; Suppl. tabella 1, Fallarino et al., 2010**).

A livello morfologico, la demielinizzazione della materia bianca e gli infiltrati infiammatori erano superiori nel midollo spinale dei topi *Grm4*^{-/-} vaccinati con MOG₃₅₋₅₅ rispetto ai topi WT (**Fig.5b**). L'EAE era associata ad un maggiore infiltrato di cellule CD4⁺, CD8⁺ e B220⁺ dagli organi linfoidi periferici al SNC sia nei topi *Grm4*^{-/-} che in quelli WT, ma la percentuale di cellule CD4⁺ e CD8⁺ - così come quella di cellule CD11b⁺ e CD11c⁺ - era marcatamente più elevata nel SNC dei *Grm4*^{-/-} al picco della malattia (**Suppl. tabella 2 e Suppl.Fig. 1-3, Fallarino et al., 2010**).

Quando abbiamo esteso l'analisi ai topi provenienti dalla stessa nidiata generati da eterozigoti – con gli animali selezionati per età e genere – il corso della malattia era ancora una volta più severo nei *Grm4*^{-/-} e *Grm4*^{+/-} rispetto a quelli *Grm4*^{+/+} (**Suppl. fig. 4, Fallarino et al., 2010**).

7.9.b Il profilo delle citochine è alterato da mGluR4

Abbiamo valutato il profilo delle citochine nei topi *Grm4*^{-/-} rispetto ai WT dopo vaccinazione con MOG₃₅₋₅₅. In cellule T CD4⁺ estratte dai leucociti infiltranti del cervello (BIL) di topi *Grm4*^{-/-} al picco dei segni neurologici (30 giorni dopo l'immunizzazione; **Fig. 6a**), abbiamo riscontrato un

significativo aumento dei trascritti di *Rorc* (che codificano per il fattore caratteristico delle T_{H17}), una riduzione dei trascritti *Foxp3* (T_{reg}) e nessun cambiamento in *Tbx21* (codificanti per *Tbet*; marcatore T_{H1}).

Un simile scenario era presente anche in tempi precedenti (giorno 10 dall'immunizzazione) nelle cellule $T CD4^+$ estratte del pool di linfonodi provenienti da topi privi di recettore *mGlu4* (**Fig. 6a**). Nessun cambiamento è stato verificato nei trascritti *Gata3* (marcatore T_{H2}) tra i vari gruppi (**Fig. 6a**). Sembra che l'assenza del recettore *mGlu4* orienti il bilancio dell'attivazione trascrizionale in favore dei geni infiammatori in risposta alla vaccinazione con *MOG*₃₅₋₅₅.

Il profilo di citochine nei topi con EAE (elevati livelli di *IL-17* e bassi di *TGF- β* da cellule T ; alti livelli di *IL-6* da cellule *DC*) suggerivano che l'assenza del recettore *mGlu4* favorisce il prevalere delle cellule T_{H17} su quelle T_{reg} , bilancio che sosterebbe l'infiammazione ed esacerberebbe i segni clinici dell'EAE (**Fig. 6b,c e Risultati Suppl., Fallarino et al., 2010**)

7.9.c *Grm4* viene espresso nelle cellule immunitarie accessorie ed in quelle adattative

L'espressione di *Grm4*, *Grm6*, *Grm7* e *Grm8* è stata esaminata mediante RT-PCR real-time (rRT-PCR) nelle cellule WT di cervello, nelle cellule dei linfonodi e negli splenociti totali oltre che in specifici tipi di cellule ($CD4^+$, $CD8^+$, $\gamma\delta$, B220, $CD11b^+$ e $CD11c^+$; **Fig. 7a**). Sebbene non abbiamo osservato trascritti per *Grm6* in nessuno dei tipi cellulari analizzati, incluso il tessuto cerebrale (dati non mostrati e **Note Suppl., Fallarino et al., 2010**), un particolare pattern d'espressione caratterizzava gli altri geni. In particolare, l'espressione di *Grm4* era maggiore nelle cellule $CD4^+$ e $CD11c^+$, indicando quelle cellule come possibili target per gli effetti mediati dal recettore *mGlu4*. L'attivazione delle cellule $CD4^+ CD25^-$ in condizioni che

favoriscono T_H0 , T_H1 e cellule T_{reg} inducibili (iT_{reg})- portava ad un considerevole incremento di *Grm4*, mentre non abbiamo osservato alcun cambiamento in un ambiente che favorisce T_H2 .

L'espressione di *Grm4* risultava incrementata anche nelle cellule T_{reg} naturali attivate (nT_{reg}) (**Fig.7b**) così come in quelle inducibili (iT_{reg}) (dati non mostrati). L'espressione del gene era virtualmente assente in un ambiente predisposto a favorire T_H17 (**Fig. 7b**).

Così, a livello delle cellule T, l'espressione del recettore mGlu4 correlava in maniera positiva con indicatori di un ambiente potenzialmente regolatorio.

Ricercando sottogruppi di cellule DC mGluR4⁺, abbiamo purificato dalla milza DC convenzionali (cDCs; CD11b⁺CD11c^{high}) e cellule DC plasmacitoidi (pDCs; mPDCA-1+CD11c^{low}). Abbiamo trovato che sia cDCs che pDCs esprimevano *Grm4* e che i ligandi per il recettore Toll-like, il lipopolisaccaride (LPS) per le cDCs ed l'oligonucleotide CpG (CpG-ODN) per le pDCs aumentavano l'espressione di *Grm4* (**Fig. 7c**). La modulazione dell'espressione del recettore mGlu4 nelle cellule nT_{reg} attivate e nelle cDCs condizionate da LPS era confermata a livello della proteina (**Fig. 7d**), supportando ulteriormente l'ipotesi che l'attivazione di mGluR4 all'interno della sinapsi immunologica contribuisce al dialogo e alla reciproca influenza tra cellule T e cellule accessorie.

7.9.d mGluR4 è necessario alle DC per orchestrare la differenziazione delle cellule T

Abbiamo esaminato qualunque possibile funzione regolatoria di mGluR4 nell'interazione tra cellule T CD4⁺ e DC in cellule in coltura *in vitro* o singole o in combinazione. Non abbiamo osservato differenze significative nella produzione di citochine (**Suppl. Fig.5, Fallarino et al., 2010**) o nelle proliferazione tra cellule T CD4⁺ mGluR4⁺ ed mGluR4⁻ in colture singole (dati non mostrati). Inoltre, in condizioni che favoriscono le iT_{reg}, l'induzione di Foxp3 era simile nelle cellule T CD4⁺ CD25⁻ sia WT che Grm4^{-/-}. La capacità soppressiva delle cellule iT_{reg} e delle nT_{reg} era comparabile (dati non mostrati). In contrasto, sia le cDC che le pDC provenienti da topi Grm4^{-/-} producevano grandi quantità di IL-6 e di IL-23, ma meno IL-12 ed IL-27, rispetto alle loro controparti WT in risposta rispettivamente allo stimolo con LPS o con CpG-ODN. Non abbiamo osservato differenze fenotipiche significative tra cellule DC immature e mature nei due genotipi (dati non mostrati).

Dati di rilievo sono emersi nelle co-culture di cellule T CD4⁺ - DC. In condizioni non indirizzate (T_H0), l'uso di cellule DC Grm4^{-/-} portava ad un considerevole aumento nel recupero totale di cellule T (**Suppl. Fig. 6, Fallarino et al., 2010**). La percentuale di cellule T IL-17⁺ CD4⁺ aumentava (P<0.001), mentre quella delle cellule T IFN-γ⁺ CD4⁺ - una porzione delle quali esprimeva anche IL-17A- era significativamente ridotta (P<0.0001) nelle colture con cellule cDC prive di mGluR4 ma con cellule T mGluR4⁺ (**Fig. 8b,c**). In accordo con questi dati, non sono stati osservati effetti additivi quando le co-culture consistevano di cellule DC e T entrambe prive di mGluR4. Sembra che l'effetto della mancanza del recettore mGlu4 sia totalmente dipendente dalle DC. Misure delle concentrazioni delle citochine nei surnatanti delle colture mostravano diminuite quantità di IL-2 T_H1-associata nelle co-culture che comprendevano DC Grm4^{-/-} (**Fig. 8d**). Poiché è noto che IL-27 contrasta l'effetto di IL-6 nell'indirizzare lo sviluppo della cellula T_H17, un effetto in grado di limitare l'EAE, la diminuzione di IL-27 durante l'attivazione delle cellule T CD4⁺ naive potrebbe favorire l'emergere delle cellule T_H17 .

7.9.e Il segnale di mGluR4 modula cAMP nelle cellule dendritiche (DC)

Le vie che portano all'aumento della formazione di cAMP nelle DC (come accade in risposta ad LPS) diminuiscono le citochine associate con le risposte T_H1 ed aumentano le citochine T_H17 -associate (IL-6 ed IL-23). Nei terminali dei nervi presinaptici e nella microglia, l'attivazione del recettore mGlu4 abbassa la formazione di cAMP intracellulare in maniera proteina G_i -dipendente. Abbiamo stimolato DC WT con forskolina, che stimola l'adenilato ciclasi, o con LPS in presenza di L-AP4 o di N-phenyl-7-(hydroxyimino)ciclopropano[b]chromen-1a-carboxamide (PHCCC). L-AP4 è un agonista ortosterico di tutto il gruppo III dei recettori mGlu, mentre il PHCCC agisce come un potenziatore selettivo (PAM: modulatore allosterico positivo) del recettore mGlu4 (**Nota Suppl., Fallarino et al., 2010**). Sebbene né L-AP4 né il PHCCC abbiano effetti sui livelli basali di cAMP, entrambe le molecole riducevano l'aumento di cAMP intracellulare indotto nelle cellule DC sia da forskolina che da LPS (**Fig. 9a e Risultati Suppl., Fallarino et al., 2010**). Il PHCCC incrementava anche la produzione di IL-12, IL-27 e di TGF- β nelle DC stimulate con LPS ma non in quelle non stimulate, mentre la produzione di IL-6, IL-10 ed IL-23 era ridotta (**Fig. 9a**).

Un quadro simile era riprodotto utilizzando DC prive di mGluR4 in combinazione con KT 5720, un inibitore specifico della protein chinasi A (PKA) (**Fig. 9b**). Per contro, il PHCCC non aveva effetto sul rilascio di citochine in DC *Grm4*^{-/-} trattate con LPS o in DC WT trasfettate con specifici siRNA (**Suppl. Fig 7 e 8, Fallarino et al., 2010**). In maniera simile, abbiamo osservato che gli effetti del PHCCC erano alterati nelle DC WT trattate con 8-bromo-cAMP, un attivatore classico della PKA (**Suppl. Fig. 8, Fallarino et al., 2010**).

7.9.f Il segnale di mGluR4 contribuisce alla resistenza verso l'EAE *in vivo*

Somministrazioni ripetute *in vivo* di PHCCC a partire da giorno 1 dall'immunizzazione con MOG₃₅₋₅₅ (**Fig. 10a, Suppl. Fig. 9 e Suppl. tabella 3, Fallarino et al., 2010**) ma non dopo l'insorgenza dei sintomi neurologici (**Suppl. Fig. 10**), attenua significativamente la malattia nei topi WT ma non in quelli *Grm4*^{-/-} ($P < 0.005$; **Fig 10b e Suppl. Fig. 11, Fallarino et al., 2010**). L'effetto era dose dipendente ed osservabile all'interno di un intervallo di dosi molto più basso rispetto a quelle che risultano tossiche (**Suppl.Fig. 12, Fallarino et al., 2010**). Sebbene nessun cambiamento significativo era osservato nella proporzione delle popolazioni delle cellule immunitarie all'interno dei linfociti infiltranti il cervello (BIL) dopo trattamento con PHCCC, un sostanziale aumento si verificava nella proporzione delle cellule CD4⁺ CD25⁺ e CD4⁺ Foxp3⁺ linfonodali (**Suppl. tabella. 4, Fallarino et al., 2010**). Sia nel BIL che nei linfonodi, l'effetto protettivo del PHCCC nei topi WT era associato con un passaggio ad una risposta dominata da cellule T CD4⁺ Foxp3⁺, T_H1 ed una riduzione dell'immunità T_H17-mediata. Un effetto protettivo delle cellule T_{reg} era anche evidente negli esperimenti di transfer adottivo di EAE con cellule CD4⁺ provenienti da topi WT trattati con PHCCC, in grado di trasferire la malattia solo quando deplete di cellule CD25⁺ (**Fig.10e e Suppl. Fig. 13, Fallarino et al., 2010**). Nonostante gli effetti del PHCCC con un trattamento discontinuo fossero attenuati ma ancora significativi ($P = 0.002$, farmaco vs veicolo) (**Suppl. Fig. 14, Fallarino et al., 2010**), i nostri dati suggeriscono l'uso di un modulatore allosterico positivo di mGluR4 supporta lo sviluppo di cellule T_{reg}, la cui attività regolatoria può ripercuotersi sulle cellule T_H17. L'uso di chimere di midollo osseo dimostra ulteriormente che gli effetti protettivi del segnale mGluR4 si verificano maggiormente in periferia tramite il reclutamento delle cellule mieloidi che esprimono *Grm4* (**Suppl. Fig. 15, Fallarino et al., 2010**). Sebbene il trattamento con PHCCC non abbia effetto sull'EAE una volta che i sintomi neurologici si sono sviluppati (**Suppl. Fig. 10, Fallarino et al., 2010**), dati paralleli ottenuti in un modello di EAE recidiva-remissiva (RR-EAE) rivelavano che il PHCCC riduceva

il numero e la gravità delle ricadute quando somministrato durante il primo attacco clinico (**Fig.10f e Suppl. tabella 5, Fallarino et al., 2010**).

Mentre questi dati forniscono la prima evidenza sperimentale che il glutammato agisce all'interfaccia tra il sistema nervoso e quello immune, l'attività di modulare le citochine da parte dell'enhancer di mGluR4 può anche essere dimostrata in cellule DC umane (**Suppl. Fig. 16, Fallarino et al., 2010**), nelle quali l'espressione di Grm4 e degli altri membri della classe III è stata verificata eseguendo un profilo Affymetrix di insieme di dati pubblici (**Suppl. Fig. 17, Fallarino et al., 2010**).

7.10 DISCUSSIONE

La Sclerosi Multipla è una malattia cronica, immuno-mediata, demielinizzante del SNC. Gli aspetti clinici ed istopatologici suggeriscono un'etiologia infiammatoria che comprende cellule innate residenti del SNC e cellule immunitarie adattative invadenti. Cellule T encefalitogeniche reattive per la mielina sono state implicate nell'inizio della cascata infiammatoria, che infine risulta nella demielinizzazione nel danno assonale. Le DC possono rappresentare dei modulatori chiave di questa cascata immunopatologica. Nell'EAE, cellule DC associate ai microvasi del SNC sono essenziali per il riconoscimento locale dell'antigene da parte delle cellule T reattive per la mielina. Inoltre, le DC modulano il reclutamento delle cellule encefalitogeniche e T_{reg} nel tessuto del SNC. Questa capacità è influenzata dall'espressione sulla superficie delle DC di molecole co-stimolatrici o inibitorie. Il fatto che le DC accumulino nel SNC prima cellule T e possano dirigere le risposte della cellula T suggerisce che esse siano determinanti chiave degli esiti autoimmuni del SNC.

Sebbene la comunicazione e la plasticità sinaptica richiedano glutammato, l'eccessivo rilascio di glutammato e il segnale attraverso iGluR risulta in eccitossicità, morte neuronale e perdita degli

oligodendrociti che producono la mielina. Le alterazioni sinaitiche sono un aspetto delle malattie neuro infiammatorie. Queste alterazioni sono in larga parte mediate dalle citochine infiammatorie rilasciate dalle cellule T infiltranti, dalla microglia attivata e sono responsabili, almeno in parte, della patologia dendritica irreversibile.

Grandi quantità di glutammato sono trovate nei cervelli di individui con sclerosi multipla e lo stesso glutammato, insieme alle citochine infiammatorie, è un fattore rilevante per la neurodegenerazione sia nella sclerosi multipla che nell'EAE.

Come altri neurotrasmettitori, per via della diversa natura e delle funzioni dei propri recettori, il glutammato potrebbe influenzare la neuro infiammazione attraverso effetti specifici sulle cellule del sistema immunitario. In questo studio abbiamo dimostrato che l'EAE era esacerbata in topi privi di mGluR4 e che la risposta immunitaria era dominata da cellule T_H17 IL-17-produttrici. Il trattamento di topi WT con un enhancer di mGluR4 induceva una risposta protettiva dominata dalle cellule T CD4⁺ T_{reg}. L'espressione costitutiva di mGluR4 si verificava in tutte le DC periferiche ed in un sottogruppo specifico di cellule T CD4⁺, che includeva le cellule T_{reg} ma non le TH17. Singolarmente, l'assenza di mGluR4 nelle DC – piuttosto che nelle cellule T CD4⁺ - orientava il bilancio della differenziazione della cellula T verso un fenotipo T_H17.

Studi sia nella sclerosi multipla che nell'EAE hanno mostrato un'associazione tra lo sviluppo delle placche demielinizzanti e l'accumulo di cellule T_H17 nel SNC ed in periferia.

I nostri dati mostrano che il glutammato esercita effetti immunoregolatori agendo sulle cellule DC ed influenzando lo sviluppo della cellula T_H e l'immunità adattativa.

Le funzioni effettrici dei linfociti sono sotto il controllo delle DC, che sono in grado di integrare una varietà di segnali in ingresso e dirigere la risposta a valle. Una recente evidenza indica un ruolo inibitorio per il GABA nell'infiammazione autoimmune, attraverso cui agenti GABAergici agiscono direttamente sulle cellule DC, abbassando gli eventi di segnalazione e diminuendo le conseguenti risposte infiammatorie adattative alle proteine della mielina. Nel nostro sistema modello, si è trovato che l'attivazione di mGluR4 modula le concentrazioni di cAMP e le

risposte in termini di citochine ai segnali infiammatori ed inibisce lo sviluppo della cellula T_H17 in risposta agli antigeni della mielina. Sebbene non in grado di conferire tolleranza duratura, gli effetti della segnalazione di mGluR4 contribuivano al reindirizzamento della risposta T_H nei topi trattati con un modulatore allosterico positivo.

Durante l'infiammazione le concentrazioni plasmatiche di glutammato salgono a livelli che potenzialmente in grado di saturare mGluR4 (40 μ M). In queste condizioni, l'attivazione di mGluR4 da parte del glutammato endogeno potrebbe limitare un'altrimenti incontrollata risposta delle cellule T_H17 ed il PHCC potrebbe rafforzare questo controllo negativo amplificando la stimolazione di mGluR4 da parte del glutammato. Gli alti livelli di glutammato nella neuroinfiammazione potrebbero esercitare un effetto che è protettivo in natura e potrebbe essere sfruttato terapeuticamente nella sclerosi multipla. La seconda generazione di enhancer per il recettore mGluR4, dotati migliori proprietà farmacodinamiche, sono attualmente studiati per il trattamento della malattia di Parkinson. L'uso di tali molecole potrebbe aprire la strada a terapie innovative volte a recuperare un bilancio appropriato delle cellule T_H nella neuro-infiammazione.

L'acido cinnabarico, un metabolita endogeno della via delle chinurenine, attiva i recettori metabotropici di tipo 4

8.1 Scopo del lavoro

La via delle chinurenine è il principale processo metabolico del L-triptofano nel fegato e negli altri tessuti, incluso il Sistema Nervoso Centrale (CNS). I due enzimi iniziali di tale via, la triptofano-2,3-diossigenasi (TDO) nel fegato e l'indoleamina-2,3 diossigenasi (IDO) negli altri tessuti, provvedono all'apertura dell'anello pirrolico facente parte dell'indolo del L-triptofano, portando alla sintesi delle chinurenine (Gal and Sherman 1980; Fukui et al. 1991). La chinurenina può essere ossidata ad acido antranilico, idrossilata a 3-idrossichinurenina, o transaminata in acido chinurenico. Sia l'acido antranilico che la 3-idrossichinurenina sono trasformati in acido 3-idrossiantranilico, che può essere convertito in acido chinolinico, il precursore metabolico della nicotinammide (Nishizuka and Hayaishi, 1963). I metaboliti della via delle chinurenine sono coinvolti nella patofisiologia di una varietà di disordini, e sono obiettivi potenziali per lo sviluppo di farmaci (Stone and Darlington, 2002). Poiché IDO è attivato da citochine pro-infiammatorie, come l'interferon- γ , l'espressione della via delle chinurenine è aumentata in risposta all'infiammazione, come accade nel cervello di pazienti con il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o colpiti da danno ischemico o traumatico. Ad esempio, pazienti con AIDS presentano nel fluido cerebrospinale concentrazioni di acido chinolinico 20 volte superiori ai soggetti di controllo (Heyes et al., 1989; 1991). La via delle chinurenine è stata direttamente implicata nei meccanismi di neurodegenerazione/neuroprotezione a causa dell'interazione dell'acido chinolinico e dell'acido chinurenico con i recettori NMDA per il glutammato. L'acido chinolinico si comporta come agonista ortosterico del recettore NMDA (Stone and Perkins, 1981; Perkins and Stone, 1982), mentre l'acido chinurenico agisce come antagonista competitivo, legandosi al sito della glicina, dello stesso recettore (Kemp, J. A., 1988; Kessler M., 1989). Gli inibitori della chinurenina-3-

monoossigenasi (l'enzima che converte chinurenina in 3-idrossichinurenina) sono stati sviluppati nel tentativo di orientare il metabolismo della chinurenina verso la formazione del "neuro protettivo" acido chinurenico. Non c'è evidenza che alcun metabolita della via delle chinurenine interagisca con i recettori metabotropici del glutammato (mGlu), non presentando alcuna di queste molecole i requisiti strutturali di base per una tale interazione. La nostra attenzione si è concentrata sull' acido cinnabarinico, un prodotto endogeno dell' ossidazione dell' acido 3-idrossiantranilico (Ogawa et al., 1983), che si è visto indurre apoptosi nei timociti (Hiramatsu et al., 2008). L'acido cinnabarinico è sintetizzato in maniera endogena attraverso un processo a due tappe, in cui l' ossidazione dell' acido 3-idrossiantranilico da parte dell' ossigeno molecolare genera un immينو chinina, la quale viene successivamente condensata con un'ulteriore molecola di acido 3-idrossiantranilico ad ottenere acido cinnabarinico e perossido di idrogeno (H₂O₂) (Ogawa et al., 1983; Dykens et al., 1987; Iwahashi H 1988; Manthey et al., 1990). L'acido cinnabarinico ha due gruppi carbossilici e un gruppo amminico libero, portando così il potenziale per interagire con il sito ortosterico nei recettori per gli aminoacidi eccitatori. Abbiamo riportato che l'acido cinnabarinico lega come agonista sia il recettore metabotropico del glutammato mGlu4 nativo che ricombinante, e condivide con gli agonisti prototipici L-AP4 e 4-fosfono fenilglicina (PPG), la capacità di proteggere i neuroni dalla morte eccitotossica.

8.2 Materiali e metodi

Forskolin, acido L-(+)-2-amino-4-fosfonobutirico (L-AP-4), N-fenil-7-(idrossiimmينو)ciclopropa[b]cromen-1a-carbossamide (PHCCC), (RS)-4-fosfonofenilglicina (PPG), N-metil-D-aspartato (NMDA), (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarbossiciclopropil)glicina (DCG-IV), acido (1S,3R,4S)-1-aminociclopentano-1,3,4-tricarbossilico (ACPT-I), e l'acido quisqualico erano forniti dal Tocris Cookson (Anawa Trading SA, Zurich, Switzerland; and Bristol, U.K.). I reagenti delle culture di tessuto provenivano dall' Invitrogen (Milan, Italy).

Citosine β -D-arabinofuranoside (AraC) e 3-isobutil-1-metilxantine (IBMX) erano fornite dalla Sigma (St. Louis, MO). I reagenti per la sintesi di acido cinnabarinico erano ottenuti dalla Fluka (Buchs, Switzerland), Merck (Darmstadt, Germany) o Sigma.

8.3 Sintesi dell'acido cinnabarinico

Ad una soluzione di acido 3-idrossiantranilico (1g, 6.33 mmol) in metanolo (470 ml), sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente, è stato aggiunto ossido di manganese (IV) (2.591g, 25.34 mmol). La reazione è stata monitorata mediante cromatografia su strato sottile (TLC) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20%). Dopo 24 ore il composto di partenza scompariva. Alla miscela di reazione veniva aggiunta trietilammina (TEA) (1.942g, 19 mmol) e poi lasciata sotto agitazione per altri 10 min. La miscela di reazione è stata filtrata attraverso un imbuto munito di tampone di celite® 521, e lavata diverse volte con metanolo. La soluzione di metanolo è stata concentrata a pressione ridotta, diluita con acqua (20 ml) e quindi acidificata con acido cloridrico (HCl) 2N fino a pH acido (pH 1-2). Il solido rosso-scuro formatosi, è stato filtrato e lavato prima con acqua (5 ml x 3) e poi con etere (20 ml x 2).

Il solido rosso-scuro è stato essiccato in P_2O_5 sotto vuoto, ottenendo 670 mg (resa: 70%) di acido cinnabarinico, quest'ultimo confermato dalla spettroscopia NMR.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ppm): δ = 6.60 (s, 1H, H-4), 7.60 (m, 1H, H-7), 7.76 (d, J = 1.2, 8.3Hz, 1H, H-6), 7.95 (d, J = 1.2, 7.7 Hz, 1H, H-8), 8.76 (bs, 1H, COOH), 9.72 (bs, 1H, COOH). $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ppm): δ = 93.5, 105.7, 120.9, 126.9, 128.6, 129.5, 129.8, 143.1, 148.3, 151.2, 153.3, 167.0, 169.8, 178.8.

8.4 Protocolli: trasfezione cellulare e saggi funzionali

Cellule embrioniche umane di rene 293 (HEK293) sono state transfettate in maniera transiente

con cloni di ratto di recettori mGlu1, mGlu2, mGlu4, mGlu5, mGlu6, mGlu7 e mGlu8 mediante elettroporazione come descritto da Brabet e colleghi (1998). Per evitare l'influenza del glutammato extracellulare, EAAC1, un trasportatore ad alta affinità per il glutammato, è stato co-trasfettato insieme al recettore. Poiché i recettori mGlu del gruppo II e III sono di norma accoppiati alla via dell'adenilato-ciclastasi tramite l'attivazione della proteina Gi/o, i recettori sono stati co-trasfettati con una proteina Gq-Gi chimerica. Questa proteina Gq modificata, viene riconosciuta dai propri recettori, ma si lega alla fosfolipasi-C. E' così possibile monitorare l'attività dei differenti recettori misurando l'inositolo fosfato come unico parametro (Gomena et al., 1996).

La costruzione del recettore mutato mGlu4 troncato al N-terminal (Δ V-mGlu4) è stata eseguita come riportato da Goudet et al. (2004). In breve, Δ V-mGlu4 è stato generato da un inserto tra il sito Mlu-I e il sito Xba-I del pRK5-NHA, la sequenza tra il residuo Q514 e quello A885 del cDNA del mGlu4 di ratto è stata ottenuta da PCR. Le differenti mutazioni del legame del mGlu4 nella tasca sono state ottenute usando la strategia del Quick-Change® (Stratagene, La Jolla, CA). Tutte le mutazioni sono state verificate da sequenziamento. Gli esperimenti sull'accumulo di [³H]inositolo fosfato ([³H]InsP) sono stati condotti in micropiatti da 96 pozzetti come precedentemente descritto (Goudet et al., 2004). In breve, dopo la trasfezione, le cellule sono state incubate tutta la notte con 3H-mioinositolo (16 Ci/mmol, Amersham, Buckinghamshire, UK). Il giorno successivo, dopo la rimozione del mezzo, il glutammato residuo è stato degradato tramite incubazione con Transaminasi-Glutammato-Piruvato (Goudet et al., 2004). In seguito, le cellule sono state stimolate con acido cinnabarico o con il relativo agonista per 30 min in presenza di LiCl, quest'ultimo atto a bloccare il fisiologico riciclo dell'inositolo fosfato.

Dopo la stimolazione, le cellule sono state incubate con acido formico freddo 0,1 M, per indurre lisi cellulare. L' [³H]-IP accumulato è stato recuperato tramite cromatografia a scambio ionico usando una resina Dowex (Biorad). Dopo l'eluizione, l'IP è stato collettato e miscelato con liquido di scintillazione (Perkin Elmer). La radioattività è stata misurata adoperando un

contatore di scintillazione e luminescenza Wallac 1450 Microbeta (Perkin Elmer). La radioattività residua nelle membrane è stata usata per normalizzare l'IP prodotto. Tutti i punti sono realizzati in triplicato e i risultati sono stati espressi come rapporto tra IP e la radioattività totale corrispondente alla quantità di IP sommata al contenuto delle membrane.

L'acido cinnabarinico è stato applicato ad una concentrazione di 100 μ M, l'acido quisqualico è stato usato come agonista selettivo del gruppo I (mGlu1 ed mGlu5). (EC_{20} : 10 nM; EC_{80} : 100 nM). (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV) è stato usato come agonista selettivo del gruppo II (mGlu2 ed mGlu3). (EC_{20} : 10 nM; EC_{80} : 500 nM). L'acido L-(+)-2-Amino-4-fosfonobutirico (L-AP4) è stato usato come agonista selettivo del gruppo III (mGlu4, mGlu6, 7 ed mGlu8). (EC_{20} : 30 nM; EC_{80} : 300 nM per mGlu4; EC_{20} : 1 μ M; EC_{80} : 10 μ M per mGlu6; EC_{20} : 10 μ M; EC_{80} : 300 μ M per mGlu7; e EC_{20} : 100 nM; EC_{80} : 1 μ M per recettori mGlu8) (Evans et al., 1982; Palmer et al., 1989; Nakanishi 1992; Ishida et al., 1993; Bushell et al., 1995).

8.5 Modello molecolare: adattamento dell'acido cinnabarinico nel cominio amino terminale del recettore mGlu4

Tutti i calcoli sono stati condotti in Discovery Studio 2.5.5 (Accelrys Software Inc., San Diego, 92121 CA). L'acido cinnabarinico è stato separato (docked) in un modello omologo di mGlu4R amino terminale domain previously validated (Selvam et al. J Med Chem, 2010). Il ligando è stato inizialmente posizionato nel sito di legame usando la versione GOLD 4.1.

GOLD usa un algoritmo genetico per docking ligando flessibile nel sito di legame del recettore (http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/). L'interazione proteina ligando è stata successivamente ottimizzata in un nano secondo molecular dynamics usando CHARMM. La traiettoria è stata equilibrata, snapshots della traiettoria è stata analizzata in termini di contatto

proteina ligando e la selettività è stata sottomessa alla minima energia di legame del modello presentato.

8.6 Studi in colture primarie neuronali

Colture primarie di cellule di granuli del cervelletto o miscuglio di cellule corticali sono state preparate da topi wild-type o topi knockout del recettore mGlu4. Ibridi omozigoti di topi knockout mGlu4 (strain name, STOCK Gprc1d^{tm1Hpn}; stock number 003576) ottenuti dal “Jackson laboratories” (Bar Harbor, ME). Topi 129Sv e CD1 (Charles River, Calco, Italy) sono stati usati per ottenere i controlli wild-type (Battaglia et al., 2006). Gli animali sono stati genotipizzati per il gene del recettore mGlu4 da primer multipli per PCR (Pekhletski and Hampson, 1996).

8.7 Preparazione di colture di cellule cerebrali di granuli

Colture primarie di granuli cerebrali di topo sono stati preparati usando alcune procedure descritte per granuli cellulari di ratto (Nicoletti et al., 1986b). Le cellule ottenute dal cervello di topi a 8-giorni, sono state sospese con Basal Eagle's Medium aggiungendo il 10% FCS, 25 mM KCl, 2 mM glutamina, e 100 µg/ml gentamicina, e plated (2.5×10^6 cells/dish) su 35-mm Nunc dishes (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, United States) ricoperte con poly-L-lysina (10 µg/ml). Le colture sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ e 95% di aria. Ara-C (10 µM) è stato aggiunto dopo 16/18 ore of culture a inibire la replicazione di cellule non neuronali. Sono state usate le colture in vitro a 6-8 giorni (DIV).

8.8 Analisi Immunoblot del recettore mGlu4 in colture di cellule cerebrali di granuli

E' stata esaminata l'espressione del recettore mGlu4 in proteine ottenute dall'estrazione da colture di granuli cerebrali preparate da topi wild-type o knockout del recettore mGlu4. Le cellule sono state raccolte e omogeneizzate a 4 °C in 50 mM di Tris-HCl buffer, pH 7.4, contenente 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatina, e 1 µg/ml leupeptina. Dopo sonicazione, 3 µl di estratto totale sono state usate per la determinazione di proteine. Cento mg di estratto di proteina sono state risospese in SDS-bromofenolo blue riducendo il buffer con 40 mM DTT. L'analisi Western blot è stata svolta usando 8% SDS gel di poliacrilamide electroblotted su membrane di polivinilidene difluoride (PVDF) (Biorad; Milan, Italy) per 1 ora. I filtri sono stati bloccati per 1 h in TBS-T buffer (100 mM Tris-HCl; 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) contenente il 5% di latte secco senza grasso. I Blots sono stati poi incubati overnight a 4 °C con uno specifico anticorpo policlonale anti-mGlu4 di ratto (Corti et al., 2002) (1:100) o anticorpo monoclonale anti-β-actin di topo (Sigma, St. Louis, MO; 1:100,000), lavati con TBS-T buffer, e poi incubate per 1 h con anticorpo secondario (perossidasi-completa anti-ratto o anti-topo, Amersham, Piscataway, NJ, diluito 1:10,000 o 1:5000 con TBS-T, rispettivamente). L'immunoreattività è stata rivelata da ECL migliorato.

8.9 Misurazioni di cAMP formato nelle colture di cellule cerebrali di granuli

Le colture sono state lavate due volte con la soluzione di Locke (154 mM NaCl, 5.6 mM glucosio, 5 mM HEPES, 1.3 mM CaCl₂, 3.6 mM NaHCO₃, pH 7.4) e sono state pre-incubate con 0.5 mM IBMX per 20 minuti a inibire il metabolismo del cAMP con fosfodiesterasi. Le colture sono state poi stimolate con forskolin (10 µM) per 20 minuti. Le molecole attive su mGlu4 o l'acido cinnabarinico sono stati poi aggiunti per un minuto prior al forskolin. L'incubazione è

stata fermata dall'aggiunta di 0,4 N PCA. Le cellule sono state raschiate dai dishes, sonicate, e centrifugate con un microfuge alla massima velocità. Il supernatante è stato conservato a 20°C. Il giorno dell'analisi, la PCA contenuta nei campioni è stata neutralizzata con K₂CO₃, e i livelli di cAMP sono stati misurati con RIA usando un kit commerciale (Perkin Elmer, Milan, Italy).

8.10 Preparazione di colture corticali miste

Miscugli di colture corticali contenenti sia neuroni che astrociti sono stati preparati da feti di topi wild type o topi mGlu4 knockout al 14–16 giorno di gestazione (Rose et al. 1992). In breve, la dissociazione di cellule corticali è stata plating in 15-mm multiwell vessels (Falcon Primaria, Lincoln Park, NY) su uno strato di astrociti confluent, usando un piatto mediodi MEM Eagle's salts supplemented with heat-inactivated HS (5%) e FCS (5%), glutamine (2 mM), glucosio (21 mM), e NaHCO₃ (25 mM). Dopo 3–5 DIV, la divisione di cellule non neuronali è stata fermata da 1–3 giorno di esposizione al Ara-C (10 µM), e le colture sono state shifted to a maintenance medium identical to plating medium but lacking FBS. Subsequent partial medium replacement was performed twice a week. Sono state usate colture a 13–14 DIV.

8.11 Esposizione ad aminoacidi eccitatori *in vitro* e misura del danno neuronale

Per l'induzione della morte eccitotossica, miscugli di colture sono state esposte al NMDA per 10 minuti a temperatura ambiente in una soluzione di sale di HEPES-buffered contenente (in mM): 120 NaCl, 5.4 KCl, 0.8 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 20 HEPES, e 15 di glucosio. Inoltre, le colture sono state abbondantemente lavate e incubate in MEM Eagle's (aggiunto con 25 mM NaHCO₃ e 21 mM glucosio) at 37°C. Le cellule sono state inoltre esposte a differenti concentrazioni di NMDA per 10 minuti, o sono state esposte a 100 µM di NMDA in assenza o in presenza di acido cinnabarinico (1-300 µM) e l'agonista selettivo del recettore mGlu4: L-AP4 (100 µM), R,S-PPG

(100 μ M), e PHCCC (30 μ M).

Il danno neuronale è stato quantificato misurando i livelli di lattato deidrogenasi (LDH) nel mezzo extracellulare usando un kit disponibile commercialmente (Roche Laboratories, Basel, Switzerland).

8.12 RISULTATI

8.12.a L'acido cinnabarinico attiva selettivamente i recettori mGlu4 espressi in sistemi eterologhi

E' stata esaminata la potenziale interazione dell'acido cinnabarinico con il recettore mGlu usando cellule HEK293 transientemente transfettate con recettori mGlu1, -2, -4, -5, -6, -7 o -8 di ratto. Cells expressing mGlu2, -4, -6, -7, and -8 sono state co-transfettate con una proteina G chimerica con la subunità alpha Gqi, which allows receptor coupling to polyphosphoinositide hydrolysis. Alla concentrazione di 100 μ M, l'acido cinnabarinico non attiva i recettori mGlu1, mGlu2, mGlu5, mGlu6, mGlu7 e mGlu8, come visto misurando la formazione di [3 H]InsP. Al contrario, l'acido cinnabarinico attiva, come un agonista parziale, il recettore mGlu4 visto da un aumento della formazione di [3 H]InsP di circa il 35%. In alcuni esperimenti, l'agonista totale, l'acido (1*S*,3*R*,4*S*)-1-aminociclopentano-1,3,4-tricarbossilico (ACPT-I), aumenta la formazione di [3 H]InsP del 170 % nelle cellule che esprimono il recettore mGlu4. Questo significa che a 100 μ M l'acido cinnabarinico era 5 volte meno efficace dell'ACPT-I nell'attivare i recettori mGlu4 (**Fig.11A**). La curva concentrazione risposta con l'acido cinnabarinico, l'acido 3-idrossiantranilico su cellule che esprimono il recettore mGlu4 è visto nella **Fig. 11B**, dove i dati sono espressi come percentuale della risposta massima al ACPT-I. L'acido cinnabarinico ha mostrato una bassa potenzialità nell'attivare i recettori mGlu4, visualizzando una attività agonista

a concentrazioni $\geq 100 \mu\text{M}$. L'acido 3-idrossiantranilico è risultato inattivo sul recettore mGlu4 (**Fig. 11B**).

E' stato combinato l'acido cinnabarinico (30 o 100 μM) con l'agonista quisqualato sul recettore mGlu1/5, con l'agonista DCG-IV sul recettore mGlu2/3, o con l'agonista L-AP4 sui recettori mGlu4/6/7/8, al loro valore di EC_{20} e EC_{80} per il rispettivo sottotipo recettoriale mGlu. L'acido cinnabarinico non influenza l'azione dell'acido quisqualico, DCG-IV o L-AP4, escludendo alcune possibili azioni dell'acido cinnabarinico come antagonista, o come modulatore allosterico positivo per alcuni sottotipi recettoriali del mGlu (non mostrato).

8.12.b L'acido cinnabarinico si lega all'interno della tasca di legame del glutammato

Per investigare sul sito di azione dell'acido cinnabarinico, è stato per primo testato su un recettore mGlu4 troncato, privato del suo dominio N-terminale, dominio Venus-flytrap (ΔV -mGlu4). I modulatori allosterici del recettore mGlu legano il dominio transmembrana del recettore, ed è stato già dimostrato che, in assenza del dominio N-terminale, i modulatori allosterici positivi attivano direttamente i recettori mGlu, comportandosi in modo simile agli agonisti ortosterici (Goudet et al. 2004, Chen et al. 2007, Chen et al. 2008). Pertanto, se l'attività agonista dell'acido cinnabarinico era dovuta ad una azione nel dominio transmembrana del mGlu4, questo composto avrebbe dovuto mantenere la sua attività in cellule che esprimono ΔV -mGlu4.

Le curve concentrazione-risposta con PHCCC, con acido cinnabarinico, con l'acido 3-idrossiantranilico su cellule che esprimono ΔV -mGlu4 sono mostrate nella **Fig. 12A**, dove i dati sono espressi come percentuale della risposta massima al PHCCC. Come previsto, il PHCCC è più attivo sul recettore mGlu4, attivando ΔV -mGlu4 recettoriale in maniera concentrazione-dipendente, mentre l'acido cinnabarinico e l'acido 3-idrossiantranilico sono inattivi (**Fig. 12A**).

Questo indica che l'acido cinnabarinico non interagisce con il dominio transmembrana del recettore mGlu4.

E' stata allora usata la mutagenesi sito-diretta per approfondire se l'acido cinnabarinico poteva legarsi all'interno della tasca del glutammato legato oppure no. A questo scopo sono stati mutati alcuni residui della tasca di legame ortosterica del mGlu4 che sono coinvolti nel legame e nell'attività del glutammato e di altri agonisti, come la L-AP4.

S159 e T182 sono coinvolti nel legame della porzione α aminoacidica del glutammato e L-AP4 (Hampson et al. 1999). La sostituzione di uno di questi amminoacidi con un Ala diminuisce l'attività di 10 μ M del L-AP4 nonché l'attività di 100 μ M dell'acido cinnabarinico, nonostante l'assenza di una frazione di α aminoacidica in questa molecola (**Fig. 12B**). Un gruppo di quattro residui basici, K74, R78, K317 e K405, è coinvolto nel legame di gruppo carbossilico o fosfonico distale del glutammato e del L-AP4, rispettivamente (Hampson et al. 1999, Rosemond et al. 2002). La sostituzione di K405 con un'Alanina abolisce la stimolazione del mGlu4 con l'acido cinnabarinico. L'attività dell'acido cinnabarinico a 100 μ M è inoltre diminuita del 50% (n=8) in mGlu4 K74A+K317A ma rimane quasi invariata in mGlu4 R78A rispetto agli mGlu4 wt (**Fig. 12B**). Mentre tra tutti i recettori mGlu la tasca di legame del glutammato è ben conservata, due residui differiscono tra mGlu4 ed mGlu8. S157 e G158 in mGlu4 sono sostituiti da due Ala in mGlu8. E' stato dimostrato che essi sono responsabili della selettività di FP427 per mGlu4 rispetto a mGlu8 (Frauli et al., 2007). L'attività dell'acido cinnabarinico è aumentata nel doppio mutante mGlu4 S157A+G158A (**Fig. 12B**) forse per via di un ridotto ingombro sterico.

Presi insieme questi dati confermano che l'acido cinnabarinico è un agonista debole di mGlu4 che agisce al sito ortosterico di legame. Alcuni, sebbene non tutti, residui critici coinvolti nel legame del glutammato o di L-AP4 sono anche importanti per l'attività dell'acido cinnabarinico.

8.12.c Adattamento dell'acido cinnabarinico nella tasca di legame del glutammato mediante molecular modeling.

I dati di mutagenesi confermano che l'acido cinnabarinico si legni al sito ortosterico di mGlu4R. L'acido cinnabarinico è stato così adattato nel modello di omologia del dominio extracellulare chiuso che avevamo precedentemente descritto (Selvam et al., 2010). La molecola si inserisce perfettamente nella fessura tra idue lobi in prossimità della loro congiunzione (**Fig. 13A**).

In degli articoli precedenti (Bertrand et al., 2002; Selvam et al., 2010), avevamo diviso la tasca di legame degli agonisti mGlu in una tasca di legame prossimale ed in una distale. La prima si lega alla porzione α -aminoacidica degli analoghi del glutammato e la seconda ai gruppi acidi della catena laterale del ligando. Nella'acido cinnabarinico non è presente nessun gruppo aminoacidico, ciononostante si è trovato che residui della tasca prossimale interagiscono con l'acido cinnabarinico. E' da notare che S159 e T182 formano legami idrogeno con gli ossigeni e D312 con il gruppo amminico del 2-amino 3-oxo phenoxazine (**Fig 13B e 13C**). Cinque residui basici distali (K71, K74, R78, K317 and K405) interagiscono con le due funzioni carbossiliche dell'acido cinnabarinico. Inoltre, anche S110 può interagirvi. I protoni di G158 sono posizionati sopra la struttura planare coniugata dell'acido cinnabarinico e fanno interazioni CH- π . Y230 fa lo stesso tipo d'interazione con H4 dell'acido cinnabarinico. Comunque, il contatto tra l'acido cinnabarinico e Y230 potrebbe non permettere una chiusura ottimale della struttura bilobata e potrebbe spiegare la parziale attività al recettore mGLu4. Abbiamo mostrato in precedenza il ruolo critico delle interazioni tra agonisti/antagonisti e quella tirosina (Bessis et al., 2002).

8.12.d L'acido cinnabarino inibisce la formazione di cAMP in colture cellulari di granuli cerebellari

Abbiamo esteso lo studio alle colture cellulari di granuli cerebellari, che esprimono recettori mGlu4 (Santi et al., 1994). Colture cellulari di granuli cerebellari di topo a 8-9 DIV sono state stimulate con acido cinnabarino e l'attivazione dei recettori mGlu4 è stata quantificata misurando l'inibizione della formazione di cAMP forskolin-indotta (I recettori mGlu4 sono accoppiati a proteine Gi/Go). L'acido cinnabarino riduceva la formazione di cAMP in una maniera dose-dipendente con una potenza ed un'efficacia maggiore di quella osservata nei sistemi d'espressione eterologhi. L'acido cinnabarino era efficace a 30 μ M ed inibiva in maniera consistente la formazione di cAMP (circa 80%) a 100 μ M. Il modulatore allosterico positivo del recettore mGlu4, PHCCC, usato come controllo positivo, riduceva a 30 μ M la formazione di cAMP di circa il 40% (**Fig. 14A**).

Al fine di separare la componente mediata dall'attivazione dei recettori mGlu4, abbiamo anche analizzato l'azione dell'acido cinnabarino e del PHCCC in colture cellulari di granuli cerebellari preparate da topi knockout per il recettore mGlu4. La mancanza di recettori mGlu4 dalle colture dei topi knockout era confermata mediante immunoblot (**Fig. 14B**). Come ci si aspettava, il PHCCC (30 μ M) inibiva la formazione di cAMP forskolin-indotta nelle colture dei topi wild-type, ma era del tutto inattivo nelle colture dei topi knockout per il recettore mGlu4 (**Fig. 5C**). A 30 μ M, l'acido cinnabarino riduceva la formazione di cAMP forskolin-indotta con una maggiore estensione nelle colture preparate da topi wild-type rispetto alle colture dei topi knockout per il recettore mGlu4. In contrasto, concentrazioni più alte di acido cinnabarino (100 μ M) erano egualmente efficaci nelle due colture (**Fig. 14C**). Così, alte concentrazioni di acido cinnabarino inibivano la formazione di cAMP reclutando meccanismi addizionali sconosciuti che possono spiegare la differenza nell'efficacia tra i recettori mGlu4 ricombinanti e nativi.

8.12.e L'acido cinnabarinico condivide l'azione degli agonisti del recettore mGlu4 nel proteggere i neuroni corticali in coltura da morte eccitotossica

Siamo partiti dall'evidenza che agonisti/enhancer del recettore mGlu4 proteggevano i neuroni corticali in coltura da morte eccitotossica (Bruno et al., 2000; Maj et al., 2003). Abbiamo utilizzato colture miste di cellule corticali, nelle quali i neuroni venivano piastrati su un monolito di astrociti confluenti. L'acido cinnabarinico di per sé non influenzava la vitalità neuronale quando applicato per 10 min o 24 ore in un ampio intervallo di concentrazioni (1-300 μM) (non mostrato). Per l'induzione dell'eccitossicità, le colture sono state stimulate con NMDA 100 μM per 10 min (paradigma di tossicità "veloce") e la morte neuronale è stata quantificata 24 ore più tardi. L'acido cinnabarinico attenuava la morte neuronale eccitotossica a concentrazioni ≥ 30 . Concentrazioni di 30, 100 e 300 μM di acido cinnabarinico riducevano la tossicità da NMDA con la medesima estensione. L'azione dell'acido cinnabarinico è mimata da composti che attivano i recettori mGlu4, incluso gli agonisti ortosterici, L-AP4 e (*R,S*)-PPG (entrambe a 100 μM) e dall'enhancer PHCCC (30 μM). L-AP4 e (*R,S*)-PPG mostravano, come neuroprotettivi, un'efficacia leggermente maggiore rispetto all'acido cinnabarinico o al PHCCC (**Fig. 15A**). L'attività protettiva dell'acido cinnabarinico era confermata in un altro set di esperimenti nei quali le colture erano stimulate da concentrazioni crescenti di NMDA in assenza o in presenza di acido cinnabarinico 100 μM . L'acido cinnabarinico riduceva la morte eccitotossica in maniera simile quando le concentrazioni di NMDA erano 100-300 μM (**Fig. 15B**). In fine, abbiamo esteso lo studio a colture cellulari corticali preparate da topi knockout per il recettore mGlu4. In queste colture, la neuroprotezione da parte di tutte le concentrazioni di acido cinnabarinico testate (30, 100 o 300 μM) era attenuata del 40-50% (**Fig. 15C**). Come atteso (Bruno et al., 2000; Maj et al., 2003), la neuroprotezione da parte di L-AP4, (*R,S*)-PPG, e PHCCC era abolita nelle colture preparate dai topi knockout per il recettore mGlu4 (**Fig. 15C**).

8.13 DISCUSSIONE

Abbiamo mostrato che l'acido cinnabarinico, un metabolita endogeno della via delle chinurenine, che porta due funzioni carbossiliche e un gruppo aminico, agisce come un agonista dei recettori mGlu4. Vogliamo sottolineare che l'acido cinnabarinico è (i) la prima chinurenina riportata in grado di interagire con un sottotipo di recettore mGlu; (ii) uno dei pochi composti che mostrano selettività per il recettore mGlu4 rispetto agli altri sottotipi recettoriali del gruppo III. In cellule HEK293 trasfettate, l'acido cinnabarinico si comportava come agonista parziale dei recettori mGlu4, con nessuna attività sui recettori mGlu1, -2, -5, -6, -7 e -8. L'acido cinnabarinico mostrava efficacia intrinseca per i recettori mGlu4 in condizioni che abbassavano consistentemente i livelli di glutammato extracellulare (cotrasfezione delle cellule HEK293 con il trasportatore del glutammato, EAAC1, e degradazione enzimatica del glutammato mediata dall'alanina amino transferasi).

Per individuare il sito d'azione dell'acido cinnabarinico, lo abbiamo testato su un recettore mGlu4 troncato privo del dominio extracellulare dove si legano gli agonisti ortosterici. Contrariamente all'enhancer del recettore mGlu4, PHCCC, l'acido cinnabarinico non attivava i recettori troncati privi del dominio extracellulare N-terminale e non potenziava l'azione dell'agonista del recettore mGlu4, L-AP4. Ciò indica che l'acido cinnabarinico non si comporta come un modulatore allosterico positivo del recettore mGlu4 e che la sua azione richiede la presenza del dominio Venus Fly Trap N-terminale che contiene il sito principale di legame per il glutammato e gli altri agonisti ortosterici. Abbiamo successivamente adoperato recettori mGlu4 nei quali i residui critici per il sito di legame del glutammato sono mutati in Alanina. Abbiamo mostrato che i due residui importanti per i gruppi α aminoacidici del glutammato, S159 e T182, sono anche critici per l'attività dell'acido cinnabarinico, a dispetto del fatto che tale molecola sia priva di qualunque funzione. Alcuni residui basici coinvolti nel legame della funzione distale acida del glutammato o di L-AP4, K74, K317 e K405 sono anche implicati nell'attività dell'acido cinnabarinico.

Partendo da questi dati, abbiamo inserito l'acido cinnabarinico in un modello del dominio extracellulare del recettore mGlu4 usando il molecular modeling. La molecola si adatta bene nella tasca di legame del glutammato. Si è trovato che alcuni residui fondamentali per il legame del glutammato al sito prossimale e a quello distale interagiscono con l'acido cinnabarinico, come S150 e T182 che formano legami idrogeno con gli ossigeni del composto. Poiché l'acido cinnabarinico è legato vicino alla giunzione tra i due lobi, la struttura planare e rigida della sua parte fenoxazinica potrebbe impedire la completa chiusura del dominio e spiegare la parziale attività di questa molecola.

L'acido cinnabarinico era anche in grado di attivare recettori mGlu4 nativi espressi da colture cellulari di granuli cerebellari e da neuroni corticali cresciuti in colture miste. Nelle colture cellulari di granuli cerebellari abbiamo misurato l'inibizione della formazione di cAMP, che è il principale meccanismo di trasduzione accoppiato ai recettori mGlu4. Per analizzare il coinvolgimento dei recettori mGlu4 nativi nell'azione dell'acido cinnabarinico, abbiamo adoperato colture cellulari di granuli cerebellari preparate da topi knockout per il recettore mGlu4. Abbiamo adottato questa strategia, non essendo disponibili antagonisti del recettore mGlu4 ad alta affinità, selettivi e attendibili. L'inibizione della formazione di cAMP da parte dell'acido cinnabarinico a 30 μM era in larga parte attenuata (sebbene non abolita) nelle cellule dei granuli mancanti dei recettori mGlu4. In contrasto, l'azione dell'acido cinnabarinico ad una concentrazione di 100 μM era indipendente dai recettori mGlu4. Così, alte concentrazioni di acido cinnabarinico reclutano meccanismi addizionali che portano all'inibizione della formazione di cAMP. Poiché gli esperimenti sono stati condotti in presenza di IBMX, possiamo escludere che alte concentrazioni di acido cinnabarinico aumentino la degradazione di cAMP attivando le fosfodiesterasi. La spiegazione più plausibile è che alte concentrazioni di acido cinnabarinico attivino altri recettori di membrana accoppiati a proteine Gi. Un candidato potenziale è il recettore mGlu3, che è altamente espresso nelle colture di granuli cerebellari (Santi et al., 1994) e non è stato testato nelle cellule HEK293. Dovrebbe, comunque, essere sottolineato che i recettori mGlu2 ed mGlu3

condividono la stessa farmacologia di agonisti, rendendo la possibilità che l'acido cinnabarinico attivi mGlu3 ma non mGlu2 poco plausibile. In alternativa, alte concentrazioni di acido cinnabarinico potrebbero agire intracellularmente ed inibire l'attività dell'adenilato ciclasi in maniera diretta. Studi precedenti, condotti in fettine di cervello, hanno mostrato che L-AP4 e L-serine-O-phosphate, ossia: I due agonisti ortosterici prototipici del gruppo III, agiscono all'interno della cellula ed inibiscono l'attività delle aminotrasferasi di tipo II (Battaglia et al., 2000).

uno scenario differente è stato osservato nelle colture corticali miste testate con una breve stimolazione di NMDA. Questo modello di morte neuronale eccitotossica è stato usato per la dimostrazione dell'attività neuroprotettiva di composti che attivano i recettori mGlu4 (Bruno et al., 2000; Maj et al., 2003; see also present data). L'acido cinnabarinico conferiva una significativa protezione contro tossicità da NMDA, non mostrando alcun effetto a 1 e 10 μM , con un apparente plateau a 30-300 μM . Così, in questo particolare modello, non abbiamo trovato le differenze tra acido cinnabarinico 30 e 100 μM che avevamo visto quando misuravamo la formazione di cAMP nelle colture cellulari di granuli. La neuroprotezione con tutte le concentrazioni efficaci di acido cinnabarinico era attenuata, ma non abolita, nelle colture preparate da topi knockout per il recettore mGlu4. In contrasto, la neuroprotezione di L-AP4, R,S-PPG, e PHCCC era abrogata in assenza dei recettori mGlu4. Se si separa la componente mediata dai recettori mGlu4, l'efficacia dell'acido cinnabarinico come neuroprotettivo è meno del 50% rispetto a quella di L-AP4, R,S-PPG, e PHCCC, confermando che l'acido cinnabarinico si comporta come agonista parziale dei recettori mGlu4. La presenza di una componente aggiuntiva nell'attività neuroprotettiva dell'acido cinnabarinico era inaspettata, essendo stato dimostrato che la molecola induce morte cellulare apoptotica nei timociti attraverso la formazione di specie reattive dell'ossigeno ed attivazione della caspasi (Hiramatsu et al., 2008). Nonostante quanto riportato sui timociti, nelle nostre colture corticali l'acido cinnabarinico non altera di per sé la vitalità neuronale se applicato al mezzo di coltura per 24 h. La natura della componente recettore

mGlu4-indipendente nell'attività protettiva dell'acido cinnabarinico contro morte neuronale eccitotossica rimane da chiarire.

Con sorpresa, la concentrazione efficace minima dell'acido cinnabarinico in grado di attivare I recettori mGlu4 era più basso nelle colture di neuroni (30 μ M) che nelle cellule HEK293 (100 μ M). Questo è inaspettato con gli agonisti dei recettori mGlu. Ad esempio, L-AP4 e R,S-PPG attivano i recettori mGlu4 ricombinanti e nativi con potenza simile (Bruno et al., 2000; see also Schoepp et al., 1999), mentre l'ultima generazione di agonisti dei recettori mGlu2/3, come LY354740 ed LY379268, sono meno potenti nel proteggere i neuroni corticali contro la morte eccitotossica (D'Onofrio et al., 2001; Corti et al., 2007) che nell'attivare i recettori mGlu2 o mGlu3 nelle cellule ricombinanti (see Schoepp et al., 1999). La maggiore affinità dell'acido cinnabarinico per i recettori mGlu4 nativi potrebbe dipendere dalla presenza di un co-recettore o di una proteina d'ancoraggio assente nelle cellule ricombinanti. In alternativa, I recettori mGlu4 nei neuroni potrebbero formare complessi omo o eteromultimerici. Che favoriscono l'interazione con l'acido cinnabarinico.

La nostra scoperta che l'acido cinnabarinico attiva i recettori mGlu4 ha un certo numero di possibili implicazioni. Un' aumentata formazione di acido cinnabarinico durante la neuroinfiammazione (vedi Introduzione e referenze all'interno) potrebbe proteggere I neuroni dagli effetti dannosi delle citochine proinfiammatorie o da tossine endogene. Ad esempio, l'acido cinnabarinico potrebbe limitare la neurotossicità causata dagli alti livelli di acido chinolinico nel SNC dei pazienti affetti da HIV (Heyes et al., 1991). L'attivazione dei recettori mGlu4 è anche stata implicata nella regolazione della sinapsi immunologica tra una cellula presentante l'antigene ed una cellula T naïve (Fallarino et al., 2010), dove l'attivazione della via delle chinurenine ha un ruolo consolidato nella tolleranza immunologica (Grohmann et al., 2002). L'acido cinnabarinico potrebbe essere una delle congiunzioni mancanti nei meccanismi di comunicazione cellula-cellula all'interno del sistema immunitario. Non sono ancora disponibili dati sulle concentrazioni

extracellulari di acido cinnabarinico in condizioni fisiologiche o patologiche. Quest'informazione farà luce sul preciso ruolo dell'acido cinnabarinico come ligando endogeno dei recettori mGlu4.

BIBLIOGRAFIA

Abbas, A.K., Andrew, Lichtman, A.H, Pillai, A. *Cellula and Molecular Immunnology*. 2009

Aiba, A., Kano, M., Chen, C., Stanton, M.E., Fox, G.D., Herrup, K., Zwingman, T.A.,Tonegawa, S., 1994. Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 79, 377–388.

Amori L, Guidetti P, Pellicciari R, Kajii Y, and Schwarcz R (2009) On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. *J Neurochem* 109:316-25.

Aronica, E., Leenstra, S., Jansen, G.H., van Veelen, C.W., Yankaya, B., Troost, D., 2001a. Expression of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor proteins in glioneuronal tumors from patients with intractable epilepsy: colocalization with N-methyl-D-aspartic acid receptor. *Acta Neuropathologica* 101,383–392.

Aronica, E., Yankaya, B., Jansen, G.H., Leenstra, S., van Veelen, C.W., Gorter, J.A.,Troost, D., 2001b. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor protein expression in glioneuronal tumors from patients with intractable epilepsy. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 27, 1–16.

Aronica, E., Catania, M.V., Geurts, J., Yankaya, B., Troost, D., 2001c. Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes. *Neuroscience* 105, 509–520.

Aronica, E., Gorter, J.A., Jansen, G.H., van Veelen, C.W., van Rijen, P.C., Ramkema, M., Troost, D., 2003. Expression and cell distribution of group I and group II metabotropic glutamate receptor subtypes in Taylor-type focal cortical dysplasia.

Epilepsia 44, 785–795.

Battaglia G, Rassoulpour A, Wu HQ, Hodgkins PS, Kiss C, Nicoletti F, and Schwarcz R (2000) Some metabotropic glutamate receptor ligands reduce kynurenate synthesis in rats by intracellular inhibition of kynurenine aminotransferase II. *J Neurochem* **75**:2051-60.

Battelli, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-8 (2006).

Batten, M. et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 7, 929-36 (2006).

Baude, A., Nusser, Z., Roberts, J.D., Mulvihill, E., McIlhinney, R.A., Somogyi, P., 1993. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11, 771–787.

Bertrand HO, Bessis AS, Pin JP and Acher FC (2002) Common and selective molecular determinants involved in metabotropic glutamate receptor agonist activity. *J Med Chem* 45(15):3171-3183.

Besong G. et al. Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits the production of RANTES in glial cell culture. *J Neurosci* 22, 5403-11 (2002).

Bessis AS, Rondard P, Gaven F, Brabet I, Triballeau N, Prezeau L, Acher F and Pin JP (2002) Closure of the Venus flytrap module of mGlu8 receptor and the activation process: Insights from mutations converting antagonists into agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17):11097-11102.

Boldyrev, A. A., Carpenter, D. O. & Johnson, P. Emerging evidence for a similar role of glutamate receptors in the nervous and immune system. *J Neurochem* 95, 913-8 (2005).

Brabet I, Parmentier ML, De Colle C, Bockaert J, Acher F, and Pin JP (1998) Comparative effect of L-CCG-I, DCG-IV and gamma-carboxy-L-glutamate on all cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *Neuropharmacology* 37:1043-51.

Bruno V, Battaglia G, Ksiazek I, van der Putten H, Catania MV, Giuffrida R, Lukic S, Leonhardt T, Inderbitzin W, Gasparini F, Kuhn R, Hampson DR, Nicoletti F, and Flor PJ (2000) Selective activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors is protective against excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* 20:6413-20.

Bushell TJ, Jane DE, Tse HW, Watkins JC, Davies CH, Garthwaite J, and Collingridge GL (1995) Antagonism of the synaptic depressant actions of L-AP4 in the lateral perforant path by MAP4. *Neuropharmacology* 34:239-41.

Canudas, A. M. et al. PHCCC, a specific enhancer of type 4 metabotropic glutamate receptors, reduces proliferation and promotes differentiation of cerebellar granule cell neuroprecursors. *J Neurosci* 24, 10343-52 (2004).

Carpeneo R, Chiarugi A, Russi P, Lombardi G, Carlà V, Pellicciari R, Mattoli L, and Moroni F (1994) Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. *Neuroscience* **61**:237-43.

Casabona, G., Knoepfel, T., Kuhn, R., Gasparini, F., Baumann, P., Sortino, M.A., Copani, A., Nicoletti, F., 1997. Expression and coupling to polyphosphoinositide hydrolysis of group I metabotropic glutamate receptors in early postnatal and adult rat brain. *European Journal of Neuroscience* **9**, 12–17.

Chen Y, Goudet C, Pin JP, Conn PJ, and Conn PJ (2008) N-{4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide (CPPHA) acts through a novel site as a positive allosteric modulator of group 1 metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol* **73**:909-18.

Chen Y, Nong Y, Goudet C, Hemstapat K, de Paulis T, Pin JP, and Conn PJ (2007) Interaction of novel positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 5 with the negative allosteric antagonist site is required for potentiation of receptor responses. *Mol Pharmacol* **71**:1389-98.

Claman HN, Chaperon EA, Triplett RF. Immunocompetence of transferred thymus-marrow cell combinations. *J Immunol* **97**;6:828-32, 1966. *J Immunol.* 2004 Jul 1; **173**(1):9-13.

Claman HN, Chaperon EA, Triplett RF. Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966 Aug-Sep; **122**(4):1167-71.

Coesmans, M., Smitt, P.A., Linden, D.J., Shigemoto, R., Hirano, T., Yamakawa, Y., van Alphen, A.M., Luo, C., van der Geest, J.N., Kros, J.M., Gaillard, C.A., Frens, M.A., de Zeeuw, C.I., 2003. Mechanisms underlying cerebellar motor deficits due to mGluR1-autoantibodies. *Annals of Neurology* 53, 325–336.

Conn, P. J. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 205-37 (1997).

Corti C, Battaglia G, Molinaro G, Rizzo B, Pittaluga A, Corsi M, Mugnaini M, Nicoletti F, and Bruno V (2007) The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/neuroprotection. *J Neurosci* 27:8297-308.

Craner, M.J., Kataoka, Y., Lo, A.C., Black, J.A., Baker, D., Waxman, S.G., 2003. Temporal course of upregulation of Na(v)1.8 in Purkinje neurons parallels the progression of clinical deficit in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 62, 968–975.

D'Onofrio M, Cuomo L, Battaglia G, Ngomba RT, Storto M, Kingston AE, Orzi F, De Blasi A, Di Iorio P, Nicoletti F, and Bruno V (2001) Neuroprotection mediated by glial group-II metabotropic glutamate receptors requires the activation of the MAP kinase and the phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *J Neurochem* 78:435-45.

Dykens JA, Sullivan SG, and Stern A (1987) Oxidative reactivity of the tryptophan metabolites 3-hydroxyanthranilate, cinnabarinic acid, quinolinic acid and picolinic acid. *Biochem Pharmacol* 36:211-7.

Evans RH, Francis AA, Jones AW, Smith DA, and Watkins JC (1982) The effects of a series of omega-phosphonic alpha-carboxylic amino acids on electrically evoked and excitant amino acid-induced responses in isolated spinal cord preparations. *Br J Pharmacol* **75**: 65–75.

F. Fazio, S. Notartomaso, E. Aronica, M. Storto, G. Battaglia, E. Vieira, S. Gatti, V. Bruno, F. Biagioni, R. Gradini F. Nicoletti, R. Di Marco, 2008. Switch in the expression of mGlu1 and mGlu5 metabotropic glutamate receptors in the cerebellum of mice developing experimental autoimmune encephalomyelitis and in autaptic cerebellar samples from patients with multiple sclerosis. *Neuropharmacology* **55**,491–499.

Fallarino F, Notartomaso S, Fazio F, Buscati CL, Volpi C, Battaglia G, Bruno V, Nicoletti F, Grohmann U, and Di Marco R (2009) mGlu4 metabotropic glutamate receptor negatively regulates TH17 cell-driven immune responses: A new target for the experimental treatment of neuroinflammatory autoimmune disorders. *Soc Neurosci Abs* 334.4/J33

Franco, R., Pacheco, R., Lluís, C., Ahern, G. P. & O'Connell, P. J. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol* **28**, 400-7 (2007).

Furuzawa-Carballeda, J., Vargas-Rojas, M. I. & Cabral, A. R. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev* **6**, 169-75 (2007).

Frauli M, Hubert N, Schann S, Triballeau N, Bertrand HO, Acher F, Neuville P, Pin JP and Prezeau L (2007) Amino-pyrrolidine tricarboxylic acids give new insight into group III metabotropic glutamate receptor activation mechanism. *Mol Pharmacol* **71**(3):704-712.

Gasparini, F., Lingenhöhl, K., Stoehr, N., Flor, P.J., Heinrich, M., Vranesic, I., Biollaz, M., Allgeier, H., Heckendorn, R., Urwyler, S., Varney, M.A., Johnson, E.C., Hess, S.D., Rao, S.P., Sacca, A.I., Santori, E.M., Veliçelebi, G., Kuhn, R., 1999. 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology* 38, 1493–1503.

Geurts, J.J., Wolswijk, G., Boer, L., van der Valk, P., Polman, C.H., Troost, D., Aronica, E., 2003. Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. *Brain* 126, 1755–1766.

Gijbels, K., Brocke, S., Abrams, J.S., Steinman, L., 1995. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Molecular Medicine* 1, 795–805.

Giovannoni, G., Ebers, G., 2007. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Current Opinion in Neurology* 20, 261–268.

Gomez J, Joly C, Kuhn R, Knöpfel T, Bockaert J, and Pin JP (1996) The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the other intracellular domains to control coupling to G-proteins. *J Biol Chem* **271**:2199-205.

Goudet C, Gaven F, Kniazeff J, Vol C, Liu J, Cohen-Gonsaud M, Acher F, Prezeau L, and Pin JP (2004) Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:378–383.

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, and Puccetti P (2002) CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* **3**:1097-101.

Gruol, D., Nelson, Thomas E., 2005. Purkinje neuron physiology is altered by the inflammatory factor interleukin-6. *The Cerebellum* **4**, 198–205.

Gu, X.Q., Yao, H., Haddad, G.G., 2001. Increased neuronal excitability and seizures in the Na(p)/H(p) exchanger null mutant mouse. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* **281**, 496–503.

Hampson DR, Huang XP, Pekhletski R, Peltekova V, Hornby G, Thomsen C and Thogersen H (1999) Probing the ligand-binding domain of the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* **274**(47):33488-33495.

Hansel, C., Linden, D.J., 2000. Long-term depression of the cerebellar climbing fiber–Purkinje neuron synapse. *Neuron* **26**, 473–482.

Harrington, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-32 (2005).

Herzig, V., Schmidt, W.J., 2004. Effects of MPEP on locomotion, sensitisation and conditioned reward induced by cocaine or morphine. *Neuropharmacology* **47**, 973–984.

Heyes MP, Brew BJ, Martin A, Price RW, Salazar AM, Sidtis JJ, Yergey JA, Mouradian MM, Sadler AE, and Keilp J (1991) Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status. *Ann Neurol* **29**:202-9.

Hiramatsu R, Hara T, Akimoto H, Takikawa O, Kawabe T, Isobe K, and Nagase F (2008) Cinnabarinic acid generated from 3-hydroxyanthranilic acid strongly induces apoptosis in thymocytes through the generation of reactive oxygen species and the induction of caspase. *J Cell Biochem* **103**:42-53.

Ichise, T., Kano, M., Hashimoto, K., Yanagihara, D., Nakao, K., Shigemoto, R., Katsuki, M., Aiba, A., 2000. mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* 288, 1832–1835.

Ishida M, Saitoh T, Shimamoto K, Ohfuné Y, and Shinozaki HA (1993) A novel metabotropic glutamate receptor agonist: marked depression of monosynaptic excitation in the newborn rat isolated spinal cord. *Br J Pharmacol* **109**:1169-77.

Jong, Y.J., Schwetye, K.E., O'Malley, K.L., 2007. Nuclear localization of functional metabotropic glutamate receptor mGlu1 in HEK293 cells and cortical neurons: role in nuclear calcium mobilization and development. *Journal of Neurochemistry* 101, 458–469.

Jutel, M. et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 423, 420-5 (2001).

Kessler M, Terramani T, Lynch G, and Baudry M (1989) A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem* **52**:1319-28.

Khan AA, Bose C, Yam LS, Soloski MJ, Rupp F. Physiological regulation of the immunological synapse by agrin. *Science*. 2001 Jun 1;292(5522):1681-6. Epub 2001 May 10

Kano, M., Hashimoto, K., Kurihara, H., Watanabe, M., Inoue, Y., Aiba, A., Tonegawa, S., 1997. Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking mGluR1. *Neuron* **18**, 71–79.

Kim, Y.T., Namkung, Y.L., Kwak, J., Suh, C.K., 2007. Involvement of Na⁺-Ca²⁺ exchanger on metabotropic glutamate receptor 1-mediated [Ca²⁺]_i transients in rat cerebellar Purkinje neurons. *Neuroscience* **146**, 170–177.

Komyima, Y. et al. IL17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**, 566-73 (2006).

Kuerten, S., Kostova-Bales, D.A., Frenzel, L.P., Tigno, J.T., Tary-Lehmann, M., Angelov, D.N., Lehmann, P.V., 2007. MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *Journal of Neuroimmunology* **189**, 31–40.

Kutzelnigg, A., Faber-Rod, J.C., Bauer, J., Lucchinetti, C.F., Sorensen, P.S., Laursen, H., Stadelmann, C., Brück, W., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Lassmann, H., 2007. Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathology* **17**, 38–44.

Laouar, Y et al. TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10865-70 (2008).

Lassmann, H., Ransohoff, R.M., 2004. The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends in Immunology* 25, 132–137.

Linden, D.J., Dickinson, M.H., Smeyne, M., Connor, J.A., 1991. A long-term depression of AMPA currents in cultured cerebellar Purkinje neurons. *Neuron* 7, 81–89.

Maj M, Bruno V, Dragic Z, Yamamoto R, Battaglia G, Inderbitzin W, Stoehr N, Stein T, Gasparini F, Vranesic I, Kuhn R, Nicoletti F, and Flor PJ (2003) (-)-PHCCC, a positive allosteric modulator of mGluR4: characterization, mechanism of action, and neuroprotection. *Neuropharmacolog* **45**:895-906.

Martin, L.J., Blackstone, C.D., Huganir, R.L., Price, D.L., 1992. Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* 9, 259–270.

McKenzie, B. S., Kastelein, R. A. & Cua, D. J. Understanding the IL-23-IL17 immune pathway. *Trends Immunol* 27, 17-23 (2006).

Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., Ben-Nun, A., 1995. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *European Journal of Neuroscience* 25, 1951–1959.

Mendel, I., Katz, A., Kozak, N., Ben-Nun, A., Revel, M., 1998. Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *European Journal of Neuroscience* **28**, 1727–1737.

Moroni F, Cozzi A, Peruginelli F, Carpenedo R, and Pellegrini-Giampietro DE (1999) Neuroprotective effects of kynurenine-3-hydroxylase inhibitors in models of brain ischemia. *Adv Exp Med Biol* **467**:199-206.

Nagamura Y, Uesugi K, Naito J, and Ishiguro I (1999) Cinnabarinic acid was formed in damaged mitochondria and its effect on mitochondrial respiration. *Adv Exp Med Biol* **467**:419-23.

Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* **23**;258:597-603.

Ngomba RT, Ferraguti F, Badura A, Citraro R, Santolini I, Battaglia G, Bruno V, De Sarro G, Simonyi A, van Luijelaar G, and Nicoletti F (2008) Positive allosteric modulation of metabotropic glutamate 4 (mGlu4) receptors enhances spontaneous and evoked absence seizures. *Neuropharmacology* **54**:344-54.

Nicoletti, F., Bruno, V., Copani, A., Casabona, G. & Knopfel, T. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* **19**, 267-71 (1996).

Nicoletti F, Iadarola MJ, Wroblewski JT, and Costa E (1986a) Excitatory amino acid recognition sites coupled with inositol phospholipid metabolism: developmental changes and interaction with alpha 1-adrenoceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:1931-5.

Nicoletti F, Wroblewski JT, Novelli A, Alho H, Guidotti A, and Costa E (1986b) The activation of inositol phospholipid hydrolysis as a signal transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurosci* **6**: 1905-1911.

Nishizuka Y and Hayaishi O (1963) Enzymic synthesis of niacin nucleotides from 3-hydroxyanthranilic acid in mammalian liver. *J Biol Chem* **238**: 483-5.

Norcross MA. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)*. 1984 Sep-Oct;135D(2):113-34. Review.

Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 343, 938–951.

Ogawa H, Nagamura Y, and Ishiguro I (1983) Cinnabarinic acid formation in malpighian tubules of the silkworm. *Bombyx mori*: reaction mechanism of cinnabarinic acid formation in the presence of the catalase and manganese ions. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **364**:1507-18.

O'Malley, K.L., Jong, Y.J., Gonchar, Y., Burkhalter, A., Romano, C., 2003. Activation of metabotropic glutamate receptor mGlu5 on nuclear membranes mediates intranuclear Ca²⁺ changes in heterologous cell types and neurons. *Journal of Biological Chemistry* 278, 28210–28219.

Palmer E, Monaghan DT, and Cotman CW (1989) Trans-ACPD, a selective agonist of the phosphoinositide-coupled excitatory amino acid receptor. *Eur J Pharmacol* **3**;166:585–587.

Pekhletski, R., R. Gerlai, L. S. Overstreet, X. P. Huang, N. Agopyan, N. T. Slater, W. Abramow-Newerly, J.C. Roder, and D. R. Hampson. 1996. Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J Neurosci* 16:6364-6373.

Pekhletski R, and Hampson DR (1996) Differentiating allele combinations of a transgene using multiple primer PCR. *Biotechniques* 20:956–960.

Perkins MN and Stone TW (1982) An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res* 247:184-7.

Pin, J.P., Duvoisin, R., 1995. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1–26.

Rose K, Goldberg MP, and Choi DW (1992) Cytotoxicity in murine neocortical cell cultures, in, *Methods in toxicology* (Tyson CA and Frazier JM eds) pp. 46–60, San Diego Academics, San Diego.

Rosemond E, Peltekova V, Naples M, Thogersen H and Hampson DR (2002) Molecular determinants of high affinity binding to group III metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 277(9):7333-7340.

Samoilova, E.B., Horton, J.L., Hilliard, B., Liu, T.S., Chen, Y., 1998. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *Journal of Immunology* 161, 6480–6486.

Shigemoto, R., Abe, T., Nomura, S., Nakanishi, S., Hirano, T., 1994. Antibodies inactivating mGluR1 metabotropic glutamate receptor block long-term depression in cultured Purkinje cells. *Neuron* 12, 1245–1255.

Santi MR, Ikonovic S, Wroblewski JT, and Grayson DR (1994) Temporal and depolarization-induced changes in the absolute amounts of mRNAs encoding metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule neurons in vitro. *J Neurochem* **63**:1207-17.

Schoepp DD, Jane DE, and Monn JA (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **38**:1431-76.

Schwarcz R and Pellicciari R (2002) Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:1-10.

Selvam C, Oueslati N, Lemasson IA, Brabet I, Rigault D, Courtiol T, Cesarini S, Triballeau N, Bertrand HO, Goudet C, Pin JP and Acher FC (2010) A virtual screening hit reveals new possibilities for developing group III metabotropic glutamate receptor agonists. *J Med Chem* 53(7):2797-2813.

Sillevis Smitt, P., Kinoshita, A., De Leeuw, B., Moll, W., Coesmans, M., Jaarsma, D., Henzen-Logmans, S., Vecht, C., De Zeeuw, C., Sekiyama, N., Nakanishi, S., Shigemoto, R., 2000. Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *The New England Journal of Medicine* 342, 21–27.

Steckler, T., Lavreysen, H., Oliveira, A.M., Aerts, N., Van Craenendonck, H., Prickaerts, J., Megens, A., Lesage, A.S., 2005. Effects of mGlu1 receptor blockade on anxiety-related behaviour in the rat lick suppression test. *Psychopharmacology* 179, 198–206.

Stone TW and Darlington LG (2002) Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1:609-20.

Stone TW and Perkins MN (1981) Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* 72: 411-2.

Storto, M. et al. Expression of metabotropic glutamate receptors in murine thymocytes and thymic stromal cells. *J Neuroimmunol* 109, 112-20 (2000).

Varney, M.A., Cosford, N.D., Jachec, C., Rao, S.P., Saccaan, A., Lin, F.F., Bleicher, L., Santori, E.M., Flor, P.J., Allgeier, H., Gasparini, F., Kuhn, R., Hess, S.D., Velicelebi, G., Johnson, E.C., 1999. SIB-1757 and SIB-1893: selective, noncompetitive antagonists of metabotropic glutamate receptor type 5. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290, 170–181.

Vieira, E., Huwyler, J., Jolidon, S., Knoflach, F., Mutel, V., Wichmann, J. Fluorinated 9H-Xanthene-9-carboxylic acid oxazol-2-yl-amides as potent, orally available mGlu1 receptor enhancers. *ChemMedChem*, in press.

Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., Linington, C., 1994. Animal models. *Annals of Neurology* 36, S47–S53.

Wirleitner B, Neuraüter G, Schröcksnadel K, Frick B, and Fuchs D (2003) Interferon-gamma-induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Curr Med Chem* **10**:1581-91.

Woiciechowsky, C. et al. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Met* 4, 808-13 (1998).

Yang, L. et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T (H) 17 cells. *Nature* 454,350-2 (2008).

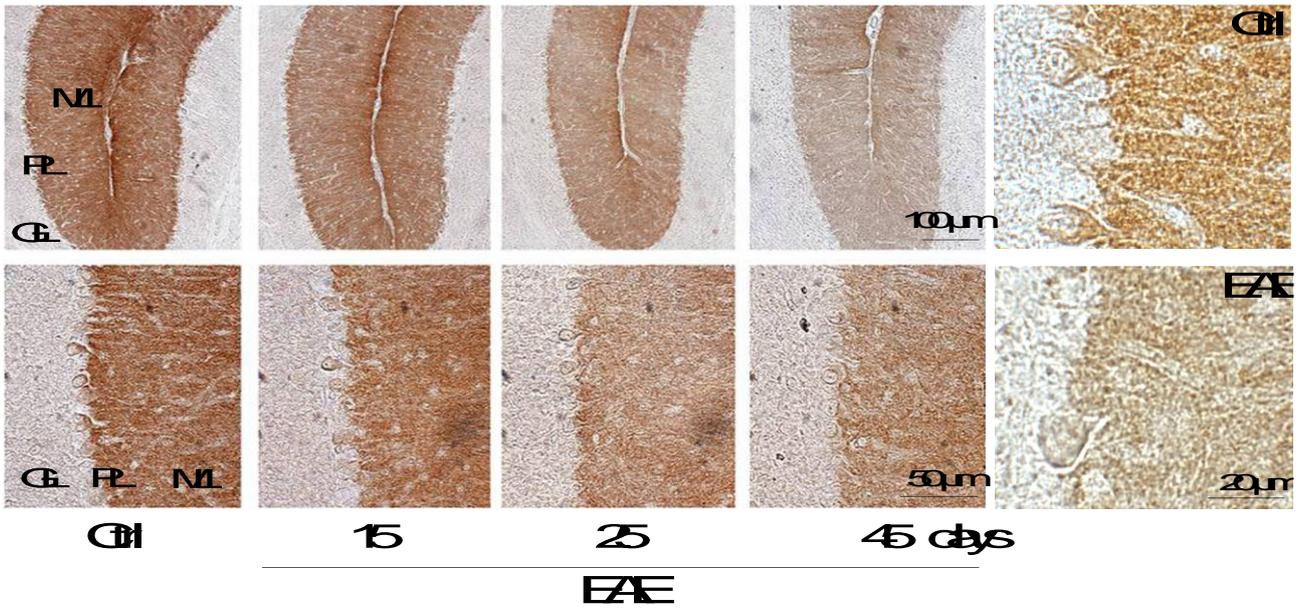
FIGURE E TABELLE

	Gender	Age (years)	Multiple Sclerosis	Duration of symptoms (years)	Cause of death	mGlu1 receptor I.R.	mGlu5 receptor I.R.
1	F	59	Yes	>20	Resp.insufficiency	2	2
2	M	73	Yes (SP)	22	Ileus, shock	3	1
3	F	68	Yes	17	Pneumonia	1	3
4	M	56	Yes (SP)	27	Pneumonia	1	1
5	M	66	Yes	-	Sepsis	3	0
6	F	75	Yes (PP/SP)	27	Surgery complic.	1	1
7	F	65	Yes (RR)	25	Cardiac failure	1	3
8	M	63	Yes (PP)	25	Cardiac arrest	1	3
9	F	70	Yes (RR)	40	Urinary infection	2	3
Mean±SEM		66±2.1		26.1±2.4		1.66±0.3*	1.88±0.4*
10	M	73	Nb		Cancer	3	0
11	M	67	Nb		-	3	0
12	M	56	Nb		Cardiac infart	3	0
13	F	59	Nb		Ileus, shock	3	0
14	F	68	Nb		Euthanasia	3	0
15	F	66	Nb		Cardiac infart	3	0
16	M	61	Nb		Cardiac infart	3	0
17	F	66	Nb		Cancer	3	0
18	F	59	Nb		Cancer	3	0
Mean±SEM		63.8±1.8				3±0	0±0

Espressione dei recettori mGlu1 e mGlu5 in cellule del Purkinje di 9 pazienti con SM e di 9 pazienti senza SM.

Tabella 1

A



B

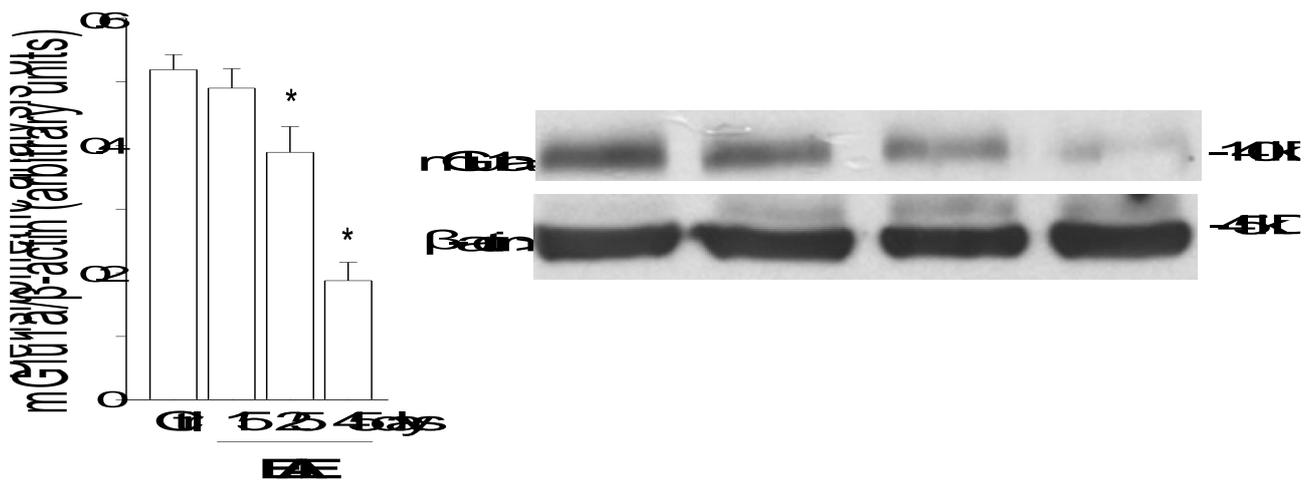
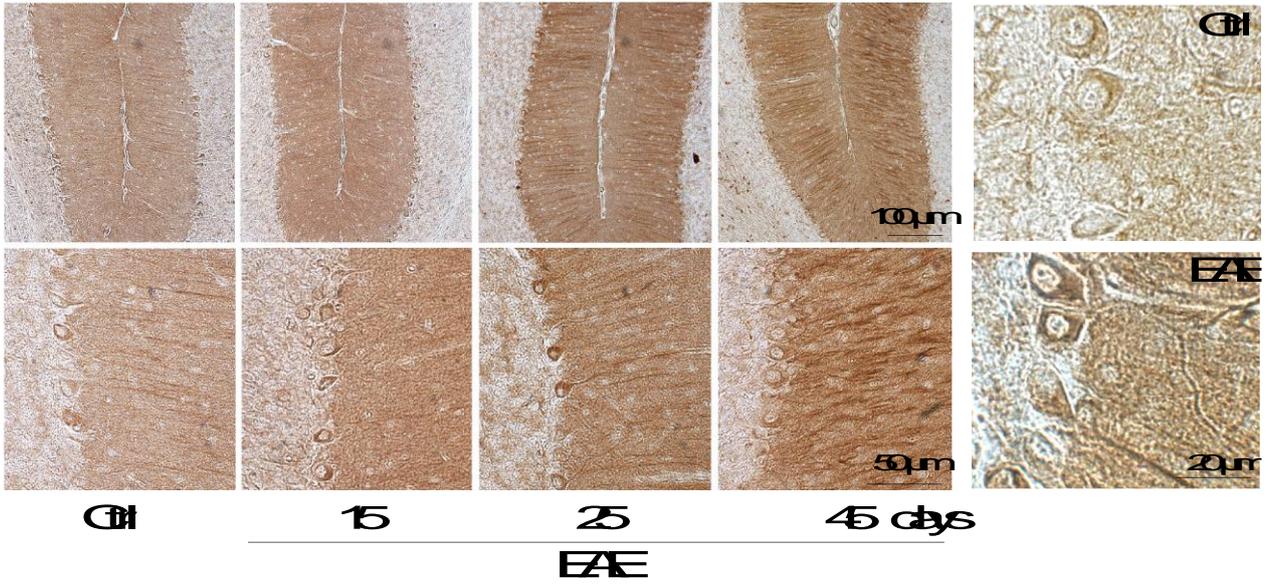


Figura 1

C



D

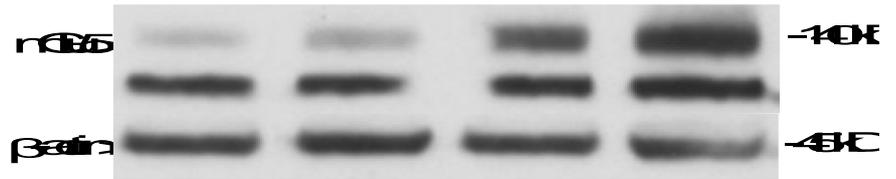
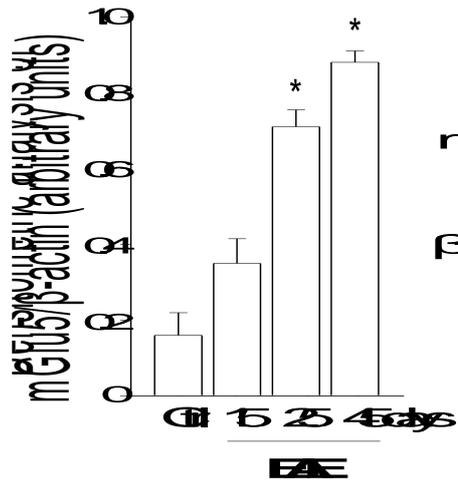


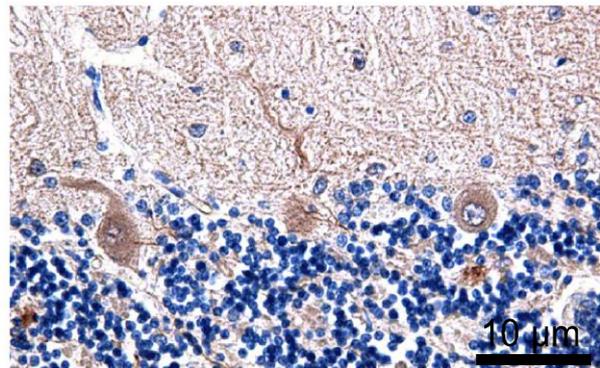
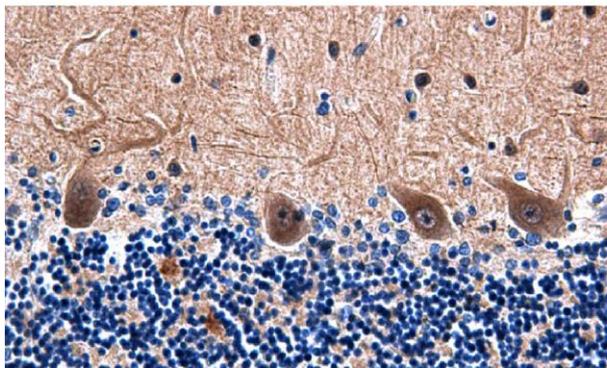
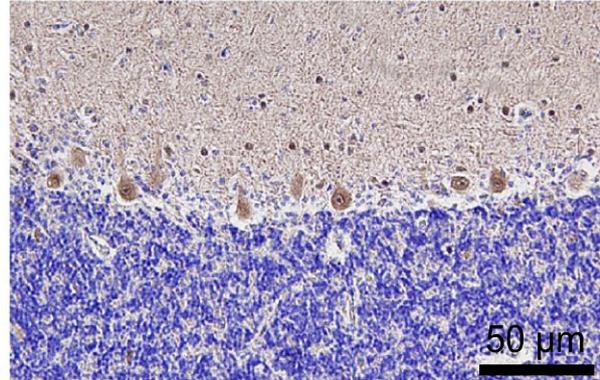
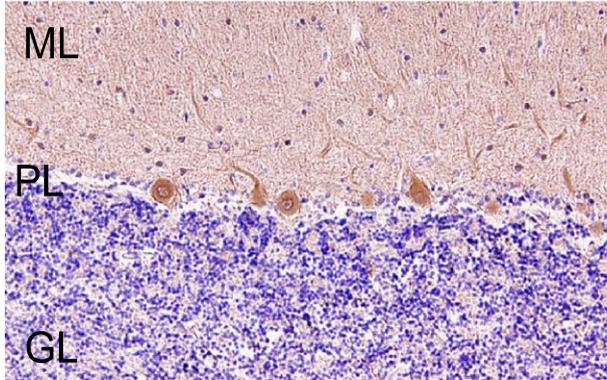
Figura 1

A

IMMUNOREATTIVITA' mGluR1

Control

Multiple Sclerosis



B

IMMUNOREATTIVITA' mGluR5

Control

Multiple Sclerosis

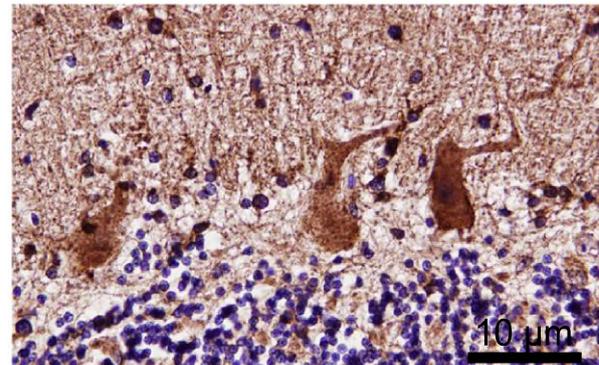
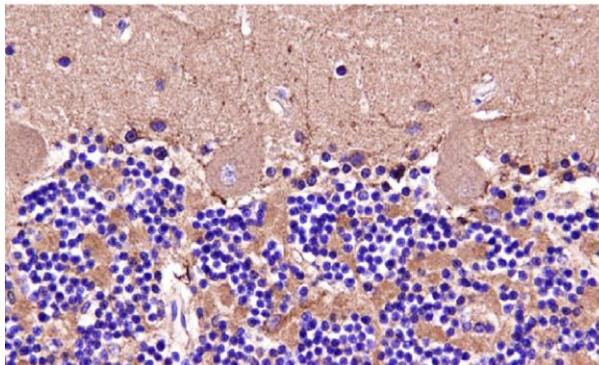
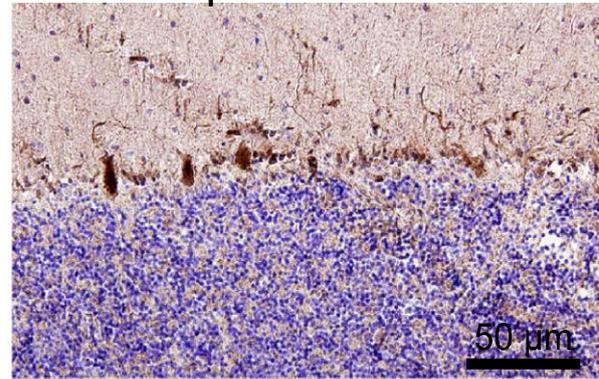
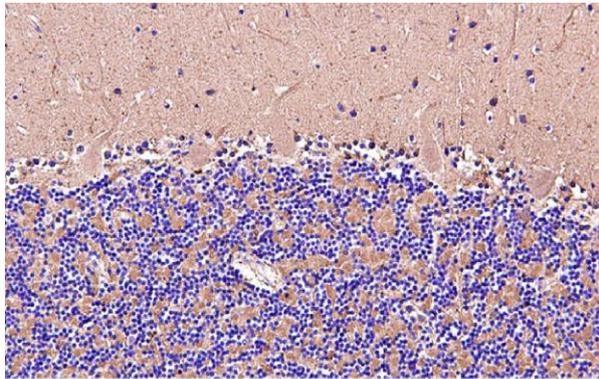


Figura 2

Esperimento #1

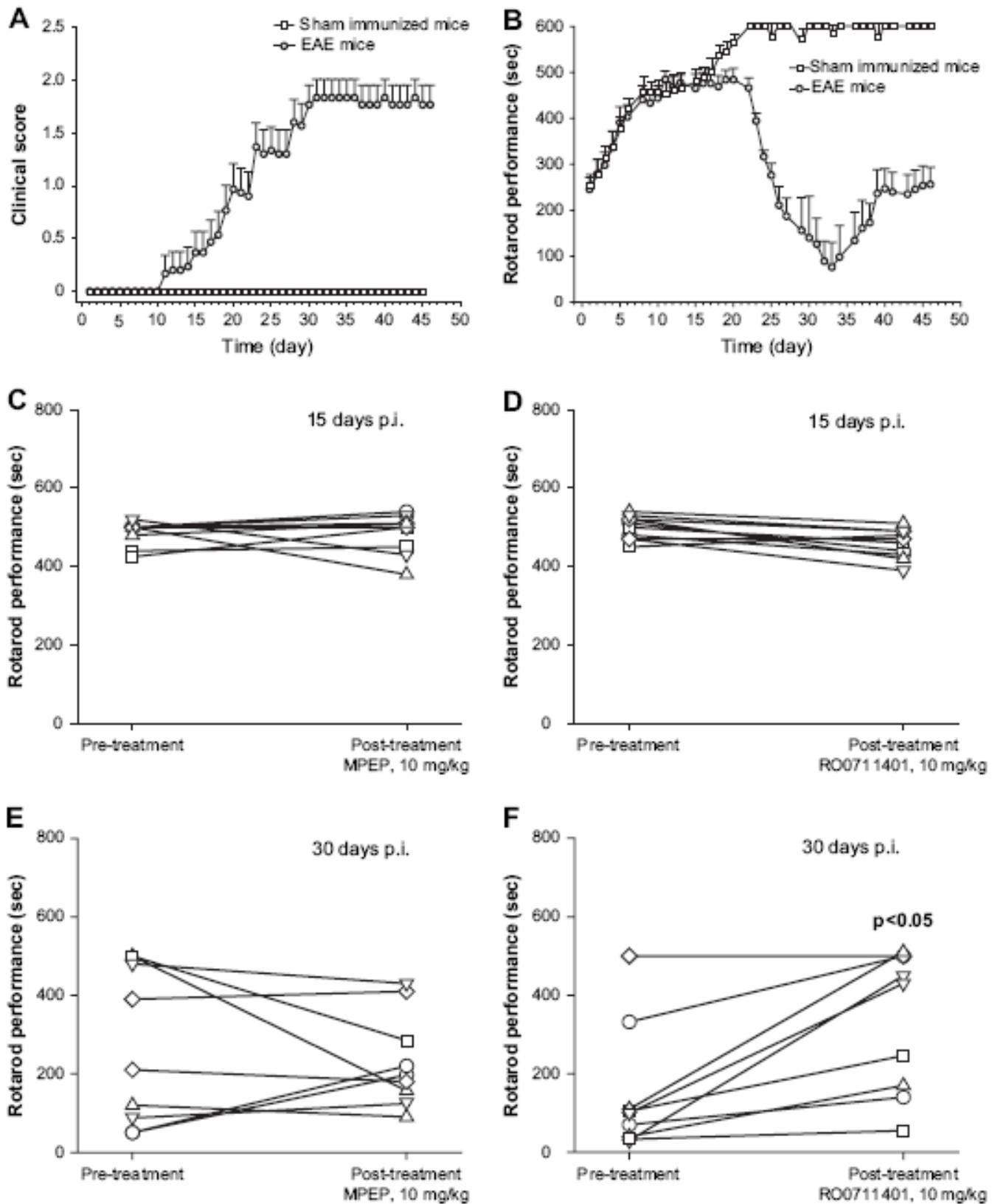


Figura 3

Esperimento #2

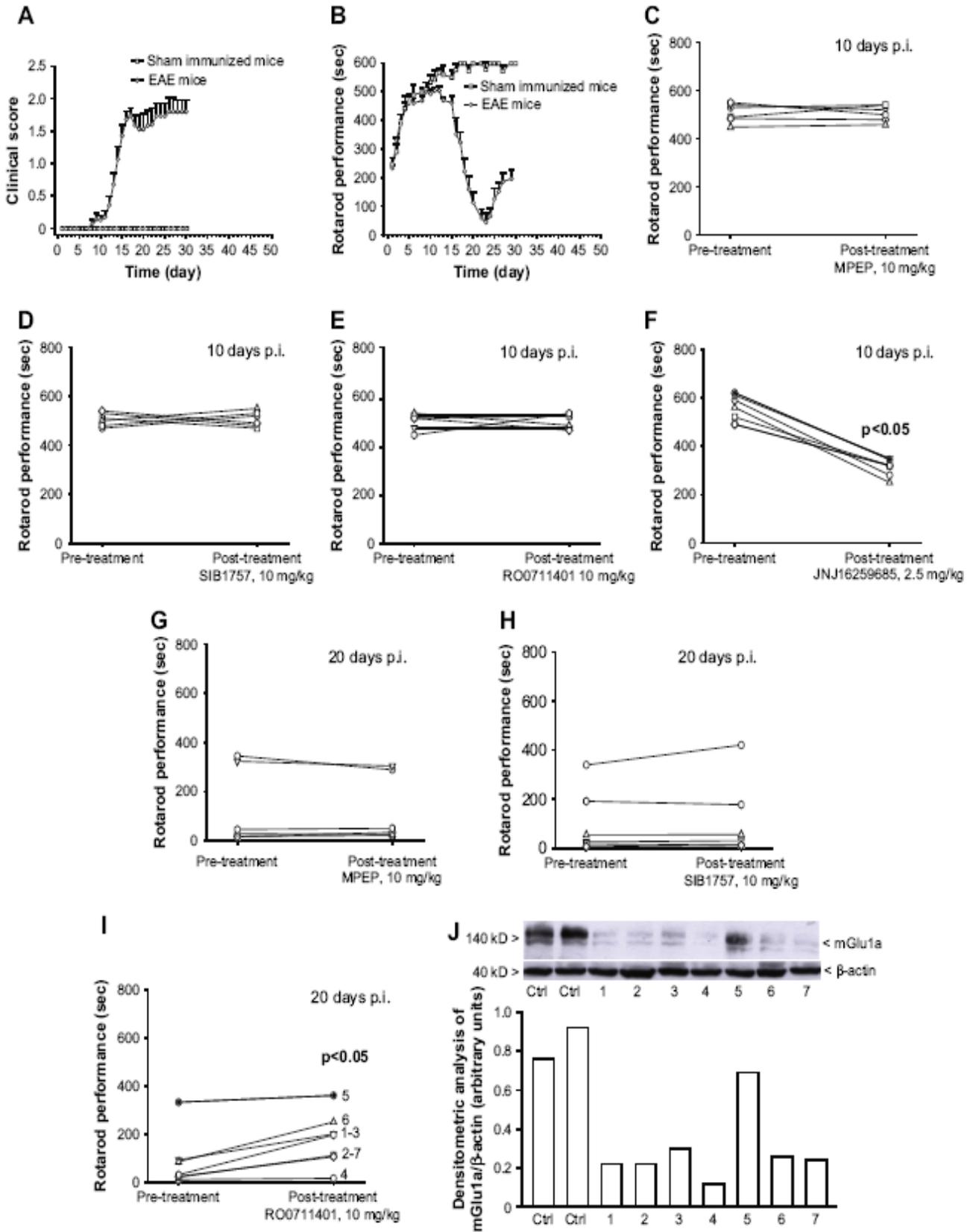


Figura 4

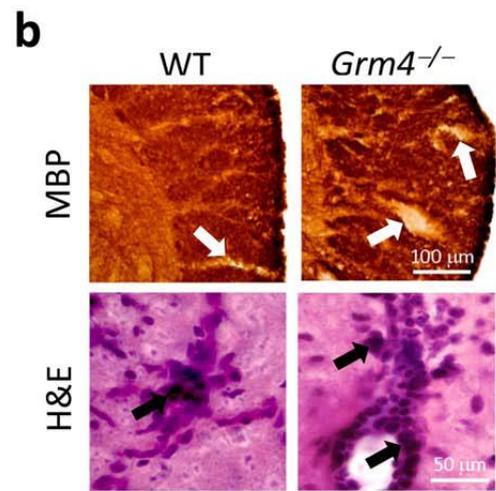
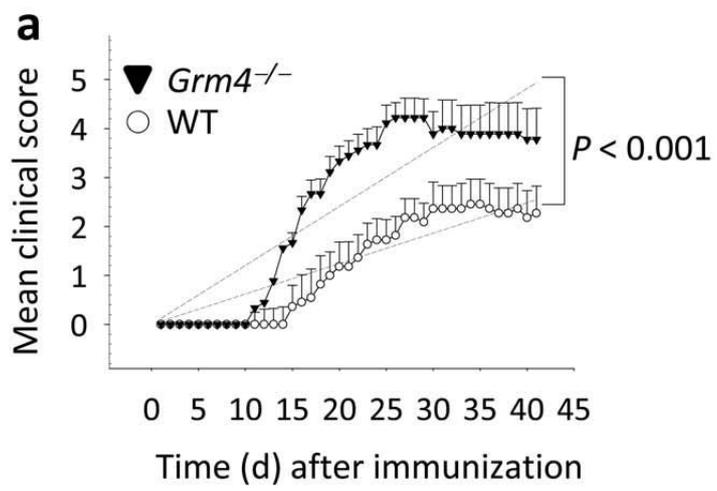


Figure 5

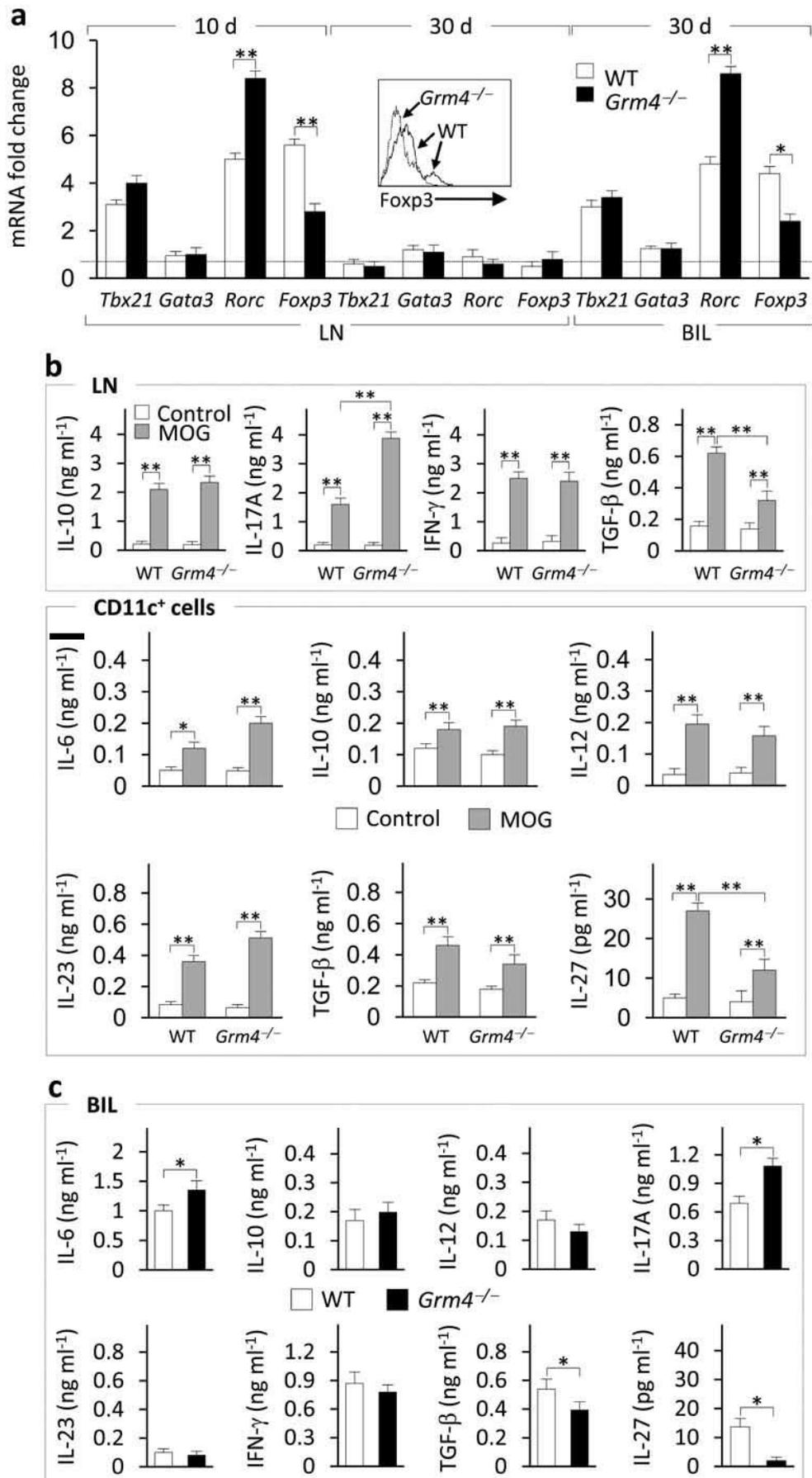


Figura 6

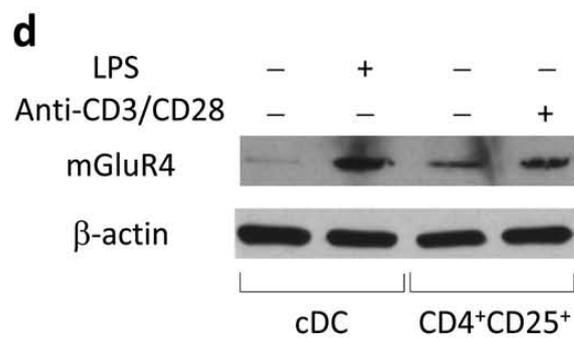
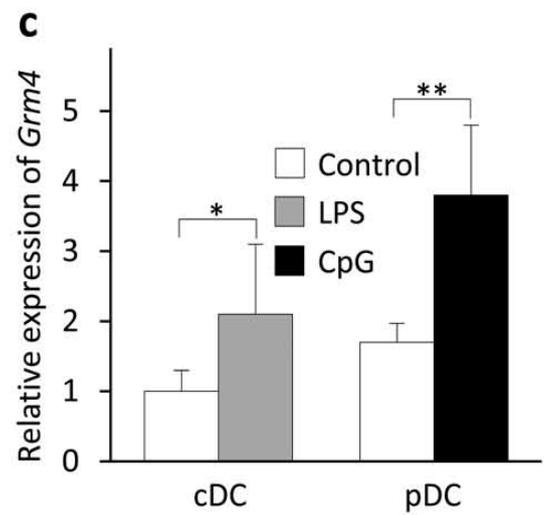
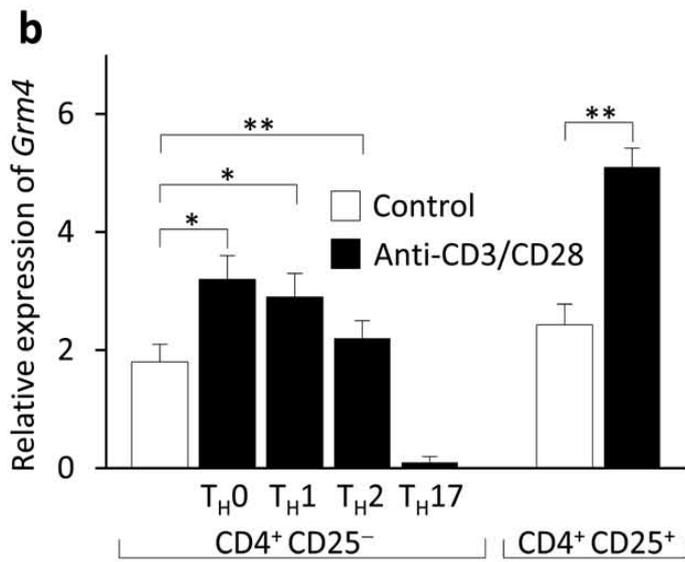
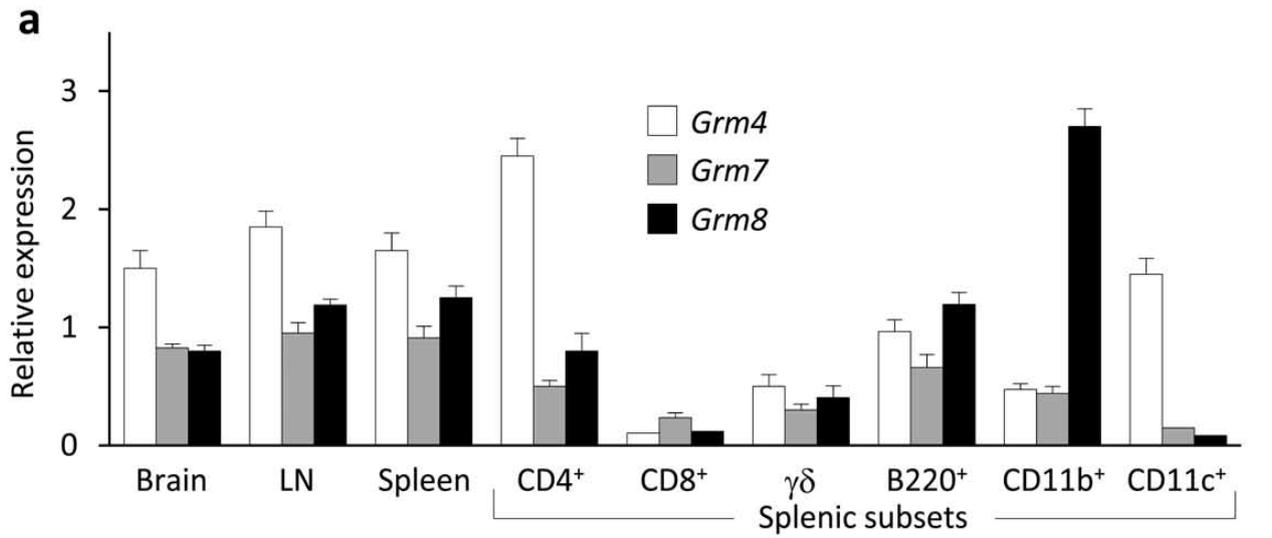


Figure 7

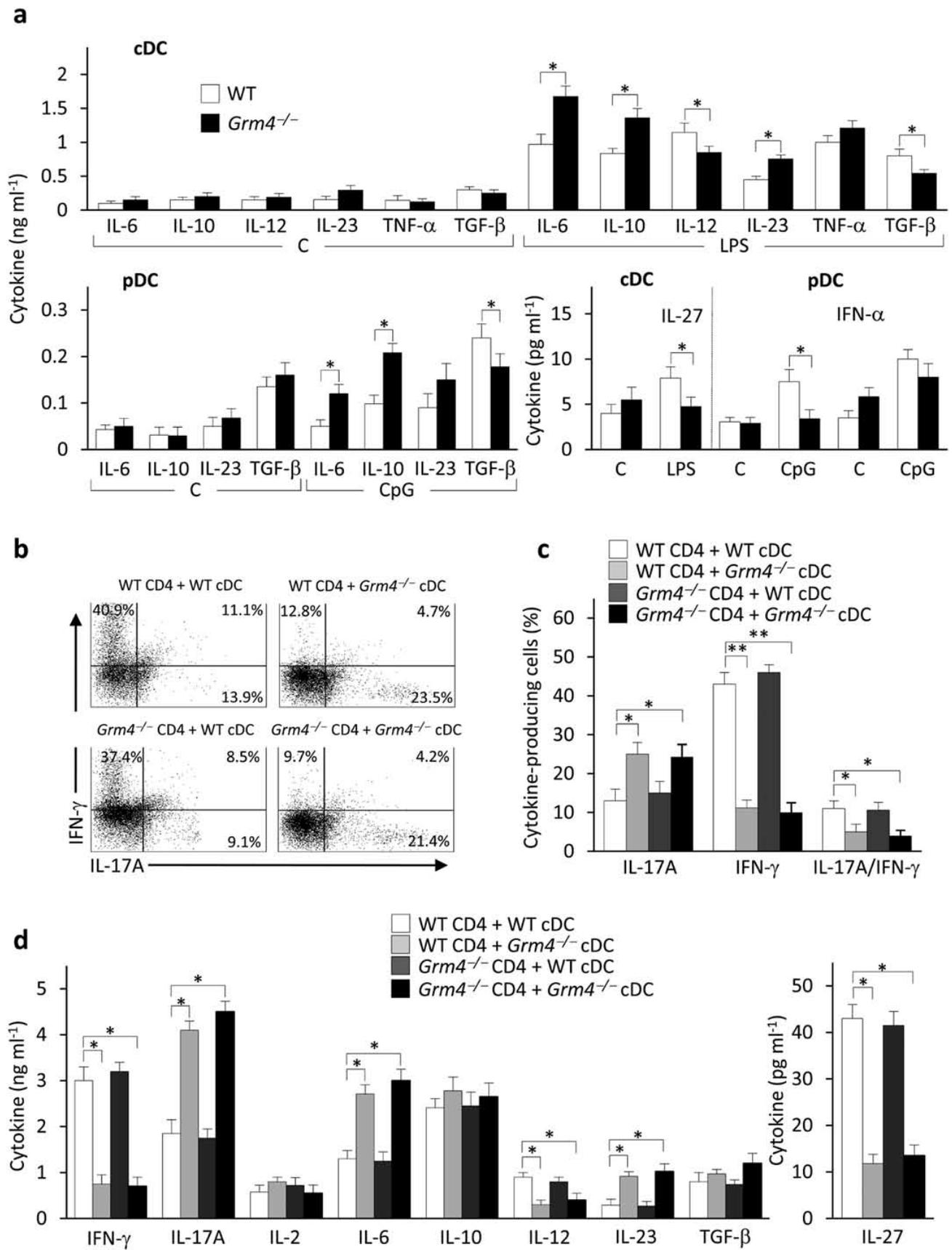


Figure 8

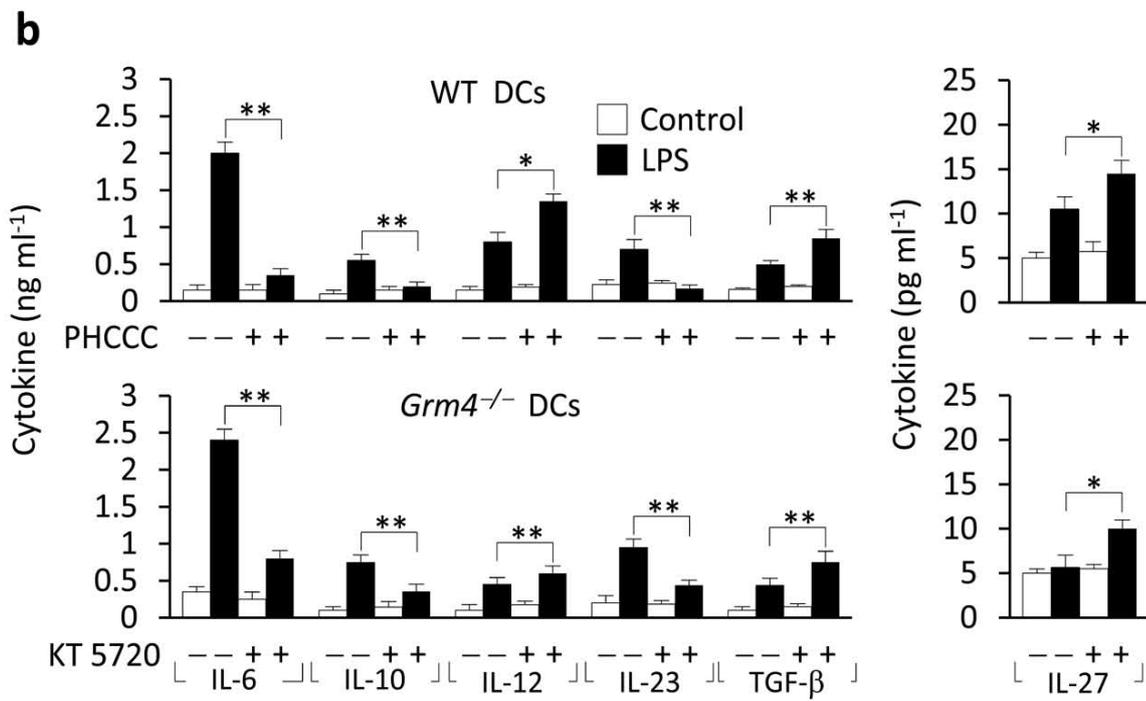
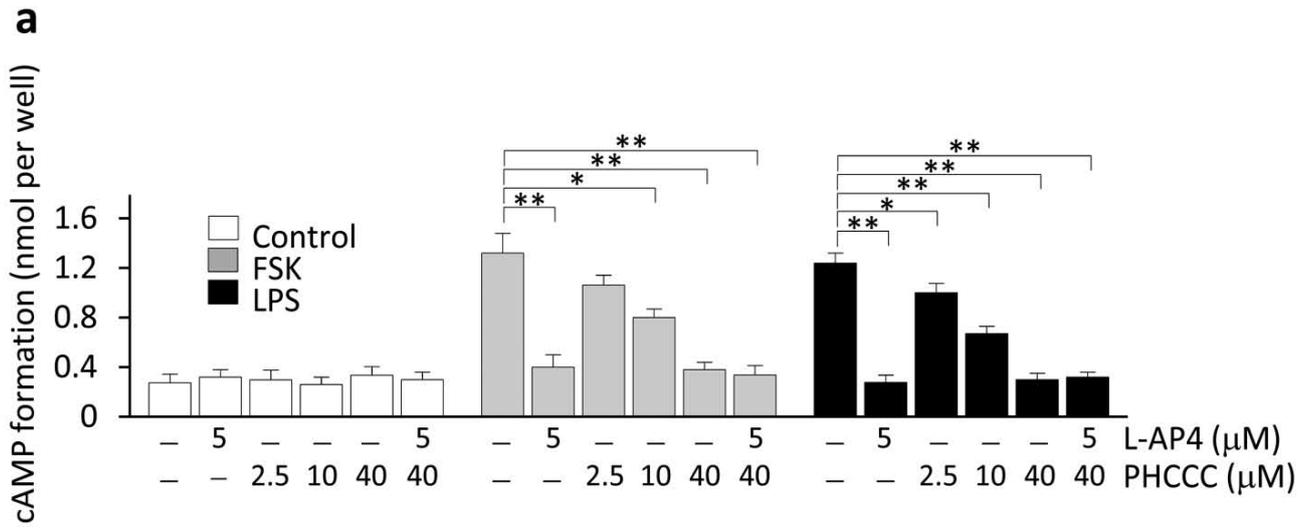


Figura 9

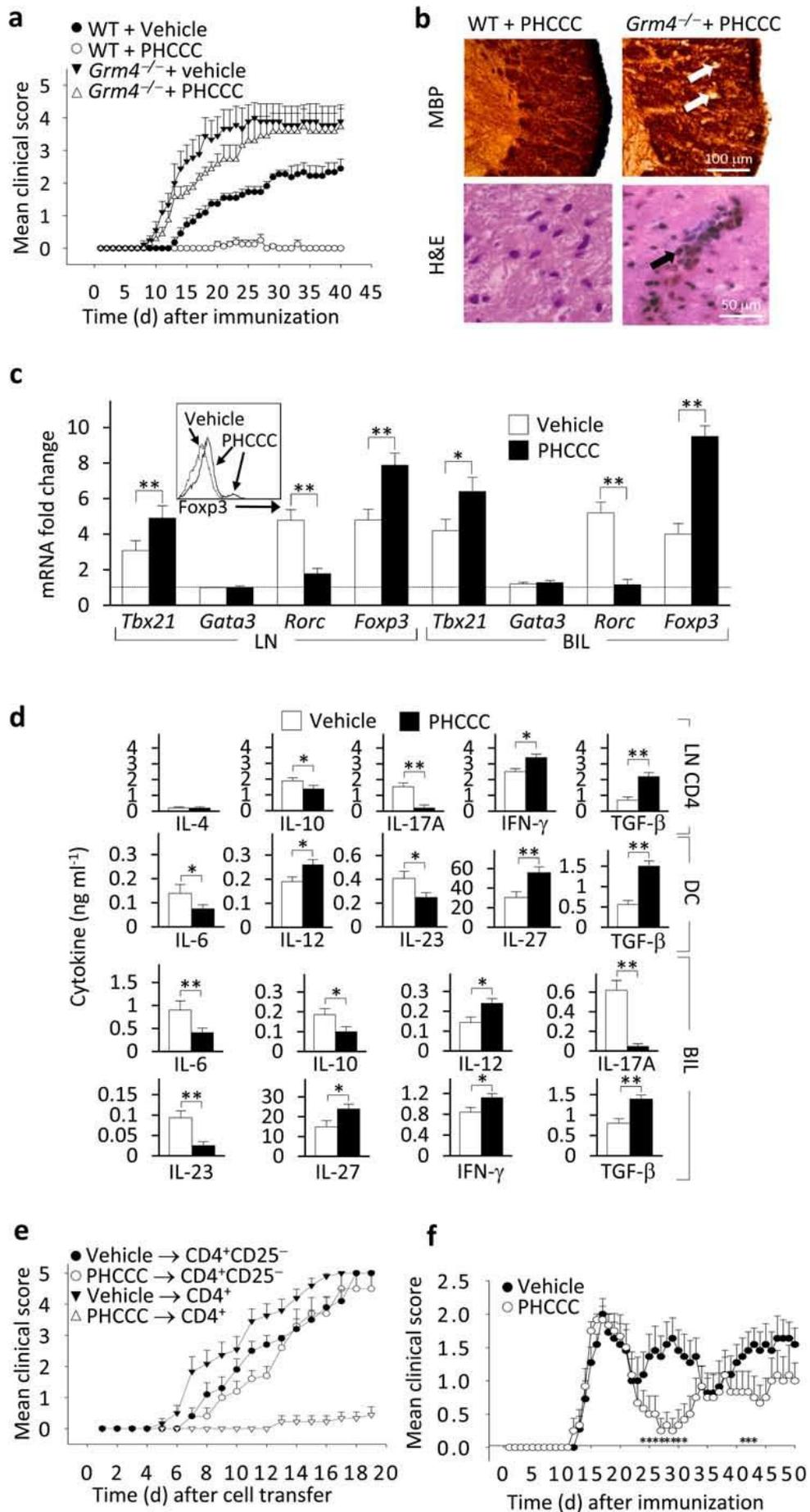


Figure 10

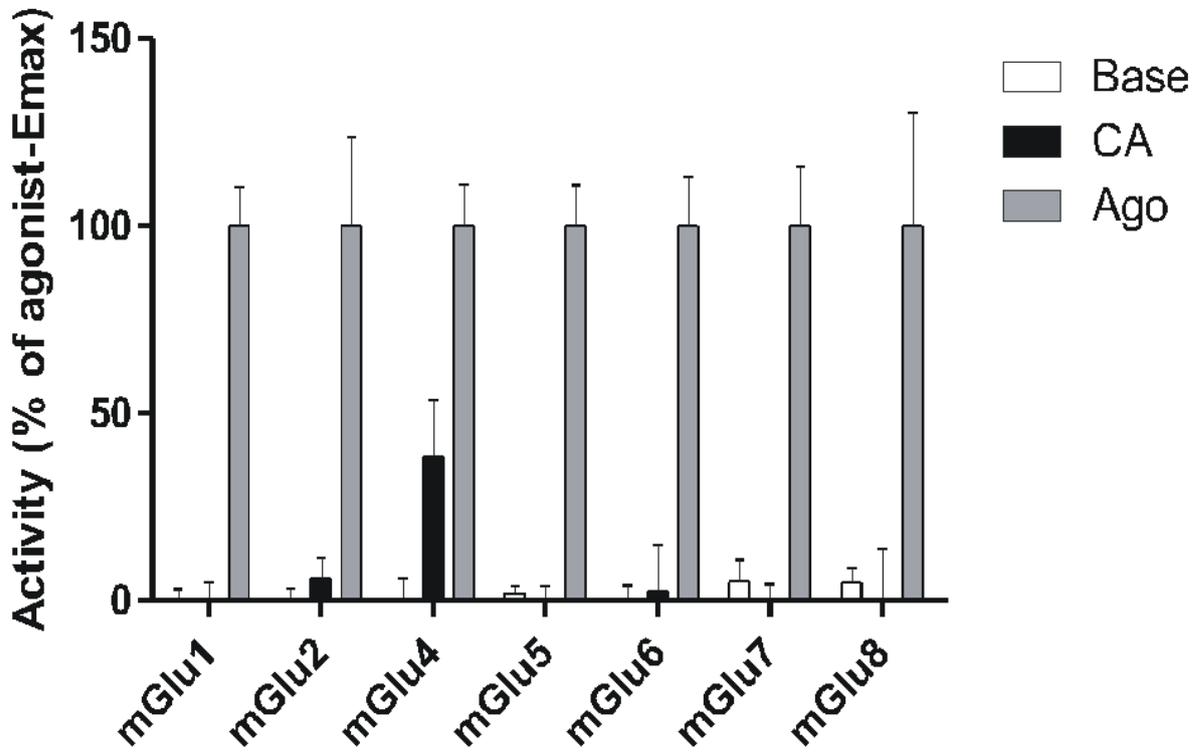
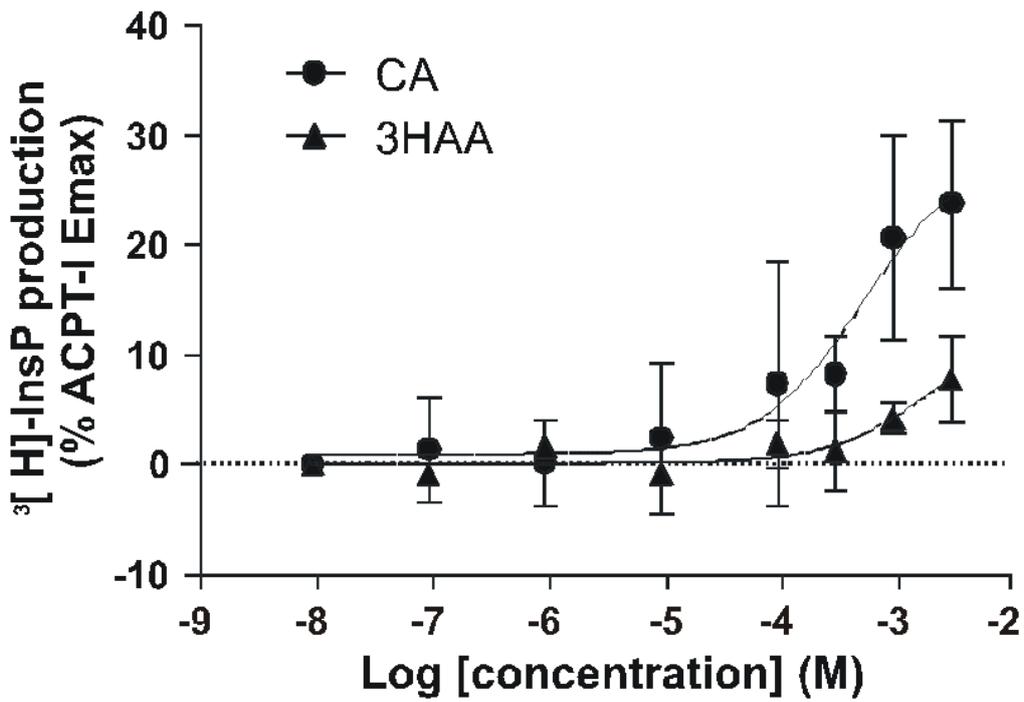
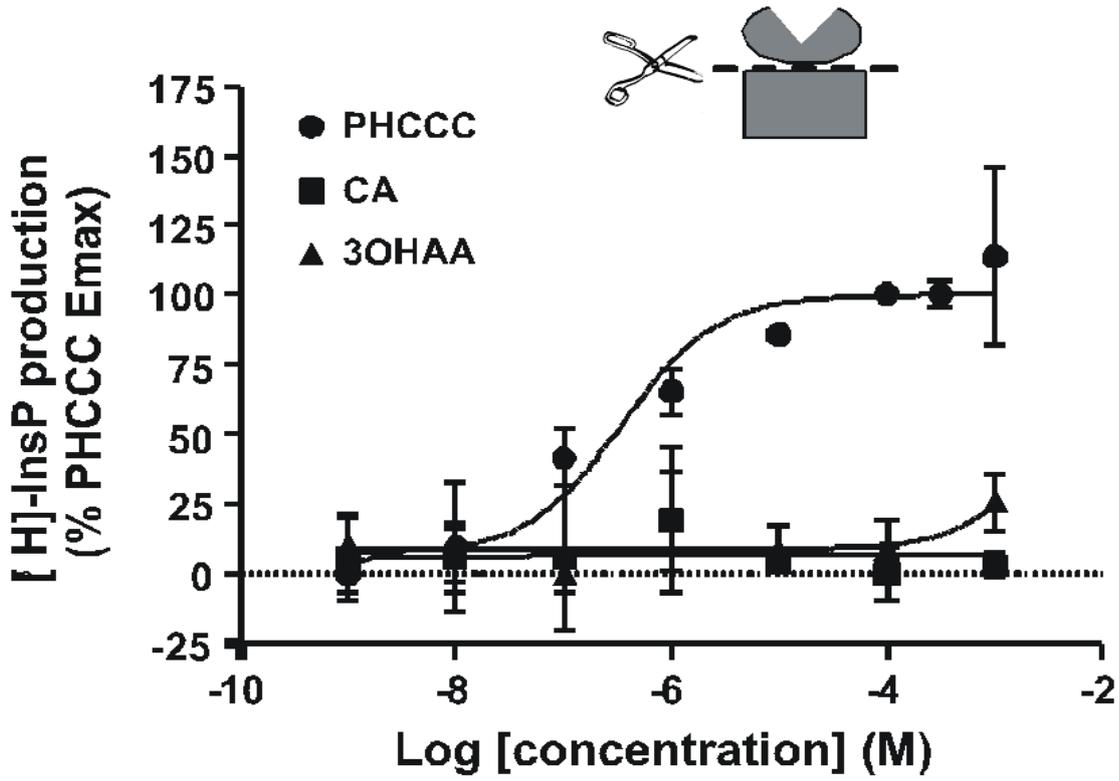
A**B**

Figura 11

A



B

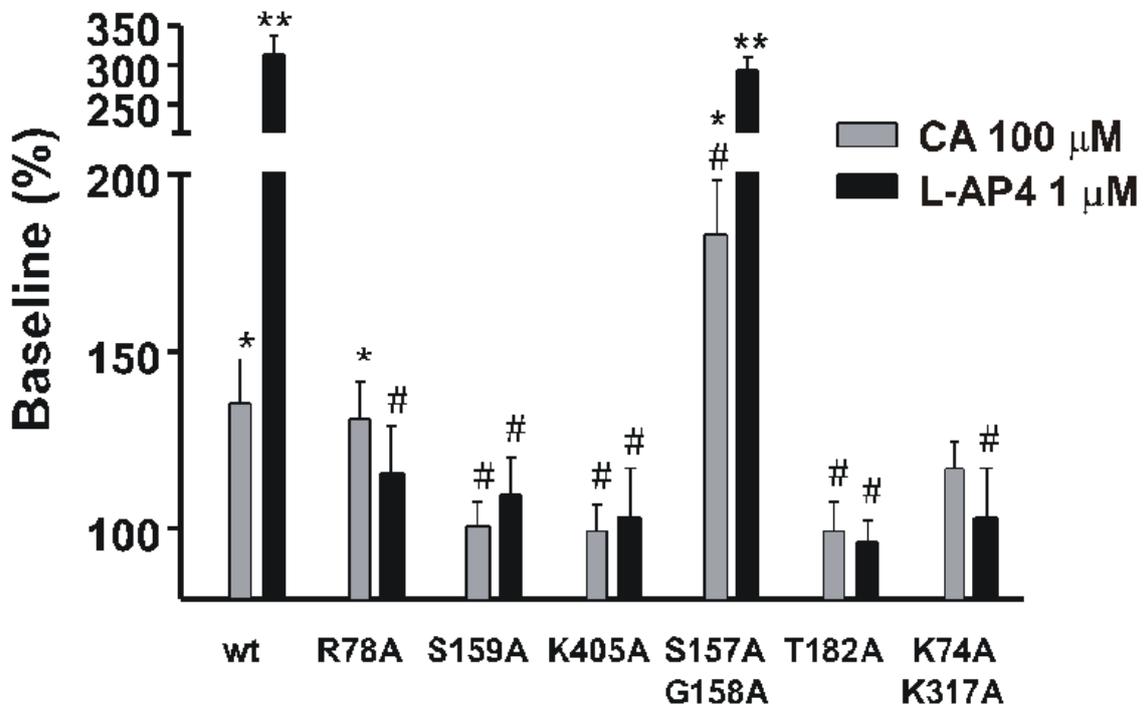


Figure 12

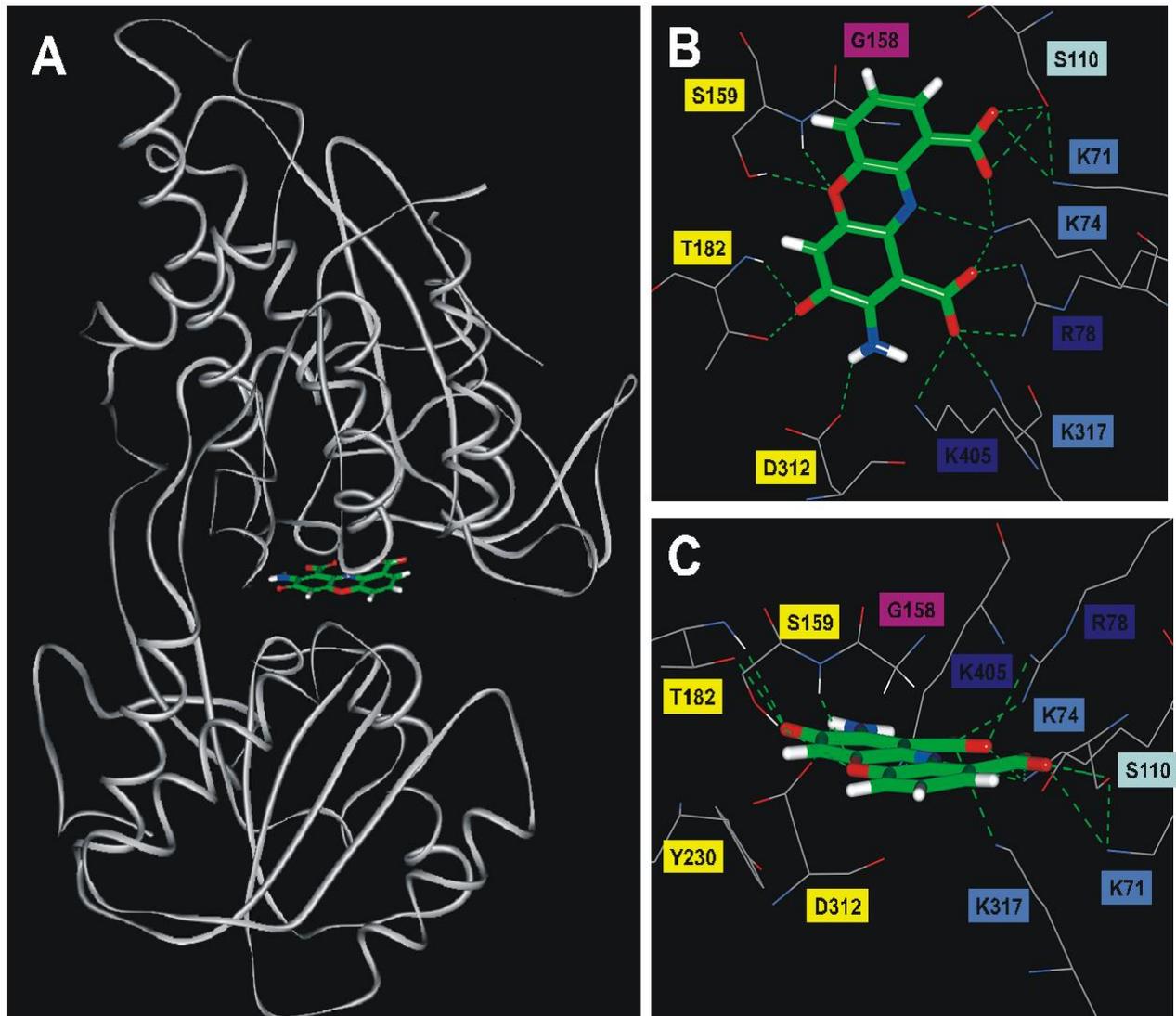
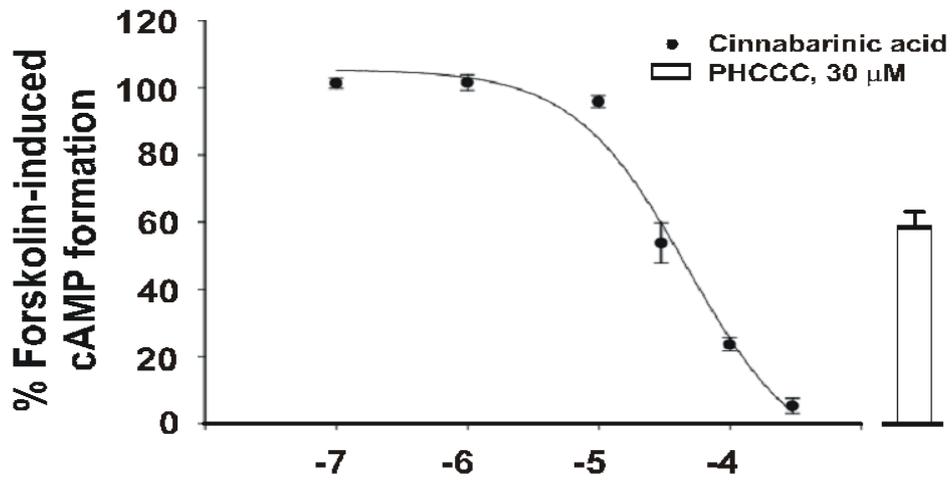
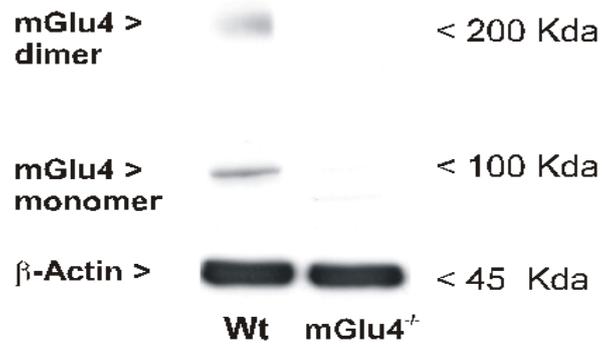
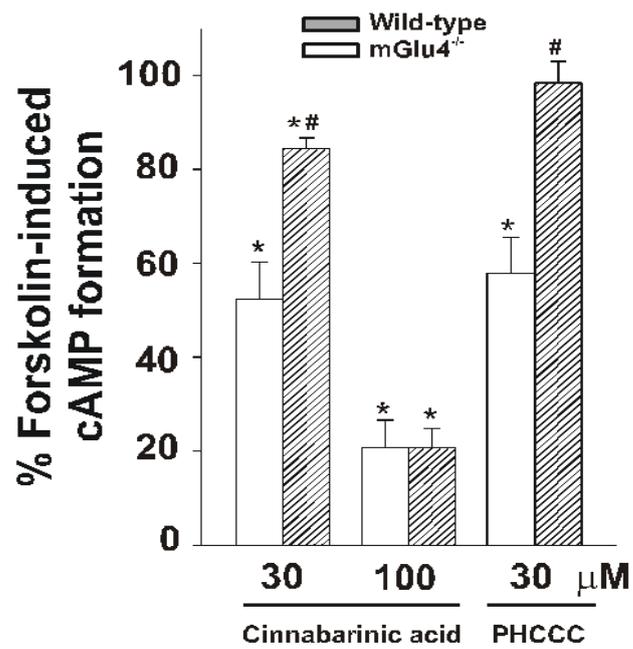
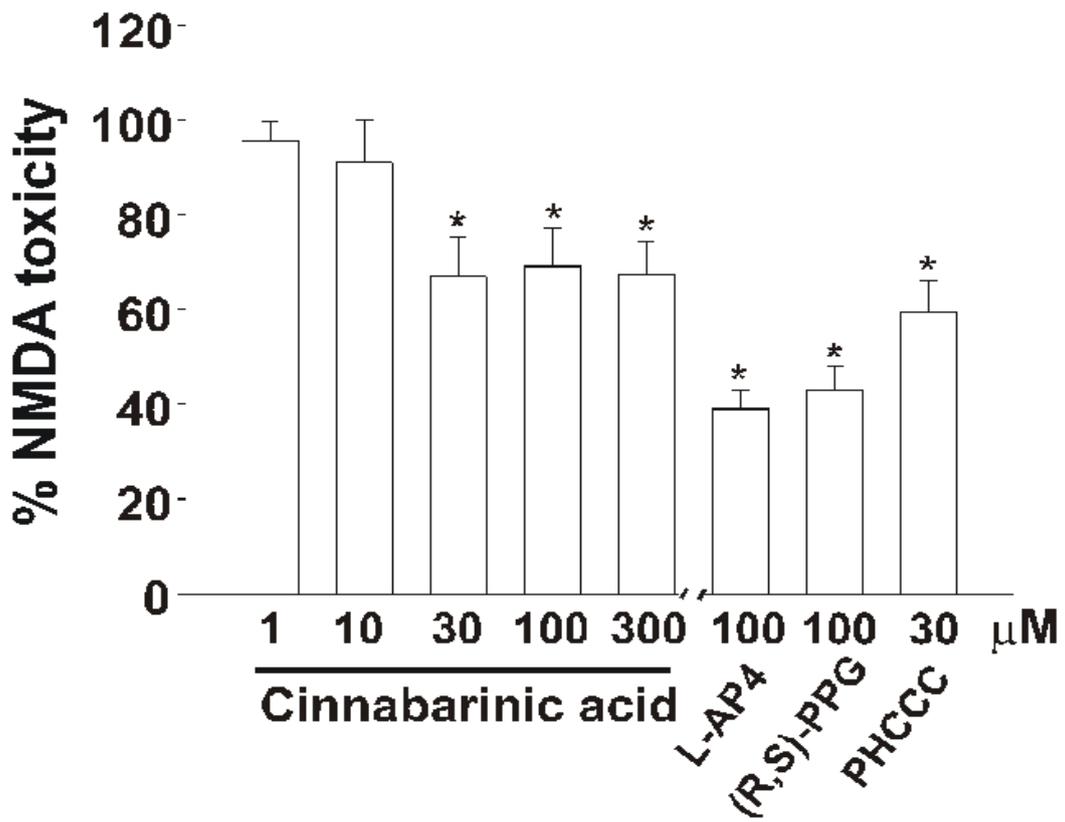


Figura 13

A**B****C****Figura 14**

A



B

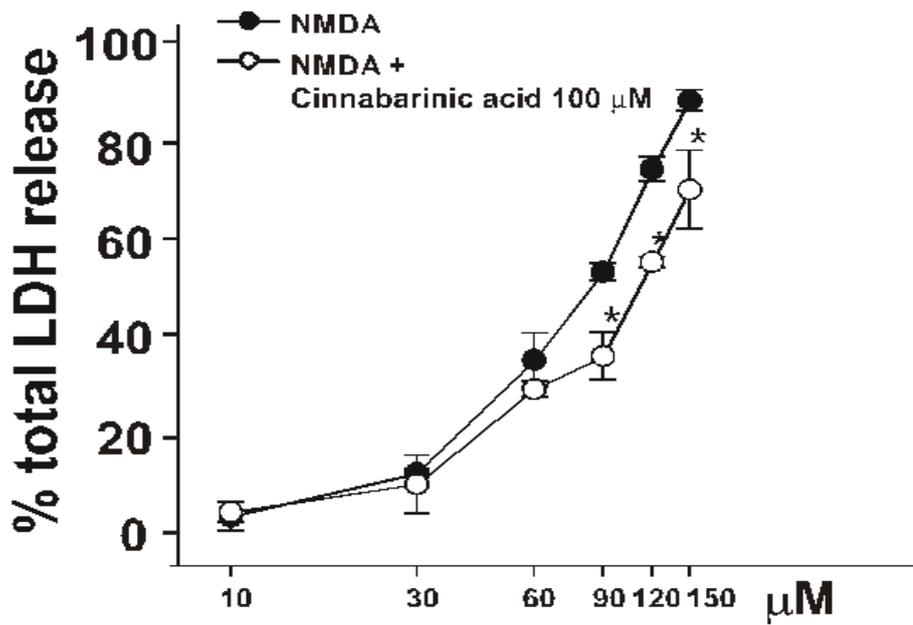


Figura 15

C

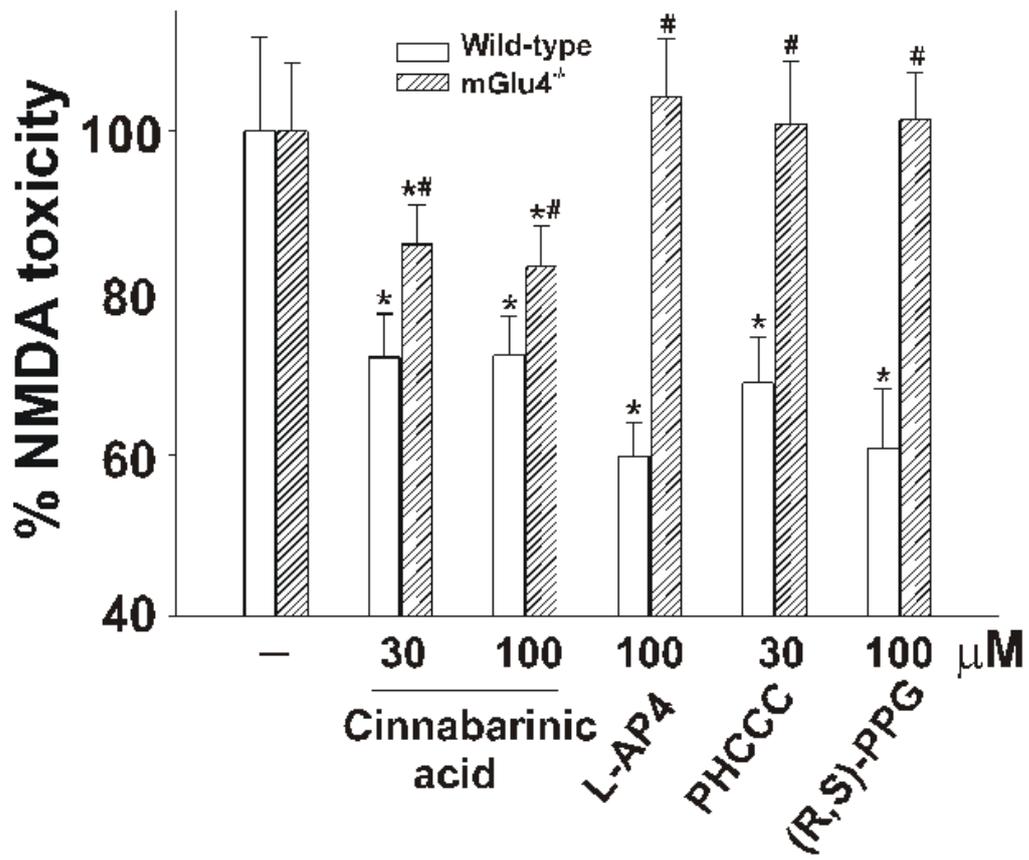


Figura 15

Indice

INTRODUZIONE	3
1.1 Sclerosi Multipla	3
1.2 Epidemiologia	5
1.3 Eziopatogenesi	6
1.4 Il sistema immunitario nella patogenesi della SM	7
1.5 Funzioni della guaina mielinica	8
1.6 Caratteristiche istologiche	9
1.7 Fisiopatologia	10
1.8 Forme di sclerosi multipla	12
1.8.a Fase transizionale	13
1.8.b Forma progressivo-secondaria	14
1.8.c Forma progressiva-primaria	14
1.8.d Forma progressivo-ricidivante	14
1.8.e Forma benigna	15
1.9 Decorso e prognosi	15
1.10 Terapia	16
2.1 L'encefalomielite allergica sperimentale (EAE)	19
2.2 Decorso clinico dell'EAE	20
2.3 Il sistema immunitario nella EAE	21
2.3a Linfociti T	21
2.3b Linfociti B	22
2.4 Cellule presentanti l'antigene (APCs)	22
3.1 Recettori metabotropici per il glutammato (mGluR)	24

3.2 Farmacologia dei recettori mGlu	27
3.2.a Caratteristiche farmacologiche generali	27
3.2.b Farmacologia dei recettori mGlu del primo gruppo	28
3.2.c Farmacologia dei recettori mGlu del secondo gruppo	29
3.2.d Farmacologia dei recettori mGlu del terzo gruppo	30
3.2.e Ligandi ortosterici e modulatori allosterici dei recettori mGluR	31
4.1 Triptofano	32
4.2 Il metabolismo del triptofano	32
4.3 La via delle chinurenine	34
5.1 La sinapsi immunologica	39
5.2 Sindesma tra sinapsi immunologica e sinapsi neuronale	40
<i>Cambio d'espressione dei recettori metabotropici per il glutammato del gruppo I nel cervelletto di topi che sviluppano EAE ed in tessuti cerebellari autoptici di pazienti con sclerosi multipla</i>	42
6.1 Scopo dello studio	42
6.2 Materiali e metodi	44
6.3 Animali	44
6.4 Induzione dell'EAE	44
6.5 Quantificazione della malattia e grado di disabilità	45
6.6 Espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 in topi con EAE	45
6.7 Analisi western blot dei recettori mGlu1a e mGlu5	46
6.8 Immunoistochimica	47
6.9 Valutazione della coordinazione motoria in topi con EAE	48
6.9.a Rota.rod test	48
6.9.b Footprinting test	48

6.10 Espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 nel cervelletto autoptico di pazienti con e senza sclerosi multipla	49
6.10.a Pazienti e tessuti	49
6.10.b Preparazione dei tessuti	49
6.10.c Immunocitochimica	50
6.11 RISULTATI	50
6.11.a Induzione dell'EAE nei topi	50
6.11.b Cambiamento dell'espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 nelle cellule cerebellari del Purkinje di topi con EAE	51
6.11.c Espressione dei recettori mGlu1a e mGlu5 nel cervelletto di pazienti con sclerosi multipla	52
6.11.d Il trattamento in acuto con RO0711401 migliora la coordinazione in topi con EAE	53
6.12 DISCUSSIONE	54
<i>Il recettore metabotropico per il glutammato mGlu4 modula l'immunità adattativa e frena la neuroinfiammazione</i>	58
7.1 Scopo dello studio	58
7.2 Materiali e metodi	59
7.3 Animali	59
7.4 Induzione dell'EAE e trattamento <i>in vivo</i> con PHCCC	60
7.5 Quantificazione della malattia e del grado di disabilità (vedi 6.5)	61
7.6 Istopatologia ed immunoistochimica	61
7.7 Isolamento e stimolazione di leucociti	62
7.8 Citofluorimetria	63
7.9 RISULTATI	64
7.9.a L'EAE viene esacerbata dall'assenza di mGluR4	64

7.9.b Il profilo delle citochine è alterato da mGluR4	65
7.9.c Grm4 viene espresso nelle cellule immunitarie accessorie ed in quelle adattative	65
7.9.d mGluR4 è necessario alle DC per orchestrare la differenziazione delle cellule T	67
7.9.e Il segnale di mGluR4 modula cAMP nelle cellule dendritiche (DC)	68
7.9.f Il segnale di mGluR4 contribuisce alla resistenza verso l'EAE <i>in vivo</i>	69
7.10 DISCUSSIONE	70
<i>L'acido cinnabarinico, un metabolita endogeno della via delle chinurenine, attiva i recettori metabotropici di tipo 4</i>	73
8.1 Scopo del lavoro	73
8.2 Materiali e metodi	74
8.3 Sintesi dell'acido cinnabarinico	75
8.4 Protocolli: trasfezione cellulare e saggi funzionali	76
8.5 Modello molecolare: adattamento dell'acido cinnabarinico nel dominio amino terminale del recettore mGlu4	77
8.6 Studi in colture primarie neuronali	78
8.7 Preparazione di colture di cellule cerebellari di granuli	78
8.8 Analisi immunoblot del recettore mGlu4 in colture di cellule cerebellari dei granuli	79
8.9 Misurazione di cAMP formato in colture di cellule cerebellari di granuli	79
8.10 Preparazione di colture corticali miste	80
8.11 Esposizione ad aminoacidi eccitatori <i>in vitro</i>, misura del danno neuronale	80
8.12 RISULTATI	81
8.12.a L'acido cinnabarinico attiva selettivamente i recettori mGlu4 espressi in sistemi eterologhi	81

8.12.b L'acido cinnabarinico si lega all'interno della tasca di legame del glutammato	82
8.12.c Adattamento dell'acido cinnabarinico nella tasca di legame del glutammato mediante molecular modeling	84
8.12.d L'acido cinnabarinico inibisce la formazione di cAMP in colture cellulari di granuli cerebellari	85
8.12.e L'acido cinnabarinico condivide l'azione degli agonisti del recettore mGlu4 nel proteggere i neuroni corticali in coltura da morte eccitotossica	86
8.13 DISCUSSIONE	87
BIBLIOGRAFIA	92
FIGURE E TABELLE	109
INDICE	128

