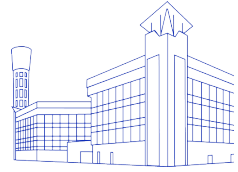




ISTITUTO DI RICERCHE FARMACOLOGICHE **MARIO NEGRI**

Via Giuseppe La Masa, 19 - 20156 Milano MI - Italy - www.marionegri.it

tel +39 02 39014.410 - fax +39 02 354.6277 - annamaria.vezzani@marionegri.it



**Caratterizzazione di nuovi meccanismi molecolari che sottendono alla comparsa
e ricorrenza delle crisi in epilessia: sviluppo preclinico di nuove strategie
anticonvulsivanti per controllare le crisi farmacoresistenti**

P.I. Angelisa Frasca, PhD

Lab Neurologia Sperimentale

Dipartimento di Neuroscienze

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri

Via G. La Masa 19

20156 Milano

Tel. 02-39.014.410

Fax. 02-35.46.277

Riassunto del progetto

Questo progetto si prefigge di studiare *il ruolo di specifiche molecole, coinvolte nei meccanismi di immunità innata, nella comparsa e ricorrenza delle crisi nell'epilessia*. In particolare, studieremo una molecola, *HMGB1*, con proprietà proinfiammatorie, che espleta le sue funzioni attraverso la stimolazione di due classi di recettori, definiti "*Toll-like*" (*TLR*) e "*RAGE*".

Questo studio estende le nostre precedenti evidenze sperimentali che hanno stabilito negli ultimi 5 anni di ricerca un ruolo importante dei processi infiammatori nella fisiopatologia delle convulsioni, aprendo la strada alla *possibilità di controllare le crisi resistenti ai classici farmaci anticonvulsivanti (AED) con innovativi approcci terapeutici anti-infiammatori*.

I recettori TLR, in particolare i TLR4 e il recettore della IL-1beta, chiamato IL-1R1, sono espressi dalle cellule del sistema immunitario e dalle cellule residenti nel parenchima cerebrale come la glia, i neuroni, e cellule endoteliali della barriera ematoencefalica. Questi recettori sono attivati sia in presenza di macromolecole espresse da agenti infettivi (ad es. virus e batteri) che da molecole endogene prodotte in un tessuto danneggiato da un evento patologico (ad es. traumatico, ischemico oppure dalla comparsa di una crisi epilettica). Lo studio del coinvolgimento di questi recettori e dei loro ligandi nella patologia epilettica potrebbe chiarire non solo i meccanismi molecolari coinvolti nei fenomeni di ipereccitabilità neuronale che sottendono la comparsa delle crisi, ma anche il legame causale dimostrato da studi clinici, tra infezioni ed epilessia. Questo aspetto è particolarmente importante per le epilessie della prima infanzia poiché i bambini sono particolarmente esposti e suscettibili alle infezioni sia sistemiche che del sistema nervoso centrale (SNC).

In questo progetto, noi studieremo in maniera specifica i seguenti aspetti:

1. l'espressione dei recettori TLR4 e del loro ligando endogeno HMGB1 nell'area epilettogena in modelli sperimentali di convulsioni
2. se la stimolazione o il blocco dei recettori TLR4, o l'inattivazione di HMGB1, con farmaci specifici modifica l'attività convulsiva

3. la suscettibilità alle convulsioni in topi con una mutazione spontanea del TLR4 che risulta in un blocco della funzione recettoriale
4. l'espressione di TLR4 e HMGB1 nel tessuto epilettico umano ottenuto chirurgicamente da pazienti farmacoresistenti
5. l'interazione funzionale tra il TLR4 e il recettore IL-1R1 della IL-1beta

Per studiare questi aspetti utilizzeremo un approccio multidisciplinare che comprenderà tecniche di immunoistochimica, biochimica e approcci farmacologici applicati a modelli di convulsioni e di epilessia che abbiano una rilevanza clinica. I risultati di questo studio accresceranno le nostre conoscenze sul ruolo dei meccanismi di immunità innata nella fisiopatologia delle crisi epilettiche, e ci permetteranno di sviluppare a livello preclinico nuove strategie farmacologiche per controllare i fenomeni di ipereccitabilità responsabili delle crisi epilettiche.

Introduzione

Emergenti evidenze sia sperimentali che cliniche supportano il coinvolgimento di processi immunitari ed infiammatori nella eziopatogenesi delle crisi epilettiche (Vezzani e Granata, 2005; Vezzani and Baram, 2007).

Risposte infiammatorie specifiche, che si manifestano con la produzione di molecole sia pro- che anti-infiammatorie, sono indotte nel cervello in risposta a trauma, ischemia, infezioni, convulsioni febbrili, stato epilettico che sono eventi patologici associati con un elevato rischio di sviluppare epilessia (Herman, 2002; Vezzani and Granata, 2005, Lucas et al, 2006; Bartfai et al, 2007).

Abbiamo recentemente descritto pronunciati processi infiammatori nel tessuto umano epilettogeno in casi clinici di epilessia farmacoresistente con diversa eziologia (Vezzani e Granata, 2005; Vezzani et al, 2008; Ravizza et al, 2006; Ravizza et al, 2008).

Studi farmacologici in modelli sperimentali di convulsioni, e l'utilizzo di topi transgenici con alterazioni di specifici mediatori dell'infiammazione, hanno mostrato che le citochine, i fattori del complemento e le prostaglandine, contribuiscono significativamente alle convulsioni e alla neurodegenerazione che spesso e' associata alle crisi epilettiche (Vezzani and Granata, 2005; Vezzani et al, 2008).

Queste evidenze sia cliniche che sperimentali indicano quindi che l'infiammazione e' un fattore patologico associato alle crisi epilettiche e che potrebbe contribuire significativamente alla patologia epilettica indipendentemente dalle cause che l'hanno indotta.

Nei modelli sperimentali risulta chiaro che l'attivita' convulsiva per se puo' indurre infiammazione nel cervello anche in assenza di morte cellulare; tuttavia la combinazione di convulsioni e neurotossicita' sembra avere un ruolo importante per perpetuare l'infiammazione e renderla cronica. In questo contesto, abbiamo dimostrato che fenomeni infiammatori nel tessuto epilettico umano sono invariabilmente associati a zone di neurotossicita' (Ravizza et al, 2006; Ravizza et al, 2008).

In questo contesto il nostro laboratorio ha studiato in maniera estesa il ruolo della IL-1beta nei fenomeni epilettici, dimostrando che questa citochina e' indotta nel tessuto epilettogeno principalmente nella glia e nelle cellule endoteliali della microvascolatura cerebrale (Ravizza et al, 2008; Vezzani et al, 1999; De Simoni et

al, 2000). Incrementi di IL-1beta in specifiche aree epilettogene, come l'ippocampo, aumentano l'eccitabilità neuronale e la vulnerabilità dei neuroni al danno eccitotossico, e potrebbero contribuire al danno della barriera ematoencefalica che porta ad una aumentata permeabilità della stessa a molecole presenti nel sangue e normalmente escluse dal parenchima cerebrale; questo processo rappresenta un fattore pro-epilettogeno importante (Vezzani and Granata, 2005, Vezzani et al, 2008, Oby and Janigro, 2006).

Abbiamo recentemente caratterizzato il "signaling" intracellulare che sottende alla attività pro-convulsivante e pro-neurotossica della IL-1beta: l'interazione con il suo recettore IL-1R1 attiva la famiglia delle Src chinasi inducendo la fosforilazione della subunità NR2B del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA) che risponde al glutammato ed è coinvolto in maniera cruciale nella comparsa e ricorrenza delle crisi. Questo evento di fosforilazione produce un aumento di calcio intracellulare nei neuroni esposti al glutammato che risulta a sua volta in un aumentato fenomeno di eccitabilità neuronale (Viviani et al, 2003; Balosso et al, 2008). Il "signaling" è mediato dal complesso recettoriale IL-1R1 e da una proteina accessoria (IL-1RacP) che è strumentale per la trasduzione del segnale intracellulare, questo complesso fa parte della famiglia cosiddetta dei recettori *Toll-like* (TLR).

La famiglia dei TLR ha un ruolo chiave nell'attivazione della immunità innata durante il riconoscimento di un agente patogeno. L'attivazione del TLR "signaling" induce una attivazione trascrizionale di vari mediatori dell'infiammazione attraverso l'induzione di NFkB or AP-1, due fattori trascrizionali (O'Neil, 2008). In assenza di agenti patogeni, TLR "signaling" può essere attivato da citochine, quali la IL-1b o IL-18, o da ligandi endogeni chiamati DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*). I DAMP sono segnali di pericolo rilasciati dalle cellule del parenchima cerebrale per allertare le cellule circostanti ed attivare programmi omeostatici di difesa.

Una proteina DAMP di particolare interesse è HMGB1 (*High Mobility Box Group 1*), una proteina non-istonica che ha il ruolo fisiologico di facilitare la trascrizione genica interagendo con la cromatina (Bianchi, 2007). Inoltre, questa molecola possiede proprietà extracellulari proinfiammatorie: è attivamente secreta dai monociti/macrofagi stimolati da citochine o da LPS, o può venire liberata passivamente dalle cellule necrotiche. Il suo rilascio extracellulare avviene dopo essere trasportata dal nucleo al citoplasma, attraverso meccanismi non ancora

completamente chiariti. Nello spazio extracellulare la molecola HMGB1 può espletare diverse funzioni sia da sola che complessata ad altre molecole, come ad esempio IL-1beta:

1. sottende al reclutamento di cellule infiammatorie al sito di danno tissutale; 2. agisce come fattore angiogenico; 3. aumenta la produzione di molecole infiammatorie e il rilascio di glutammato dalla glia; 4. può attivare metalloproteinasi contribuendo alla degradazione della matrice extracellulare e al danno di barriera ematoencefalica (Bianchi, 2007; Qiu et al, 2008; Pedrazzi et al, 2007).

HMGB1 si lega sia ai recettori TLR2 e TLR4 che al recettore RAGE (*Receptor for Advance Glycation End product*) ed attiva la cascata intracellulare delle MAP Kinasi (ERK1/2) e il fattore trascrizionale proinfiammatorio NFkB (Bianchi, 2007).

In particolare, TLR4 e RAGE sono espressi dalla glia, dai neuroni e dalle cellule endoteliali (Bianchi, 2007). Questi recettori sono indotti dalle convulsioni (dati preliminari) e possono anche essere indotti da HMGB1 rilasciato dalle cellule, creando quindi un “loop” che potrebbe essere coinvolto nella cronicizzazione dei fenomeni infiammatori descritti in epilessia, e che potrebbe contribuire alla progressione della patologia. Una eccessiva attivazione del “signaling” mediato da HMGB1 è stato descritto in varie situazioni patologiche sia acute che croniche, e i dati disponibili supportano un suo possibile coinvolgimento nei meccanismi patogenetici di varie malattie infiammatorie periferiche (Bianchi, 2007; O’Neil, 2008; van Beijnum et al, 2008).

Scopo della ricerca

Noi ipotizziamo che il rilascio di HMGB1 dalle cellule parenchimali cerebrali (neuroni e glia) indotto da un evento patologico iniziale (stato epilettico) sia strumentale per sostenere un processo infiammatorio cronico nel tessuto cerebrale, aumentando quindi l'eccitabilità neuronale, e contribuendo a fenomeni di plasticità maladattativa (ad es. alterazioni di barriera ematoencefalica, reclutamento di macrofagi, alterazioni dei recettori del glutammato) che portano alla comparsa delle convulsioni spontanee (epilessia).

In particolare, studieremo se l'induzione di stato epilettico (crisi severe e prolungate) induce il rilascio di HMGB1 dalle cellule coinvolte nel fenomeno patologico, con conseguente attivazione del "signalling" mediato da TLR4.

Valuteremo inoltre se questa cascata di eventi contribuisce:

1. ad alterare il network neuronale determinando fenomeni di ipereccitabilità
2. promuove epilettogenesi (la comparsa di epilessia dopo un evento precipitante come lo stato epilettico) attraverso l'induzione e il mantenimento di un fenomeno infiammatorio
3. se intervenendo sulla attivazione del "pathway" HMGB1-TLR4 con interventi farmacologici specifici possiamo antagonizzare le crisi epilettiche nei modelli sperimentali

Piano sperimentale

I modelli sperimentali di convulsioni e di epilessia utilizzati in questo studio sono descritti, e la scelta di questa modelli giustificata, nella sezione Metodi del progetto. La sezione Metodi contiene anche la descrizione e le referenze di tutte le metodologie utilizzate nel progetto.

Gi esperimenti eseguiti in questo studio utilizzeranno il minimo numero di topi adulti necessario per ottenere risultati valutabili statisticamente.

Scopo 1: *Caratterizzazione della espressione di HMGB1 e TLR4 nel cervello del topo dopo induzione di stato epilettico fino alla comparsa delle convulsioni spontanee. Confronto con l'espressione delle stesse molecole nel tessuto epilettico umano.*

Esperimenti:

Con studi di immunohistochimica che si avvalgono dell'utilizzo di anticorpi specifici, condurremo un dettagliato studio temporale per valutare l'espressione delle molecole suddette dopo l'induzione di crisi epilettiche nel topo. Valteremo le aree di induzione e generalizzazione delle crisi (ippocampo, aree neuronalmente associate del sistema limbico e neocorteccia), specificamente dopo 24 ore dall'induzione di stato epilettico (fase acuta convulsiva), 3 giorni (fase di epilettogenesi prodromica per l'induzione di epilessia) e 2 mesi dopo stato epilettico (epilessia conclamata). Utilizzeremo marcatori specifici delle cellule neuronali (NeuN), gliali (GFAP, cd11b) ed endoteliali (EBA) per identificare le popolazioni cellulari che esprimono le molecole di interesse, cioè HMGB1 e TLR4, e la loro co-localizzazione con IL-1b e IL-1R1, per verificare la concomitanza di questi eventi infiammatori. L'analisi sia qualitativa che quantitativa (% di cellule fenotipicamente identificate che esprimono le molecole di interesse) verrà effettuata da un ricercatore inconsapevole della identità dei campioni sperimentali, utilizzando la microscopia ottica e confocale. I neuroni in fase neurodegenerativa verranno identificati utilizzando la colorazione di Nissl e il Fluoro-Jade B. Tecniche di Western Blot verranno utilizzate per misurare i livelli endogeni di HMGB1 ed avere quindi una stima dell'aumento indotto nel tessuto coinvolto dall'attività convulsiva.

Questo studio verrà fedelmente riprodotto in un modello di crisi epilettiche acute transitorie, che si distingue dal modello di stato epilettico sopradescritto in

quanto le crisi discrete non inducono epilessia nell'animale e il danno neuronale indotto e' molto limitato rispetto a quello che caratterizza il modello di stato epilettico (vedi **Metodi**). In questo ultimo modello sono gia' disponibili dati preliminari riportati nella sezione dedicata a pagina 19 del progetto.

Risultati attesi: Questi esperimenti dimostreranno se HMGB1 e TLR4 sono indotti in una situazione (lo stato epilettico) che porta allo sviluppo di epilessia. Ci aspettiamo di trovare un aumento delle molecole di interesse nelle cellule coinvolte nell'attivita' convulsiva ed una concomitante traslocazione nucleo-citoplasma di HMGB1, indice del rilascio della molecola. L'identificazione delle cellule che esprimono HMGB1 dimostrera' la fonte di produzione e rilascio della molecola, mentre l'identificazione delle cellule che esprimono TLR4 dimostrera' quali sono le cellule che rispondono (e sono quindi il "target") di HMGB1.

Inoltre il confronto tra un modello di stato epilettico ed un modello di crisi discrete e reversibili ci permettera' di capire se l'induzione delle molecole di interesse e la loro persistenza nel tessuto dipendono dalla gravita' delle crisi e dall'entita' del danno cellulare conseguentemente indotto.

I nostri dati preliminari (vedi sezione dedicata) dimostrano che siamo in grado di misurare tutte le proteine di interesse sopradescritte.

Se i risultati di espressione nel modello sperimentale saranno positivi, valuteremo l'espressione delle stesse molecole nel tessuto epilettico di pazienti con epilessia farmaco-resistente (epilessia del lobo temporale, TLE). Questo studio sara' condotto dalla Dott.ssa T. Ravizza (Lab Neurologia Sperimentale, IRFMN, Milano) in collaborazione con la Dott.ssa E. Aronica (Universita' di Amsterdam, Medical Center) con la quale abbiamo gia' effettuato studi su tessuti epilettogeni chirurgicamente asportati da pazienti epilettici farmaco-resistenti per valutarne l'espressione di IL-1b e molecole associate (Ravizza et al, 2006; Ravizza et al, 2008).

Scopo 2: *Ruolo del "signaling" HMGB1-TLR4 nei fenomeni di ipereccitabilita' che sottendono alle convulsioni*

Studieremo se l'attivazione specifica, o l'inibizione, del "signalling" HMGB1-TLR4 altera la suscettibilita' alle convulsioni nella loro fase acuta e ricorrente. Trarremo vantaggio della disponibilita' di attivatori e inibitori selettivi del "signalling".

1. Studieremo gli effetti dose-risposta (2-10 μ g) della somministrazione intraippocampo di HMGB1, BoxA (un antagonista di HMGB1), antagonisti selettivi di TLR4 sulle convulsioni discrete e reversibili indotte da una dose relativamente bassa di acido iniettato nell'ippocampo del topo. Questi esperimenti dimostreranno se il "signaling" e' funzionalmente attivato durante le convulsioni (come suggerito dai nostri dati preliminari di immunostochimica e dai dati preliminari farmacologici, vedi p. 19).
2. Utilizzeremo topi epilettici con convulsioni ricorrenti e spontanee refrattarie al trattamento con i classici farmaci antiepilettici (AED), per dimostrare se il "signalling" HMGB1-TLR4 e' attivato e contribuisce alla ricorrenza delle crisi. Utilizzeremo topi con una frequenza di convulsioni spontanee costante (vedi Metodi) che verranno inizialmente iniettati in ippocampo con il veicolo del farmaco e successivamente monitorati per 2 ore utilizzando analisi EEG, in modo da escludere effetti non specifici sulla attivita' epilettica dovuti alla procedura di iniezione. Quindi i topi riceveranno i farmaci utilizzati nell'esperimento 1, alle dosi dimostrate efficaci nel modello di convulsioni discrete, e l'attivita' convulsiva registrata per le successive 2 ore. Questo e' il minimo tempo richiesto per vedere un effetto sulla frequenza e durata delle crisi spontanee rispetto alla "baseline" che precede l'iniezione del farmaco in questo modello (dati preliminari) ma sara' prolungato se le condizioni sperimentali lo richiederanno fino a 4-6 ore; se a questo tempo post-iniezione nessuno effetto si sara' manifestato considereremo il trattamento inefficace. Se 24 ore dopo il trattamento, l'attivita' convulsiva nei topi ritornera' ai valori di "baseline" prima del trattamento, allora gli stessi topi verranno utilizzati per studiare i vari farmaci in maniera sequenziale. Se cio' non avvenisse, allora si useranno gruppi sperimentali diversi per ciascun farmaco.

Inizialmente, utilizzeremo ciascun farmaco alla dose dimostratasi efficace nel modello di convulsioni discrete (esperimento 1); se non ci fossero effetti significativi sulla attivita' epilettica, allora ciascun farmaco verra' utilizzato alla massima dose consentita dalla sua solubilita' nel volume di iniezione (1 μ l).

Risultati attesi: Se il “signaling” HMGB1-TLR4 e’ significativamente coinvolto nei meccanismi di ictogenesi, ci aspettiamo di aumentare l’attivita’ epilettica con HMGB1 e di diminuirla con BoxA e gli antagonisti dei recettori TLR4. Se questi effetti si manifestano nel modello di crisi discrete e reversibili (modello di crisi sintomatiche acute) ci aspettiamo di confermarli anche nel modello di crisi croniche e ricorrenti. Tuttavia cio’ va verificato poiche’ il tessuto epilettico cronico presenta delle modificazione patologiche (ad es. perdita di neuroni, gliosi reattiva, riarrangiamnti sinaptici) che potrebbero modificare i “targets” dei farmaci utilizzati rendendoli inefficaci.

Non ci aspettiamo problemi tecnici nell’esecuzione di questi esperimenti farmacologici poiche’ i modelli che utilizzeremo e le tecniche EEG sono gia’ da tempo utilizzate e convalidate nel nostro laboratorio come mostrano sia i nostri dati preliminari che le nostre pubblicazioni.

Scopo 3: *Ruolo del “signalling” mediato dai recettori TLR4 nel fenomeno di epilettogenesi*

Studieremo se l’attivazione dei recettori TLR4 e’ strumentale per la comparsa di convulsioni spontanee (epilessia). Utilizzeremo topi con una mutazione spontanea che li rende deficitari del segnale mediato dai recettori TLR4 (Metodi). Questi topi verranno iniettati con alte dosi di acido kainico per indurre stato epilettico seguito dalla comparsa di convulsioni spontanee e ricorrenti (Riban et al, 2002; vedi Metodi). Valuteremo con analisi EEG se la durata e frequenza di spikes durante lo stato epilettico differisce tra i topi con la mutazione e i loro controlli non-mutati; valuteremo 1 mese dopo l’induzione dello stato epilettico se i topi mutati hanno epilessia (a questo tempo i topi non-mutati che hanno avuto uno stato epilettico di almeno 3 ore consecutive, sviluppano nel 100% dei casi convulsioni spontanee), e se la frequenza e durata delle convulsioni spontanee differerisce da quella dei topi non mutati utilizzati come gruppo controllo. Questa valutazione richiedera’ una analisi EEG continuativa per almeno 2 settimane (24 ore al giorno; 7 giorni alla settimana).

Risultati attesi: se il “signaling” mediato dal TLR4 e’ critico per la comparsa di epilessia, allora dovremmo trovare una riduzione delle crisi o la loro mancata comparsa nei topi con questo “signalling” difettivo. Se i topi non mostreranno

convulsini spontanee dopo 1 mese dall'induzione di stato epilettico, verranno studiati dopo ulteriori 2 mesi per 2 settimane con analisi continuativa EEG, tempo al quale verranno definiti non epilettici nel caso le crisi spontanee non fossero ancora presenti.

Scopo 4: *Valutazione degli eventi molecolari che vengono indotti dall'attivazione del "signalling" HMGB1-TLR4 in ippocampo*

Poiche' il "signalling" attivato dal recettore TLR4 coinvolge molecole adattatrici intracellulari comuni con il "signalling" del recettore IL-1R1 della IL-1beta (Bianchi, 2007, O'Neil et al, 2008), e poiche' la IL-1beta ha attivita' proconvulsivante mediata da una specifica cascata di eventi intracellulari (Balosso et al, 2008), valuteremo se gli stessi eventi molecolari sono condivisi da HMGB1-TLR4.

Specificamente, utilizzando tecniche di western blot studieremo se l'attivazione di TLR4 da parte di HMGB1 attiva la famiglia delle Src kinasi, e induce fosforilazione su tirosina della subunita' NR2B del recettore NMDA, inducendo quindi un aumento del flusso intraneuronale del calcio (Viviani et al, 2003). Questo evento molecolare sottende a fenomeni di ipereccitabilita' e potrebbe quindi essere responsabile degli eventi mediati da HMGB1 sulla attivita' convulsiva in vivo.

Significato e implicazioni di questo studio

Questo studio è innovativo poiché esplora il coinvolgimento nella eziopatologia delle convulsioni di nuove molecole endogene con proprietà proinfiammatorie. Queste molecole sono considerate segnali di pericolo rilasciati dalle cellule in un ambiente patologico allo scopo di ristabilire la omeostasi nel tessuto. Tuttavia un rilascio eccessivo e la conseguente attivazione di “signalling” intracellulari sulle cellule bersaglio che esprimono i recettori per queste molecole, può indurre un fenomeno di infiammazione cronica nel tessuto che contribuisce significativamente alla patologia.

La possibilità di dimostrare l'esistenza di questi meccanismi in modelli di epilessia aprirà nuove prospettive di trattamento delle crisi epilettiche utilizzando nuove molecole come gli inibitori di HMGB1 o gli antagonisti dei recettori TLR4. Queste molecole sono in fase di sviluppo per altre patologie di tipo infiammatorio (Bianchi, 2007).

I nostri studi contribuiranno a consolidare le interazioni tra sistema immunitario ed epilessia che stanno diventando oggetto di intensi studi sia sperimentali che clinici. Inoltre, poiché i recettori TLR4 sono attivati da macromolecole espresse da agenti patogeni come batteri e virus, lo studio del loro ruolo nella patologia epilettica può chiarire i meccanismi attraverso i quali le infezioni del SNC possono indurre crisi sintomatiche acute ed epilessia in una percentuale di individui, questo aspetto è particolarmente importante per l'epilessia nella prima infanzia poiché i bambini sono una popolazione particolarmente esposta alle infezioni.

Metodi

Animali utilizzati per la sperimentazione

Le procedure riguardanti l'utilizzo degli animali e la loro cura saranno condotte in conformità con le direttive istituzionali ed internazionali (4D. L.N. 116, G.U. supplemento 40, 18-2-1992 e EEC Consiglio direttivo 86/609, 1, 12 Dicembre 1987; NIH Guida per la cura e l'uso degli animali da laboratori, U.S. Consiglio di Ricerca Nazionale 1996). Saranno utilizzati per questi esperimenti topi adulti maschi C57BL6 e topi transgenici Tlr4^{LPS-d} e i loro controlli C3H/HeN (30-35 g).

Applicazione di cannula guida per l'iniezione intracerebrale dei farmaci e impianto degli elettrodi per le registrazioni elettroencefalografiche (EEG)

Le procedure sono state precedentemente descritte in dettaglio (Balosso et al, 2008). Gli animali saranno anestetizzati profondamente tramite iniezione intraperitoneale (i.p.) di equitesina (1% fenobarbitale + 4% cloralio idrato; 3 mg/kg) per il posizionamento di una cannula guida e degli elettrodi di registrazione EEG intraippocampo tramite chirurgia stereotassica secondo le coordinate fornite dall'apposito atlante (Franklin and Paxinos, 1997). Gli elettrodi saranno collegati ad un connettore ed insieme alla cannula di iniezione fissati alla teca cranica utilizzando del cemento dentario acrilico. Tutti gli esperimenti saranno effettuati una settimana dopo la chirurgia per permettere il pieno recupero dell'animale.

Iniezione intracerebrale dei farmaci

I farmaci saranno dissolti in un tampone fosfato sterile (PBS, pH 7.4) e iniettati in 1.0 µl unilateralmente nell'ippocampo dorsale. Il giorno delle iniezioni, gli animali saranno posti nelle gabbie di registrazione e l'ago di iniezione (30 gauge) sarà inserito nella cannula e connesso a una microsiringa da 10 µl e i farmaci saranno iniettati a un flusso di 0.25 µl/min. 7 ng in 1 µl di acido kainico (Sigma-Aldrich) saranno iniettati per indurre attività convulsiva, come precedentemente descritto (Balosso et al, 2008) che consiste di episodi EEG ictali discreti e attività interictale caratterizzata da "spikes" nel 100% degli animali. Questa attività si manifesta per circa 1.5-2 ore dall'iniezione del kainato e si esaurisce nella successiva mezz'ora. Gli animali non presentano convulsioni spontanee e hanno un fenomeno degenerativo

localizzato nell'ippocampo iniettato con il kainato che consiste nella perdita selettiva delle cellule piramidali CA3 (Balosso et al, 2008).

HMGB1, BoxA (forniti dal Dott. Bianchi, Ospedale San Raffaele, Milano) e un antagonista del TLR4 (Ultrapure *R.sphaeroides* LPS, InvivoGen) saranno iniettati in ippocampo 15 minuti prima dell'acido kainico.

Tutti gli esperimenti farmacologici saranno condotti tra le 9:00 e le 14:00; i topi di controllo riceveranno uguali volumi dei corrispondenti veicoli dei farmaci prima della somministrazione di acido kainico.

Registrazioni e quantificazioni EEG delle convulsioni: modello di convulsioni acute

La registrazione delle convulsioni indotte dall'iniezione di acido kainico è già stata ampiamente descritta (Balosso et al., 2008). In breve, prima della somministrazione di acido kainico verrà eseguita una registrazione EEG di 30 minuti per ottenere un tracciato basale. La registrazione continuerà per 180 minuti dopo l'iniezione di acido kainico. Gli episodi convulsivi (attività ictale) sono caratterizzati da "spikes" ad alta frequenza e/o complessi di "polispikes" e "spikes" sincronizzati ad alto voltaggio registrati nell'ippocampo iniettato e nel controlaterale. Questa attività epilettiforme perdura circa 90-120 minuti dopo l'iniezione di acido kainico. L'attività di "spiking" si osserva tipicamente tra e dopo le convulsioni. La registrazione EEG di ogni animale sarà analizzata visivamente da almeno due sperimentatori inconsapevoli del trattamento effettuato. L'attività convulsiva sarà quantificata valutando: 1. Il tempo trascorso dall'iniezione di acido kainico e la comparsa della prima convulsione; 2. il numero e durata delle convulsioni (ottenuto sommando la durata di ogni singola convulsione). L'attività interictale sarà calcolata sommando il tempo trascorso in attività di "spiking".

Saranno analizzati 8 animali per gruppo sperimentale; considerando la possibile sporadica perdita dell'impianto EEG, verranno preparati per gli esperimenti il 20% di topi in più per ogni gruppo sperimentale.

Modello di convulsioni spontanee

Il modello di convulsioni spontanee nei topi è stato ampiamente descritto da Riban (Riban et al., 2002) e riprodotto nel nostro laboratorio.

200 ng di acido kainico saranno iniettati in 50 nl nell'ippocampo dei topi nei quali era stata precedentemente applicata una cannula guida per le iniezioni intracerebrali (vedi

sopra). Questa alta concentrazione di acido kainico induce uno stato epilettico non-convulsivo (valutabile solo con analisi EEG perché non associato a convulsioni motorie) che perdura dalle 3 alle 8 ore. Questo periodo è caratterizzato da attività epilettiforme continua sia nell'ippocampo iniettato che nel controlaterale. Tutti i topi con uno stato epilettico che duri per almeno 3 ore, sviluppano convulsioni spontanee croniche e ricorrenti dopo 1 mese. Tra la fine dello stato epilettico acuto e l'inizio dell'attività epilettica cronica sono presenti sporadici episodi convulsivi e "spikes" rari. Per gli esperimenti farmacologici saranno utilizzati solamente i topi con un tracciato EEG che mostri convulsioni spontanee e ricorrenti con frequenza e durata costanti per almeno una settimana di registrazione (circa l'80% dei topi iniettati presenta queste caratteristiche). L'effetto dei farmaci sarà valutato come descritto nel piano sperimentale confrontando il tracciato post-trattamento con la "baseline" di ciascun topo prima del trattamento. Verranno effettuati campionamenti di attività EEG per almeno 2 ore prima del trattamento e per almeno 2 ore, e fino ad un massimo di 4-6 ore, dopo il trattamento.

Giustificazione della scelta dei modelli

Il modello di convulsioni acute permetterà di studiare il ruolo del "signalling" HMGB1-TLR4 nei meccanismi di ictogenesi; il modello di convulsioni spontanee studierà il coinvolgimento di questa interazione nella comparsa e ricorrenza delle convulsioni spontanee. Entrambi i modelli di convulsioni sono caratterizzati nel nostro laboratorio e sono stati usati per studiare gli effetti di aumento della attività convulsiva da parte della IL-1 β e l'attività modulatrice sulle convulsioni del TNF- α (Vezzani et al., 2000; Balosso et al., 2005; Balosso et al. 2008). La bassa dose di acido kainico utilizzata nel modello acuto di convulsioni permette di indurre una neurodegenerazione selettiva delle cellule piramidali CA3 limitata all'ippocampo iniettato.

Nel modello di convulsioni croniche, gli episodi convulsivi spontanei si sviluppano nei topi una settimana dopo lo stato epilettico e ricorrono per almeno 6 mesi. È importante considerare che il tracciato basale delle convulsioni spontanee in ogni topo è stabile e riproducibile dopo 1 mese dall'induzione dello stato epilettico, e le convulsioni non avvengono in "clusters" come dimostrato misurando la frequenza e la durata degli eventi ictali, 1 mese dopo l'induzione dello stato epilettico. Le convulsioni spontanee sono refrattarie ai classici AED (Riban et al., 2002; dati non

pubblicati del nostro laboratorio). I cambiamenti istopatologici nell'ippocampo comprendono la morte neuronale, la dispersione delle cellule dei granuli e lo "sprouting" delle "mossy fibres", con caratteristiche simili a quelle descritte nella epilessia del lobo temporale nell'uomo. Saranno analizzati 8 animali per gruppo sperimentale; considerando la possibile sporadica perdita dell'impianto EEG e la morte dei topi dovuta allo stato epilettico (30%), verranno preparati il 50% in più di animali in ogni gruppo sperimentale.

Analisi istologica

I topi saranno anestetizzati con Equitesina e perfusi attraverso l'aorta ascendente con una soluzione tampone, seguita dal 4% di paraformaldeide come precedentemente descritto (Balosso et al., 2008). Il cervello sarà successivamente post-fissato per 90 minuti a 4°C, e poi trasferito in saccarosio al 20% in PBS per 24 ore a 4°C. Il cervello sarà poi immerso in isopentano a -50°C per 3 minuti e conservato a -80°C fino al suo utilizzo.

Una serie di fettine coronali (40 µm) saranno tagliate tramite criostato congelatore (-20°C). In questo modo sarà possibile determinare il posizionamento degli elettrodi e la traccia dell'iniezione ed eseguire le analisi istologiche e immunocitochimiche.

HMGB1 sarà valutato come precedentemente descritto (Lo Coco et al, 2007); TLR4 sarà valutato incubando le fettine in tampone fosfato con un anticorpo primario per 48 ore (Santa Cruz, 1:150), quindi con un anticorpo secondario "anti-rabbit" e il segnale rivelato con diaminobenzidina e nichel ammonio.

Per doppia e tripla marcatura con marker neuronali e gliali verranno utilizzate fettine adiacenti a quelle utilizzate per visualizzare HMGB1 e TLR4, utilizzando le tecniche di immunofluorescenze precedentemente descritte (Ravizza et al, 2008).

Allo scopo verranno utilizzati un microscopio ottico (Olympus BX51) e un microscopio Olympus Fluorview confocale. L'acquisizione delle immagini avverrà con una telecamera ColorView e le immagini verranno analizzate utilizzando Soft Imaging System CellF.

L'analisi istologica in tessuto epilettico umano sarà effettuata con metodiche analoghe a quelle utilizzate per il tessuto cerebrale del topo con opportune modifiche e secondo le procedure descritte precedentemente (Ravizza et al, 2006; Ravizza et al, 2008). I pazienti reclutati per l'analisi e le loro caratteristiche cliniche sono riportati nella sezione dei dati preliminari (Tabella 2).

La conta delle cellule HMGB1 positive sarà effettuata come precedentemente descritto (Ravizza et al, 2008).

Western blot

La metodologia per valutare il “signalling” che coinvolge Src kinasi e NR2B e’ stata descritta in dettaglio precedentemente (Balosso et al, 2008).

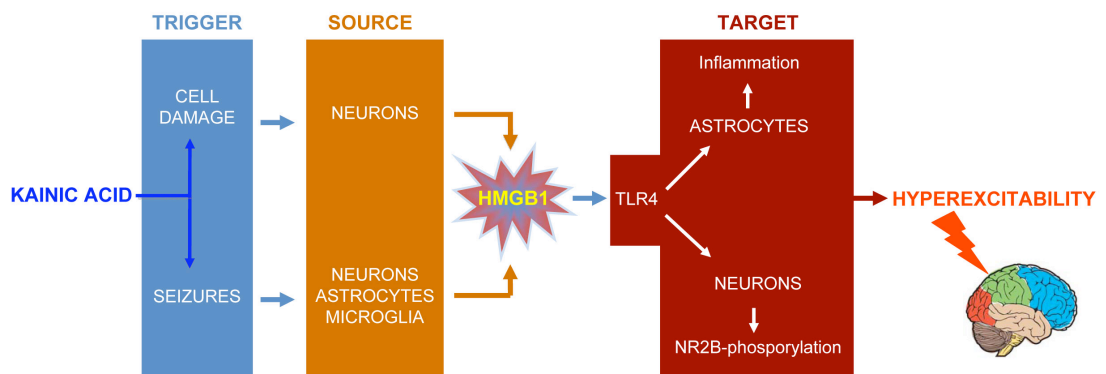
HMGB1 sarà valutato con una metodologia analoga utilizzando un anticorpo primario (Abcam ab18256, 1:1000) e un anticorpo secondario anti-rabbit (Amersham, 1:5000).

Le proteine verranno visualizzate utilizzando la chemiluminescenza e quantificate utilizzando ImageJ software.

Analisi statistica

I dati saranno rappresentati come medie \pm SEM e analizzati utilizzando Graph-Pad Prism Software. L’effetto dei trattamenti sarà valutato utilizzando “one-way” o “two-way” ANOVA seguiti dal test di Tukey or Kruskal–Wallis or Mann-Whitney. Le differenze saranno considerate significative con un valore $p < 0.05$.

I punti 1 e 2 del progetto sono stati sviluppati nel corso dello scorso anno e hanno portato alla pubblicazione dei nostri risultati su Nature Med, 28 March 2010; doi:10.1038/nm.2127. I punti 3 e 4 saranno sviluppati nel corso del 2011.



La nostra ipotesi è che un evento patologico nel tessuto cerebrale (riprodotto dalla iniezione di acido kainico in ippocampo che produce un danno neuronale eccitotossico) induca la sintesi e il rilascio di HMGB1 dalle cellule lesionate e dalle cellule gliali attivate sia dal danno che dalla comparsa delle prime crisi. HMGB1 nello spazio extracellulare interagisce con i recettori TLR4 che vengono sovraespressi nel tessuto epilettogeno ed induce “signalling” intracellulari che inducono fenomeni infiammatori attraverso l’attivazione trascrizionale NFκB nella glia e ipereccitabilità neuronale attraverso la fosforilazione della subunità NR2B del recettore NMDA del glutammato. Questa casata di eventi contribuisce sia alla precipitazione della prima crisi che alla loro ricorrenza.

Lista delle referenze

Balosso S, Ravizza T, Perego C et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann Neurol.* 2005;57:804-812

Balosso S, Maroso M, Sanchez-Alavez M et al. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta. *Brain.* 2008;131:3256-65

Bartfai T, Sanchez-Alavez M, Andell-Jonsson S et al. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever, and neurotrauma. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1113:173-177

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81:1-5

De Simoni MG, Perego C, Ravizza T et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci.* 2000;12:2623-2633

Herman ST. Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. *Neurology.* 2002;59:S21-26

Kim JB, Lim CM, Yu YM, Lee JK. Induction and subcellular localization of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the postischemic rat brain. *J Neurosci Res.* 2008;86:1125-1131

Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Vielhaber S et al. The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia.* 2004;45:1478-1487

Kutuzova GD, Albrecht RM, Erickson CM, Qureshi N. Diphosphoryl lipid A from *Rhodobacter sphaeroides* blocks the binding and internalization of lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells. *J Immunol.* 2001;167:482-489

Lo Coco D, Veglianesi P, Allievi E, Bendotti C. Distribution and cellular localization of high mobility group box protein 1 (HMGB1) in the spinal cord of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Lett.* 2007;412:73-7

Liu K, Mori S, Takahashi HK et al. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J.* 2007;21:3904-3916

Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S232-240

Noe' F, Pool AH, Nissinen J et al. Neuropeptide Y gene therapy decreases chronic spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2008;131:1506-1515

Oby E, Janigro D. The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia.* 2006;47:1761-74

O'Neill LA. 'Fine tuning' TLR signaling. *Nat Immunol.* 2008;9:459-461

Pedrazzi M, Patrone M, Passalacqua M et al. Selective proinflammatory activation of astrocytes by high-mobility group box 1 protein signaling. *J Immunol.* 2007;179:8525-8532

Poltorak A, He X, Smirnova I et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282:2085-2088

Qiu J, Nishimura M, Wang Y et al. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:927-938

Raucci A, Cugusi S, Antonelli A et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* 2008;22:3716-3727

Ravizza T, Boer K, Redeker S et al. The IL-1beta system in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neurobiol Dis.* 2006;24:128-143

Ravizza T, Gagliardi B, Noe F et al. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2008;29:142-160

Riban V, Bouillere V, Pham-Le BT et al. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 2002;112:101-111

Rigau V, Morin M, Rousset MC et al. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2007;130:1942-1956

Turrin NP, Rivest S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2004;16:321-334

van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis.* 2008;11:91-99

Vezzani A, Conti M, De Luigi A et al. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci.* 1999;19:5054-5065

Vezzani A, Moneta D, Conti M et al. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:11534-11539

Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia.* 2005;46:1724-1743

Vezzani A, Baram TZ. New roles for interleukin-1beta in the mechanism of epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2007;7:45-50

Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav Immun.* 2008;22:797-803

Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci.* 2003;23:8692-8700