

Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Biociències  
Departament de Biologia cel·lular, Fisiologia i Immunologia

# **ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA HEAT SHOCK PROTEIN-70 EN LA PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

**M<sup>a</sup> José Mansilla López**

Servei de Neurologia-Neuroimmunologia  
Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat)  
Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)  
Hospital Universitari Vall d'Hebron

**Tesis para optar al título de doctora en Inmunología  
de la Universitat Autònoma de Barcelona**

Barcelona 2014

**Directores:** Carmen Espejo Ruiz y Xavier Montalban Gairin

**Tutora:** Dolores Jaraquemada

**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona



Los directores **Carmen Espejo Ruiz** y el **Dr. Xavier Montalban Gairin** y la tutora **Dolores Jaraquemada**,

Cerfican:

Que el trabajo experimental y la redacción de la memoria de la Tesis Doctoral “Estudio de la Función de la Heat Shock Protein-70 en la Patogenia de la Esclerosis Múltiple” han sido realizados por M<sup>a</sup> José Mansilla López bajo su dirección y consideran que es apta para ser presentada para optar al grado de Doctor en Inmunología por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Barcelona, el 30 de septiembre del 2014.

**Dra. Carmen Espejo**

**Dr. Xavier Montalban**

**Dra. Dolores Jaraquemada**

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (Proyecto CP07/00146).

M<sup>a</sup> José Mansilla ha estado financiada por el Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (VHIR).

*Dedicado a todos los que habéis  
compartido junto a mí esta experiencia  
y, especialmente, a mis padres  
M<sup>a</sup> Carmen y Antonio*

## ABREVIATURAS

<b>Ab:</b>	anticuerpo
<b>Ag:</b>	antígeno
<b>APC:</b>	célula presentadora de antígeno
<b>BHE:</b>	barrera hematoencefálica
<b>BOC:</b>	bandas oligoclonales
<b>Breg:</b>	células B reguladoras
<b>BS:</b>	medio Bottenstein Sato
<b>BSA:</b>	albúmina de suero bovino
<b>Casp3:</b>	caspara-3
<b>cDNA:</b>	DNA copia
<b>cpm:</b>	cuentas por minuto
<b>CS:</b>	control sano
<b>DA:</b>	ratas <i>dark agouti</i>
<b>DE:</b>	desviación estándar
<b>DNA:</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DMSO:</b>	dimetilsulfóxido
<b>EAE:</b>	encefalomielitis autoinmune experimental
<b>EBV:</b>	virus Epstein-Barr
<b>EDSS:</b>	Escala de discapacidad ampliada de Kurtzke
<b>EM:</b>	esclerosis múltiple
<b>EMA:</b>	agencia europea del medicamento
<b>EMRR:</b>	esclerosis múltiple remitente-recurrente
<b>EMPP:</b>	esclerosis múltiple primariamente progresiva
<b>EMSP:</b>	esclerosis múltiple secundariamente progresiva

<b>FBS:</b>	suero fetal bovino
<b>FDA:</b>	agencia americana del medicamento ( <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FITC:</b>	isocianato de fluoresceína
<b>FoxP3:</b>	<i>forkhead box P3</i>
<b>GA:</b>	acetato de glatirámico
<b>GFAP:</b>	proteína fibrilar ácida de la glia
<b>GM-CSF:</b>	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>GWAS:</b>	estudios de asociación de genoma completo ( <i>Genome Wide Association Studies</i> )
<b>HE:</b>	hematoxilina-eosina
<b>HLA:</b>	antígeno leucocitario humano
<b>HERV:</b>	retrovirus endógeno humano
<b>HHV:</b>	herpes virus humano
<b>HOx:</b>	hemo oxigenasa 1
<b>HSF1:</b>	<i>heat shock factor 1</i>
<b>HSP:</b>	<i>Heat Shock Protein</i> . La nomenclatura en mayúsculas hace referencia a las familias proteicas.
<b>Hsp:</b>	<i>heat shock protein</i> . La nomenclatura en minúsculas hace referencia a los miembros de las familias o proteínas concretas.
<b>IE:</b>	índice de estimulación
<b>IFN:</b>	interferón
<b>IL:</b>	interleuquina
<b>IMDM:</b>	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
<b>iNOS:</b>	óxido nítrico sintasa inducible
<b>ip:</b>	intraperitoneal
<b>iv:</b>	intravenoso
<b>KB:</b>	Klüver-Barrera
<b>KO:</b>	ratón deficiente en un gen (del inglés, <i>knockout</i> )

<b>LCR:</b>	líquido cefalorraquídeo
<b>LEA:</b>	<i>Lycopersicon esculentum agglutinin</i>
<b>LFB:</b>	<i>luxol fast blue</i>
<b>LMP:</b>	leucoencefalopatía multifocal progresiva
<b>LPS:</b>	lipopolisacárido
<b>mAb:</b>	anticuerpo monoclonal
<b>MBP:</b>	proteína mielínica básica
<b>MHC:</b>	complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MDA:</b>	malondialdehído
<b>MFI:</b>	intensidad media de fluorescencia
<b>MMP:</b>	metaloproteinasas de la matriz extracelular
<b>MOG:</b>	glicoproteína mielínica de oligodendrocitos
<b>NITT:</b>	nitrotirosina
<b>NK:</b>	células asesinas naturales (del inglés, <i>natural killer</i> )
<b>NO:</b>	óxido nítrico
<b>nTreg:</b>	células T reguladoras naturales
<b>OPC:</b>	células progenitoras de oligodendrocitos
<b>PBMC:</b>	células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS:</b>	tampón salino fosfato
<b>PDGF:</b>	factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PE:</b>	ficoeritrina
<b>PEG:</b>	polietilenglicol
<b>PerCP:</b>	proteína clorofila peridina
<b>PFA:</b>	paraformaldehído
<b>PGIA:</b>	artritis reumatoide inducida con proteoglicano
<b>PLP:</b>	proteína proteolipídica

<b>RNA:</b>	ácido ribonucleico
<b>ROS:</b>	especies reactivas del oxígeno
<b>RPMI:</b>	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>sc:</b>	subcutáneo
<b>SEM:</b>	error estándar de la media
<b>siRNA:</b>	pequeño RNA de interferencia ( <i>small interference RNA</i> )
<b>SNA:</b>	síndrome neurológico aislado
<b>SNC:</b>	sistema nervioso central
<b>SPF:</b>	ambiente libre de patógenos ( <i>specific patogen free</i> )
<b>T3:</b>	triyodotironina
<b>T4:</b>	L-tiroxina
<b>TA:</b>	temperatura ambiente
<b>TCR:</b>	receptor de célula T
<b>Th:</b>	linfocito T colaborador ( <i>T helper</i> )
<b>TLR:</b>	receptor de tipo Toll ( <i>toll-like receptor</i> )
<b>TNF:</b>	factor de necrosis tumoral
<b>Tr1:</b>	células reguladoras tipo 1
<b>Treg:</b>	células T reguladoras
<b>UDG:</b>	<i>Uracil-DNA Glycosylase</i>
<b>VLA:</b>	<i>very late activation antigen</i>
<b>VCAM:</b>	<i>vascular cell adhesión molecule</i>
<b>WT:</b>	ratones salvajes (del inglés, <i>wild type</i> )

**Nota:** En la mayoría de abreviaturas se ha utilizado la nomenclatura inglesa para mantener el mismo criterio que se utiliza en las publicaciones internacionales.





# Índice

---

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b> .....	<b>13</b>
1. Aspectos clínicos .....	13
2. Etiología .....	16
2.1. Factores genéticos .....	17
2.2. Factores ambientales .....	18
2.3. Otros factores moduladores .....	19
2.4. Antígenos candidatos .....	20
3. Patogenia .....	21
3.1. Proceso inflamatorio .....	22
3.2. Remielinización .....	33
4. Tratamientos .....	33
<b>ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>36</b>
1. Inducción de la EAE .....	36
2. Curso clínico .....	37
3. Histopatología .....	39
4. Patogenia .....	40
<b>PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO</b> .....	<b>43</b>
1. Familia HSP70 .....	43
2. Neuroprotección y Hsp70 .....	44
2.1 Función neuroprotectora de la Hsp70 en la EM .....	46
3. Inmunomodulación y Hsp70 .....	47

3.1	Mimetismo molecular .....	47
3.2	Respuesta celular .....	48
3.3	Respuesta humoral.....	53
4.	Funciones de Hsp70 en la patogenia de la EM .....	54
5.	Estudios genéticos.....	56
6.	Potencial terapéutico de las HSP .....	57
<b>HIPÓTESIS .....</b>		<b>61</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>		<b>65</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>		<b>69</b>
<b>PARTE I. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE Hsp70 EN PACIENTES CON EM Y CONTROLES SANOS.....</b>		<b>69</b>
1.	Pacientes y CS .....	69
2.	Obtención de PBMC.....	69
3.	Expresión genética de Hsp70.....	72
3.1.	Extracción de RNA total.....	72
3.2.	Retrotranscripción.....	74
3.3.	PCR a tiempo real .....	75
4.	Expresión proteica de Hsp70 .....	78
4.1	Marcaje de superficie directo .....	79
4.2	Marcaje intracelular directo.....	79
5	Inducción de la expresión de Hsp70A1/B .....	81
6	Análisis estadístico .....	81
<b>PARTE II. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE Hsp70 <i>IN VITRO</i> Y EN UN MODELO ANIMAL DE EM .....</b>		<b>82</b>
1.	Animales.....	82

2. Genotipado .....	82
2.1. Extacción DNA genómico .....	83
2.2. Amplificación del gen <i>Hsp70.1</i> .....	84
2.3. Electroforesis.....	85
3. Inducción de la EAE y seguimiento clínico .....	86
4. Tratamiento con siRNA .....	87
5. Análisis de la reactividad antígeno específica.....	87
6. Análisis de la producción de citocinas .....	88
7. Análisis histopatológico .....	89
8. Cultivo mixto de células de SNC de ratón .....	92
9. Cultivo mixto de células gliales .....	95
10. Modelo <i>in vitro</i> de inflamación en el SNC.....	95
11. Inmunocitoquímica y detección de apoptosis en cultivos de células del SNC .....	96
12. Análisis estadístico .....	98

## **RESULTADOS.....101**

### **PARTE I. EXPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Hsp70 EN PACIENTES CON EM Y CONTROLES SANOS.....101**

1. Selección del control endógeno.....	101
2. Sobreexpresión de Hsp70 en PBMC de pacientes con EM .....	102
3. Sobreexpresión de Hsp70-1A/B en linfocitos y monocitos de pacientes con EM .....	104
4. Inducción de la expresión de Hsp70 tras un estrés térmico o inflamatorio .....	106

### **PARTE II. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE Hsp70 *IN VITRO* Y EN UN MODELO ANIMAL DE EM.....109**

1. Genotipado de ratones WT y <i>Hsp70.1</i> KO .....	109
---	-----

2. Los ratones deficientes en <i>Hsp70.1</i> presentan menor susceptibilidad a desarrollar EAE .....	110
3. Aumento de la respuesta antígeno específica en ratones deficientes en <i>Hsp70.1</i> con EAE.....	112
4. La deficiencia en <i>Hsp70.1</i> no modifica el perfil de secreción de citocinas .....	114
5. La deficiencia de <i>Hsp70.1</i> no modifica las alteraciones neuropatológicas de la EAE.....	114
6. Modelo <i>in vitro</i> de inflamación en el SNC.....	119
7. Efecto del estímulo inflamatorio en los cultivos de células del SNC.....	122
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>127</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>141</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>145</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>173</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>209</b>



# Resumen

---

## RESUMEN

La proteína de choque térmico [heat shock protein (Hsp)-70] es una chaperona inducible por condiciones de estrés celular que puede ejercer una función citoprotectora y antiapoptótica a nivel intracelular, mientras que cuando es secretada al medio extracelular la Hsp70 actúa promoviendo la respuesta inmune, tanto la innata como la adaptativa.

El objetivo de esta tesis doctoral es estudiar la función de la Hsp70 en la patogenia de la esclerosis múltiple (EM); una enfermedad crónica, inflamatoria y desmielinizante en la cual la Hsp70 puede ejercer tanto una función beneficiosa, actuando como molécula citoprotectora en el sistema nervioso central (SNC), como una función perjudicial, potenciando la respuesta autoinmunitaria.

Con esta finalidad, se cuantificó la expresión génica y proteica de Hsp70 en pacientes con EM en comparación con controles sanos (CS), observándose un aumento de la expresión basal de Hsp70 en las células mononucleares de sangre periférica y, en consecuencia, una reducción de la capacidad de inducción de su expresión tras ser sometidas a condiciones de estrés. Estos hallazgos parecen estar relacionados con el estado de activación crónica resultante de la respuesta inmunológica que tiene lugar en los pacientes con EM, por lo que decidimos estudiar la relevancia de Hsp70 en la patogenia de la EM mediante el análisis de su función citoprotectora e inmunológica en cultivos de células del SNC y en el modelo animal de la EM, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Los estudios *in vitro*, en cultivos de células del SNC sometidos a un estrés inflamatorio, así como el análisis del grado de desmielinización y de daño axonal en ratones con EAE deficientes en Hsp70 (Hsp70 KO) comparado con ratones control, no reveló un papel citoprotector relevante de la Hsp70 en el SNC. Sin embargo, los ratones Hsp70 KO y los ratones a los que se les había inhibido la

expresión de Hsp70 mediante la administración de siRNA sí presentaron una reducción de la incidencia y una disminución de la severidad de la EAE en comparación con los ratones control; indicando que la Hsp70 participa, aunque no es crucial, en el desarrollo de la enfermedad. De esta forma, los estudios inmunológicos revelaron que los esplenocitos deficientes en Hsp70 presentaban un aumento de la respuesta antígeno específica aunque un nivel de producción de citocinas inflamatorias similar a los ratones control.

Los resultados sugieren que aunque la función de Hsp70 no es decisiva en el desarrollo de la enfermedad, participa promoviendo una respuesta auto-reactiva eficiente. Por lo tanto, estrategias terapéuticas dirigidas a disminuir la expresión de Hsp70 podrían tener un efecto beneficioso reduciendo la respuesta autoinmune inicial que tiene lugar en los pacientes con EM, sin suponer un mayor perjuicio respecto a su función citoprotectora.





# Introducción

---

### ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa que afecta el sistema nervioso central (SNC). Debuta generalmente en adultos jóvenes de entre 20 y 40 años, siendo más frecuente en mujeres que en hombres (razón 2,3:1). Su prevalencia en nuestro país oscila entre 70-80 casos por cada 100.000 habitantes, afectando a unas 46.000 personas en España [1]. La EM es la mayor causa de discapacidad no traumática, por lo que es una enfermedad con un fuerte impacto social y económico.

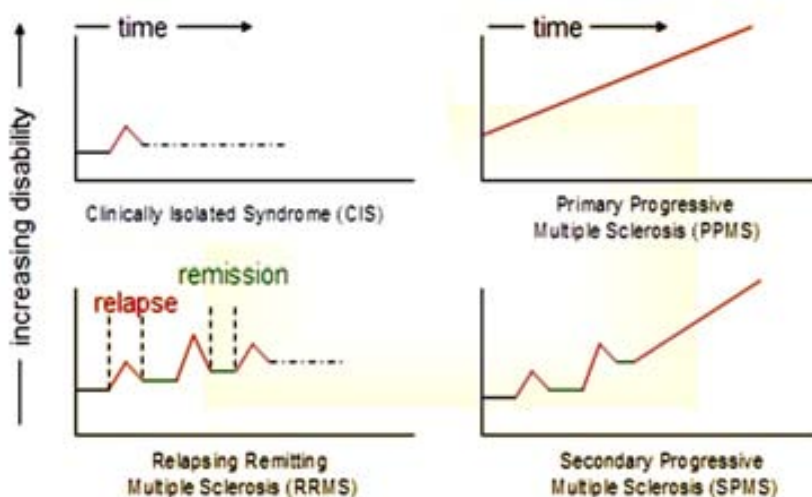
#### 1. Aspectos clínicos

La EM está causada por una destrucción de las vainas de mielina que recubren los axones neuronales, provocando una disrupción del impulso nervioso y dando lugar a un amplio espectro de signos clínicos dependiendo del área de afectación del SNC. Los signos clínicos más habituales son los problemas visuales, motores y sensitivos y estos pueden presentarse en cuatro formas clínicas. La reciente revisión de Lublin (2014) define los cursos clínicos teniendo en consideración tanto parámetros de evolución clínica como una descripción de la actividad y la progresión de la enfermedad basada en datos clínicos (fases de empeoramiento o brotes clínicos) y radiológicos [2]. Según esta clasificación, los cursos clínicos de la enfermedad son (Fig.1):

- Remitente-recurrente (RR): es la forma clínica más común, presentándose en aproximadamente un 80-90% de los pacientes. Se caracteriza por la aparición de episodios clínicos de empeoramiento de la enfermedad (exacerbaciones o brotes clínicos) separados por periodos de remisión total o parcial de los síntomas.

## Introducción

- Secundariamente progresiva (SP): aproximadamente el 50% de los pacientes con EMRR, tras un periodo de unos 10-15 años evoluciona a una forma clínica progresiva.
- Primariamente progresiva (PP): entre el 10-20% de los pacientes con EM presentan desde el inicio un aumento progresivo de la discapacidad.
- Síndrome neurológico aislado (SNA o CIS, del inglés, *clinically isolated syndrome*): la nueva clasificación clínica considera el SNA como la primera manifestación clínica de la enfermedad, el cual presenta parámetros de inflamación y desmielinización compatibles con EM a pesar de no cumplir los criterios clínicos y radiológicos de diseminación en el tiempo y el espacio (necesarios para considerarse como EM clínicamente definida, EMCD). Cabe destacar que la mayoría de los pacientes con SNA acaban evolucionando a una EMCD [3].

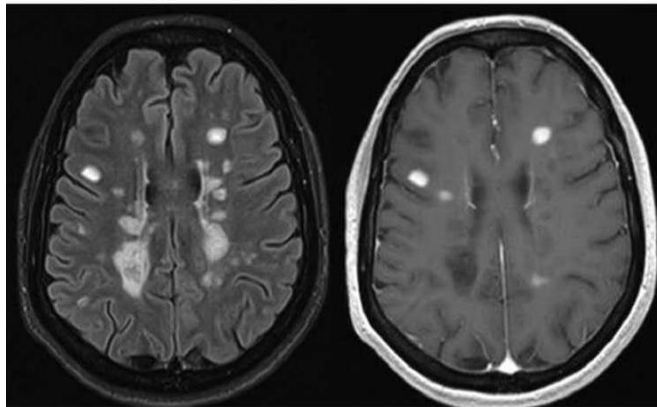


**Figura 1. Cursos clínicos de EM.** Los pacientes con EM pueden presentar 3 formas de EM clínicamente definida: remitente-recurrente (RR), secundariamente progresiva (SP) y primariamente progresiva (SP). La nueva clasificación de los cursos clínicos de Lublin et al. 2014 incluye el síndrome neurológico aislado (SNA o CIS) como la primera manifestación clínica de la enfermedad [2].

Fuente: Diagnostic Signature Challenge - MS Stage Sub-Challenge.  
<https://sbvimprover.com>.

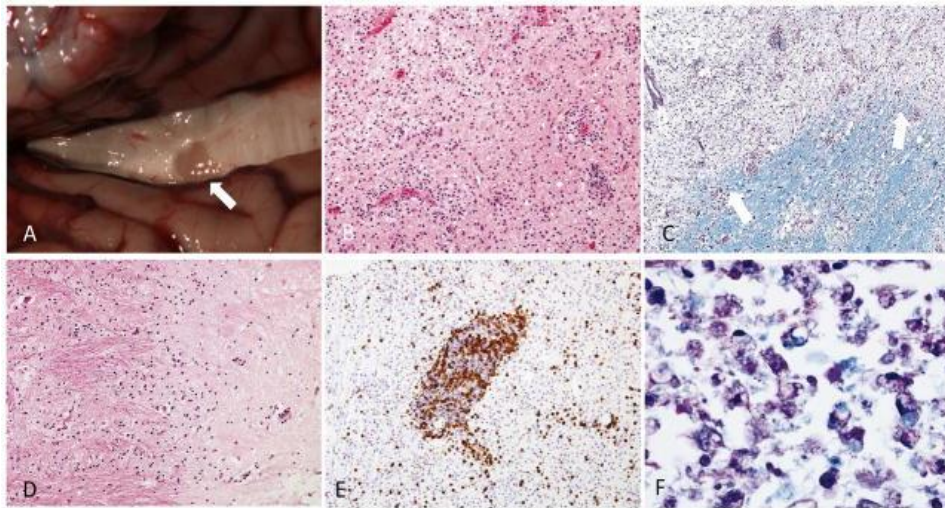
Los cursos clínicos de EMRR, EMSP, EMPP y SNA se subclasifican a su vez en formas clínicas activas o no activas teniendo en cuenta parámetros de actividad determinada por parámetros clínicos (presencia de nuevos brotes) y/o parámetros radiológicos (presencia de nuevas lesiones) y por progresión de la discapacidad.

La principal característica histopatológica de la EM es la presencia de lesiones focales localizadas principalmente en la sustancia blanca tanto en el encéfalo como en medula espinal, las cuales son observables por resonancia magnética (RM) (Fig. 2). Estas lesiones o placas son áreas de desmielinización bien definidas y caracterizadas por la presencia de inflamación, gliosis y cierto grado de pérdida axonal y de oligodendrocitos (Fig. 3).



**Figura 2. Imagen de resonancia magnética de un paciente con EM.** Izquierda: imagen de RM ponderada en T2 y obtenida con una secuencia Flair (*fluid attenuation inversion recovery*). La imagen muestra múltiples lesiones desmielinizantes hiperintensas comparado con la apariencia normal del tejido cerebral. Derecha: imagen de RM ponderada en T1 y contrastada con gadolinio. La imagen muestra lesiones hiperintensas, captantes de gadolinio, que indican el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Fuente: Àlex Rovira, Cristina Auger, Juli Alonso. Magnetic Resonance Monitoring of Lesion Evolution in Multiple Sclerosis. *Ther Adv Neurol Disorders*. 2013;6(5):298-310.



**Figura 3. Características histológicas de las lesiones en la EM.** A. Examen macroscópico del cerebro de un paciente de 79 años con EMRR. La visualización dorsal del corpus callosum tras separar los hemisferios cerebrales revela la presencia de un área descolorida (flecha). B. Placa aguda de EM con hipercelularidad causada por la infiltración perivascular y en el parénquima de leucocitos (hematoxilina-eosina). C. Sección de una placa marginal con un borde poco definido pero discreto (flechas) (*luxol fast blue periodic acid-Schiff* [LFB-PAS]). D. Placa inactiva que presenta bordes sin presencia de una marcada inflamación (hematoxilina-eosina). E. Agrupación de linfocitos CD3+ en un manguito perivascular en un área de lesión activa (tinción inmunohistoquímica de CD3). F. Macrófagos espumosos caracterizados por contener fragmentos de mielina en placas marginales (LFB-PAS).

Fuente: Gregory F. Wu, Enrique Alvarez. *The Immunopathophysiology of Multiple Sclerosis*. *Neuro Clin* 29 (2011) 257-278.

## 2. Etiología

La causa de la EM es desconocida. Los numerosos estudios realizados en las últimas décadas indican que la EM es una enfermedad compleja en la cual participan factores genéticos y ambientales.

### 2.1. Factores genéticos

Los esfuerzos para identificar genes asociados con la EM revelaron que, a pesar de ser una enfermedad con un importante componente genético, no tiene un patrón de herencia mendeliana. En este caso, la susceptibilidad global de desarrollar EM está determinada por interacciones complejas de variantes alélicas de un elevado número de genes, cada uno de los cuales contribuye de forma débil a aumentar la susceptibilidad de padecer la enfermedad [4]. La combinación de factores genéticos que confieren susceptibilidad junto con la interacción con determinados factores ambientales serían los causantes de desencadenar diferentes enfermedades inflamatorias crónicas, entre ellas, la EM [4,5].

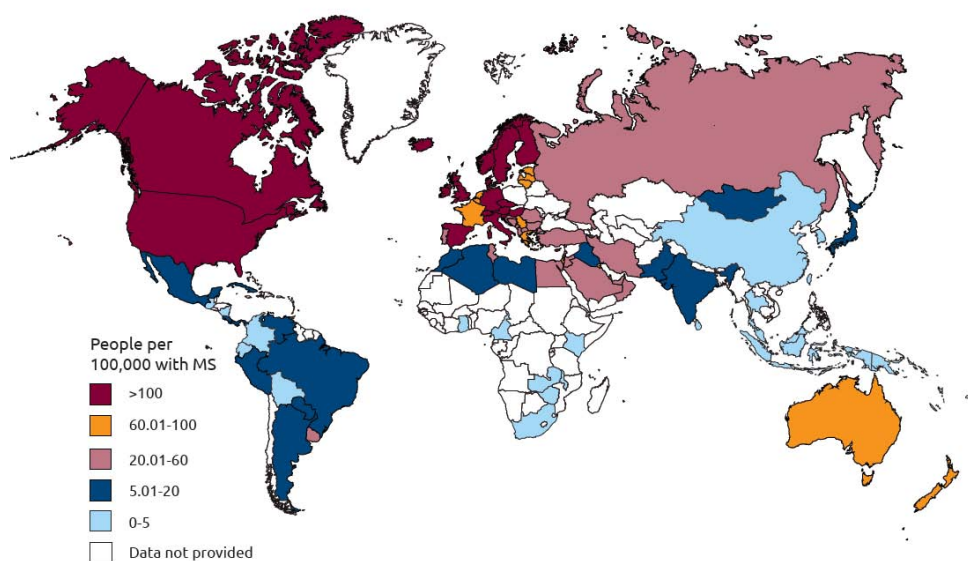
Los numerosos estudios genéticos realizados han logrado identificar diferentes genes asociados con EM. La asociación más fuerte y mejor caracterizada es la descrita para los genes de la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) localizada en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21). Dentro de este *locus*, se han identificado una fuerte asociación de los alelos del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, en particular el HLA-DR2 y su correspondiente haplotipo DR15 (*DRB1\*1501*, *DRB5\*0101*, *DQA1\*0102*, *DQB1\*0602*) [6,7].

El desarrollo de los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *Genome Wide Association Studies*) ha permitido el mapeo genómico completo y se han identificado otros genes asociados con la EM, aunque de forma muy débil, que no se hallan en la región del HLA. La mayoría de estos genes están relacionados con funciones inmunológicas, siendo los genes que codifican los receptores de la cadena  $\alpha$  de la interleucina (IL)-2 e IL-7 los más relevantes [8-10].

## Introducción

### 2.2. Factores ambientales

A pesar de que determinados genes aumenten la susceptibilidad de padecer EM, no todas las personas que son genéticamente susceptibles acaban desarrollando la enfermedad (únicamente el 25% de los gemelos monocigóticos coincide en el desarrollo de EM), indicando que es necesaria la contribución de una serie de factores ambientales para dar lugar a la aparición de la EM [5,9].



**Figura 4. Distribución mundial de la EM.** Prevalencia de la EM a nivel mundial en 2013. Fuente: Federación Internacional de Esclerosis Múltiple. Atlas of MS 2013. Mapping Multiple Sclerosis around de world. <http://www.msif.org>

Los estudios de prevalencia reflejan que, en general, el riesgo de padecer EM varía dependiendo de la latitud geográfica. De este modo los países del norte de Europa, Estados Unidos, Canadá y el sureste de Australia presentan una elevada prevalencia, mientras que en China o África los casos de EM son muy escasos (Fig. 4). Aunque la causa de esta variabilidad no está clara, puede estar relacionada con la carga genética de cada zona geográfica, aunque también se ha relacionado con un déficit de vitamina D, debido a una reducción de la radiación solar en las áreas de mayor frecuencia [11].

Por otra parte, la exposición a agentes infecciosos durante la infancia-adolescencia también se ha considerado un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad. En este sentido, los estudios de migración han revelado que los individuos que migran antes de la adolescencia adquieren el riesgo de padecer EM de la zona geográfica a la que viajan. Se ha descrito una larga lista de agentes infecciosos relacionados con la patogenia de la enfermedad, aunque ninguno de ellos es indispensable para el desarrollo de la EM. Los más relacionados con la EM son los virus, de los cuales destacan el herpes virus humano-6 (HHV-6), el virus de Epstein-Barr (EBV) y los retrovirus endógenos humanos (HERV)[12-16].

### 2.3. Otros factores moduladores

Las enfermedades autoinmunes son en general mucho más frecuentes en mujeres que en hombres [17,18]. En la EM se ha observado que las mujeres son el doble de susceptibles que los hombres de desarrollar la enfermedad, sugiriendo un posible papel de las hormonas en la respuesta inmunológica. Se ha descrito que los linfocitos T de las mujeres [19] muestran, en general, mayor reactividad [20] y tienden a secretar niveles más elevados de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en respuesta a la proteína proteolipídica (PLP) [19]. Por otra parte, durante el embarazo el número de brotes clínicos de la enfermedad está significativamente reducido, mientras que poco después del parto aumenta el riesgo de presentar un brote clínico [21], demostrando que la regulación hormonal juega un papel importante en la patogenia de esta enfermedad.

Otros factores que también se han relacionado con mayor riesgo de desarrollar la EM son el estrés, la dieta y el tabaquismo [22-25].

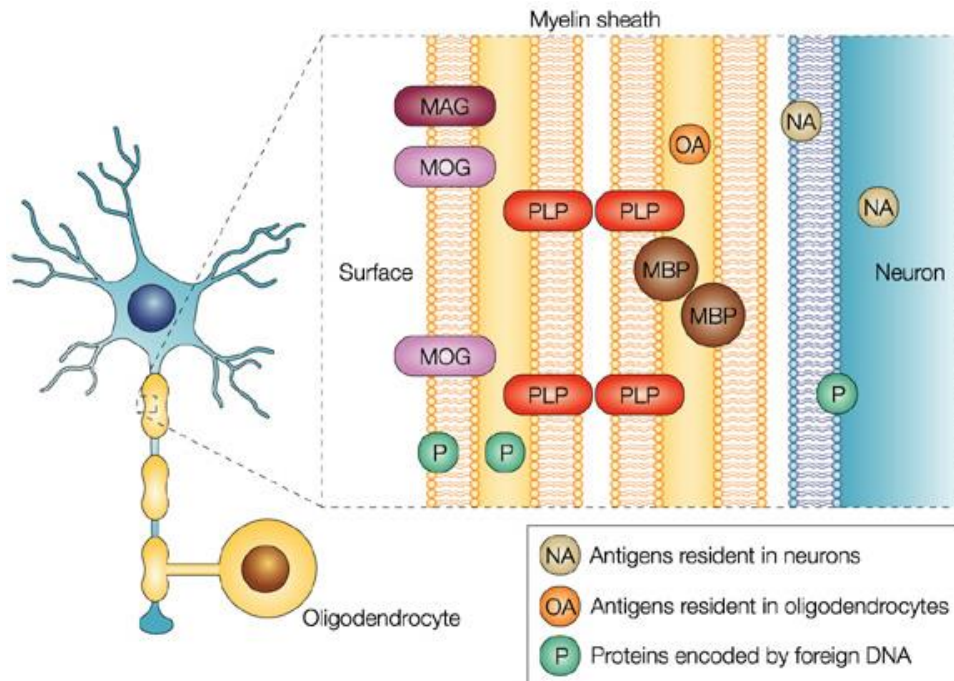


## Introducción

---

### 2.4. Antígenos candidatos

La mielina del SNC es una estructura compleja generada por los oligodendrocitos y que recubre los axones neuronales permitiendo la transmisión saltatoria de los impulsos nerviosos. Su composición puede variar pero, en general está formada por un elevado contenido lipídico (70-85%) y una fracción proteica (15-30%). De la fracción proteica derivan los principales antígenos candidatos y que han sido utilizados para inducir el modelo animal de la enfermedad, la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). Entre ellos cabe destacar la proteína mielínica básica (MBP), la PLP y la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG) (Fig. 5) [26]. También se ha dado importancia a estructuras no proteicas de la mielina como los gangliósidos, observándose en el suero y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM un aumento de anticuerpos anti-gangliósido en comparación con los CS [27,28]. Otros antígenos candidatos no relacionados con la mielina son la proteína astrogliar S100 $\beta$  [29], las proteínas de choque térmico, en concreto la  $\alpha$ B-cristalina [30], Hsp60 and Hsp70 [31], y componentes de las neuronas y los axones tales como los neurofilamentos y la neurofascina [32,33]. Finalmente, otra molécula que recientemente se ha relacionado con la EM es la subunidad KIR4.1 de los canales de potasio presente en las células gliales. En el estudio de Srivastava y colaboradores (2012) se ha hallado que un 47% de los pacientes con EM presentan anticuerpos anti-KIR4.1 en suero (y en el LCR) en comparación con el 1% de pacientes con otras enfermedades neurológicas o la ausencia en CS [34]. No obstante, hasta el momento ninguno de estos auto-antígenos candidatos se ha podido relacionar de forma exclusiva con el desarrollo de la respuesta inmunitaria característica de la EM.



**Figura 5. Antígenos candidatos de la respuesta inmunológica en la EM.** Las proteínas de la mielina, y moléculas presentes en los oligodendrocitos y en las neuronas/axones son posibles autoantígenos relacionados con la patogenia de la EM. MAG, glicoproteína asociada a la mielina; MBP, proteína básica de la mielina, MOG, glicoproteína mielínica de oligodendrocitos; PLP, proteína proteolípídica.

Fuente: Bernhard Hemmer, Juan J. Archelos & Hans-Peter Hartung. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 291-301 (April 2002).

### 3. Patogenia

Aunque la causa de la EM es desconocida, los hallazgos de estudios realizados tanto en pacientes con EM como en su modelo animal, la EAE, indican que el sistema inmune está claramente implicado en la patogenia de la enfermedad. El hallazgo de células B y células T auto-reactivas frente a antígenos mielínicos en las lesiones de los pacientes con EM y la descripción de múltiples mecanismos de daño mediados por el sistema inmune han aportado suficientes evidencias que han hecho considerar la EM una enfermedad autoinmune [35,36].

## Introducción

---

### 3.1. Proceso inflamatorio

#### **Activación de linfocitos T específicos frente antígenos de la mielina**

La participación del sistema inmune en la EM se refleja por la presencia de células T reactivas frente a MBP en la sangre periférica de los pacientes con EM que, aunque también se encuentran en la misma frecuencia en los CS, en los pacientes con EM presentan un estado mayor de activación y un fenotipo memoria [37]. Como se ha comentado, la causa de activación de las células T auto-reactivas en los pacientes con EM es aún desconocida. Se cree que una compleja combinación de factores genéticos y ambientales provocaría la activación de las células T periféricas reactivas frente a péptidos mielínicos. Algunos de los mecanismos propuestos como probables inductores de la activación son el mimetismo molecular (activación de las células auto-reactivas a causa del reconocimiento de antígenos patogénicos que comparten un elevado grado de similitud con antígenos encefalitogénicos) [38,39], un fallo en el sistema de inmunorregulación (déficit funcional de las células T reguladoras, Treg) [40] o por un efecto *bystander* (activación de células auto-reactivas de forma secundaria causada por el proceso inflamatorio que tiene lugar durante las infecciones) [35].

#### **Infiltración de células inflamatorias en el SNC**

La activación de las células T conlleva la secreción de citocinas inflamatorias como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  que inducen la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales de las vénulas [41] y median la extravasación de células inflamatorias al SNC.

Aunque históricamente el SNC ha sido considerado un órgano con privilegio inmune, en situaciones patológicas tales como infecciones los linfocitos son capaces de migrar a través de la barrera hematoencefálica (BHE) e invadir el

SNC para atacar los agentes patogénicos [42,43]. La transmigración de células inflamatorias a través de la BHE es un proceso secuencial en el que intervienen principalmente moléculas de adhesión (selectinas e integrinas), quimiocinas y metaloproteinasas de matriz extracelular (*matrix metalloproteinases*, MMP). Los pasos iniciales en la migración y adherencia celular están mediados por interacciones entre **moléculas de adhesión** expresadas en las células endoteliales y las células del sistema inmune. Una molécula clave implicada en la extravasación leucocitaria es la integrina  $\alpha 4\beta 1$  o VLA-4 (*very late activation antigen*), la cual está expresada en la superficie de los linfocitos activados e interacciona con la molécula de adhesión celular vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) expresada en las células endoteliales del capilar [44]. La importancia de esta interacción en la patogenia de la EM ha sido claramente demostrada tras observar que el bloqueo de la subunidad  $\alpha 4$ -integrina del VLA-4 por el anticuerpo monoclonal humanizado natalizumab inhibe la migración de las células inmunes al SNC y está relacionado con una reducción significativa tanto de la actividad clínica como radiológica de la EM [45].

Las **quimiocinas** son moléculas que actúan como factores quimioatrayentes regulando el reclutamiento y la migración de los leucocitos desde la sangre periférica hacia las zonas de inflamación. Las quimiocinas presentes en el lumen endotelial se unen a los receptores de quimiocinas de los leucocitos circulantes que expresan los correspondientes receptores, seleccionando de esta forma el tipo celular que extravasará y llegará al SNC [46-48]. Algunos estudios han hallado niveles alterados de quimiocinas y de sus receptores en sangre periférica, LCR y en las lesiones de pacientes con EM [49], indicando la relevancia de la función de las quimiocinas en la neuropatogenia de la enfermedad.

## Introducción

---

Otras moléculas importantes en la mediación del proceso de extravasación leucocitaria son las **MMP**. Estas proteínas son enzimas proteolíticas que además de estar involucradas en la disrupción de la integridad de la BHE degradando la matriz extracelular también participan en la formación de placas de desmielinización y en la pérdida axonal [50]. De estas proteínas cabe destacar la MMP-9, los niveles séricos de la cual son mayores en pacientes con EM que en controles [51,52], observándose un aumento de la concentración de MMP-9 durante el brote clínico de la enfermedad y una correlación con el número de lesiones captantes de gadolinio mediante RM [51].

Históricamente se ha definido la EM, al igual que su modelo animal, la EAE, como una enfermedad mediada por linfocitos T CD4+. Una de las razones que apoya esta hipótesis es que la EAE puede inducirse de forma pasiva mediante la transferencia adoptiva de clones de células T CD4+ reactivas frente a antígenos mielínicos [35,53].

Una vez los **linfocitos T CD4+** auto-reactivos atraviesan la BHE e infiltran el SNC, estas células son re-activadas tras reconocer el correspondiente antígeno encefalitogénico presentado en el contexto del MHC-II por **células presentadoras de antígenos** (APC) como las células dendríticas y la microglía residente del SNC, así como los macrófagos infiltrantes [54,55]. La reactivación induce la liberación de citocinas pro-inflamatorias y mediadores solubles que destruirán aún más la BHE y estimularán la quimiotaxis, provocando a una segunda oleada de reclutamiento de células inflamatorias hacia el SNC.

Tras la activación, las células T CD4+ *naïve* (o vírgenes) se diferencian en varias poblaciones de células T con diferentes funciones efectoras. Las células **Th1** producen citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  que activa macrófagos para matar patógenos intracelulares. Por otra parte, las células **Th2** secretan citocinas anti-inflamatorias como la IL-4 y la IL-10 que son importantes en la

eliminación de patógenos extracelulares [56]. El desequilibrio entre el nivel de citocinas Th1 y Th2 se ha implicado durante muchos años en la inmunopatogenia de la EM. El descubrimiento del linaje **Th17**, células productoras de la citocina proinflamatoria IL-17 [57], ha sido asociado con numerosas enfermedades autoinmunes, entre ellas la EM [58-61]. Se ha descrito un aumento de IL-17 tanto en sangre, LCR, y tejido cerebral en pacientes con EM [58]. No obstante, parece que la proporción Th17/Th1 parece ser un factor esencial que determina la inflamación en el SNC y elevadas proporciones de células Th17/Th1 están asociadas con la infiltración de células T e inflamación en el parénquima del cerebro [62]. Los estudios patológicos en pacientes con EM y en la EAE han demostrado que las células que expresan IL-17 o IFN- $\gamma$  atraviesan eficientemente la BHE y se acumulan en el cerebro [63]. En consecuencia ambos tipos celulares, Th1 y Th17, parecen desempeñar un papel importante en la patogenia de la EM [62,64].

Mientras que las células Th1 y Th17 parecen ser las responsables de desencadenar la formación de lesiones en SNC, las células Th2 y las **células T reguladoras** (Treg) serían importantes en la eliminación/resolución del proceso inflamatorio. Las células Treg naturales (nTreg) se caracterizan por la expresión de CD25 y el factor de transcripción FoxP3 (del inglés, *forkhead box P3*) y son capaces de regular la respuesta inmunitaria mediante la inhibición de la proliferación de las células T [65]. Aunque el número de células nTreg en sangre periférica y LCR es similar en pacientes con EM y controles, algunos estudios indican defectos en la capacidad de las células nTreg de los pacientes con EM de suprimir la activación de las células T específicas de mielina en la periferia [40,66]. En cambio, se ha descrito una ausencia de células nTreg en el tejido cerebral de pacientes con EM [58], que puede estar causada por una falta de funcionalidad de las nTreg en el SNC o por un defecto en la migración o supervivencia de la nTreg en el SNC [40,67].

## Introducción

---

Pese a que clásicamente se ha definido la EM como una enfermedad mediada principalmente por células T CD4+ otros tipos celulares también contribuyen en la respuesta inflamatoria que se produce en la EM. En este sentido, existen evidencias que sugieren un papel relevante de las **células T CD8+** en la inmunopatogenia de la EM. Cabe destacar por ejemplo, que en algunos estudios se ha descrito mayor número de linfocitos T CD8+ en los infiltrados inflamatorios que de células T CD4+ [68,69]). Además, se ha observado que existe una correlación entre el daño axonal y el número de linfocitos T CD8+ que infiltran la lesión [70] y mediante estudios *in vitro* se ha mostrado que las células T CD8+ pueden transectar neuritas de manera dependiente de MHC-I, indicando que las células T CD8+ pueden participar en el daño axonal observado en las lesiones de EM atacando de forma directa las neuronas [71]. Por otra parte, también se ha demostrado que la transferencia adoptiva de clones de células T CD8+ específicas de la mielina induce la EAE [72], ejerciendo de tal forma una función efectora en la patogenia de la enfermedad.

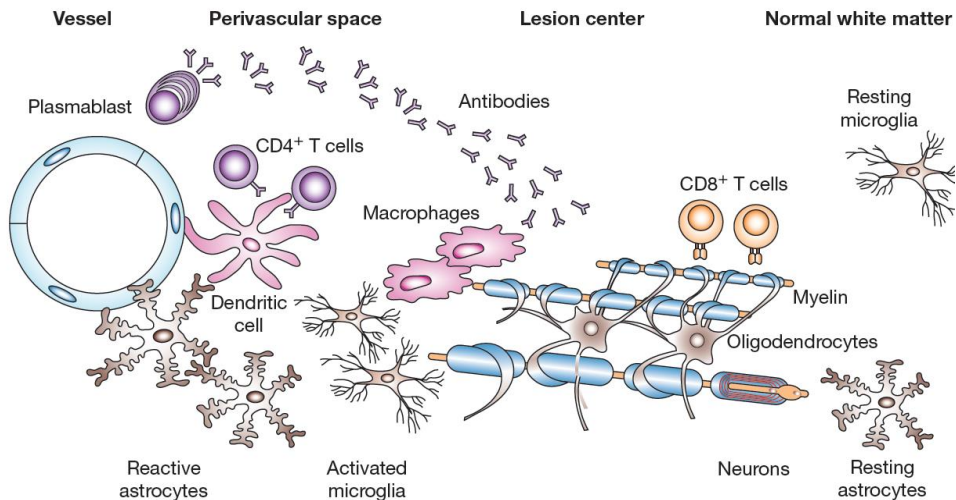
Por otra parte, las **células B** pueden actuar como células presentadoras de antígeno, pero de forma más relevante, pueden producir anticuerpos una vez maduran y se convierten en células plasmáticas. Los auto-anticuerpos liberados por estas células pueden unirse a las células diana y activar la cascada del complemento o inducir la fagocitosis mediada por anticuerpos por parte de los macrófagos. Las células B pueden participar directamente en el proceso de desmielinización mediante la secreción de anticuerpos patogénicos dirigidos contra los oligodendrocitos de forma dependiente o no de la presencia del complemento [73].

En el contexto de la EM, diferentes evidencias demuestran que la inmunidad humoral también tiene un papel relevante en la patogenia de la enfermedad. La más importante es la síntesis intratecal persistente de inmunoglobulinas oligoclonales en el LCR de pacientes con EM. De este modo, se ha descrito que

un 96% de los pacientes con EM presentan bandas oligoclonales (BOC) de IgG y, aunque no son específicas de la enfermedad, la determinación de BOC IgG se utiliza como parte de los criterios diagnósticos de la enfermedad en su forma primariamente progresiva [74] y son sin duda de ayuda diagnóstica en el resto de formas clínicas [75-78]. Por otra parte, la detección de BOC IgM en el LCR de pacientes con EM se ha relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad [79]. También se ha descrito la presencia de estructuras que se asemejan a los agregados foliculares con centros germinales en las meninges de algunos pacientes con un curso crónico progresivo de la enfermedad, lo que sugiere que la proliferación, la maduración de la afinidad antígeno-mediada y la diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos puede mantenerse de forma local en el SNC y contribuir al proceso patogénico [80]. El tratamiento con rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que elimina de forma eficiente las células B *naïve* y memoria, ha mostrado una reducción del número de lesiones inflamatorias y una disminución de los brotes clínicos [81] presumiblemente por una disminución de la capacidad presentadora de antígeno y de la producción de citocinas mediada por las células B.

Como resultado de la inducción del proceso inflamatorio descrito, se activan diferentes mecanismos efectores responsables de producir el daño tisular (Fig. 6).





**Figura 6. Inmunopatogénesis de la EM.** Esquema de los principales tipos celulares implicados en la formación de lesiones en la EM y sus funciones. Las células T, B y los macrófagos infiltran el SNC. Los linfocitos T CD4+ se localizan a nivel perivascular, donde se reactivan tras reconocer antígenos encefalitogénicos presentados por las células dendríticas y la microglía. En consecuencia, se inicia una respuesta inmunológica que recluta más linfocitos y macrófagos al SNC y activa la microglía, provocando la liberación de citocinas proinflamatorias. Los linfocitos T CD8+ infiltran el parénquima, junto con las citocinas y los mediadores inflamatorios, atacan de forma directa células que expresan MHC-I como las neuronas y los oligodendrocitos. Las células B liberan anticuerpos IgG que reconocen proteínas de la superficie de los oligodendrocitos y las neuronas. Los anticuerpos unidos a sus antígenos pueden fijar complemento, desencadenando la cascada del sistema del complemento o induciendo la fagocitosis mediada por anticuerpo por parte de los macrófagos. Los macrófagos activados también liberan citocinas proinflamatorias y moléculas tóxicas como el óxido nítrico, el cual principalmente daña oligodendrocitos y neuronas. Los astrocitos reactivos inducen gliosis en el borde de la lesión.

Fuente: Bernhard Hemmer, Stefan Nessler, Dun Zhou, Bernd Kieseier and Hans-Peter Hartung. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006 Apr;2(4):201-11.

### Remisión de la inflamación

En la EMRR la recuperación clínica se ha asociado con la supresión de la inflamación, relacionada a su vez con la inducción de células Treg productoras de citocinas antiinflamatorias como la IL-10, la IL-4 y el TGF- $\beta$  [82-84]. La IL-4 es una citocina producida principalmente por células Th2 con lo cual, su síntesis se asocia con una disminución de la respuesta Th1. Por otra parte, el papel del TGF- $\beta$  es algo contradictorio ya que, a pesar de tener una potente actividad inhibidora de las células T [85], el TGF- $\beta$  en presencia de IL-6 e IL-21 participa en la diferenciación de las células Th17 [86] y, por lo tanto, puede producir una exacerbación de la EAE [87]. Por el contrario, la IL-10 ha demostrado tener una función crucial en la supresión de las respuestas de células T efectoras en el SNC de ratones con EAE [88]. Además de sus propiedades antiinflamatorias, la IL-10 está relacionada con la diferenciación de células Treg inducidas (iTreg) a partir de células T CD4+ *naïve*, denominadas también células Treg de tipo 1 (Tr1). Estas células han mostrado tener un elevado potencial inmunoregulador en modelos experimentales [89,90].

Recientemente se ha descrito la existencia de células B reguladoras (Breg) que de forma similar a las células Treg producen IL-10, TGF- $\beta$  y expresan FoxP3. El análisis de células B en pacientes con EMRR ha mostrado niveles reducidos de células Breg productoras de IL-10 y se ha descrito que la capacidad supresora de éstas células está relacionada con la expresión de IL-35 tras su activación vía TLR4 y CD40 [91,92].

Otro tipo celular relacionado con una función inmunoreguladora son las células natural killer (NK). Las células NK forman parte de la respuesta innata y pueden actuar como células reguladoras (CD16+ CD56+), eliminando las células T infiltrantes induciendo su apoptosis mediante la señalización (CD95) Fas-FasL [93]. De este modo, se ha correlacionado la reducción de la actividad

## Introducción

---

inflamatoria en el SNC de los pacientes con EM tratados con el anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD25, daclizumab, con una expansión de la población de células NK reguladoras CD56<sup>brillantes</sup> [94].

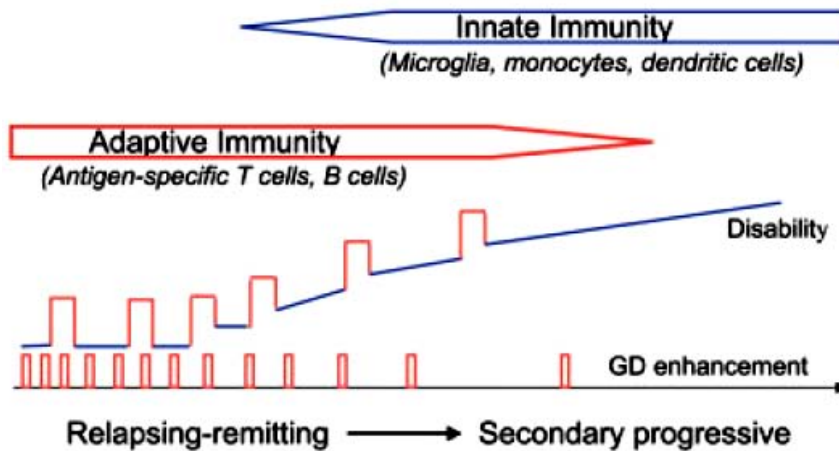
### Mecanismos patogénicos de daño tisular

Las lesiones de EM son áreas de desmielinización caracterizadas por la presencia de inflamación, gliosis y cierto grado de pérdida axonal y de oligodendrocitos [95].

Durante mucho tiempo la desmielinización ha sido considerada como una característica patológica primaria de la EM. Sin embargo, se ha encontrado que la pérdida axonal se correlaciona con la progresión de la enfermedad y la discapacidad neurológica permanente en pacientes con EM [96,97].

En las fases iniciales de la enfermedad, los pacientes presentan principalmente la forma clínica RR. Durante esta fase tiene lugar una desmielinización inflamatoria que da lugar a la formación de placas focales, localizadas preferentemente en la sustancia blanca. En las fases tardías de la enfermedad, en la que los pacientes presentan predominantemente formas clínicas SP o también en los pacientes EMPP, se observa una desmielinización diseminada en el córtex cerebral y del cerebelo además de cambios neurodegenerativos por toda la sustancia blanca y gris [98]. Estos procesos acaban desarrollando una enfermedad severa con una profunda atrofia cerebral y medular, con una extensa pérdida de tejido y dilatación de los ventrículos cerebrales (Fig. 7).

Las lesiones desmielinizantes inflamatorias están caracterizadas por la presencia de infiltrados inflamatorios, compuestos principalmente por linfocitos T CD8+ restringidos por MHC-I, los cuales sufren una expansión clonal en la lesión [72] y pueden destruir de forma directa neuronas y oligodendrocitos. Los linfocitos T



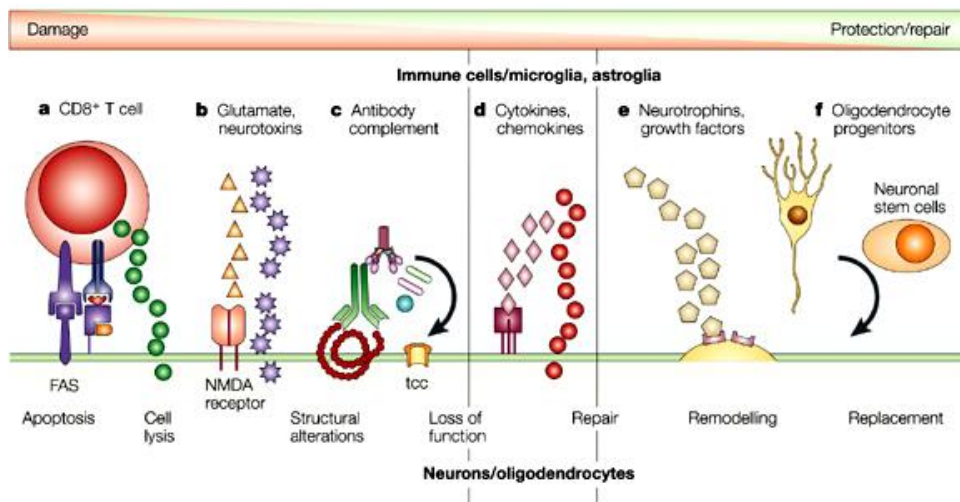
**Figura 7. Respuesta inmunológica y evolución clínica en la EM.** La mayoría de los pacientes debutan con un curso clínico RR, en la cual participa de forma predominante una respuesta inmune adaptativa. Esta fase de la enfermedad está caracterizada por la presencia de brotes clínicos, detección de lesiones captantes de gadolinio mediante RM y reducida discapacidad. A medida que pasa el tiempo, la enfermedad evoluciona a una forma SP, caracterizada por acumulación progresiva de la discapacidad en ausencia de brotes clínicos. Esta fase de la enfermedad la respuesta inmune innata tiene un papel mucho más relevante que la respuesta adaptativa.

Fuente: Weiner HL. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol.* 2009 Mar;65(3):239-48.

CD4+ restringidos por MHC-II y las células B se localizan principalmente en el espacio perivascular y en las meninges, mientras que su infiltración en el parénquima del SNC es escasa. Los linfocitos Th1 y Th17 median el daño tisular activo mediante la activación y el reclutamiento de la microglía y los macrófagos [99]. Los macrófagos infiltrantes producen citocinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) como el óxido nítrico (NO), IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y MMP que, junto con la producción de anticuerpos reactivos frente a antígenos de la mielina y el sistema del complemento, contribuyen al daño de las vainas de mielina, a los oligodendrocitos y a las neuronas (Fig. 8) [53, 95, 100]. Finalmente, la carencia de factores neurotróficos suministrados por los oligodendrocitos a los axones como resultado de una desmielinización crónica

## Introducción

es otro factor que puede contribuir al daño axonal [101]. La inflamación y el daño axonal van seguidos de procesos de reparación y remielinización tisular, aunque también se generan cicatrices como resultado de la activación astrocítica (Fig. 8). Tras un periodo largo de evolución de la enfermedad, las lesiones con inflamación aguda disminuyen pero el daño axonal y la formación de cicatrices continua, provocando la progresión de la neurodegeneración.



**Figura 8. Representación de los diferentes mecanismos de daño neuronal y de oligodendrocitos.** (a) Ataque antígeno-específico de las células T CD8<sup>+</sup> mediado por la secreción de perforina y granzima y la activación de la molécula FAS; (b) liberación de aminoácidos excitatorios y neurotoxinas que se unen a los receptores de glutamato o que afectan de forma directa las células; (c) unión de anticuerpos específicos que provocan la activación del sistema del complemento y también, posiblemente, promoviendo la remielinización; (d) liberación de citocinas, MMPs y metabolitos por los macrófagos, la microglía, las células T y la astrogliá que están involucradas en la inflamación, neurodegeneración y neuroprotección; (e) liberación de neurotrofinas, por las células gliales y las células T CD4<sup>+</sup>, implicadas en neuroprotección y regeneración; (f) migración de progenitores de oligodendrocitos y neuronas al lugar dañado.

NMDA: N-methyl-d-aspartato.

Fuente: Bernhard Hemmer, Juan J. Archelos & Hans-Peter Hartung. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Nature Reviews Neuroscience 3, 291-301 (April 2002).

### 3.2. Remielinización

El SNC de los pacientes con EM tiene la capacidad de remielinizar axones desmielinizados y restaurar así su funcionalidad [102,103]. Se ha descrito que el ambiente inflamatorio estimula la producción de factores inductores de la proliferación de células precursoras de oligodendrocitos (OPC), los cuales colonizan la zona de lesión, se diferencian a oligodendrocitos mielinizantes y contactan con los axones desmielinizados para generar una nueva vaina de mielina [104,105] (Fig. 8). Sin embargo, una vez el axón está completamente transectado o la integridad del cuerpo de la célula neuronal está severamente comprometida, los mecanismos de reparación son insuficientes [106,107]. Conforme la enfermedad progresa, la carga lesional aumenta en el SNC, dando lugar a una discapacidad neurológica permanente [100]. Se ha propuesto que la causa del daño neurológico es el incremento de la pérdida de axones y neuronas tras la desmielinización o por mecanismos independientes de la desmielinización [108,109].

## 4. Tratamientos

Actualmente, la EM no tiene cura. Los tratamientos existentes están dirigidos a disminuir la frecuencia e intensidad de los brotes clínicos y a retrasar la progresión de la enfermedad. Ya que la EM está considerada una enfermedad mediada por el sistema inmune, las estrategias terapéuticas se han enfocado en modular o suprimir dicha respuesta.

Un primer tipo de tratamientos son los dirigidos a tratar el brote agudo de la enfermedad con dosis elevadas de corticoesteroides tales como la prednisolona o metilprednisolona [110].

El otro grupo de tratamientos son los denominados tratamientos modificadores de la enfermedad. Dentro de este grupo, los interferones beta (IFN- $\beta$ ), IFN- $\beta$ -1b

## Introducción

---

e IFN- $\beta$ -1a, y el acetato de glatirámico (AG) son los tratamientos de primera línea de actuación ya que han demostrado modular la respuesta inmune, consiguiendo reducir la tasa de brotes, la acumulación de lesiones por RM y, en menor medida, la progresión de la discapacidad [111-113]. El IFN- $\beta$  ha mostrado ejercer múltiples efectos inmunomoduladores en las células T y tener propiedades antivirales [114]. Por su parte, el AG es un copolímero sintético que se cree que actúa modulando las células T autorreactivas frente a MBP [114,115], sin embargo los mecanismos de acción concretos tanto del IFN- $\beta$  como del AG todavía se desconocen.

Los tratamientos de segunda línea son más efectivos pero tienen importantes efectos secundarios asociados. En consecuencia, estos tratamientos se utilizan en caso de no responder a los tratamientos de primera línea o de pacientes con una rápida progresión de la enfermedad. En este grupo encontramos los tratamientos inmunosupresores, como la mitoxantrona [116], el natalizumab y el fingolimod. Como ya se ha comentado anteriormente, el natalizumab es un anticuerpo humanizado que bloquea la subunidad  $\alpha$ 4-integrina del VLA-4, inhibiendo la migración de células inflamatorias al SNC. A pesar de la elevada efectividad de este tratamiento a nivel clínico y radiológico [45], este fármaco presenta el riesgo de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una enfermedad causada por el virus JC que puede llegar a tener graves consecuencias neurológicas [117].

Recientemente se aprobó la comercialización del primer fármaco oral en Europa, el fingolimod, el cual se une al receptor 1-fosfato de la esfingosina y evita que los linfocitos salgan del ganglio linfático, impidiendo que contribuyan a la respuesta autoinmunitaria [118]. Posteriormente, la agencia americana, la FDA (*Food and Drug Administration*), y la agencia europea del medicamento (EMA) han aprobado otros dos fármacos orales para el tratamiento en EM, la teriflunomida (un inhibidor de la síntesis de pirimidinas) y el dimetil fumarato, el

cual consigue reducir el nivel de citocinas proinflamatorias [119]. Finalmente, otro fármaco endovenoso aprobado por la EMA es el alemtuzumab (anti-CD52). No obstante, todos estos fármacos están pendientes de su incorporación en España.

Otras estrategias terapéuticas nuevas, la mayoría basadas en la utilización de anticuerpos monoclonales, como el daclizumab (anti-CD25), ocrelizumab y ofatumumab (ambos anti-CD20) y el fármaco oral laquinimod están actualmente en fase de ensayo clínico.

Las terapias previamente descritas están dirigidas a intervenir en la respuesta inmunológica. No obstante, es importante resaltar que la transección axonal es un evento que se encuentra de forma temprana y persistente en EM, pudiéndose observar incluso en pacientes con SNA [120]. Estas observaciones destacan la importancia de encontrar estrategias terapéuticas dirigidas a proteger los axones y las neuronas que se administren en fases tempranas de la enfermedad. Sin embargo, el efecto neuroprotector de fármacos como el fingolimod (que *in vitro* promueve la supervivencia de los oligodendrocitos y estimula la remielinización [121]) o el dimetil fumarato (que tiene efecto antioxidante) parecen estar relacionados con su efecto frenando la respuesta inmunológica y no han mostrado efecto en modelos *in vivo* de desmielinización [122,123].



### **ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL**

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes modelos animales que mimetizan algunos de los principales aspectos clínicos e histopatológicos de la EM. Estos modelos son una herramienta muy útil para el estudio de los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de la respuesta autoinmune en el SNC, así como para testar la eficacia de nuevas estrategias terapéuticas.

Los modelos animales más utilizados para el estudio de la EM se basan en la reacción autoinmune frente antígenos de la mielina y se inducen mediante inmunización con antígenos mielínicos o por transferencia de células T específicas contra antígenos de la mielina [124,125]. Estos modelos son los denominados modelos autoinmunes o encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Aunque no son tan utilizados, otros modelos animales de la EM son los modelos desmielinizantes, los cuales pueden inducirse mediante la administración de sustancias tóxicas (como la cuprizona, el bromuro de etidio o la lisolecitina) y los modelos víricos inducidos mediante la inoculación intracerebral de virus neurotrópicos (como el virus Theiler) [126].

#### **1. Inducción de la EAE**

La EAE es el resultado de la inmunización de una especie y cepa de animal susceptible con un antígeno encefalitogénico determinado. Los primeros experimentos de EAE los realizó Rivers en 1933, el cual inmunizó monos con homogeneizado de SNC de conejos [127]. Desde entonces, diferentes especies y cepas de animales (incluyendo roedores y primates) se han utilizado para generar diferentes modelos de EAE. De forma similar a la EM, la susceptibilidad de desarrollar EAE está asociada con los genes del locus del MHC [128].

En general, el procedimiento de inmunización consiste en la administración subcutánea del antígeno emulsionado con el adyuvante de Freund que contiene *Mycobacterium tuberculosis* para potenciar la respuesta inmunológica. Finalmente, también se administra toxina pertussis para aumentar la severidad y reproducibilidad de la enfermedad [129]. De forma alternativa, la EAE puede inducirse de forma pasiva mediante la transferencia de las células T reactivas de animales con EAE o clones de células T específicos frente antígenos de la mielina [130].

Los antígenos utilizados para inducir la EAE pueden ser homogeneizado de SNC, proteínas mielínicas (principalmente la MBP, la MOG y la PLP) o péptidos derivados de éstas [131]. Otras proteínas encefalitogénicas incluyen la forma lipídica de la MBP y antígenos no mielínicos como la proteína de unión a calcio derivada de astrocitos S100 $\beta$  [29,132].

### **2. Curso clínico**

Tras inmunizar a los animales, ya sea de forma activa o pasiva, se desencadena una respuesta inmunológica específica frente al antígeno mielínico que provoca la aparición de una serie de signos clínicos de parálisis que se presentan de forma ascendente. En el caso de los roedores, la parálisis comienza afectando únicamente la cola provocando paresia parcial o total de ésta (flacidez). Conforme la enfermedad avanza, la parálisis se extiende causando paraparesia o paraplejía de los miembros posteriores, pudiendo llegar hasta un grado de tetraparesia o tetraplejía que en ocasiones puede llegar a causar la muerte del animal (Fig. 9).

## Introducción

---



**Figura 9. Animales con signos clínicos de EAE.** Imágenes representativas de dos ratones C57BL/6 inmunizados con MOG<sub>35-55</sub>. Ratón con parálisis parcial de la cola (izquierda) y ratón con una afectación severa de la enfermedad mostrando parálisis total de la cola, paraplejía y debilidad en las patas delanteras (derecha).

Los signos clínicos pueden presentarse en forma remitente-recurrente, crónica progresiva o monofásica [133]. A continuación se describen los modelos más representativos de los diferentes cursos clínicos:

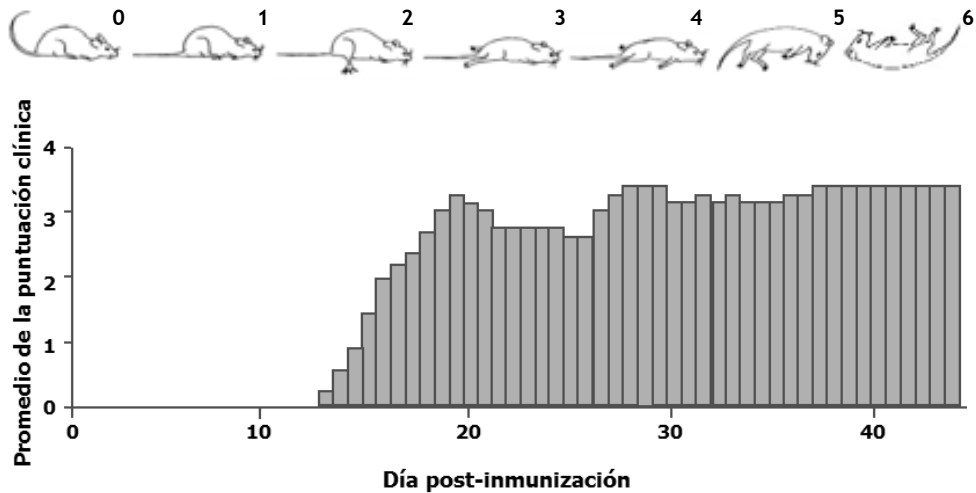
**EAE aguda:** Inmunizando ratas Lewis y Dark Agouti (DA) con la proteína MBP o péptidos encefalitogénicos derivados de ella, se desarrolla un tipo de EAE aguda o monofásica, que cursa con un único episodio clínico de enfermedad [134,135].

**EAE remitente-recurrente:** curso clínico en el cual se observan dos o más brotes clínicos. Este modelo se consigue utilizando principalmente ratones SJL inmunizados con PLP [136].

**EAE no remitente:** en la cual los animales desarrollan un curso clínico progresivo sin brotes (Fig. 10). Los animales capaces de desarrollar este curso clínico son ratas y ratones con dotación genética H-2b, generalmente C57BL/6J, inmunizados el antígeno MOG [128,137] y ratones con dotación genética H-2u inmunizados con MBP [138,139].

Actualmente, el modelo de ratones C57BL/6J inmunizados con MOG es el modelo más extensamente utilizado debido a que existen múltiples

transgénicos generados en el *background* C57BL/6. Por esta razón, éste ha sido el modelo animal utilizado en esta tesis doctoral.



**Figura 10. Patrón evolutivo de los signos neurológicos en ratones C57BL/6J inmunizados con el péptido 35-55 de la MOG.** El gráfico representa la puntuación clínica que se asigna a los diferentes grados de parálisis (mostrado en la parte superior de la figura) respecto al día después de la inmunización. La puntuación clínica va desde la ausencia de signos clínicos (puntuación= 0) pasando por la paraplejía de los miembros posteriores (puntuación= 3) hasta la muerte del ratón a causa de la enfermedad (puntuación= 6).

### 3. Histopatología

A diferencia de la EM, los modelos clásicos de EAE están caracterizados por la aparición de una parálisis ascendente debido a que la infiltración de células inflamatorias en el SNC tiene lugar predominantemente en médula espinal, mientras que es escasa en el encéfalo. De esta forma, los animales con EAE presentan infiltrados inflamatorios perivasculares formados principalmente por linfocitos T y macrófagos que han atravesado la BHE, localizándose predominantemente en la médula espinal. En las lesiones de la mayoría de los

## Introducción

---

modelos de EAE predominan las células T CD4+ asociadas con una inflamación global y relativamente poca desmielinización, en contraste con la desmielinización mediada por las células T CD8+ que tiene lugar en la EM [68]. A lo largo de los años, sin embargo, se han conseguido modelos que reproducen diferentes características patológicas de la EM tales como presencia de lesiones inflamatorias desmielinizantes focales con un grado variable de remielinización en cerebro y médula espinal [140], daño axonal y destrucción en el área de la lesión [141], además de desmielinización cortical, incluyendo desmielinización subpial extensa [142,143].

### 4. Patogenia

Los modelos EAE han permitido estudiar las respuestas inflamatorias implicadas en la patogenia de la EM. Además, la tecnología de la manipulación genética para generar animales *knockouts* o deficientes de un determinado gen y ratones transgénicos (que sobreexpresan un gen concreto) ha permitido el estudio de la función de múltiples moléculas como citocinas, quimiocinas o receptores y la función de diferentes tipos celulares en la patogenia de la EAE [144,145].

El análisis de los diferentes tipos celulares identificó las células T CD4+ productoras de IFN- $\gamma$ , las células Th1, como las responsables de la respuesta auto-reactiva en la EAE. De este modo, la transferencia adoptiva de clones de células Th1 específicas frente antígenos mielínicos da lugar al desarrollo de la enfermedad [146,147]. Los mecanismos patogénicos inducidos por el IFN- $\gamma$  incluyen la secreción de NO mediada por la activación de los macrófagos [148], la inducción de la expresión de moléculas de MHC-II, la migración de células T [149] y la destrucción de oligodendrocitos [150].

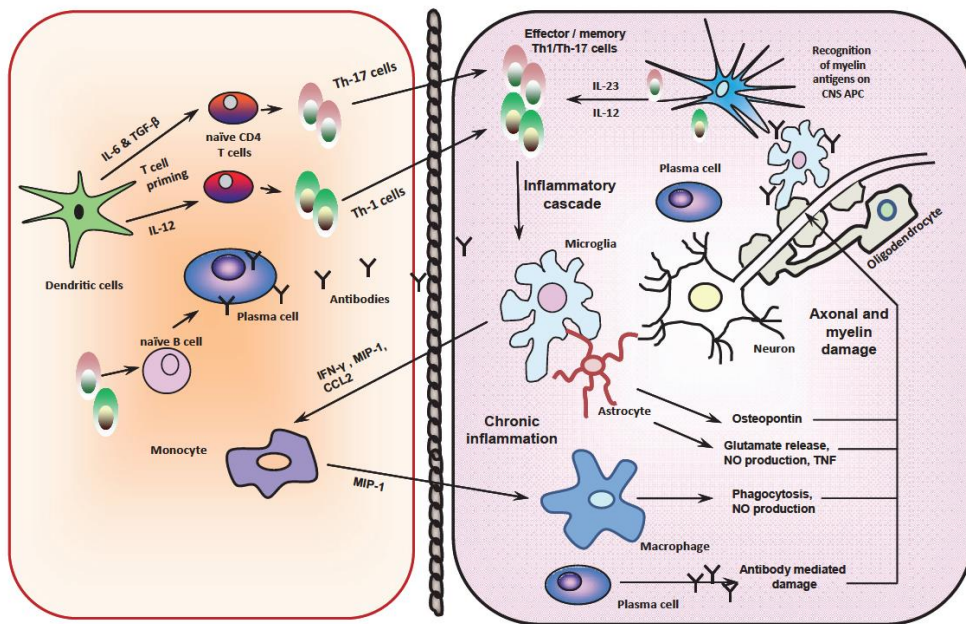
Sin embargo, al igual que pasa con la enfermedad humana, la EAE no se puede considerar una enfermedad exclusivamente Th1 (Fig. 11). De esta forma se halló que los ratones deficientes en IL12, (IL12<sup>-/-</sup>), necesaria para la generación de

células Th1 [151,152], y los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> [153] son susceptibles al desarrollo de la EAE, mientras que los ratones IL23<sup>-/-</sup>, necesaria para la generación de células Th17, presentaban una elevada resistencia a la inducción de la EAE [154]. En consecuencia, se realizaron diferentes estudios que revelaron la presencia de células productoras de IFN- $\gamma$  e IL-17 en el SNC y el LCR de pacientes con EM [59,155-157]. Sin embargo, la función de las células Th17 h aún no está clara ya que la sobreexpresión de IL17 en las células T no exacerba la EAE y la neutralización de las citocinas IL-17A e IL-17F no reduce la incidencia ni la severidad de la enfermedad [158]. Por otra parte, las células Th1 son capaces de llegar al SNC que no presenta inflamación, mientras que las células Th17 infiltran el tejido únicamente tras la llegada de las células Th1 [159]. De este modo, se ha descrito que la transferencia adoptiva de células Th17 altamente purificadas no consigue inducir la EAE si no se transfieren junto con células Th1 [159]. Por otra parte, se ha cuestionado la estabilidad del fenotipo de las células Th17 ya que éstas pueden desarrollar un fenotipo Th17/Th1, caracterizado por la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  [160,161].

Tras descartar el IFN- $\gamma$  y la IL-17 como citocinas esenciales en el desarrollo de la EAE, los estudios se han centrado en el análisis del factor estimulador de colonias de macrófagos (GM-CSF). Los ratones GM-CSF<sup>-/-</sup> han mostrado ser resistentes a la EAE [162] ya que la producción de GM-CSF por parte de las células T (Th1 o Th17) es esencial para la inducción de la EAE [163], incluso en ausencia de IFN- $\gamma$  e IL-17 [164,165]. Se ha postulado que el GM-CSF podría promover la inflamación en el SNC induciendo la movilización de monocitos y su infiltración al SNC donde se diferenciarían a DC inflamatorias y macrófagos [166]. Se ha descrito que pacientes con una EM activa presentan niveles elevados de GM-CSF en el LCR [167]. Todo ello, ha llevado al desarrollo de un anticuerpo monoclonal humanizado que neutraliza el GM-CSF (MOR103). El estudio del tratamiento con anti-GM-CSF se encuentra actualmente en estudio

## Introducción

clínico en fase I para evaluar su seguridad (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01517282>).



**Figura 11. Principales mecanismos patogénicos en la EAE.** Las células Th1, productoras de IFN- $\gamma$ , y las células Th17, productoras de IL-17, son activadas en periferia por células dendríticas. Las células Th1 y Th17 activadas son capaces de atravesar la BHE y llegar al SNC. Una vez en el SNC, las células Th1 y Th17 entran en contacto y son reactivadas por células presentadoras de antígeno cargadas con antígenos del SNC, produciendo citocinas y mediadores inflamatorios que dañan la mielina y los axones. Por otra parte, también se activa la microglía residente que produce factores que atraen más células inflamatorias al SNC y que perpetúan la cascada inflamatoria. Los anticuerpos y las células B también pueden entrar en el SNC y las células plasmáticas producen anticuerpos en el SNC. El daño mediado por anticuerpos contribuye en la desmielinización inflamatoria y la neurodegeneración.

Fuente: Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 164:1079-106. (Oct, 2011).

### PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP) son un grupo de proteínas filogenéticamente conservadas a lo largo de la evolución que se encuentran expresadas tanto en células procariotas como eucariotas. Su nomenclatura está relacionada con su peso molecular, que puede variar entre 17 KDa y más de 100 KDa, y se clasifican en 6 familias: la familia HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y la familia de las HSP pequeñas. En general, la expresión de las HSP puede ser constitutiva o inducible. En condiciones fisiológicas, las HSP actúan como chaperonas ayudando en el correcto plegamiento de las proteínas de nueva síntesis. Por otra parte, las HSP también juegan un papel importante evitando la formación de agregados proteicos, degradando proteínas inestables o mal plegadas y en el transporte de proteínas a través de diferentes compartimentos celulares [168-172]. En condiciones de estrés celular como puede ser un estrés térmico, se desencadena una respuesta que promueve la expresión de las proteínas HSP inducibles, las cuales participan de forma decisiva en la recuperación de la homeostasis y desarrollan funciones de supervivencia celular. El término de “proteínas de choque térmico, HSP” lo acuñó Ritossa [173] tras el descubrimiento de estas proteínas en respuesta a un estrés térmico en *Drosophila*. Sin embargo, otras condiciones de estrés como la privación de nutrientes, la irradiación, la hipoxia, los metales pesados, el estrés oxidativo y tóxico, las infecciones o la exposición a citocinas inflamatorias también inducen la expresión de las HSP [174-178]. Por esta razón las HSP también son conocidas como proteínas de estrés.

#### 1. Familia HSP70

La familia de la HSP70 es la familia de las HSP más conservada. Esta familia tiene diferentes miembros ubicados en diferentes localizaciones celulares: la proteína de retículo endoplasmático, Bip (Grp78); la proteína mitocondrial, mt-Hsp70



## **Introducción**

---

(Grp75); y las proteínas de expresión constitutiva, Hsc70 (Hsp73), e inducible, Hsp70 (Hsp72), las cuales pueden hallarse tanto en citoplasma como en núcleo [179-181].

De los miembros de la familia de la HSP70, la forma inducible o Hsp70 ha sido objeto de estudio debido a que tiene una doble funcionalidad dependiendo de su localización. De forma intracelular tiene funciones citoprotectoras relacionadas con sus características de chaperona, pero cuando se libera al medio extracelular puede ejercer funciones inmunomoduladoras, tanto de induciendo respuestas inmunológicas innatas y adaptativas como induciendo respuestas tolerogénicas.

## **2. Neuroprotección y Hsp70**

Las enfermedades neurodegenerativas son procesos crónicos y progresivos que, en general, se caracterizan a nivel histológico por la presencia de agregados proteicos anómalos. Por esta razón, las HSP han sido ampliamente estudiadas en la enfermedades de Alzheimer y en la enfermedad de Parkinson como estrategia terapéutica para promover la eliminación de los agregados y las proteínas mal plegadas [182,183].

En el contexto del SNC, la expresión de Hsp70 en condiciones de estrés se induce principalmente en los oligodendrocitos, la microglía y los astrocitos reactivos [184-187]. Además de su función citoprotectora, la Hsp70 también tiene una potente función antiapoptótica, ya que interviene en múltiples procesos de la cascada de señalización de muerte celular programada, tanto de la vía intrínseca como extrínseca [188-191]. En consecuencia, la sobreexpresión de Hsp70 en cultivos celulares de neuronas y en diferentes modelos animales de enfermedades neurodegenerativas ha demostrado tener un efecto beneficioso reduciendo el número y el tamaño de las inclusiones y de los agregados de las proteínas causantes de la enfermedad y con ello la severidad del fenotipo de la

misma. De este modo, se ha descrito que la sobreexpresión de Hsp70 previene la formación de agregados intracelulares de péptido amilode [192,193], de proteína tau [194], de la proteína huntingtina [195] y la formación de fibrilas de  $\alpha$ -sinucleína [196].

Los estudios de preconditionamiento en isquemia, hipertemia y excitotoxicidad han permitido estudiar la función citoprotectora de las HSP en las enfermedades neurodegenerativas [197-199]. Estos estudios consisten en provocar un estímulo subletal (preconditionamiento) tras el cual se sucede un segundo estímulo más severo que el anterior. El tratamiento preconditionador se relaciona con una disminución de la pérdida de células gliales y neuronales. Debido a que el preconditionamiento induce, principalmente, la expresión de Hsp70, los efectos neuroprotectores observados se han relacionado con la inducción de Hsp70. De forma similar, cuando se realizó un preconditionamiento térmico en ratones, antes de inducir la EAE, que conllevó una sobreexpresión de Hsp70 y, se observó que la incidencia de la enfermedad y el daño neuronal se redujeron y que los signos clínicos de la EAE fueron menos severos [200].

Sin embargo, contrariamente a lo que se conocía, además de la función citoprotectora de las HSP como proteínas intracelulares, las HSP también pueden liberarse al medio extracelular, donde desencadenarían una variedad de efectos. En el SNC, las células gliales producen y liberan HSP, entre ellas la Hsc70 y la Hsp70, las cuales son rápidamente captadas por las neuronas. Debido a que, tras condiciones de estrés, las neuronas expresan altos niveles de Hsc70 pero escasa Hsp70 [201], se ha propuesto la transferencia de Hsp70 glía-axón como un mecanismo neuroprotector compensatorio por parte de las células gliales para proteger a las neuronas adyacentes frente a un estrés o daño agudo [202-205].

## **Introducción**

---

En consecuencia, podría pensarse que el aporte exógeno de Hsp70 en el SNC podría ser una estrategia terapéutica prometedora para reducir la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas.

### **2.1 Función neuroprotectora de la Hsp70 en la EM**

En la EM, la respuesta inmunológica que tiene lugar en el SNC genera un ambiente inflamatorio y oxidativo que induce la sobreexpresión de la mayoría de HSP (incluyendo la Hsp70) en las lesiones de SNC de los pacientes con EM y en la EAE [206-209]. Como se ha descrito que la Hsp70 ejerce una función neuroprotectora en la muerte celular inducida por isquemia [210,211], la sobreexpresión de esta proteína en las lesiones de los pacientes con EM podría proteger las células del SNC frente al ambiente inflamatorio característico de la enfermedad [207,212-214]. En este sentido, De Souza y colaboradores describieron que la estimulación de células gliales humanas con citocinas proinflamatorias como la IL-1, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , induce la expresión de Hsp70, predominantemente en oligodendrocitos [215]. Todos estos datos sugieren que la fase inflamatoria que tiene lugar en las fases iniciales de la EM/EAE actúa a modo de estímulo preconditionador estimulando la producción de Hsp70, al mismo tiempo que las células gliales liberan Hsp70 para proteger las neuronas de la fase neurodegenerativa posterior. Por lo tanto, un fallo en la inducción de la Hsp70 o una producción insuficiente de HSP en el SNC sería un posible factor determinante para el desarrollo y la progresión de la EM.

Los hallazgos a lo largo de los años han demostrado claramente la función citoprotectora tanto intra- como extracelular de las HSP en el SNC. Como resultado, se han diseñado diferentes estrategias terapéuticas dirigidas a inducir la expresión de las HSP en enfermedades neurológicas caracterizadas por la presencia de agregados de proteínas mal plegadas [182,183]. No obstante, la EM no acaba de encajar en este tipo de neuropatologías. En el caso de la EM se

considera que la respuesta inmunológica que tiene lugar es la responsable de inducir un proceso neurodegenerativo que provoca los síntomas clínicos. En este contexto, las HSP extracelulares, concretamente Hsp70, podría en realidad ser más perjudicial que beneficiosa. Mientras que la liberación de Hsp70 en enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson daría lugar a una reducción de proteínas mal plegadas, en EM la Hsp70 podría exacerbar la respuesta inmunológica actuando como adyuvante en la presentación de péptidos mielínicos y actuando como citocina proinflamatoria [216]. El mecanismo por el cual Hsp70 podría participar en la inducción de la respuesta inmune se describe más adelante.

### **3. Inmunomodulación y Hsp70**

Las HSP tienen funciones inmunomoduladoras ya que pueden inducir respuestas inmunes actuando como una citocina proinflamatoria pero también mediar respuestas inmunes reguladoras. Entender los mecanismos mediados por las HSP en relación con el balance entre autoinmunidad y tolerancia es esencial para el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas para las enfermedades autoinmunes y el cáncer.

#### **3.1 Mimetismo molecular**

Las HSP son proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución. En concreto, la Hsp70 muestra un 60-78% de homología entre las células eucariotas y hay una homología del 40-60% entre la Hsp70 eucariota y la DnaK de *E. coli* [176,217]. Las HSP son los antígenos inmunodominantes de muchas bacterias. De todas ellas, la Hsp60 y Hsp70 son las más inmunogénicas, considerándose antígenos peligrosos capaces de unir infección y autoinmunidad. Las células T y los anticuerpos generados frente a HSP microbianas pueden atacar las HSP propias mediante el reconocimiento de epítomos conservados o vía reactividad cruzada (mimetismo molecular),

## **Introducción**

---

provocando inflamación tisular [218,219]. La respuesta inducida por mimetismo molecular entre la Hsp60 y la Hsp70 bacterianas y de mamíferos se ha relacionado con la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluyendo la diabetes tipo 1 [220], la aterosclerosis [221], la artritis reumatoide [222] y la EM [223-226], hallándose niveles elevados de HSP extracelular y de auto-anticuerpos anti-HSP en pacientes con estas enfermedades. Sin embargo, en contra de lo que cabría esperar, en algunos estudios que han utilizado modelos animales de artritis reumatoide [227,228], de diabetes tipo 1 y de EM [229,230] al igual que en algunos ensayos clínicos en humanos [231], la preinmunización con la gp96, Hsp60 o Hsp70 bacteriana suprime la inducción de la enfermedad inflamatoria. Un estudio realizado por Wieten y colaboradores demostró que la propagación de la capacidad reguladora mediada por la Hsp70 microbiana en el modelo de artritis reumatoide inducida con proteoglicano (PGIA), un modelo murino de artritis crónica remitente mediado por células T, es dependiente de la producción de IL-10 y de las células Treg que reconocen (por reactividad cruzada) HSP propias [232]. El elevado grado de similitud filogenética entre la Hsp60 y la Hsp70 al igual que la presencia de la Hsp60 y la Hsp70 en la circulación periférica de individuos sanos [233,234] indicaría que las respuestas inmunes de las HSP deben estar altamente controladas y reguladas. Sin embargo, el repertorio de células T en el adulto incluye células T reactivas frente a HSP propias, las cuales han escapado de la tolerancia central y, por lo tanto, viajan por la periferia donde se cree que juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica [235,236].

### **3.2 Respuesta celular**

Para iniciar una respuesta de células T es necesaria la activación y la coestimulación que aportan las células presentadoras de antígeno profesionales (APC), principalmente las células dendríticas, pero también los monocitos y las

células B activadas. Dependiendo de las señales presentes durante la interacción célula T:APC se inducirá una respuesta inmune (inflamatoria) o tolerogénica. En la literatura se han descrito dos tipos de interacción entre las APC y las HSP que inducen una respuesta inmune innata o adaptativa dependiendo de la presencia o ausencia de antígeno unido [237-239]. Los estudios *in vitro* han mostrado que las HSP, incluida la Hsp70, Hsp90, gp96 (Hsp90 de retículo endoplasmático) y la calreticulina, son liberadas por células necróticas (y no por células apoptóticas) tras un trauma o un estrés agudo, y estas HSP liberadas actúan como señal de peligro, promoviendo la maduración de las DC y ejerciendo funciones inmunoestimuladoras [240]. Además, algunos estudios han demostrado que la Hsp70 también puede ser liberada por células gliales y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en situaciones de estrés psicológico o tras el ejercicio físico [241-243]. En este sentido, Busero y colaboradores demostraron que el ambiente proinflamatorio mediado por IFN- $\gamma$ , pero no por la citocina antiinflamatoria TGF- $\beta$ , induce la liberación activa de Hsp70 [244].

A diferencia de las funciones citoprotectoras u homeostáticas mediadas por la Hsp70 intracelular, la Hsp70 extracelular induce tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa. En la respuesta inmune innata, las HPS extracelulares, incluyendo Hsp60, Hsp70 y gp96, provenientes de los patógenos o de las células huésped, ejercen una función de "citocina" en la maduración de las APC. En el caso de Hsp70, la respuesta inmune innata se induce a través de la interacción con receptores *toll-like* (TLR)2, TLR4 y la molécula de coestimulación CD14 [245]. Además, de en la activación y en la maduración de las DC, la Hsp70 actúa como quimioatrayente y desencadena los efectos citolíticos de las células NK mediante la interacción con CD94 [246-248]. Al mismo tiempo, la liberación de Hsp70 provoca la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual induce la producción de citocinas proinflamatorias (IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y GM-CSF)

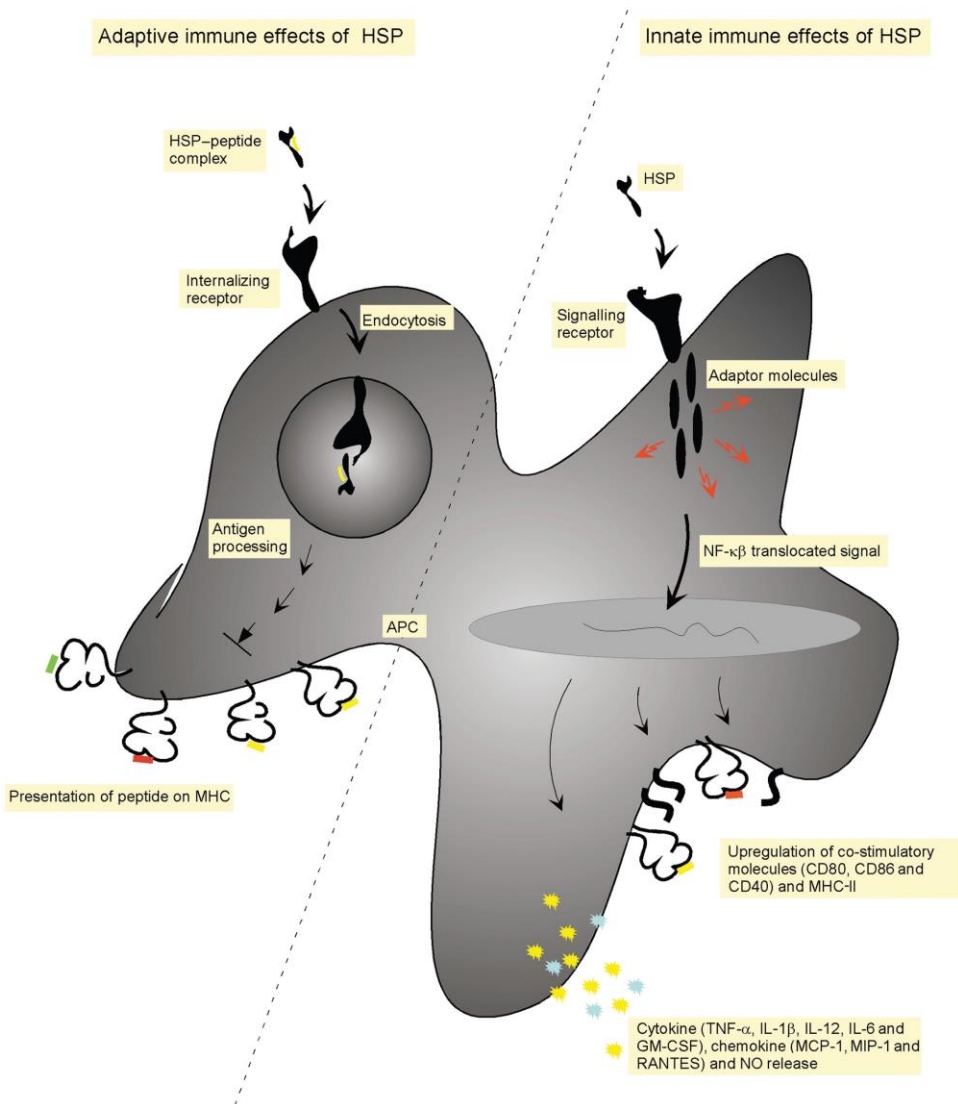
## Introducción

---

[240,249,250], la secreción de quimiocinas, (MCP-1, RANTES y MIP-1 $\alpha$ ) [251] y la producción de NO [252] por los macrófagos y/o DC. Finalmente, la Hsp70 extracelular aumenta la expresión de CD83, CD86, CD40 y MHC-II en las DC y la migración de estas células al nódulo linfático [240,253,254], favoreciendo la inducción la respuesta inmunológica (Fig. 12). Teniendo en cuenta estos hallazgos, se podría pensar que en condiciones de estrés agudo la liberación de Hsp70 actuaría como señal de peligro para preparar el sistema inmune frente a un probable agente patológico.

Por otra parte, debido a su función chaperona, las HSP liberadas al medio extracelular pueden actuar como adyuvantes y unir péptidos inmunogénicos. En la respuesta inmune adaptativa, los complejos HSP-antígeno son eficientemente internalizados vía endocitosis mediada por CD40, CD91 (receptor de la macroglobulina  $\alpha 2$ ) o por los receptores *scavenger* LOX-1. Una vez en el interior de la célula, los complejos son procesados en el citosol de forma dependiente de proteosoma y son presentados vía MHC-I o MHC-II, las cuales inducirán la activación de células T CD8+ y T CD4+, respectivamente [255-257] (Fig. 12). La capacidad de los complejos HSP-antígeno para inducir la respuesta inmune adaptativa ha sido utilizada en la generación de vacunas en las cuales se ha añadido la Hsp70 como adyuvante para potenciar la inmunogenicidad de los antígenos tumorales [258,259].

El término de “chaperoquina” fue acuñado por Asea para describir la función dual de las HSP como chaperonas y citocinas. Sin embargo, se ha cuestionado la función citocina de las HSP, incluyendo la Hsp70, por el hecho de que los estudios utilizan HSP recombinantes, las cuales contienen trazas de endotoxinas (LPS o compuestos microbianos) que pueden producir el efecto de citocina que se les atribuye a las HSP [260,261]. A pesar de que no se puede excluir esta posibilidad, los resultados de estudios realizados con HSP altamente purificadas muestran que éstas activan las DC y los monocitos *in vitro* [252].



**Figura 12. Inducción de respuesta inmune innata y adaptativa por las HSP.** La interacción de las HSP con receptores de las APC da lugar a la inducción de dos tipos de respuesta. Una respuesta adaptativa, en la que los péptidos unidos a HSP son internalizados por receptores endocíticos. En el citosol, los péptidos son procesados y presentados por moléculas de MHC. También se puede inducir una respuesta innata en la cual las HSP se unen a receptores que desencadenan una cascada de señalización que activa el factor de transcripción NF-κB, resultando en la liberación de citocinas, quimiocinas, NO y la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras y de MHC-II.  
Fuente: Blinder RJ, Vatner R, Srivastava P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 2004; 64: 442–451.



## Introducción

---

En el contexto de la EM, se ha hallado una sobreexpresión significativa de Hsp70 en las lesiones de los pacientes con EM [207,208,212]. En ese sentido, Cwiklinska y colaboradores detectaron la presencia de complejos Hsp70-MBP y Hsp70-PLP en el tejido cerebral de los pacientes con EM. Como se ha comentado, la MBP y la PLP son posibles auto-antígenos en EM. La Hsp70 se une a los péptidos de MBP y PLP generando complejos altamente inmunogénicos, los cuales son procesados por las APC y presentados vía MHC-II, estimulando la respuesta mediada por células T CD4+ en animales con EAE [262-264]. Galazka y colaboradores describieron que los ratones SJL y C57BL/6 inmunizados con los péptidos PLP<sub>139-151</sub> y MOG<sub>35-55</sub> y, respectivamente, presentaban complejos de Hsp70 unida a péptidos del SNC generados durante la fase inflamatoria de la enfermedad. La pre-inmunización de los ratones con estos complejos antes de inducir la enfermedad generaba una respuesta tolerogénica mediada por células NK en ratones SJL pero no en ratones C57BL/6. La razón podría ser que los complejos de péptidos y Hsp70 inducen la sobreexpresión de la molécula H60, un ligando del receptor activador de células NK NKG2D. Sin embargo, en el caso de los esplenocitos de los ratones C57BL/6 los niveles de H60 no aumentaron [265,266]. Un estudio reciente de estos autores ha logrado identificar el péptido 38-57 de la *histidine triad nucleotide-binding protein-1* (HINT<sub>138-57</sub>) como el péptido que, unido a Hsp70, es el responsable de inducir la expresión de H60 en las células NK y, por consiguiente, inducir una respuesta inmunoreguladora [267].

Por otra parte, un estudio de Mycko y colaboradores mostró que los ratones C57BL/6 deficientes en Hsp70 (Hsp70 KO) presentaban una forma moderada de EAE caracterizada por un episodio agudo inicial seguido de una remisión completa de la enfermedad. Este efecto se relacionó con una baja capacidad proliferativa de los linfocitos T CD4+ estimulados con MOG [268]. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de Hsp70 en un contexto genético y ambiental

propicios podría aumentar la susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes desmielinizantes.

También se ha descrito que hay una subpoblación de linfocitos T  $\gamma\delta$  expandidos de forma clonal que responden frente a Hsp70 en las lesiones de los pacientes con EMRR [269]. Las células T  $\gamma\delta$  poseen una potente actividad citotóxica capaz de matar oligodendrocitos *in vitro* [270]. Además, las células T  $\gamma\delta$  al igual que las células T CD4+ y las células NK producen grandes cantidades de IL-17 [271], la cual está involucrada en la patogenia de la EM y de la EAE, al igual que en la de otras enfermedades autoinmunes [272,273].

Todas estas evidencias parecen indicar que una expresión aberrante o desregulada de Hsp70 podría estar implicada en la patogenia de la EM y en otras enfermedades inflamatorias crónicas mediante dos mecanismos: exacerbando o contribuyendo al ambiente inflamatorio crónico y/o induciendo la presentación de auto-antígenos mielínicos generados a causa del daño tisular y la muerte celular. Estas hipótesis están apoyadas por un estudio reciente que ha hallado una sobreexpresión aberrante de Hsp70 tras un estímulo térmico o inflamatorio en las PBMC de los pacientes con EM [274].

### 3.3 Respuesta humoral

Diferentes estudios han demostrado un aumento de los niveles de la Hsp60 y de la Hsp70 en sangre en la hipertensión, la arterosclerosis y la enfermedad vascular renal y periférica [275-277]. Además de la función “citocina”, la Hsp70 extracelular y la Hsp70 de membrana puede ser una diana de los anticuerpos. El hecho de haberse encontrado Hsp70 soluble y anticuerpos anti-Hsp70 [234] en la circulación periférica de CS, sugiere que estos anticuerpos anti-HSP podrían tener una función inmunoreguladora con el objetivo de eliminar el exceso de Hsp70 extracelular tras la resolución de una situación de estrés. La presencia de anticuerpos anti-Hsp70 en el LCR y el suero de pacientes con EM se describió

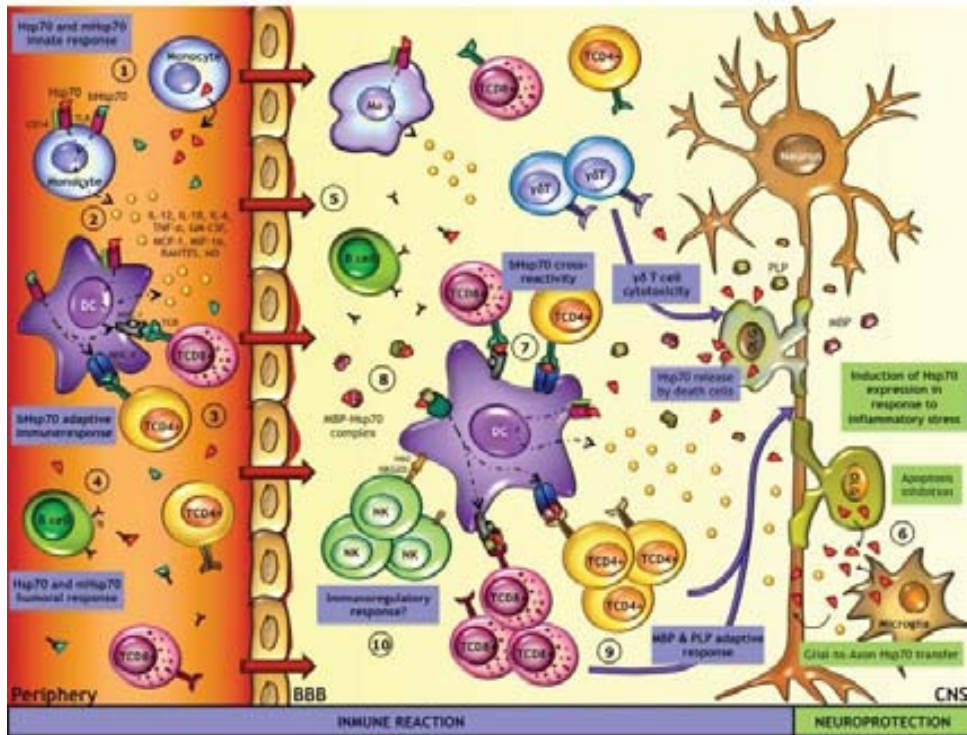
## **Introducción**

---

por primera vez por Birnbaum and Kotilinek in 1993 [278]. Posteriormente, en 2008, un estudio que utilizó un *microarray* proteico con antígenos del SNC relacionados con EM y otras enfermedades neurológicas detectó un aumento específico de anticuerpos anti-HSP (mayoritariamente Hsp60 y Hsp70) en el suero de pacientes con EMRR comparado tanto con CS como con pacientes con formas progresivas de la enfermedad [31,279]. Además, Chiba y colaboradores hallaron niveles elevados de auto-anticuerpos IgG específicos de Hsp70 en el LCR de pacientes con EM en comparación con pacientes con enfermedades neuronales motoras [226]. No se hallaron diferencias en los niveles de anticuerpos frente a Hsp27, Hsp60 o Hsp90 entre estos grupos de pacientes. Sin embargo, a pesar de los estudios realizados [280], la función de estos anticuerpos anti-Hsp70 en los pacientes con EM aún no se conoce.

### **4. Funciones de Hsp70 en la patogenia de la EM**

Las funciones pleiotrópicas de Hsp70 junto con la compleja patogenia de la EM dificultan el saber concretamente qué funciones desarrolla la Hsp70 en la enfermedad. En la figura 13 se resumen los posibles mecanismos en los cuales podría estar participando la Hsp70 en la patogenia de la EM [281].



**Figura 13. Posibles funciones de Hsp70 en la patogénesis de la EM.** A raíz del estrés generado por una infección, tiene lugar una inducción de la expresión de Hsp70 y ésta es liberada por las células mononucleares a nivel periférico (1). Actuando como señal de peligro, la Hsp70 endógena y la bacteriana (bHsp70) podrían unirse a los receptores de membrana CD14, TLR2 y TLR4 provocando la liberación de citocinas (IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y GM-CSF), quimiocinas (MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y RANTES) y NO por células dendríticas y/o monocitos (2). Por otra parte, la bHsp70 es procesada intracelularmente y es presentada por moléculas de MHC-I y MHC-II en las APC, dando lugar a la generación de células T CD8+ y CD4+ específicos de bHsp70 (3) y la producción de anticuerpos anti-bHsp70 por parte de linfocitos B (4). A pesar de la presencia de la BHE, los leucocitos logran llegar al SNC (5). En el SNC, el ambiente inflamatorio induce la expresión de Hsp70 por las células del SNC (6). Debido a la elevada homología entre la Hsp70 bacteriana y la eucariota, los linfocitos específicos de bHsp70 reaccionan de forma cruzada frente a la Hsp70 liberada, provocando una respuesta (auto)inmune frente a la Hsp70 propia (7). Además, los péptidos mielínicos de proteínas como la PLP o la MBP, generados durante la destrucción de la mielina, se unen a la Hsp70 debido a sus propiedades como chaperona. Los complejos Hsp70-PLP y Hsp70-MBP son reconocidos por las APC (8), desencadenando una respuesta inmune adaptativa frente a los péptidos de PLP y MBP (9). Finalmente, la Hsp70 también podría ejercer una función

## Introducción

---

inmunoreguladora mediada por células NK (10), aunque los mecanismos aún no son claros.

Fuente: Mansilla MJ, Montalban X, Espejo C. Heat shock protein 70: roles in multiple sclerosis. Mol Med. 2012.

## 5. Estudios genéticos

Ya se ha comentado que los factores genéticos contribuyen en el desarrollo de la EM. El locus del MHC-II, en particular el alelo *HLA-DRB1\*1501*, es el locus que presenta mayor asociación con la susceptibilidad a la EM [282]. Curiosamente, los tres genes codificantes de Hsp70 (*HSPA1A*, *HSPA1B* y *HSP-HOM*) están localizados en el locus del MHC, concretamente en el *cluster* del MHC de clase III, próximo a la región del MHC-II [283]. De forma similar a lo que ocurre en los humanos, los genes de Hsp70 en otras especies, incluyendo la cabra, el ratón y la rata también están localizados en la región del MHC [284], sugiriendo una posible relación entre la Hsp70 y la respuesta alterada que tiene lugar en la EM.

El análisis de los genes de Hsp70 reveló un elevado grado de conservación filogenética. Por ejemplo, *HSPA1A* y *HSPA1B* son idénticos en un 99% [285]. De forma similar, el polimorfismo de los genes de Hsp70 es bajo; y en consecuencia, los polimorfismos hallados en las regiones codificantes dan lugar a mutaciones silenciosas [284], sugiriendo que la Hsp70 tiene una función esencial en la fisiología celular y el mantenimiento de la homeostasis en condiciones de estrés. Se ha estudiado la relación entre diferentes polimorfismos de los genes de Hsp70 y la EM y no se ha hallado una relación entre el efecto en la susceptibilidad/protección frente a la EM o una asociación con datos clínicos para las diferentes poblaciones de pacientes estudiadas [286-288]. Sin embargo, se han encontrado diferencias contradictorias en los estudios de expresión génica entre pacientes con EM y CS. Mientras que los primeros estudios mostraron una sobreexpresión de *HSPA1A* en las lesiones de los pacientes con EM [208,209,212], posteriormente se describió una

disminución de la expresión génica de *HSPA1A* en PBMC de pacientes con EM respecto a los CS [289-291]. Los estudios histológicos en pacientes con EM y en la EAE han confirmado la sobreexpresión de *HSPA1A* en las lesiones en el SNC; sin embargo, sorprendentemente, el análisis proteico de la expresión basal de Hsp70 en PBMC no relevó diferencias entre los pacientes con EM y los CS. Sin embargo, se encontró una sobreexpresión proteica aberrante de Hsp70 en las PBMC de los pacientes con EM tras un estímulo inflamatorio o un estrés térmico [274]. Estos hallazgos sugieren que la función de Hsp70 podría depender del contexto, y por lo tanto, en el SNC la Hsp70 podría tener una función neuroprotectora mientras que en las PBMC ésta podría ser proinflamatoria. Por ello, son necesarios más estudios para determinar cómo estas funciones están interconectadas en la EM.

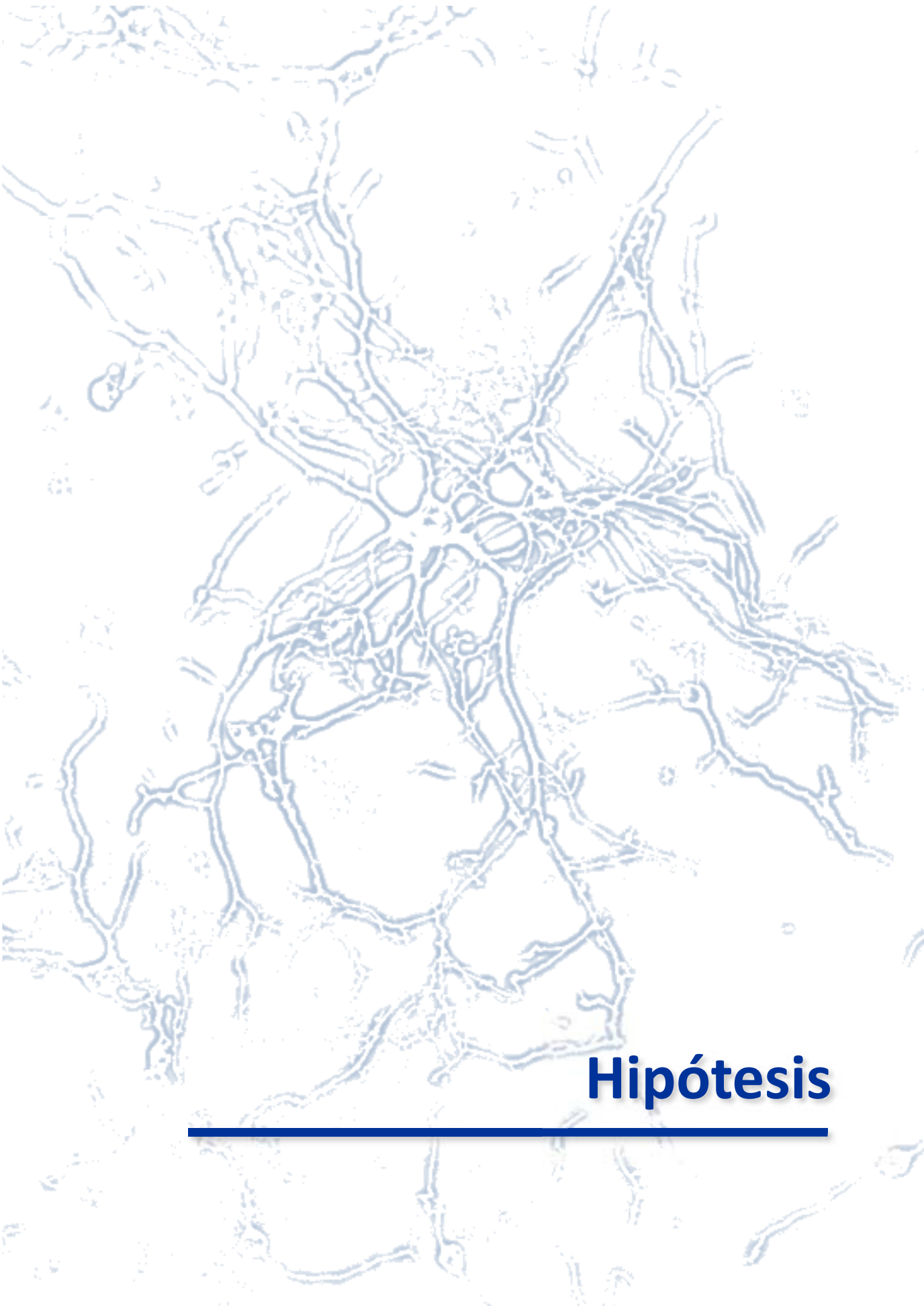
### **6. Potencial terapéutico de las HSP**

El efecto beneficioso de la sobreexpresión de Hsp70 reduciendo las inclusiones o los agregados proteicos, sugiere que la inducción de Hsp70 mediante fármacos sería una estrategia terapéutica prometedora y factible para el tratamiento de diferentes enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer. En este sentido, se han descrito diferentes componentes que inducen la expresión de las HSP. Los inhibidores de la Hsp90, como por ejemplo la geldamicina, provocan la liberación del factor de choque térmico 1 (*heat shock factor*, HSF1), el cual induce la expresión de la Hsp70 y de otras chaperonas. En la EAE, la inducción de la expresión de la Hsp70 por la administración de geldamicina suprime la respuesta inflamatoria glial y mejora la enfermedad [292]. El arimoclomol, una droga experimental que actúa como co-inductor de las HSP mediante la estabilización de la forma activa de HSF1, está en ensayo clínico de fase II para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica [293-295]. Esta droga ha demostrado prolongar la vida media de la enzima superóxido dismutasa 1 en ratones incluso cuando el tratamiento se

## Introducción

---

había iniciado tras el inicio de la enfermedad [296,297]. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), como por ejemplo el ácido salicílico, activan de forma directa el HSF1 [298]. Además, los NSAID son especialmente interesantes por su doble función citoprotectora (induciendo la expresión de HSP) y sus funciones antiinflamatorias [299]. El principal problema asociado con el tratamiento con NSAID es que se requiere una elevada concentración para lograr niveles terapéuticos en el SNC debido a su baja capacidad para atravesar la BHE [300]. Finalmente, el celastrol y el triptolide son sustancias derivadas de plantas medicinales que han sido utilizadas durante siglos en la medicina tradicional para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. El efecto terapéutico de estos componentes se ha relacionado con la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B mediada por la sobreexpresión de la Hsp70. La administración profiláctica o terapéutica de triptolide ha mostrado ser un potente supresor de la EAE mediante la inducción de la expresión de la Hsp70, la cual a su vez bloquea la activación de NF- $\kappa$ B, lo que atenúa la respuesta proinflamatoria [301-303]. Por otra parte, el triptolide a elevadas concentraciones también ejerce un efecto antiproliferativo, promoviendo la apoptosis mediada por la reducción de la expresión de la Hsp70 [304,305]. Sin embargo, la toxicidad y la insolubilidad del triptolide en agua reducen la viabilidad de esta droga en la práctica clínica. Se han diseñado derivados del triptolide y actualmente están siendo testados como tratamientos para el cáncer [306].



**Hipótesis**

---



## HIPÓTESIS

En la literatura, los datos de expresión génica de Hsp70 procedentes de estudios de *microarrays* son contradictorios. Mientras que en las lesiones de EM y de EAE se ha descrito un aumento de la expresión de Hsp70, que se ha confirmado a nivel proteico mediante estudios histopatológicos, en el sistema inmune se ha hallado una disminución de la expresión génica de Hsp70 en las PBMC de pacientes con EM. Se ha descrito que la Hsp70 puede ejercer funciones diferentes dependiendo de su localización, ejerciendo funciones citoprotectoras cuando se localiza a nivel intracelular o promoviendo la respuesta inmune cuando es liberada al medio extracelular.

Estos datos nos hicieron plantearnos la hipótesis de que **la Hsp70 en la EM puede tener funciones citoprotectoras en células del SNC (neuronas y oligodendrocitos) pero también puede actuar a nivel periférico promoviendo la respuesta autoinmune.**

Por lo que consideramos relevante caracterizar la función de esta proteína en la patogenia de la EM así como valorar su potencial como diana terapéutica.



# Objetivos

---

# OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es el estudio de la función de la Hsp70 en la patogenia de la EM.

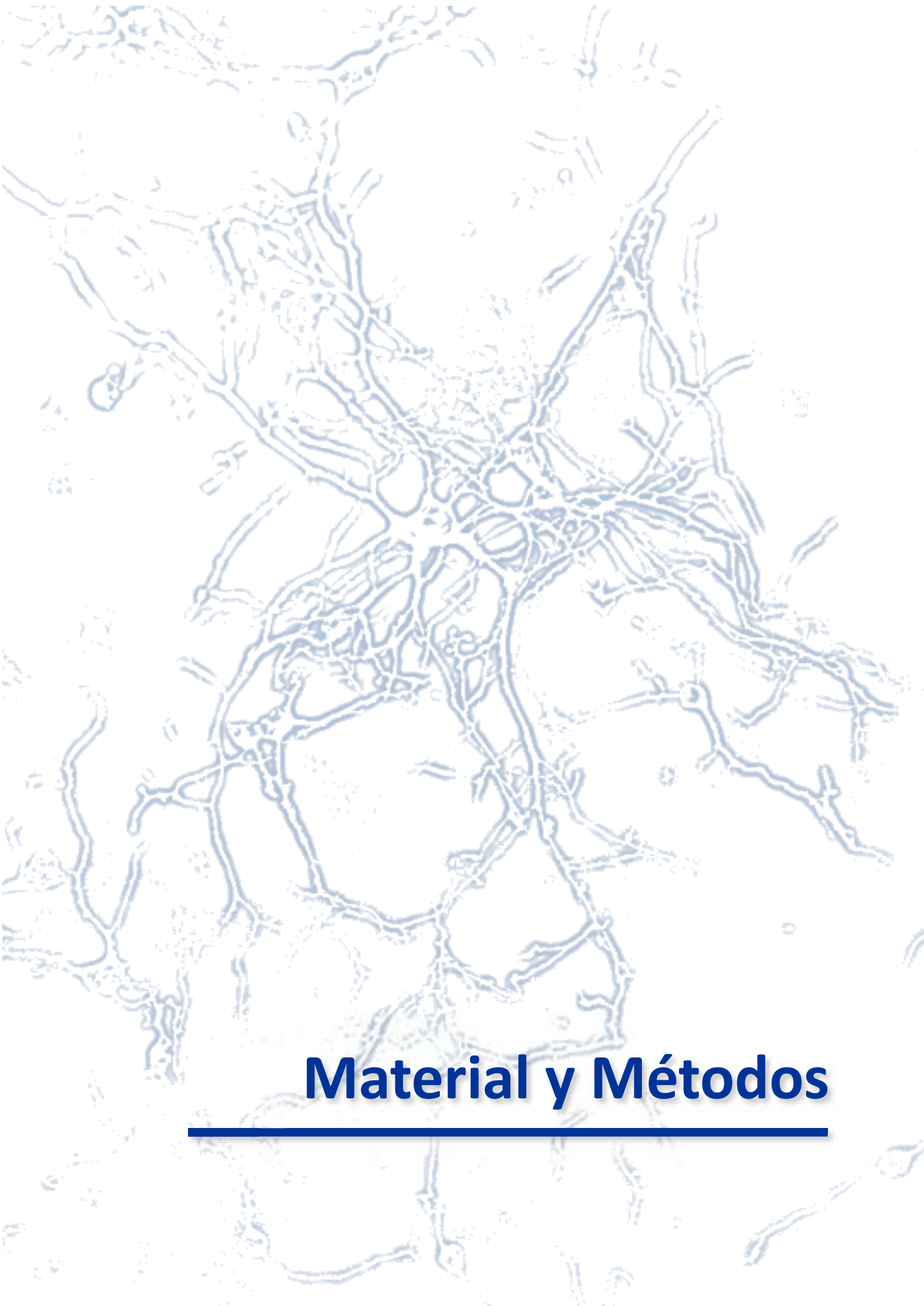
Con este fin, los objetivos concretos que nos propusimos fueron los siguientes:

## **1. Comparar de la expresión de Hsp70 entre pacientes con EM y CS:**

- 1.1. Determinar la expresión génica de Hsp70 en PBMC a nivel basal.
- 1.2. Estudiar el efecto de la criopreservación en la expresión génica de Hsp70 en PBMC.
- 1.3. Cuantificar la expresión protéica de Hsp70 en linfocitos T CD4+ y CD8+ y en monocitos a nivel basal.
- 1.4. Estudiar la inducción de la expresión protéica de Hsp70 en linfocitos T CD4+, T CD8+ y en monocitos tras un estímulo térmico o un estímulo inflamatorio.

## **2. Estudiar de la función de la Hsp70 en la patogenia de la EM:**

- 2.1. Determinar el efecto de la inhibición de la expresión de Hsp70 en un modelo animal de EM, la EAE.
  - 2.1.1. Análisis de las características clínicas e histopatológicas.
  - 2.1.2. Estudios inmunológicos (ensayos de proliferación celular y detección del perfil de secreción de citocinas).
- 2.2. Estudiar de la función citoprotectora de la Hsp70 en un modelo *in vitro* de neuroinflamación.



# **Material y Métodos**

---

## **PARTE I. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE Hsp70 EN PACIENTES CON EM Y CONTROLES SANOS**

### **1. Pacientes y CS**

Se incluyeron pacientes con SNA o EMRR que, no estando en fase de brote clínico, fuesen a recibir, por primera vez, tratamiento específico para la EM (IFN- $\beta$  o Copaxone), es decir, pacientes con actividad clínica. No se incluyeron en el estudio pacientes que en el mes previo a la extracción de sangre hubiesen recibido corticosteroides. También se incluyó un grupo de CS pareados por edad y sexo con los pacientes de EM. Las características clínicas y demográficas de los pacientes con EM y de los CS incluidos en el estudio se detallan en la Tabla 1.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, España). Todos los pacientes y los CS incluidos en el estudio firmaron el correspondiente consentimiento informado del mismo.

### **2. Obtención de PBMC**

Se realizó una extracción de 32ml de sangre periférica en cuatro tubos con citrato sódico y ficoll incorporado (8ml de sangre por tubo) (BD Vacutainer® CPT™). Los tubos se centrifugaron durante 25min. a 1500G a 19°C. Utilizando una pipeta pasteur estéril, se recogió la banda de las PBMC separadas gracias a la diferencia de densidad. Se realizaron 2 lavados de las PBMC utilizando una solución tamponada de fosfatos (PBS) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado (ambos de Gibco BRL, Paisley, UK) y centrifugando 10min. a 350G Finalmente, las PBMC obtenidas se resuspendieron en 1ml de RPMI 1640 suplementado con 10% FBS inactivado, 2mM de glutamina, 25mM de HEPES, 50U/ml de penicilina y 50mg/ml de estreptomicina (RPMI completo), todos obtenidos de Gibco BRL (Paisley, UK).

**Tabla 1.** Características demográficas y clínicas de los pacientes con EM y los CS.

		EXPRESIÓN GÉNICA <i>HSPA1A</i>		EXPRESIÓN PROTÉICA HSP70-1A/B	
		PBMC FRESCAS	PBMC CONGELADAS	PBMC NO ESTIMULADAS	PBMC ESTIMULADAS
<b>N</b>	EM	30	9	32	14
	CS	30	10	30	14
<b>Edad</b>	EM	35,7±9,0	37±10,9	34,3±9,1	34,1±9,4
	CS	33,9±8,3	30,3±6,2	31,2±7,6	30,9±6,5
<b>Ratio ♂/♀ (% mujeres)</b>	EM	13/17 (56,7%)	4/5±55,6%	11/21 (65,6%)	4/10 (71,4%)
	CS	11/19 (63,3%)	3/7±70,0%	9/21 (70,0%)	3/11 (78,6%)
<b>EDSS</b>	EM	1,7±0,7	1,9±0,9	1,8±0,9	1,8±0,6
<b>Tiempo de evolución de la enfermedad (años)</b>	EM	4,2±4,9	3,4±4,1	3,5±4,4	4,8±5,5
<b>Nº lesiones captantes de gadolinio</b>	EM	1,5±3,1	0,4±1,1	3,3±6,5	4,6±7,0
<b>Forma clínica</b>	EM	27 EMRR / 3 SNA	8 EMRR / 1 SNA	23 EMRR / 9 SNA	10 EMRR / 4 SNA

SNA: síndrome neurológico aislado; CS: control sano; EDSS: Escala de discapacidad ampliada de Kurtzke; EM: esclerosis múltiple; EMRR: EM remitente recurrente; PBMC: células mononucleares de sangre periférica. Datos expresados como media (desviación estándar [DE]).

Una vez se contaron las PBMC obtenidas utilizando un contador hematológico Coulter® Act Diff™ (Beckman Coulter, Inc. L'Hospitalet de Llobregat, ES), se separaron  $5 \times 10^6$  células para realizar el análisis de la expresión génica y/o  $1 \times 10^7$  células para el análisis de expresión proteica.

De un subgrupo de pacientes con EM y CS se criopreservaron PBMC ( $\geq 5 \times 10^6$  células/vial). Para ello, las PBMC se diluyeron en RPMI completo para obtener una concentración de como mínimo  $1 \times 10^7$  PBMC/ml y se alicuotaron  $5 \times 10^6$  PBMC (500 $\mu$ l) en criotubos previamente refrigerados y depositados en hielo. A continuación se añadió gota a gota el mismo volumen, 500 $\mu$ l, de medio de congelación frío (RPMI con 20% de dimetilsulfóxido, DMSO). Los viales se transfirieron rápidamente a un congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  y se dejaron durante 24h. para permitir la realización de la rampa de temperatura. Finalmente, los viales se trasladaron a un contenedor de nitrógeno líquido donde se mantuvieron guardadas hasta el momento de su utilización.

Para la descongelación de las PBMC criopreservadas, se extrajeron los criotubos del tanque de nitrógeno líquido y se depositaron en hielo seco o nieve carbónica. En la sala de cultivos, los viales se sumergieron en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y se fueron agitando suavemente hasta observar la formación del menisco por el inicio del proceso de descongelación. Rápidamente, se añadió 1ml de medio RPMI completo precalentado a  $37^{\circ}\text{C}$  y rápidamente se transfirió todo el contenido a un tubo con 10ml de RPMI completo a precalentado a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación, las células se centrifugaron 10min. a 350G a temperatura ambiente (TA) y el pellet de células se resuspendió en 1ml de RPMI completo. Finalmente, se contó el número de PBMC obtenidas utilizando el contador hematológico y se cogió el volumen necesario para obtener  $5 \times 10^6$  PBMC o todo el volumen en caso de no llegar a dicha cantidad.

## Material y Métodos

---

### 3. Expresión genética de Hsp70

La expresión génica de Hsp70 (gen *HSPA1A*) se determinó en muestras de PBMC frescas de 30 pacientes con EM y 30 CS, así como en un subgrupo de muestras de PBMC criopreservadas de 9 pacientes con EM y 10 CS.

#### 3.1. Extracción de RNA total

##### **PBMC frescas**

A partir de  $5 \times 10^6$  PBMC se procedió a la extracción del RNA total mediante el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Tras la centrifugación de las PBMC, se aspiró con cuidado el máximo de sobrenadante y se realizó el paso de lisis celular. Se añadieron 350 $\mu$ l de buffer RLT conteniendo 3,5 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA) y se agitó la muestra durante 1min. en el vórtex.
- Se transfirió todo el contenido del tubo a una columna QIAshredder spin column (Qiagen) y se centrifugó 2min. a 16100G. El filtrado obtenido es el denominado homogenado que contiene tanto las proteínas como los ácidos nucleicos de las PBMC.
- El homogenado se congeló rápidamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta tener un mayor número de muestras para continuar el proceso.
- En el momento en el que se recopilaron  $\geq 6$  muestras, se descongelaron los homogenados en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  agitando lentamente.
- Rápidamente, se añadieron 350 $\mu$ l de etanol al 70% y pipeteó hasta conseguir mezclar las dos fases que se crean. Con este paso se consigue precipitar los ácido nucleicos.
- El total del volumen obtenido (700 $\mu$ l) se transfirió a una columna RNeasy *spin column* y se centrifugó a  $\geq 8000\text{G}$  durante 15seg. (desde que la centrífuga alcanza la velocidad).



- El líquido filtrado se eliminó y se añadió 350µl del buffer RW1 a la columna para lavar los ácidos nucleicos que se han quedado adheridos al filtro de la columna.
- Tras centrifugar 15seg. a  $\geq 8000G$ , se realizó un paso opcional de digestión con DNasa I para eliminar la contaminación de DNA genómico. Se añadió 10µl de DNasa libre de RNA (27,27 unidades Kunitz\*) + 70µl de buffer RDD cubriendo el filtro de la columna. Se incubó 15min. a TA y se lavó añadiendo 350µl de buffer RW1.

\* Una unidad Kunitz se define como la cantidad de DNasa I que causa un incremento de 0,001 de absorbancia a A260 por minuto y por mililitro a 25°C, pH 5,0, con un DNA altamente polimerizado como sustrato [307].

- Después de centrifugar 15seg. a  $\geq 8000G$  se descartó el líquido filtrado y se realizó otro lavado añadiendo 500µl de buffer RPE.
- Se centrifugó 15seg. a  $\geq 8000G$ , se eliminó el líquido filtrado y se realizó un último lavado con 500µl de buffer RPE.
- Tras centrifugar 2min. a  $\geq 8000G$ , se cambió el tubo colector de la columna por un tubo eppendorf *RNasa-free* y se añadió 15µl de agua *RNasa-free* sobre el filtro, sin tocarlo.
- Se centrifugó 1min. a  $\geq 8000G$  y el RNA eluido se vuelve a pasar el filtro para tratar de eluir el máximo de RNA.
- A continuación, el RNA obtenido se cuantificó utilizando 2µl de muestra y el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, DE, USA).

### **PBMC congeladas**

Tras descongelar las PBMC, se cogieron  $2,5-5 \times 10^6$  PBMC y se realizó la extracción del RNA total siguiendo los mismos pasos que en el caso de las PBMC frescas excluyendo el paso de congelación del homogeneizado.

## Material y Métodos

---

### 3.2. Retrotranscripción

Tras cuantificar el RNA total obtenido, se retrotranscribió 1µg de RNA total a DNA copia o cDNA utilizando el kit Omniscript RT Kit (Qiagen).

Para realizar la reacción se utilizaron como cebadores o *primers random hexamers* de Applied Biosystems (CA, USA).

Componentes de la reacción:

REACTIVO	VOLUMEN
Buffer RT 10X	2µl
dNTPs	2µl
Inhibidor de RNasa 10U/ul	1µl
<i>Random hexamers primers</i> (10µM)	2µl
Enzima Omniscript RT	1µl
Muestra RNA (1µg)	Xµl
H <sub>2</sub> O RNasa free	(12-X) µl
Volumen final	<b>20µl</b>

Programa:

TEMPERATURA	TIEMPO
37°C	60 min.
4°C	∞

El cDNA se guardó a -20°C hasta el momento de realizar la PCR real time.

### 3.3. PCR a tiempo real

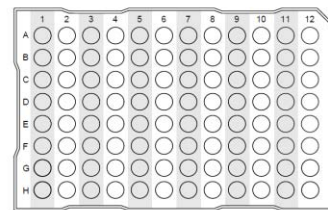
La cuantificación del cDNA retrotranscrito de nuestro gen de interés, *HSPA1A*, se realizó mediante la técnica de PCR a tiempo real utilizando un método de cuantificación relativa con sondas Taqman (Applied Biosystems).

#### Puesta a punto

Con la finalidad de escoger el gen endógeno idóneo para nuestro estudio, determinamos qué gen de expresión constitutiva (gen endógeno) se mantenía más estable tanto en las muestras de PBMC de pacientes con EM como de CS.

Utilizando la placa Taqman Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems, ref 4309199) analizamos la expresión de 11 genes endógenos (y un control positivo interno) de dos muestras de pacientes con EM y dos de CS.

El siguiente listado corresponde al contenido de la placa de controles endógenos. Cada número corresponde a una columna de la placa con una sonda y *primers* específicos. Las sondas en todos los casos están marcadas con la sonda VIC™ (Applied Biosystems).



Columna	Ensayo Control	Abreviatura
1	Control Positivo Interno	IPC
2	RNA ribosomal 18S	18S
3	Proteína ribosomal ácida	huPO
4	Beta-actina	huβA
5	Ciclofilina	huCYC
6	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	huGAPDH
7	Fosfogliceroquinasa	huPGK
8	β <sub>2</sub> -Microglobulina	Huβ2m
9	β-Glucuronidasa	huGUS
10	Hipoxantina-guanina fosfo-ribosiltransferasa	huHPRT
11	Factor de transcripción IID, proteína de unión a TATA	huTBP
12	Receptor de la transferrina	huTfR

## Material y Métodos

Componentes de la reacción para cada muestra:

Teniendo en cuenta que se realizaron duplicados de cada gen endógeno más un control interno y contando con un volumen de pérdida (dos muestras), se realizaron los cálculos de los reactivos para 26 reacciones: [(11 genes + 1 control) x 2]+2.

REACTIVO	VOLUMEN
Taqman Gene Expression Master Mix (2X)	650µl
Muestra cDNA (1µg)	20µl
H <sub>2</sub> O RNasa free	630µl
Volumen final (50 µl/reacción)	1300µl

Se añadió 50µl de la mezcla de reacción a cada pocillo.

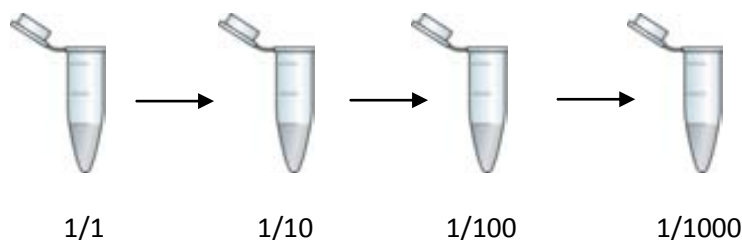
Se utilizó el equipo ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) y se realizó el siguiente programa:

PASOS		TEMPERATURA	TIEMPO
1. INCUBACIÓN de la UNG AmpErase		50°C	2 min.
2. ACTIVACIÓN de la AmpliTaq		95°C	10 min.
3. AMPLIFICACIÓN (40 ciclos)	DESNATURALIZACIÓN	95°C	15 seg.
	HIBRIDACIÓN +EXTENSIÓN	60°C	1 min.

El siguiente paso fue comprobar que la Taq polimerasa tenía la misma eficiencia de amplificación para el gen endógeno, *huPGK*, y el gen en estudio, *HSPA1A*.

Para ello, se hizo un banco de dilución de una muestra de cDNA concentrada y se determinó la capacidad de amplificación de ambos genes.

Banco de dilución seriada:



180 ng cDNA/rx
18 ng cDNA/rx
1,8 ng cDNA/rx
0,18 ng cDNA/rx

Reacción:

REACTIVO	VOLUMEN
Taqman Gene Expression Master Mix con UDG* (2X)	12,5µl
Taqman Gene Expression Assay (20X), sonda	1,25µl
Muestra cDNA	1,6µl
H <sub>2</sub> O RNasa free	9,65µl
<b>Volumen final</b>	<b>25µl</b>

\* UDG: *Uracil-DNA Glycosylase*. Enzima que glicosila los uracilos presentes en el DNA, minimizando la amplificación del DNA genómico contaminante de la muestra. Debido a que el gen *HSPA1A* es un gen que no contiene intrones, además de realizar una digestión del DNA durante el proceso de purificación del RNA total, también se utilizó la enzima UDG durante la amplificación del cDNA para evitar amplificaciones de DNA genómico.

## Material y Métodos

### Cuantificación relativa de *HSPA1A*

Para la cuantificación de la expresión de *HSPA1A* se utilizó el Taqman Assay Hs00359163\_s1 y el Taqman Assay para *phosphoglycerate-kinase 1*, huPGK1 (ref. 4333765T), gen endógeno, ambas marcadas con FAM™/MGB (Applied Biosystems).

Programa:

PASOS		TEMPERATURA	TIEMPO
1. INCUBACIÓN de la UNG AmpErase		50°C	2 min.
2. ACTIVACIÓN de la AmpliTaq		95°C	10 min.
3. AMPLIFICACIÓN (40 ciclos)	DESNATURALIZACIÓN	95°C	15 seg.
	HIBRIDACIÓN +EXTENSIÓN	60°C	1 min.

Se realizaron triplicados de cada muestra y se calculó la expresión relativa de *HSPA1A* de cada muestra mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [308].

#### 4. Expresión proteica de Hsp70

El análisis de la expresión proteica de Hsp70 (HSPA1A/B) se realizó en PBMC frescas y tras ser sometidas a un estrés térmico o inflamatorio (ver apartado 5).

La cuantificación de la expresión de HSPA1A/B se realizó en las poblaciones de linfocitos T CD4+ (células CD3+ CD8-), linfocitos T CD8+ (células CD3+ CD8+) y monocitos (células CD14+) mediante citometría de flujo. Estas moléculas se marcaron mediante un marcaje de superficie directo y, seguidamente, se realizó un marcaje intracelular directo para detectar las moléculas de Hsp70 (HSPA1A/B). Debido a que la Hsp70 puede translocarse al núcleo, se utilizaron

dos procedimientos de marcaje intracelular, uno que permitía realizar una tinción únicamente citoplasmática y otro que permitía realizar una tinción citoplasmática y nuclear (marcaje intracelular total).

### 4.1 Marcaje de superficie directo

1. A una muestra de  $3-5 \times 10^5$  PBMC/100 $\mu$ l de medio completo se le añadió los anticuerpos específicos o los correspondientes controles de isotipo conjugados con los diferentes fluorocromos (Tabla 2).
2. Incubar 25min. a TA y en oscuridad.
3. Añadir 2ml de PBS y centrifugar a 350G durante 5 min.
4. Tras decantar el sobrenadante, continuar con marcaje intracelular de HSPA1A/B.

### 4.2 Marcaje intracelular directo

#### **Tinción citoplasmática**

1. Resuspender las células a las que se les ha realizado el marcaje de superficie en 100 $\mu$ l de solución de solución fijadora (solución A) del kit IntraStain, Fixation and Permeabilization kit (Dako, Glostrup, Dinamarca).
2. Incubar 15min. a TA y en oscuridad.
3. Añadir 2ml de PBS y centrifugar a 350G durante 5 min.
4. Tras decantar el sobrenadante, resuspender en 100 $\mu$ l de solución permeabilizadora (solución B) del kit IntraStain, Fixation and Permeabilization kit (Dako) y añadir el anticuerpo anti-HSPA1A/B o el respectivo control de isotipo, ambos conjugados con el fluorocromo phycoerythrin (PE) (Tabla 2).
5. Incubar 30min a TA y en oscuridad.
6. Añadir 2ml de PBS y centrifugar a 350G durante 5 min.

## Material y Métodos

- Tras decantar el sobrenadante, resuspender las células en 250-300µl de PBS.
- Adquirir en el citómetro de flujo FACS Canto™ y análisis con el programa Diva (BD, Mountain View, CA, USA).

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados para la determinación de la expresión proteica de Hsp70A1/B en linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y monocitos.

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	ISOTIPO	CASA COMERCIAL
anti-CD3 PerCP	Linfocitos T	mouse IgG1	BD Pharmingen, CA, USA
anti-CD8 FITC	Linfocitos T CD8+	mouse IgG1	BD Pharmingen, CA, USA
anti-CD14 APC	Monocitos	mouse IgG2a	BD Pharmingen, CA, USA
anti-Hsp70A1/B PE	Hsp70 inducible	mouse IgG1	Stressgen, Assay Designs Inc., MI, USA

APC: alofocianina; FITC: isocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP: proteína clorofila peridina.

### Tinción intracelular total

- Resuspender las células a las que se les ha realizado el marcaje de superficie en 100µl de solución de solución Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen, San Diego, CA).
- Incubar 20min. a 4°C y en oscuridad.
- Añadir 2ml de PermWash buffer 1x (BD Pharmingen) y centrifugar a 350G durante 5 min.
- Tras decantar el sobrenadante, resuspender en 100µl de solución PermWash buffer 1x y añadir el anticuerpo anti-HSPA1A/B o el control de isotipo.
- Incubar 45min. a 4°C y en oscuridad.



6. Añadir 2ml de PermWash buffer 1x (BD Pharmingen) y centrifugar a 350G durante 5 min.
7. Tras decantar el sobrenadante, resuspender las células en 250-300 $\mu$ l de PBS.
8. Adquirir en el citómetro de flujo FACS Canto™ y análisis con el programa Diva (BD).

### 5 Inducción de la expresión de Hsp70A1/B

Con el objetivo de analizar la capacidad de inducción de la expresión de Hsp70A1/B de las PBMC de los pacientes con EM y los CS, se realizaron dos tipos de estímulos, un estrés térmico y un estrés inflamatorio. Para inducir el estrés térmico (*heat shock*, HS) se incubaron las PBMC toda la noche a 40°C seguido por un periodo de recuperación de 30min. a 37°C. El estrés inflamatorio se indujo incubando las células en presencia de 5mg/ml lipopolisacárido (LPS) (Sigma Aldrich) durante 24h. a 37°C en atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y el programa Prism versión 5.1 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Dependiendo de la distribución de las variables se aplicó la prueba t de Student o la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney o Wilcoxon (análisis pareado). Cuando se compararon más de dos grupos de muestras relacionadas se utilizó el test de Friedman y se aplicó el *post-hoc* de Dunn. Se aplicó una correlación de Spearman o modelos lineales generalizados para determinar la asociación entre la expresión de Hsp70A1/B y las variables clínicas y demográficas de los pacientes con EM y los CS. En todos los casos se consideró que la diferencia era estadísticamente significativa cuando el valor de  $p < 0,05$ .

### **PARTE II. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE Hsp70 IN VITRO Y EN UN MODELO ANIMAL DE EM**

#### **1. Animales**

Para el estudio de la función de la Hsp70 en la EAE se utilizaron ratones C57BL/6 salvajes (WT) y deficientes en *Hsp70.1* (*Hsp70.1* KO) adquiridos en Macrogen (Seoul, Korea), a partir de los cuales establecimos nuestra colonia en las instalaciones libre de patógenos (SPF) de nuestro estabulario (Institut de Recerca de Vall d'Hebron, Barcelona, España). También se adquirieron ratones C57BL/6J WT de siete semanas de edad procedentes de Harlan (Italia) para el estudio del silenciamiento de *Hsp70.1* mediante RNA de interferencia (siRNA). Los animales fueron estabulados en condiciones estándar de luz y temperatura controladas. El agua y la comida fueron suministradas *ad libitum*.

Para la realización de cultivos gliales mixtos se utilizaron ratas Wistar posnatales de 0-2 días (P0-P2) provenientes de Janvier (Francia).

El diseño experimental y el mantenimiento de los ratones se realizaron siguiendo las directrices publicadas en el Decreto 214/97 del 30 de Julio sobre la Regulación de la Utilización de Animales para la Experimentación de la Generalitat de Catalunya y en el marco de las Directivas de Consejo Europeo.

#### **2. Genotipado**

Todos los animales utilizados para los experimentos de EAE fueron genotipados para comprobar que tenían el gen mutado de *Hsp70.1*.

Como material de partida para realizar el genotipado se utilizó una pequeña porción de lóbulo de oreja que se les extirpaba como método para identificar a cada animal.

### 2.1. Extacción DNA genómico

A partir de la muestra de tejido de cada animal se realizó el siguiente procedimiento para la obtención del DNA genómico.

9. Añadir 500µl de tampón TES\* + 10µl de proteinasa K (10mg/ml, Roche Diagnostics).

Tampón TES: Tris-HCl 50mM, pH= 8,0; EDTA 50mM; SDS 0,5% (Sigma).

10. Incubar toda la noche (8-24h) a 55°C para permitir la disgregación del tejido.
11. Añadir 500µl de PCIA (phenol:chloroform:isoamylalcohol= 25:24:1, Sigma) y agitar con el vórtex durante 10min.
12. Centrifugar 10min. a 16.100G a 4°C.
13. Recoger con cuidado la fase superior que se ha formado tras la centrifugación y transferirla a un nuevo tubo.
14. Añadir 1 volumen de isopropanol y mezclar varias veces por inversión.
15. Centrifugar 10min a 16.100G a 4°C.
16. Eliminar el sobrenadante mediante decantación.
17. Añadir 500µl de etanol 95% frío y agitar con el vórtex suavemente hasta que se despegue el pellet de DNA.
18. Centrifugar 10min. a 14.000 G a 4°C.
19. Eliminar el sobrenadante y lavar el DNA añadiendo 500µl de etanol al 70%. Agitar con el vórtex suavemente hasta que se despegue el pellet de DNA.
20. Centrifugar 5min. a 14.000 G a 4°C.
21. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet de DNA.
22. Resuspender el DNA con 50-100µl agua *RNasa free*.
23. Incubar 10min. a 65°C para que se disuelva bien el DNA.
24. Cuantificar la cantidad de DNA genómico mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

## Material y Métodos

### 2.2. Amplificación del gen *Hsp70.1*

Para la amplificación del gen *Hsp70.1* se utilizó la enzima AmpliTaq Gold Fast PCR (Applied Biosystems) y los siguientes *primers* para amplificar el gen WT y el gen *Hsp70.1* truncado, mutante.

<b><i>Hsp70.1</i> WT</b>	<i>Forward</i>	5' AGG AGC TGA CCC TTA ACA GC 3'
	<i>Reverse</i>	5' GTC GTT GGC GAT GAT CTC C 3'
<b><i>Hsp70.1</i> mutante</b>	<i>Forward</i>	5' CGA GAT CAG CAG CCT CTG TTC C 3'
	<i>Reverse</i>	5' GTC AGC CTC GCT GAG CTT GC 3'

Las secuencias de los primers fueron facilitadas por la compañía Macrogen, distribuidora de los ratones *Hsp70.1* KO y WT.

Componentes de la reacción:

REACTIVO	VOLUMEN
AmpliTaq master mix	10µl
<i>Primer Forward</i>	1µl
<i>Primer Reverse</i>	1µl
Muestra de DNA, 250ng	Xµl
H <sub>2</sub> O RNasa free	20-(12+X)µl
Volumen final	20µl

Programa:

PASOS		TEMPERATURA	TIEMPO
1. DESNATURALIZACIÓN		94°C	1 min.
2. AMPLIFICACIÓN  (35 ciclos)	DESNATURALIZACIÓN	94°C	5 min.
	HIBRIDACIÓN	66°C	30 seg.
	EXTENSIÓN	72°C	10 min.
4. EXTENSIÓN FINAL		72°C	1 min.
5. FINALIZACIÓN		4°C	∞

### 2.3. Electroforesis

Tras realizar las reacciones la amplificación del gen *Hsp70.1* WT y mutante se analizó el resultado mediante una electroforesis con un gel de agarosa con los productos de las reacciones. Se cargaron 12µl de cada muestra (10µl producto reacción + 2µl tampón de carga 6x) en un gel al 2% de agarosa con bromuro de etidio y se corrieron las muestras a 95 voltios durante aproximadamente 90min. En algunos carriles se cargó un marcador de peso molecular (PM) de 100pb (BioLabs, Ipswich, MA, USA).

Al finalizar la electroforesis, las bandas de amplificación se visualizaron mediante un captador de imágenes. En el caso de que se hubiese amplificado el gen *Hsp70.1* WT se obtiene una banda de 650pb y si se amplifica el gen *Hsp70.1* mutante, una banda de 1250pb.

## Material y Métodos

### 3. Inducción de la EAE y seguimiento clínico

Se inmunizaron ratones de entre 8 y 12 semanas de edad, previa anestesia con 37 mg/kg de ketamina (Ketolar, Parke-Davis) y 5,5 mg/kg de xilacina (Rompun, Bayer). Se preparó una emulsión (1:1; v/v) con 200 µg del péptido MOG<sub>35-55</sub> (sintetizado por la Secció de Proteòmica, Serveis Científicotècnics de la Universitat Pompeu Fabra) diluido en PBS y adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical CO) que contenía 400µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories). Cada ratón recibió por vía subcutánea un total de 200 µl de la emulsión repartidos en cuatro puntos próximos a los ganglios linfáticos inguinales y axilares. El mismo día de la inmunización y a las 48 horas se les administró 250 ng de toxina pertussis (Tp) (Sigma Chemical CO.) en un volumen final de 200 µl por vía intravenosa Como control del proceso de inmunización se incluyeron animales inmunizados de igual forma pero sin el péptido encefalitogénico. Todos los animales se pesaron y examinaron diariamente para evaluar la presencia y gravedad de los signos clínicos según la siguiente escala [309]:

Evaluación de los signos clínicos de EAE	
<b>0</b>	Ausencia de signos clínicos
<b>0.5</b>	Parálisis parcial de la cola (zona distal)
<b>1</b>	Parálisis total de la cola
<b>2</b>	Paraparesia de una o de ambas extremidades traseras
<b>3</b>	Paraplejia trasera
<b>4</b>	Tetraparesia
<b>5</b>	Tetraplejia (criterio de punto final)
<b>6</b>	Muerte por EAE

#### 4. Tratamiento con siRNA

Se inmunizaron ratones C57BL/6J WT tal como se describe en el apartado anterior y, una vez los animales comenzaron a mostrar signos clínicos [día 7 post-inmunización (p.i.)], se aleatorizaron en dos grupos. A ambos grupos se les administró por vía intravenosa con 200µl de PBS que contenían 2mg/kg de un pool de cuatro siRNA. Un grupo recibió un pool de siRNA específicos del gen *Hsp70.1* (*HSPA1B*, ref. E-065710) y el otro grupo (control) recibió siRNA *non-targeting* (ref. D-001910) (acell SMART pool siRNA, Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A día 14 p.i., una vez los signos clínicos de la enfermedad ya estaban establecidos, se administró una segunda dosis de siRNA de *Hsp70.1* o *non-targeting*. El seguimiento clínico de los ratones se realizó de forma ciega, es decir, el observador no conocía el siRNA que había recibido cada animal.

#### 5. Análisis de la reactividad antígeno específica

Para evaluar la capacidad proliferativa de los esplenocitos se sacrificó un grupo de ratones durante la fase inflamatoria de la EAE, día 12 p.i. y durante la fase crónica de la enfermedad día 29 p.i. (final del experimento). Se recogieron los bazo de los animales y se obtuvieron los esplenocitos prensado los bazo con el émbolo de jeringuilla estéril sobre un filtro de 70µm de diámetro. Las células se lavaron con medio IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) suplementado con 10% FBS. Tras centrifugar durante 10min. a 1250rpm, se lisaron los eritrocitos de la muestra diluyendo el pellet celular con 1ml de agua estéril. Rápidamente, se bloqueó la lisis añadiendo 20ml de IMDM+20%FBS y se filtró nuevamente con un filtro de 70µm. Tras centrifugar 10min. a 350G, las células se resuspendieron en medio de proliferación (IMDM suplementado con 10% de HyClone® FetalClone I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 50µM de 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical), 2mM de glutamina, 50U/ml de penicilina and 50mg/ml de estreptomina, todos suministrados por Gibco BRL. Tras

## Material y Métodos

---

calcular la concentración celular utilizando un contador hematológico (Coulter Act Diff), en placas de 96 pocillos se sembraron  $2 \times 10^5$  esplenocitos/pocillo en 200  $\mu$ l de medio de proliferación con 5  $\mu$ g/ml MOG<sub>35-55</sub> o sin estímulo (basal). Se realizaron 5 réplicas de cada condición y animal.

Tras 48h. de incubación, se recogieron 50  $\mu$ l del sobrenadante de cada pocillo y se guardaron a -80°C para la posterior cuantificación de los niveles de citocinas. A continuación, se añadió 1  $\mu$ Ci/pocillo de timidina tritiada (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) y se incubó durante 18h. más. Transcurrido este tiempo, se transfirieron las células a un filtro utilizando un recolector o *harvester* (Harvester 96, Tomtec®) siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificaron las cuentas por minuto (cpm) emitidas por el líquido de centelleo utilizando un contador de centelleo Microbeta Wallac Trilux (Wallac, Turku, Finlandia). El índice de estimulación (IE) se calculó como el promedio de las cpm de las cinco réplicas de los pocillos estimulados con MOG<sub>35-55</sub> dividido entre el promedio de las cpm de las cinco réplicas de los pocillos sin estímulo.

### 6. Análisis de la producción de citocinas

El análisis del perfil de secreción de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos estimulados con MOG<sub>35-55</sub> (ver apartado 5) se realizó con el kit mouse FlowCytomix Th1/Th2 10plex, (ref. BMS820FF; Bender MedSystems Inc., Burlingame, CA, USA) que permite cuantificar las siguientes citocinas: IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-4 e IL-17. La concentración de citocinas de cada muestra se determinó siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se calculó el número de muestras totales incluyendo los estándares de la curva patrón y el blanco.
2. Utilizando el protocolo en placa con filtro se humedecieron el número de pocillos necesarios añadiendo 50  $\mu$ l de *Assay Buffer* 1x y se eliminó el contenido utilizando un aspirador de placa.



3. Una vez reconstituidos los viales de estándares se preparó el banco de diluciones para la curva patrón.
4. Se añadió 25  $\mu$ l de estándar o muestra en cada pocillo.
5. A continuación, se repartió 25  $\mu$ l de la mezcla de bolas en cada pocillo.
6. Finalmente, se añadió 50  $\mu$ l de la mezcla de anticuerpos conjugados con biotina en cada pocillo.
7. Se incubó la placa sellada con un film, protegida de la luz y con agitación (500rpm) durante 2 h. a TA.
8. Se eliminó el contenido de los pocillos con un aspirador de placa.
9. Se lavó dos veces con 100  $\mu$ l de *Assay Buffer 1x*.
10. Se añadió 100  $\mu$ l de *Assay Buffer 1x* y 50  $\mu$ l de estreptavidina-PE en todos los pocillos.
11. Se incubó la placa sellada con un film, protegida de la luz y con agitación (500rpm) durante 1 h. a TA.
12. Se eliminó el contenido de los pocillos con un aspirador de placa.
13. Se lavó dos veces con 100  $\mu$ l de *Assay Buffer 1x*.
14. Se añadió 200  $\mu$ l de *Assay Buffer 1x*, se mezcló bien el contenido de cada pocillo y se transfirió a un tubo de citometría.
15. Se añadió 300  $\mu$ l de *Assay Buffer 1x* a cada tubo y las muestras se adquirieron en un citómetro FacsCanto (BD).

La concentración de citocinas se extrapoló a partir de la curva estándar de cada citocina utilizando el programa FlowCytomix™ Pro 2.4.

### **7. Análisis histopatológico**

El estudio histopatológico se realizó en animales sacrificados a día 12 p.i. o a final del seguimiento clínico (día 29 p.i.). En el caso de los ratones tratados con siRNA el estudio histopatológico se realizó únicamente a final del experimento. El SNC de los animales, cerebro y médula espinal, se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4%. Las muestras se enviaron al Departamento de Anatomía Patológica

## Material y Métodos

---

de nuestro hospital (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España), donde se incluyeron en parafina y se realizaron secciones de 4  $\mu\text{m}$ . Realizamos tinciones con hematoxilina y eosina (HE) y Klüver-Barrera (KB) para determinar el grado de inflamación y desmielinización del tejido, respectivamente. También se realizó una tinción de los macrófagos y la microglía presente en el tejido utilizando *Lycopersicon esculentum agglutinin* (LEA) (Sigma). Por otro lado, también se realizaron inmunotinciones utilizando los anticuerpos detallados en la Tabla 3. Para ello, primero se incubó el tejido con peróxido de hidrógeno al 2%, metanol en PBS durante 20min. para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Después se realizó un desenmascaramiento antigénico mediante la utilización de citrato 10mM o proteasa tipo XIV (Sigma Chemical). Las uniones inespecíficas se bloquearon incubando las secciones con una solución de bloqueo [PBS + 2% de albúmina sérica bovina (BSA), tampón de bloqueo] durante 1h a TA. A continuación, los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (ver Tabla 3). Tras realizar varios lavados con tampón de bloqueo, las muestras se incubaron durante 1h a TA con una dilución 1:200 (en solución de bloqueo) de los correspondientes anticuerpos secundarios biotinados (todos de Dako Cytomation). Finalmente, se añadió una dilución 1:100 (en PBS) del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ImmunoPure ABC Peroxidase Staining Kits, Pierce, IL, USA) durante 1h. a TA. Para visualizar la reacción de la peroxidasa se utilizaron 2,5mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina + 0.05% de peróxido de hidrógeno. Como controles negativos de la inmunotinciones se procesaron las muestras de igual forma pero omitiendo los anticuerpos primarios. La cuantificación de las células positivas se realizó en tres áreas pareadas (0,25  $\text{mm}^2$ ) de la médula espinal. Todas las evaluaciones se realizaron de manera ciega, es decir, el observador desconocía el genotipo o tratamiento (siRNA) de los animales estudiados.

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados para la realización de los estudios histopatológicos.

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	ISOTIPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-CD45	Marcador leucocitario	Rat IgG2b	1:300	R&D Systems, OX, UK
Anti-CD3	Linfocitos T	Rabbit polyclonal	1:100	Dako, Glostrup, Dinamarca
Anti-GFAP	Astroцитos	Rabbit polyclonal	1:500	Dako, Glostrup, Dinamarca
Anti-neurofilamentos no fosforilados (SMI-32)	Daño axonal	Mouse IgG	1:100	Covance Inc.
Anti-NG2	Oligodendrocitos	Rabbit polyclonal	1:200	Merck Millipore, MA, USA
Anti-malondialdehído (MDA)	Oxidación lipídica	Rabbit polyclonal	1:100	Alpha Diagnostic Int., TX, USA
Anti-nitrotirosina (NITT)	Oxidación protéica	Rabbit polyclonal	1:100	Alpha Diagnostic Int., TX, USA
Anti-hemo oxigenasa 1 (HOx)	Estrés oxidativo	Rabbit polyclonal	1:100	Enzo Life Sciences, CH, Suiza
Anti-óxido nítrico sintasa inducible (iNOS2)	Estrés oxidativo	Rabbit polyclonal	1:100	Santa Cruz Biotechnologies, TX, USA

## **Material y Métodos**

---

### **Criterio de evaluación de la presencia de infiltrados**

La evaluación de la presencia de infiltrado se realizó utilizando la tinción de HE y el siguiente criterio:

0. Ausencia de infiltrados
1. Infiltrado celular localizado únicamente en meninges
2. Baja presencia de infiltrados superficiales en parénquima
3. Moderada presencia de infiltrados (< 25%) en sustancia blanca
4. Elevada presencia de infiltrados (< 50%) en sustancia blanca
5. Presencia severa de infiltrados (>50%) en sustancia blanca

### **Criterio de evaluación de la presencia de áreas de desmielinización**

La evaluación de la presencia de áreas de desmielinización se realizó utilizando la tinción de KB y el siguiente criterio:

0. Ausencia de áreas de desmielinización
1. Baja presencia de desmielinización localizada únicamente alrededor de los infiltrados y representando <25% de la sustancia blanca
2. Moderada desmielinización, representando <50% de la sustancia blanca
3. Elevada presencia de desmielinización difusa y extensa, representando >50% de la sustancia blanca

### **8. Cultivo mixto de células de SNC de ratón**

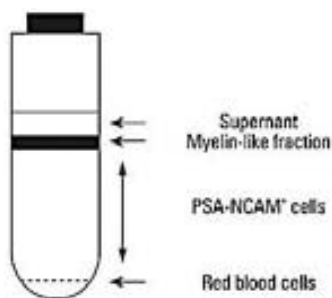
Para generar cultivos primarios mixtos compuestos por oligodendrocitos, neuronas y astrocitos se utilizaron cerebros de ratones WT o *Hsp70.1* KO de día 1 a 2 post-natal (P1-P2).

Los ratones P1-P2 fueron decapitados y, rápidamente, se procedió a la obtención del cerebro y su posterior disección, como se detalla a continuación:

- Esterilización de la cabeza sumergiéndola unos segundos en etanol 70% para transferirla posteriormente a una placa de Petri con tampón Hanks (Hanks 10X, Gibco) frío suplementado con 0,01M de tampón HEPES, 0,75% de bicarbonato sódico (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina.
- Utilizando una lupa y material de microdissección, se retiró la piel y el cráneo para la obtención el cerebro, el cual se transfirió a una nueva placa con Hanks frío suplementado.
- A continuación, se separón las meninges que recubren el cerebro y se eliminaron los bulbos olfatorios, el mesencéfalo, el cerebelo y el tronco encefálico, quedándonos así únicamente con los dos hemisferios cerebrales. Éstos se transfirieron una nueva placa de Petri con tampón Hanks frío suplementado, se hicieron grupos o *pools* de 3-5 animales WT o *Hsp70.1* KO.
- En la campana de flujo laminar, se realizó una disociación de los tejidos cortando los tejidos en trozos pequeños utilizando un bisturí.
- Seguidamente se realizó una disgregación enzimática y mecánica. Para la disgregación enzimática, se centrifugaron los trozos de tejidos (5min. a 350G) y el pellet se resuspendió con 10ml de DMEM que contenía 30µg/ml de papaína (Worthington, Nova Jersey, USA), 0,24µg/ml de L-Cisteína (Sigma) y 40µg/ml de DNasa I (previamente se pre-activó la papaína incubando la solución durante 5min. a 37°C). La solución se dejó incubando durante 20min. a 37°C y posteriormente se bloqueó la actividad enzimática añadiendo 1ml de FBS. Tras centrifugar 5min. a 350G, el pellet se resuspendió en 10ml de DMEM+10%FBS y los tejidos se sometieron a disgregación mecánica mediante prensando, primero, sobre una malla de nylon de 150µm de poro y, después, sobre una malla de 63µm. Los tejidos finalmente disgregados, se centrifugaron 5min. a 350G y el pellet celular se resuspendió en 10ml de DMEM.

## Material y Métodos

- A continuación, se realizó un gradiente de densidad con percoll de la suspensión de células WT o *Hsp70.1* para obtener la fracción celular enriquecida en células progenitoras de oligodendrocitos (OPC). Para preparar el gradiente se utilizaron tubos de 30ml a los que se les añadió 9ml de Percoll (GE Healthcare, Freiburg, Alemania), 1ml de Hanks 10X y 10ml de Hanks 1X y se centrifugaron durante 30min. a 20.000G a 4°C. Después se deposita la suspensión celular sobre el percoll, lentamente y con cuidado de no mezclar las dos fases. Se centrifuga durante 20min. a 20.000G y a 4°C. Tras la misma, se observará la formación de 4 fases (Fig. 14). Con mucho cuidado se descartan las dos primeras fases correspondientes al sobrenadante y la banda de mielina. Después recogemos la tercera fase, correspondiente a la fracción con células progenitoras (PSA-NCAM) evitando recoger eritrocitos de la última fracción.



**Figura 14. Dibujo representativo de un gradiente de percoll.** Esquema que muestra las fases que se forman tras realizar un gradiente de percoll con un homogenado de SNC.

- Tras realizar un par de lavados con DMEM+10% FBS, las células se resuspendieron en DMEM+10%FBS a una concentración de 2.000 células/ $\mu$ l y se sembraron 20 $\mu$ l de la suspensión celular en el centro de un cubreobjetos recubierto con poli-L-lisina e introducido en un pocillo de placas de 24 pocillos.
- Para que las células se adhiriesen se incubaron durante 30min. a 37°C y después se añadió 500 $\mu$ l de medio Bottenstein Sato (BS: DMEM suplementado con 0.5% FBS, 2mM L-glutamina, 10 $\mu$ M insulina (Sigma),

5ng/ml sodium selenite (Sigma), 100µg/ml transferrina (Sigma), 0.28µg/ml albumina, 60ng/ml progesterona (Sigma), 16µg/ml putrescina (Sigma), 40ng/ml triyodotironina (T3) (Sigma), 30ng/ml L-tiroxina (T4) (Sigma), 10ng/ml PDGF (Preprotech, France) en cada pocillo.

### 9. Cultivo mixto de células gliales

Se realizaron cultivos mixtos de células gliales a partir de ratas Wistar post-natales, P1 o P2. Los pasos para su obtención fueron los siguientes:

- Se obtuvo el tejido cerebral realizando el mismo procedimiento de disección descrito para los cultivos primarios de SNC de ratón.
- A continuación, en la campana de flujo laminar, se realizó una disgregación mecánica troceando los tejidos con un bisturí.
- Seguidamente, tras centrifugar los trozos de tejido, se realizó la disgregación enzimática con papaína (ver apartado 8).
- Tras bloquear la reacción con 10ml de DMEM+10% FBS, se realizó una disgregación mecánica mediante pipeteo y se filtró con filtros de 150 y 63mm de diámetro.
- Finalmente, se centrifugaron las células (5min. a 350G), se resuspendieron en DMEM+10%FBS y se sembraron en flascos de cultivo previamente recubiertos con polietilenglicol (PEG).
- El cultivo se incubó durante 10 días a 37<sup>a</sup>C, renovando el medio de cultivo dos veces por semana.

### 10. Modelo *in vitro* de inflamación en el SNC

Para generar un modelo *in vitro* de neuroinflamación, a cultivos primarios mixtos de células del SNC de ratones se les añadió microglía de rata en presencia de LPS e IFN-γ.

## Material y Métodos

---

- Para la obtención de la microglía se realizaron cultivos gliales mixtos (ver apartado 9). Tras 10 días de incubación, se agitaron los frascos de cultivo 1h. a 180 rpm y se recogió el sobrenadante de los cultivos que contenía la microglía.
- Se centrifugó el sobrenadante con las células y se realizó un lavado con 10ml de DMEM+10% FBS.
- Las células microgliales se resuspendieron en 1ml de BS y se realizó un conteo con la cámara de Neubauer.
- Como modelo *in vitro* de neuroinflamación se utilizaron cultivos primarios mixtos de células de SNC de ratones WT o *Hsp70.1* KO de 7 días de evolución, a los que se les renovó el 50% del medio de cultivo por medio BS fresco conteniendo 16.000 células microgliales/pocillo + 1µg/ml de LPS + 1µg/ml IFN-γ. Como control negativo se utilizaron cultivos a los que solo se les añadió medio BS con 16.000 células microgliales/pocillo.
- Tras 24h. de la adición del estímulo inflamatorio se realizó un estudio inmunocitoquímico.

### 11. Inmunocitoquímica y detección de apoptosis en cultivos de células del SNC

Tras el estímulo inflamatorio, las células se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4% durante 15min. a TA. Tras realizar 2-3 lavados con PBS, las células se incubaron con la solución de bloqueo (PBS + 0,1% Tritón X100 + 10% suero de caballo) durante 20min. a TA. A continuación, las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo (Tabla 4) durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras 2-3 lavados, las células se incubaron con una dilución 1:1000 de los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con Alexa-488 o Alexa-568 (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy, Pontoise, Francia) durante 90min. a TA, en agitación y oscuridad. Finalmente, se tiñó el núcleo de las células con colorante de Hoechst y las preparaciones se montaron utilizando Fluoromount-G (Clinisciences, France).



Para la detección de la microglía presente en el cultivo, además del inmunomarcaje con CD68, también se realizó una tinción con isolectina B4-FITC (Sigma) (dilución 1:1000).

En el caso del marcaje de la molécula O4, se realizó una inmunocitoquímica *in vivo* incubando las células con el anticuerpo anti-O4 diluido en DMEM+10% suero de caballo durante 30min. a 37°C. Después las células se lavaron y se fijaron con PFA al 4%.

Para la realización de controles negativos, se realizó el mismo proceso de marcaje pero omitiendo los anticuerpos primarios.

**Tabla 4.** Anticuerpos utilizados para la realización de los estudios inmunocitoquímicos en los cultivos mixtos de células del SNC.

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	ISOTIPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-O4	OPC	Mouse IgM	1:5	Hibridoma generosamente donado por el Dr. I. Sommer
Anti-MBP	Oligodendrocitos maduros	Chicken IgY	1:200	Millipore
Anti-Caspase 3 truncada (Casp3)	Células apoptóticas	Rabbit polyclonal	1:500	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Anti-NeuN	Neuronas	Mouse IgG1	1:300	Merck Millipore
Anti-GFAP	Astrocitos	Rabbit polyclonal	1:500	Dako
Anti-CD11b/c	Microglía de rata	Mouse IgG2a	1:100	BD Pharmingen, San Diego, CA
Anti-CD68	Microglía activada	Mouse IgG1	1:200	AbD Serotec, UK

## Material y Métodos

---

La detección de inmunofluorescencia se realizó en un microscopio de fluorescencia Zeiss Imager.Z1. Las imágenes se adquirieron con una cámara AxioCam equipada con un módulo ApoTome y fueron analizadas con el programa ImageJ software. El porcentaje de células Casp3+ de cada cultivo se calculó como la suma del número de células positivas de tres campos visuales representativos dividido entre la suma del total de número de células (células positivas para la tinción con Hoeschst). El porcentaje de células O4+ Casp3+, MBP+ Casp3+ y NeuN+ Casp3+ se calculó como la suma del número de células doble positivas dividido entre la suma del total de células de cada población (células O4+, MBP+ y NeuN+). Para determinar el efecto del estímulo inflamatorio, se calculó el valor de *fold change* de cada población en los cultivos de WT y *Hsp70.1* KO con respecto a sus cultivos control no estimulados.

### 12. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) y el programa Prism versión 5.1 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Dependiendo de la distribución de las variables y del tamaño de la muestra se aplicó la prueba t de Student o la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Para el análisis de variables cualitativas se aplicó la prueba de Fisher. En todos los casos se consideró que la diferencia era estadísticamente significativa cuando el valor de  $p < 0,05$ .



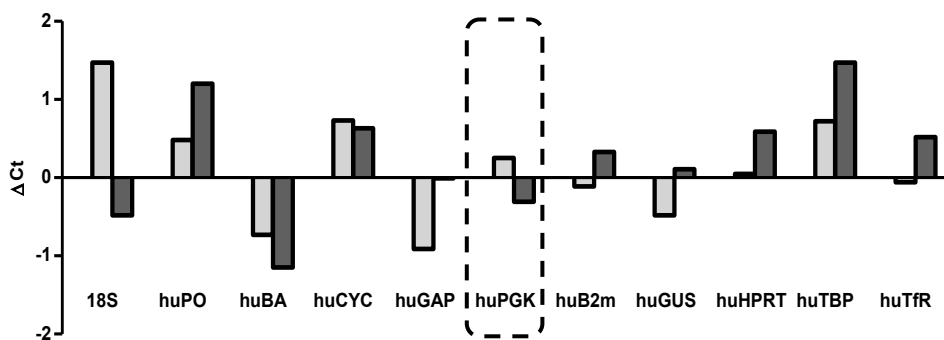
## **Resultados**

---

## PARTE I. EXPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Hsp70 EN PACIENTES CON EM Y CONTROLES SANOS

### 1. Selección del control endógeno

Con el fin de analizar la expresión del gen inducible de Hsp70 (*HSPA1A*) en nuestra población de pacientes con EM se decidió realizar una cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real. Para seleccionar el gen de endógeno o de referencia más adecuado, se analizó la expresión de 11 genes endógenos en muestras de PBMC de pacientes y de CS. El gen que presentó una menor variabilidad en todas las muestras fue el de la fosfogliceroquinasa, *huPGK*, con un valor de desviación estándar de 0,164 (Fig. 15).



**Figura 15. Expresión de genes endógenos en muestras de PBMC de pacientes con EM respecto a muestras de los CS.** Las muestras de los CS se utilizaron como referencia o muestras calibradoras y se calculó el valor de  $\Delta Ct$  de las muestras de los pacientes con EM ( $Ct$  medio muestras calibradoras (CS) –  $Ct$  medio muestras pacientes) para cada uno de los 11 genes endógenos testados.

El siguiente paso fue comprobar que la Taq polimerasa tenía la misma eficiencia de amplificación tanto para el gen endógeno, *huPGK*, como para el gen en estudio, *HSPA1A*. Para ello, se escogió una muestra con cDNA concentrado, se realizó una dilución seriada de la muestra (1/1, 1/10, 1/100 y 1/1000) y se realizó una PCR a tiempo real de los genes *huPGK* y *HSPA1A*. Con los valores de los Ct obtenidos se hizo una regresión lineal para cada uno de los genes y se

## Resultados

evaluaron los parámetros indicativos de la eficiencia de amplificación de la Taq polimerasa para cada gen: el ajuste lineal ( $r^2$ ) y la pendiente de la recta.

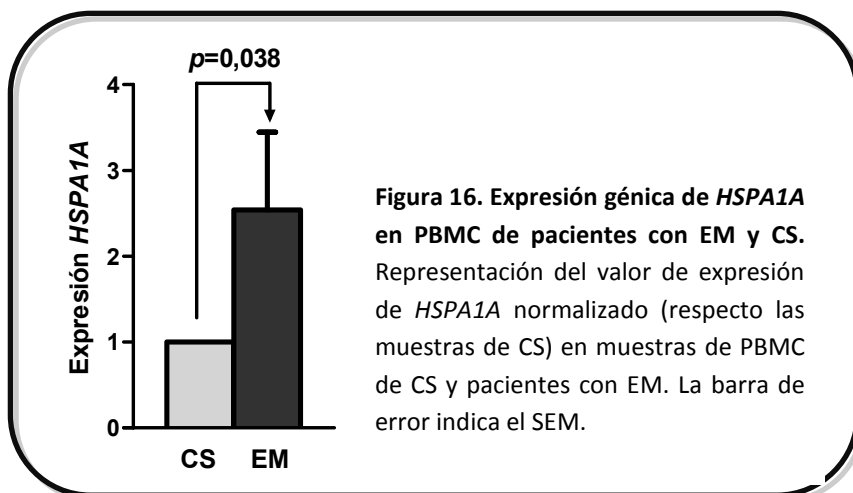
Los resultados mostraron que la Taq polimerasa presentaba una eficiencia de amplificación equivalente para ambos genes.

Curva Estándar	<i>HSPA1A</i>	<i>huPGK</i>
$r^2$	0,99	0,99
Pendiente	-4,032	-4,209

### 2. Sobreexpresión de Hsp70 en PBMC de pacientes con EM

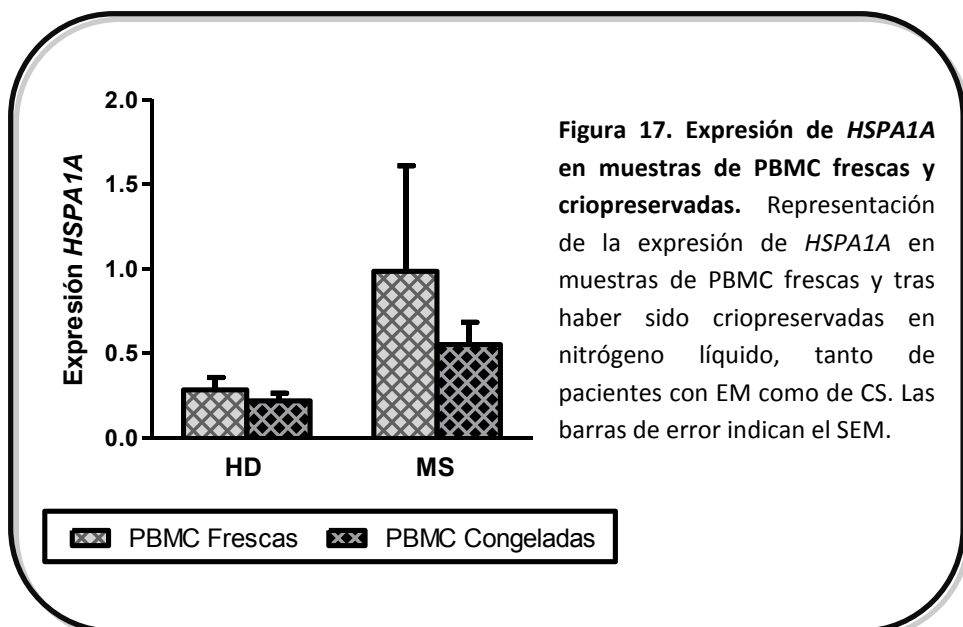
Una vez seleccionamos el gen endógeno más adecuado para nuestras muestras, se cuantificó la expresión relativa del gen inducible de Hsp70, *HSPA1A*, mediante PCR a tiempo real en PBMC de 30 pacientes con EM y 30 CS, utilizando el gen *huPGK* como gen endógeno. Las características demográficas de los pacientes y los CS incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 1.

Como se muestra en la Figura 16, se observó que las PBMC de los pacientes con EM expresaban 2,5 veces el gen *HSPA1A* que los CS ( $p=0,038$ ).



**Figura 16. Expresión génica de *HSPA1A* en PBMC de pacientes con EM y CS.** Representación del valor de expresión de *HSPA1A* normalizado (respecto las muestras de CS) en muestras de PBMC de CS y pacientes con EM. La barra de error indica el SEM.

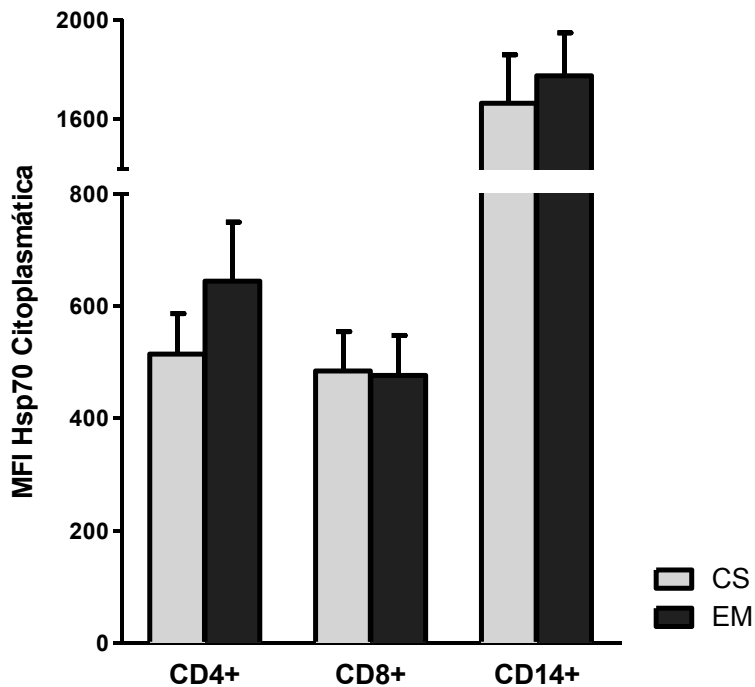
Tras hallar estas diferencias en el nivel de expresión basal de *HSPA1A* en muestras de PBMC frescas y para comparar nuestros resultados con los obtenidos previamente por otros autores mediante estudios de *microarrays*, quisimos estudiar si el proceso de criopreservación de las PBMC podía afectar a la expresión de este gen inducible por estrés. Con este objetivo, cuantificamos en un subgrupo de muestras (9 EM y 10 CS) la expresión de *HSPA1A* basalmente y tras sufrir un proceso de congelación y descongelación. Las características demográficas de las muestras de pacientes con EMRR y CS se muestran en la Tabla 1. Los resultados obtenidos mostraron que el proceso de congelación/descongelación de las PBMC no modificaba de forma significativa la expresión de *HSPA1A*, ni en los pacientes con EMRR ni en los CS (Figura 17). Con lo cual, concluimos que las PBMC de pacientes con EMRR (sin tratamiento) muestran mayor expresión de *HSPA1A* basalmente y que el resultado no se altera en el caso de que las muestras hayan sido criopreservadas previamente a la determinación.



## Resultados

### 3. Sobreexpresión de Hsp70-1A/B en linfocitos y monocitos de pacientes con EM

Tras observar la sobreexpresión génica de Hsp70 en pacientes con EM el siguiente paso fue analizar la expresión proteica de Hsp70 (Hsp70-1A/B) mediante citometría de flujo en linfocitos T CD4+ (células CD3+ CD8-), linfocitos T CD8+ (células CD3+ CD8+) y monocitos (células CD14+) de 32 pacientes con EM y 30 CS. Las características demográficas de los pacientes y los CS incluidos

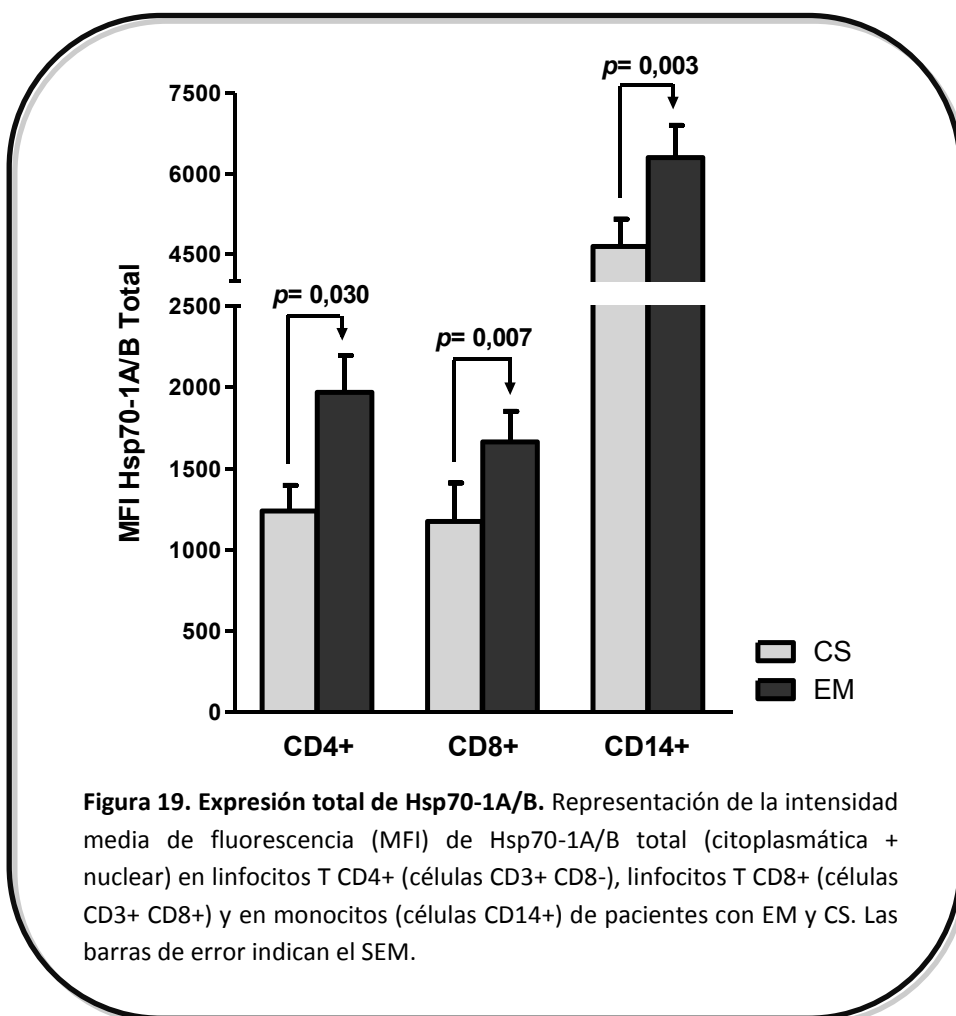


**Figura 18. Expresión citoplasmática de Hsp70-1A/B.** Representación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de Hsp70-1A/B citoplasmática en linfocitos T CD4+ (células CD3+ CD8-), linfocitos T CD8+ (células CD3+ CD8+) y monocitos (células CD14+) de pacientes con EM y CS. Las barras de error indican el SEM.

en este estudio se muestran en la Tabla 1. La inmunotinción intracitoplasmática de Hsp70-1A/B reveló que, como era de esperar, no existe una población de células positiva y otra negativa para Hsp70, sino que todas las células expresan Hsp70-1A/B aunque en diferente grado. En consecuencia, nos centramos en el estudio de la intensidad media de fluorescencia (MFI). Sin embargo, contrariamente a lo observado a nivel génico, los niveles de expresión de Hsp70-1A/B fueron muy similares entre pacientes con EM y CS en todas las poblaciones celulares estudiadas a nivel basal (Fig. 18). Cabe destacar que la expresión de Hsp70-1A/B fue muy superior en monocitos con respecto los niveles de expresión de los linfocitos T CD4+ o los linfocitos T CD8+, tanto en pacientes con EM como en CS ( $p < 0.001$  en todas las comparaciones).

Debido a que la Hsp70 puede translocarse al núcleo tras producirse un estrés celular [310], decidimos estudiar en un subgrupo de muestras, además de la expresión citoplasmática, la expresión total (citoplasmática + nuclear) de Hsp70-1A/B en la célula. Para ello, se realizó un proceso de permeabilización más agresivo que permitía permeabilizar la membrana plasmática y la membrana nuclear (ver apartado 4.2 de la sección Material y Métodos, Parte I), consiguiendo de esta manera cuantificar la expresión total de Hsp70-1A/B en las PBMC de 14 pacientes con EM y 14 CS. Las características demográficas de los pacientes y los CS incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 1. El análisis de la expresión total de Hsp70-1A/B sí reveló un aumento significativo de la expresión de Hsp70-1A/B en pacientes con EM en comparación con los CS, tal como habíamos observado a nivel de expresión génica. Dicha sobreexpresión de Hsp70 se observó tanto en linfocitos T CD4+ ( $p=0,030$ ), en linfocitos T CD8+ ( $p=0,007$ ) como en monocitos ( $p=0,003$ ) (Figura 19).





#### 4. Inducción de la expresión de Hsp70 tras un estrés térmico o inflamatorio

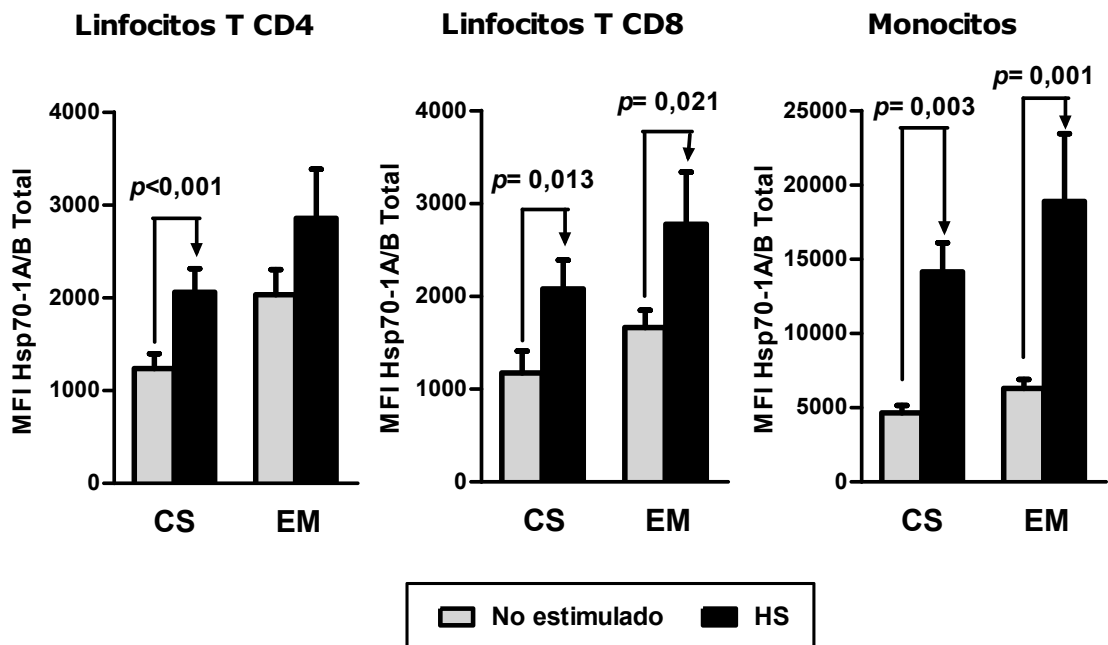
Finalmente, quisimos estudiar la capacidad de las PBMC de inducir la expresión de Hsp70 tras un estrés de tipo térmico o inflamatorio. Con esta finalidad obtuvimos PBMC de 14 pacientes con EM y 14 CS (Tabla 1) y determinamos la expresión citoplasmática y total de Hsp70-1A/B en linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y monocitos de forma basal y tras someter las PBMC a un estrés térmico o inflamatorio (LPS) tal como se especifica en el apartado 5 de la sección de Material y Métodos, Parte I.

Como se muestra en la Figura 20, el estrés térmico producido tras la incubación de las PBMC a 40°C durante toda la noche, produjo un aumento estadísticamente significativo de la expresión total de Hsp70-1A/B en linfocitos T y monocitos de CS (CD4,  $p < 0,001$ ; CD8,  $p = 0,013$  y CD14,  $p = 0,003$ ). De la misma manera, el estrés térmico también indujo un aumento significativo de la expresión de Hsp70-1A/B en linfocitos T CD8+ ( $p = 0,021$ ) y monocitos ( $p = 0,001$ ) de los pacientes con EM, pero no fue así en el caso de los linfocitos T CD4+. Curiosamente, la expresión total de Hsp70-1A/B inducida por el estrés térmico en monocitos se correlacionó positivamente con el número de lesiones en T2 en la resonancia magnética basal de los pacientes con EM ( $r = 0,61$ ,  $p = 0,034$ ).

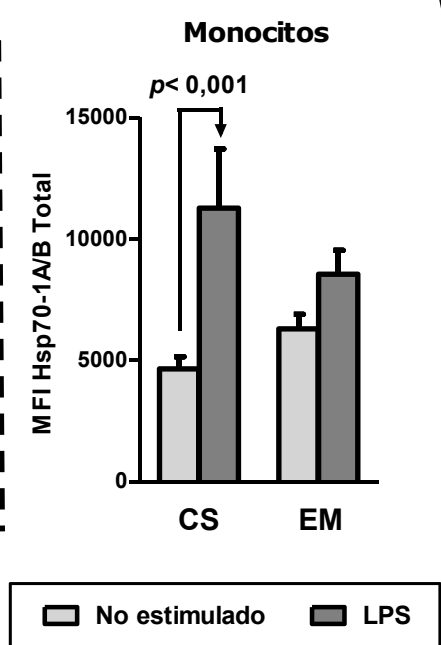
El estrés inflamatorio (estimulación con LPS) causó un aumento significativo de la expresión total de Hsp70-1A/B en los CS ( $p < 0,001$ ) pero este efecto no se observó en los pacientes con EM (Figura 20).

El análisis de la expresión citoplasmática de Hsp70-1A/B no mostró diferencias en la inducción de Hsp70-1A/B tras estrés térmico o inflamatorio ni en pacientes con EM ni en CS (datos no mostrados).

A.



B.



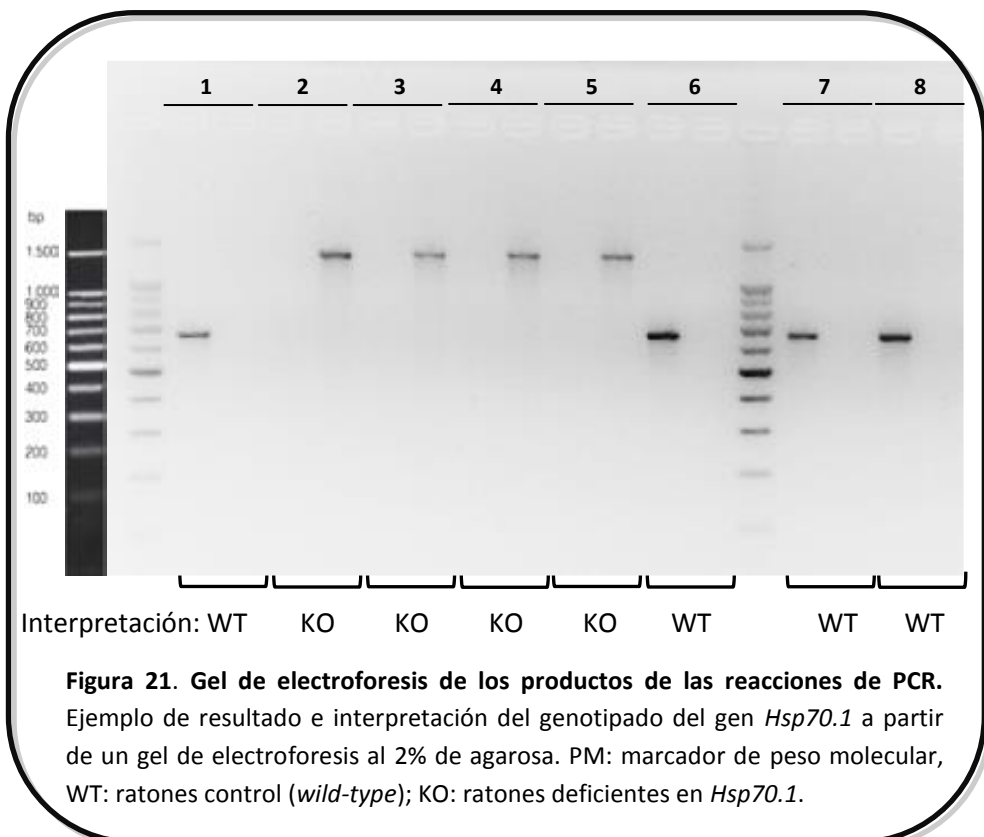
**Figura 20. Inducción de la expresión total de Hsp70-1A/B tras un estrés térmico o inflamatorio.** Representación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de Hsp70-1A/B total en linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y monocitos de pacientes con EM y CS basalmente y tras un estímulo térmico (HS) (A). Representación de la MFI de Hsp70-1A/B total en monocitos de pacientes con EM y CS basalmente y tras un estrés inflamatorio (LPD) (B). Las barras de error indican el SEM.

## PARTE II. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE Hsp70 *IN VITRO* Y EN UN MODELO ANIMAL DE EM

### 1. Genotipado de ratones WT y *Hsp70.1* KO

Con el objetivo de analizar la función de la Hsp70 inducible en la EM, utilizamos el modelo de EAE en ratones WT y *Hsp70.1* KO. Todos los ratones utilizados en estos estudios fueron genotipados antes de inducir la EAE.

Como se detalla en el apartado 2 de Material y Métodos, Parte II, tras obtener el DNA genómico de cada muestra, se realizaron dos reacciones de PCR convencional. En una reacción se utilizaban unos pares de *primers* que en el caso de los ratones WT amplificaban una región de 650pb y en la otra reacción se utilizaban unos pares de *primers* que en los ratones *Hsp70.1* KO amplificaban una región de 1250pb (Fig. 21).



**Figura 21. Gel de electroforesis de los productos de las reacciones de PCR.** Ejemplo de resultado e interpretación del genotipado del gen *Hsp70.1* a partir de un gel de electroforesis al 2% de agarosa. PM: marcador de peso molecular, WT: ratones control (*wild-type*); KO: ratones deficientes en *Hsp70.1*.

## Resultados

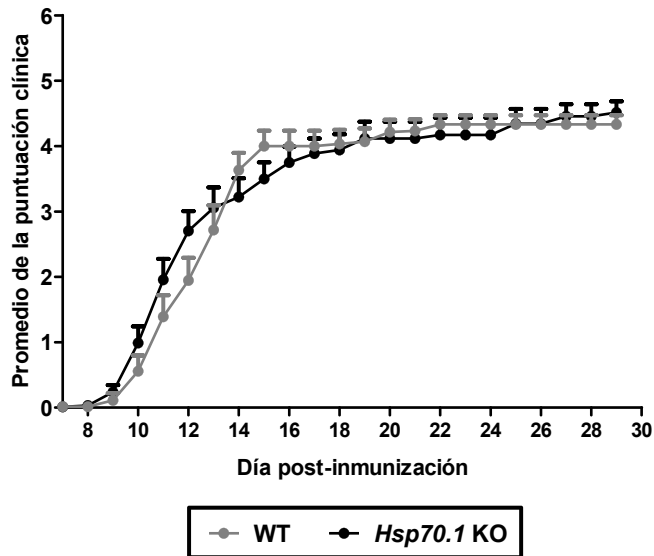
---

### 2. Los ratones deficientes en *Hsp70.1* presentan menor susceptibilidad a desarrollar EAE

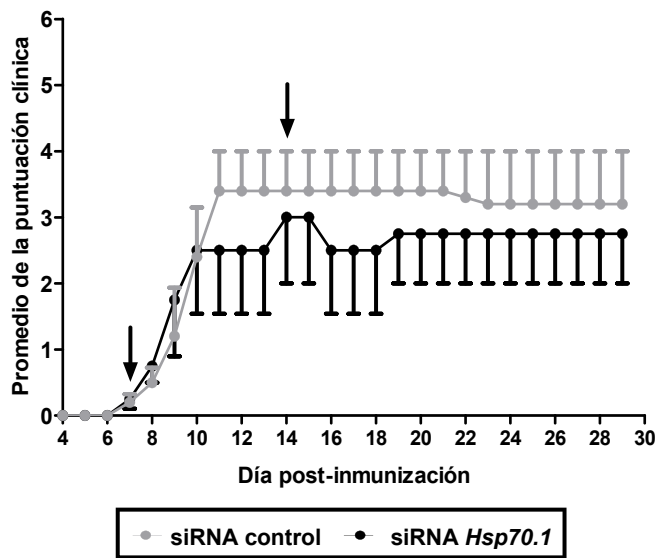
Para estudiar la función de la *Hsp70* en la patogenia de la EM utilizamos su modelo animal, la EAE, y comparamos variables clínicas, inmunológicas e histopatológicas de ratones WT y ratones deficientes en *Hsp70.1* (*Hsp70.1* KO). Para inducir la EAE inmunizamos con el péptido MOG<sub>35-55</sub> un total de 36 ratones WT y 51 ratones *Hsp70.1* KO (repartidos en 3 experimentos independientes). Los dos grupos de ratones desarrollaron el típico curso crónico no remitente que se observa en la cepa de ratones C57BL6/J inmunizados con el péptido MOG<sub>35-55</sub>. Sin embargo, los ratones *Hsp70.1* KO mostraron una disminución de la incidencia al desarrollo de la EAE (WT: 100% vs. KO: 86,3%,  $p= 0,038$ ). Esto conllevó a que se observara una reducción de la gravedad de la EAE de los ratones *Hsp70.1* KO durante la fase crónica de la enfermedad (del día 15 al 29 pi) en comparación con los ratones WT (puntuación clínica acumulada:  $51,79\pm 29,40$  vs.  $63,22\pm 12,70$ ,  $p= 0,029$ ) (Fig. 22 y Tabla 5). Sin embargo, los ratones *Hsp70.1* KO que sí desarrollaron EAE presentaron una gravedad clínica de la EAE similar a la de los ratones WT (datos no mostrados).

Los ratones *knockout* constitutivos pueden desarrollar efectos compensatorios que suplan la deficiencia de la molécula delecionada. Para comprobar los resultados obtenidos en los ratones *Hsp70.1* KO, se inmunizaron ratones WT con el péptido MOG<sub>35-55</sub> y, una vez comenzaron a ser visibles los primeros signos clínicos de EAE, se silenció la expresión de *Hsp70.1* administrando a los animales siRNA para *Hsp70.1*. De forma consistente con los resultados de los ratones *Hsp70.1* KO, los ratones tratados con siRNA-*Hsp70.1* presentaron una mejora en la progresión de la EAE en comparación con los ratones tratados con siRNA control (*non-targeting*), aunque estos resultados no alcanzaron la significación estadística, probablemente por el tamaño de los grupos estudiados (Fig 22 y tabla 5).

A.



B.



**Figura 22. Media de la puntuación clínica diaria de los ratones con EAE.** Representación de la media de la puntuación clínica diaria de ratones *Hsp70.1* KO (n= 51) y WT (n=36) (A) y de ratones tratados con siRNA para *Hsp70.1* o siRNA control (*non-targeting*) a día 7 y 14 pi (indicado con flechas) (B). Las barras de error indican el SEM.

## Resultados

**Tabla 5.** Datos clínicos de los ratones *Hsp70.1* KO y WT para la EAE, y de los ratones con EAE tratados con siRNA para *Hsp70.1* o control.

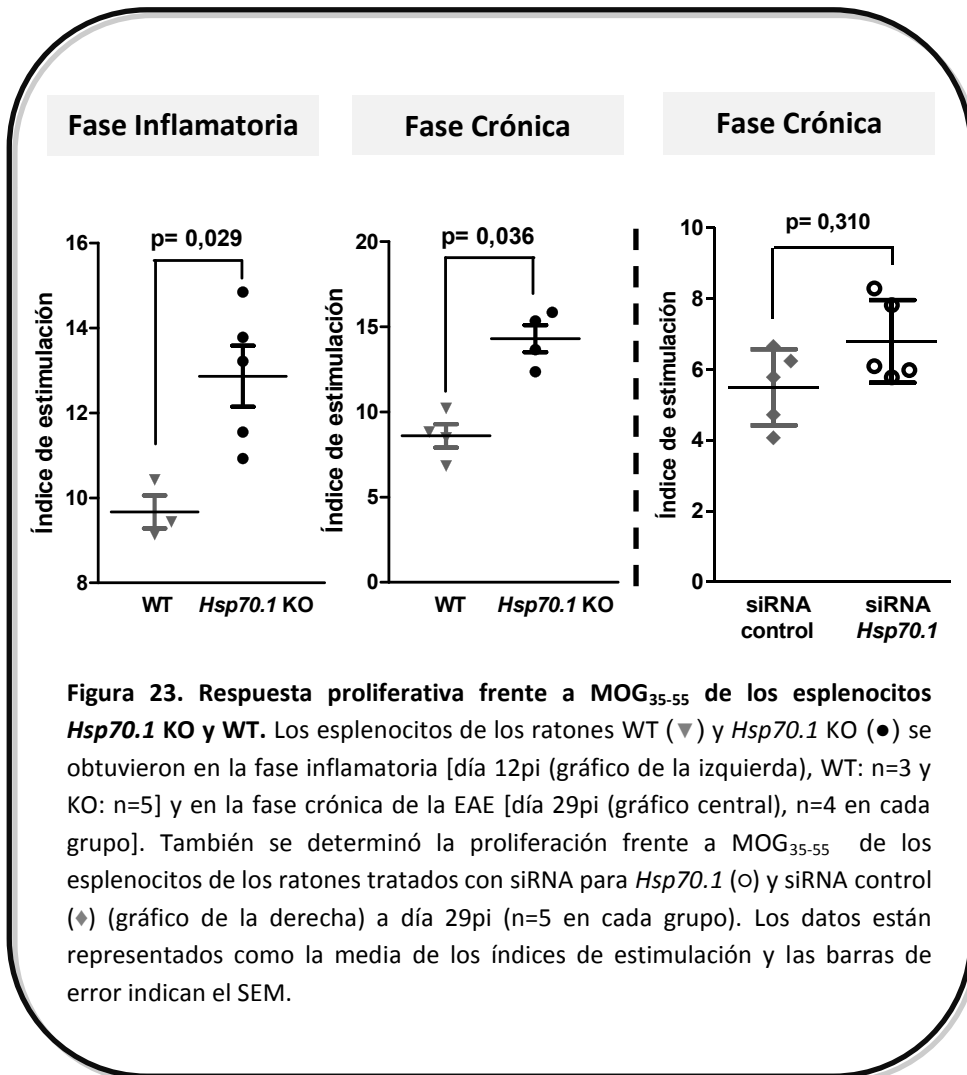
	WT	<i>Hsp70.1</i> KO	siRNA control	siRNA <i>Hsp70.1</i>
<b>Incidencia (%)</b>	36/36 (100%)	44/51 (86,3%)*	5/5 (100%)	4/5 (80,0%)
<b>Día de inicio de la EAE</b>	12,2±2,3	12,3±4,1	8,6±1,8	10,3±2,9
<b>Puntuación acumulada total</b>	72,6±19,2	61,6±36,1	67,4±31,4	45,2±39,6
<b>Puntuación acumulada en la fase crónica (del día 15- 29pi)</b>	63,2±12,7	51,8±29,4*	63,1±28,8	41,0±35,5
<b>Puntuación máxima</b>	4,3±0,8	3,8±1,9	3,4±1,3	2,8±1,8

Los resultados están expresados como media±DS. \* p<0,05.

### 3. Aumento de la respuesta antígeno específica en ratones deficientes en *Hsp70.1* con EAE

Para estudiar la función a nivel de sistema inmune de *Hsp70* en la EAE, se evaluó la capacidad proliferativa antígeno específica de los esplenocitos de los ratones deficientes en *Hsp70.1* en la fase inflamatoria (día 12 pi) y/o en la fase crónica (día 29 pi, final del seguimiento clínico) de la enfermedad. Contrariamente a lo que cabría esperar, los esplenocitos de los ratones *Hsp70.1* KO que desarrollaron EAE mostraron una elevada respuesta antígeno específica (frente a MOG<sub>35-55</sub>) en comparación con la de los esplenocitos WT, tanto en la fase inflamatoria (índice de estimulación: 14,31±1,60 vs. 8,60±1,39 p= 0,029) como en la fase crónica de la enfermedad (índice de estimulación: 12,87±1,61 vs. 9,67±0,68 p= 0,036) (Fig. 23). De forma consistente, los ratones WT que fueron tratados con siRNA para *Hsp70.1* también presentaron un aumento de la

respuesta específica frente a MOG<sub>35-55</sub> en la fase crónica de la enfermedad comparado con los ratones que recibieron el siRNA control. No obstante, estos resultados no alcanzaron la significación estadística (Fig. 23).



**Figura 23. Respuesta proliferativa frente a MOG<sub>35-55</sub> de los esplenocitos *Hsp70.1* KO y WT.** Los esplenocitos de los ratones WT (▼) y *Hsp70.1* KO (●) se obtuvieron en la fase inflamatoria [día 12pi (gráfico de la izquierda), WT: n=3 y KO: n=5] y en la fase crónica de la EAE [día 29pi (gráfico central), n=4 en cada grupo]. También se determinó la proliferación frente a MOG<sub>35-55</sub> de los esplenocitos de los ratones tratados con siRNA para *Hsp70.1* (○) y siRNA control (◆) (gráfico de la derecha) a día 29pi (n=5 en cada grupo). Los datos están representados como la media de los índices de estimulación y las barras de error indican el SEM.



## Resultados

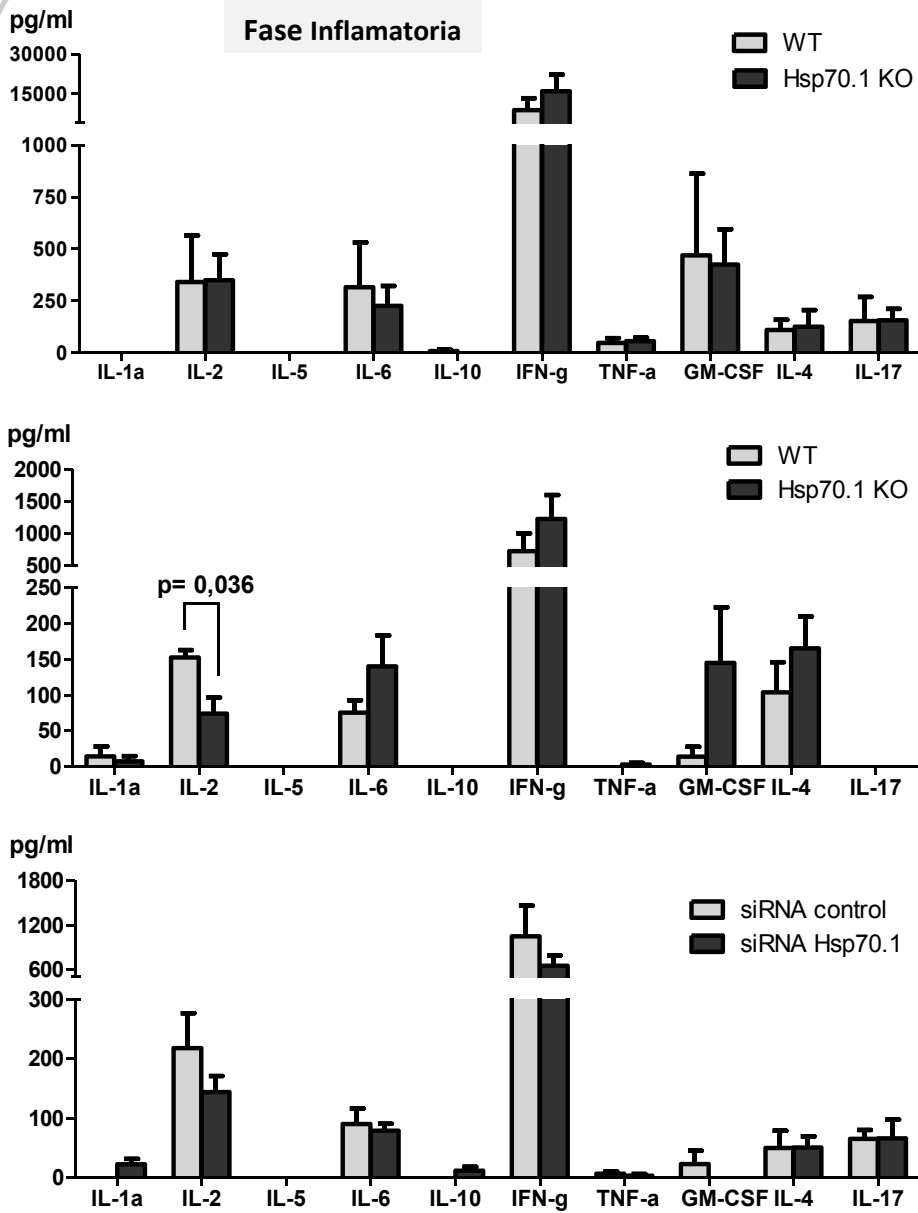
---

### **4. La deficiencia en *Hsp70.1* no modifica el perfil de secreción de citocinas**

Con la finalidad de hallar una asociación entre el aumento de la respuesta proliferativa antígeno específica con un determinado perfil de secreción de citocinas (Th1, Th2 o Th17) se cuantificaron las citocinas secretadas por los esplenocitos de los ratones *Hsp70.1* KO y WT durante la fase inflamatoria (día 12 pi) y la fase crónica (día 29 pi) de la enfermedad. A día 12 pi, no se observaron diferencias en los niveles de citocinas estudiadas entre los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones *Hsp70.1* KO y ratones control. A día 29 pi, tan solo se detectó una reducción de la secreción de IL-2 en los esplenocitos *Hsp70.1* KO en comparación con los WT ( $p=0,036$ ). Del mismo modo, no se observaron diferencias en los niveles de secreción de citocinas de los ratones que fueron tratados con siRNA para *Hsp70.1* o siRNA control (Fig. 24).

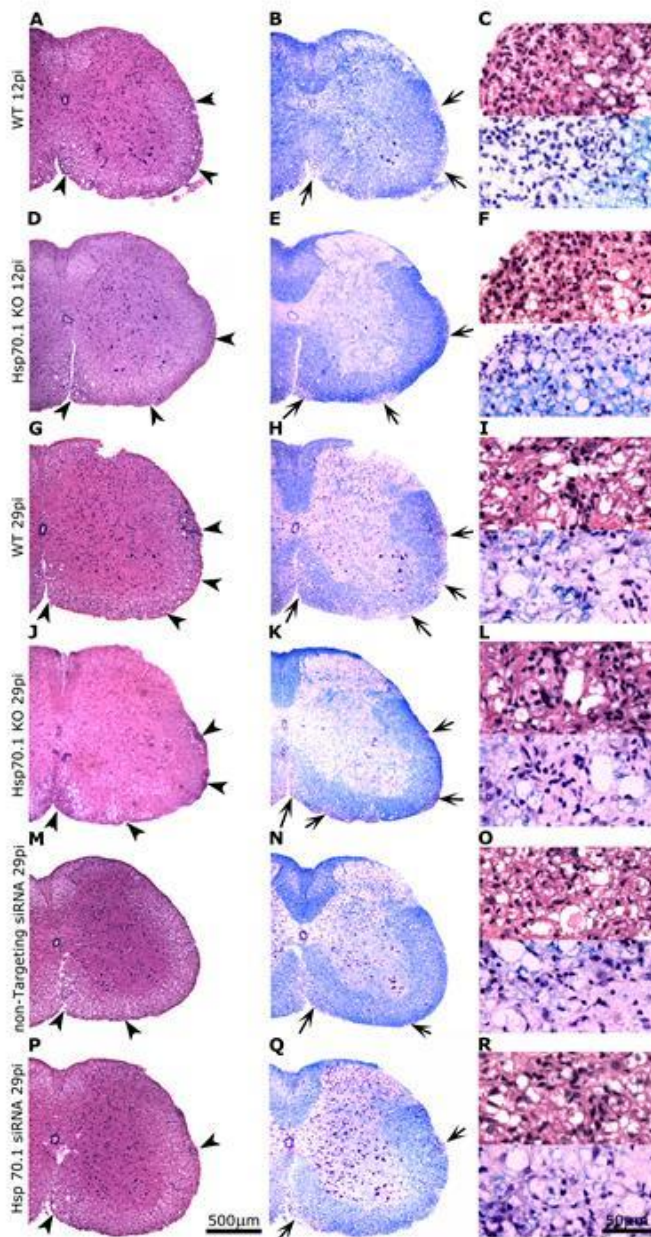
### **5. La deficiencia de *Hsp70.1* no modifica las alteraciones neuropatológicas de la EAE**

El estudio histopatológico de ratones deficientes en *Hsp70.1* y WT en la fase inflamatoria de la EAE (día 12 pi) reveló la presencia de infiltrados inflamatorios (formados por neutrófilos, linfocitos y algunos macrófagos) en la sustancia blanca de la médula espinal y el espacio subaranoideo del cerebro. También se observó una discreta desmielinización en la médula espinal. Por el contrario, en la fase crónica de la enfermedad (día 29 pi), el infiltrado inflamatorio (formado principalmente por linfocitos y macrófagos) y la desmielinización de la médula espinal fueron más extensos que durante la fase inflamatoria (día 12 pi). No obstante, no se observaron diferencias en el grado de inflamación ni desmielinización entre los ratones *Hsp70.1* KO y WT ni en la fase inflamatoria ni en la fase crónica (Fig. 25 y Fig. 26). Como era de esperar, los ratones *Hsp70.1* KO que no desarrollaron EAE no mostraron infiltrados inflamatorios o áreas de desmielinización en SNC (datos no mostrados). Por otra parte, los ratones con

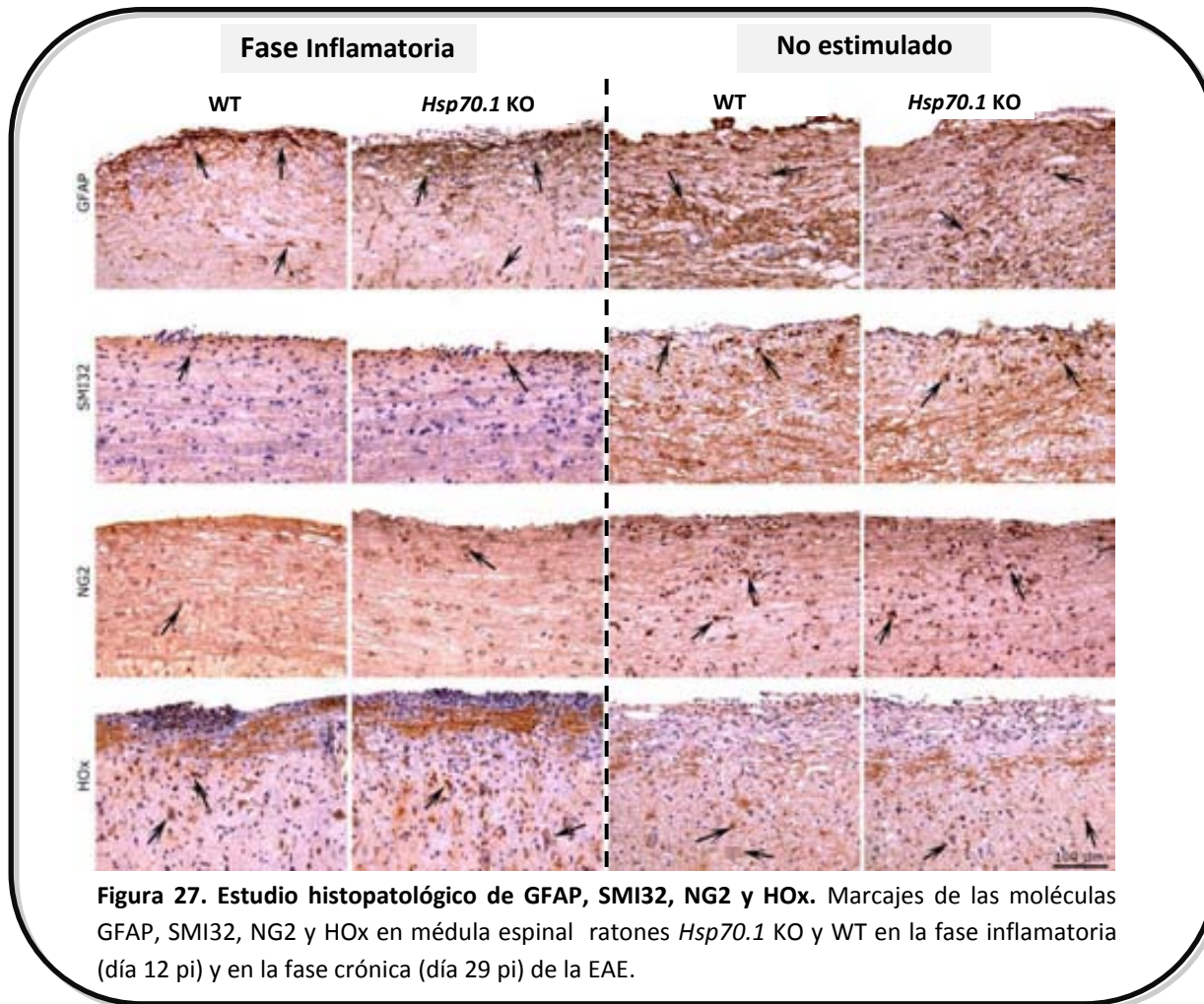


**Figura 24. Determinación del perfil de secreción de citocinas Th1/Th2/Th17.** Niveles de secreción de citocinas de esplenocitos *Hsp70.1* KO y WT estimulados con MOG<sub>35-55</sub> en la fase inflamatoria y en la fase crónica de la EAE (gráficos superior y central) y en esplenocitos de los ratones tratados con siRNA para *Hsp70.1* o siRNA control (gráfico inferior). Las barras de error indican el SEM.





**Figura 26. Estudio histopatológico de médula espinal en ratones *Hsp70.1* KO, WT y tratados con siRNA durante la fase inflamatoria (día 12 pi) y en la fase crónica (día 29 pi) de la EAE. Las tinciones con Hematoxilina-Eosina (HE) (A, D, G, J, M ,P) muestran infiltrados inflamatorios (flechas) y las tinciones de Klüver-Barrera (KB) (B, E, H, K, N, Q) muestran desmielinización (flechas). Las imágenes C, F, I, L, O y R corresponden a una ampliación de las áreas de inflamación y desmielinización.**



## 6. Modelo *in vitro* de inflamación en el SNC

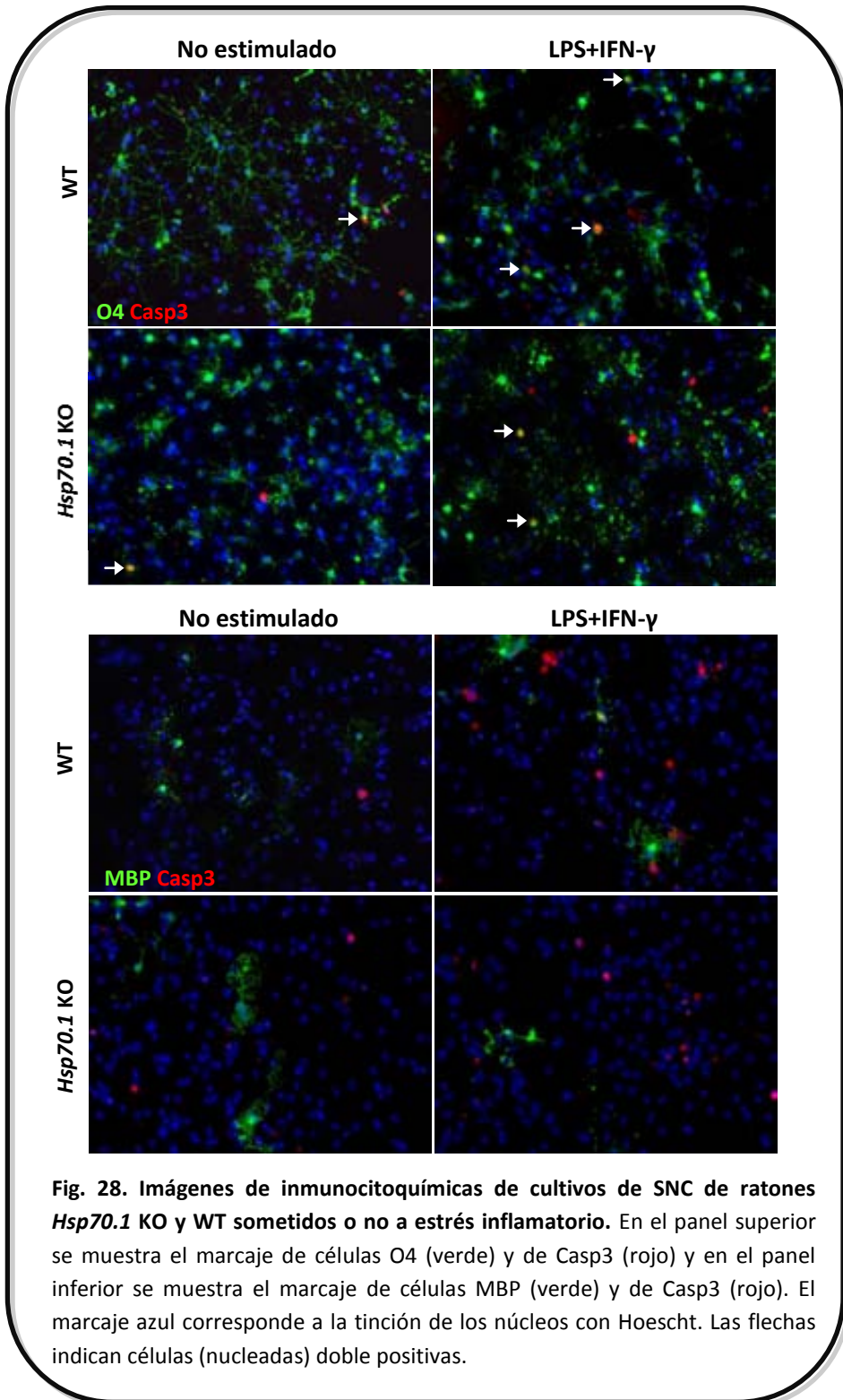
Tal como se describe en el apartado 8 de Material y Métodos, se obtuvo un cultivo mixto de células de SNC tanto de ratones *Hsp70.1* KO como de ratones WT formados por un 40,5% de neuronas, un 25,3% de oligodendrocitos [de los cuales un 20,9% eran células O4+ (OPCs) y un 4,4% eran células MBP+ (oligodendrocitos maduros)] y un 34,2% de astrocitos. No se detectó microglía intrínseca (células isolectina B4+) en los cultivos de SNC. Para determinar las condiciones óptimas para inducir apoptosis en el cultivo de células del SNC, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco que contenía diferentes cantidades de células microgliales y concentraciones crecientes de LPS e IFN- $\gamma$ . Tras analizar la inducción de apoptosis mediante la inmunodetección de Casp3 activada, se determinó que la adición de 16.000 células microgliales junto con 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS y 0,1  $\mu\text{g/ml}$  IFN- $\gamma$ , tras 24h de incubación, daba lugar a una inducción moderada de apoptosis comparado con cultivos a los que se les añadió únicamente 16.000 células gliales pero no LPS ni IFN- $\gamma$  para activarlas, los cuales raramente mostraban células apoptóticas (Tabla 6 y Fig. 28).

## Resultados

**Tabla 6.** Caracterización de los cultivos de células de SNC en condiciones basales (no estimulado) y tras el estímulo inflamatorio (LPS+IFN- $\gamma$ ).

		No estimulado	LPS+IFN- $\gamma$	<i>Fold change</i>
% Células O4+	WT	20,94 $\pm$ 0,09	15,87 $\pm$ 0,22	0,76 $\pm$ 0,01
	<i>Hsp70.1</i> KO	15,09 $\pm$ 5,43	10,09 $\pm$ 3,23	0,67 $\pm$ 0,03
% Células MBP+	WT	4,37 $\pm$ 0,75	2,85 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,13
	<i>Hsp70.1</i> KO	2,93 $\pm$ 0,13	1,15 $\pm$ 0,97	0,39 $\pm$ 0,32
% Células Casp3+	WT	1,80 $\pm$ 0,63	4,01 $\pm$ 1,66	2,51 $\pm$ 0,86
	<i>Hsp70.1</i> KO	2,31 $\pm$ 0,58	3,57 $\pm$ 0,63	1,60 $\pm$ 0,33
% Células O4+Casp3+	WT	0,51 $\pm$ 0,43	2,19 $\pm$ 0,28	6,45 $\pm$ 4,96
	<i>Hsp70.1</i> KO	0,97 $\pm$ 0,36	1,64 $\pm$ 0,58	1,70 $\pm$ 0,13

Porcentaje de células O4+, MBP+ y Casp3+ del total de células de los cultivos de células del SNC no estimulados o estimulados con LPS + IFN- $\gamma$ . El cambio inducido por el estímulo inflamatorio de cada población se calculó respecto de cultivos no estimulados. Los resultados están expresados como media $\pm$ DE.



**Fig. 28.** Imágenes de inmunocitoquímicas de cultivos de SNC de ratones *Hsp70.1* KO y WT sometidos o no a estrés inflamatorio. En el panel superior se muestra el marcaje de células O4 (verde) y de Casp3 (rojo) y en el panel inferior se muestra el marcaje de células MBP (verde) y de Casp3 (rojo). El marcaje azul corresponde a la tinción de los núcleos con Hoescht. Las flechas indican células (nucleadas) doble positivas.



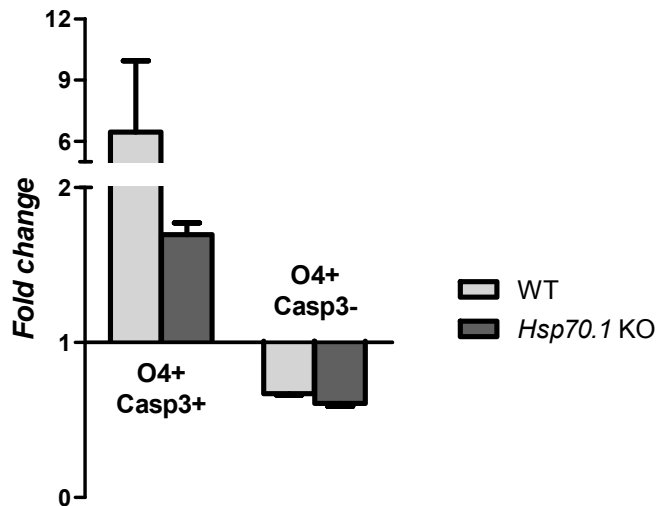
## Resultados

---

### 7. Efecto del estímulo inflamatorio en los cultivos de células del SNC

Tal como se muestra en la tabla 6, tras la adición del estímulo inflamatorio se observó un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas (células Casp3+) tanto en los cultivos de células del SNC de ratones *Hsp70.1* KO ( $p < 0.001$ ) como en los de animales WT ( $p = 0,025$ ). Entre las células apoptóticas, las OPC (células O4+) resultaron las más afectadas por el insulto inflamatorio en ambos tipos de cultivo, *Hsp70.1* KO y WT. No se detectaron oligodendrocitos maduros apoptóticos (células MBP+ Casp3+) ni tampoco se observaron neuronas apoptóticas (células NeuN+ Casp3+) (datos no mostrados). Por lo tanto, los datos sugieren que las OPC son susceptibles a la inducción de la apoptosis en nuestro modelo de neuroinflamación *in vitro*.

Para analizar la función citoprotectora de la Hsp70 se estudió la vulnerabilidad a la apoptosis de las OPC frente al estímulo inflamatorio en los cultivos de células de SNC *Hsp70.1* KO y WT. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de células OPC apoptóticas (células O4+ Casp3+) entre las células deficientes en *Hsp70.1* y las células WT (Tabla 6, Fig. 29). Estos datos sugieren que la ausencia de Hsp70 no altera la susceptibilidad de las OPC (células O4+) frente a la inducción de apoptosis mediada por la inflamación.



**Figura 29. Susceptibilidad de las células precursoras de oligodendrocitos a la apoptosis inducida por un estrés inflamatorio.** Análisis de la expresión de Casp3 en las células O4+ tras un estrés inflamatorio. El *fold change* de células O4+ apoptóticas (Casp3+) y viables (Casp3-) fue similar en los cultivos de SNC WT y *Hsp70.1* KO tras 24h. de estimulación con LPS + IFN- $\gamma$ . Las barras de error indican el SEM.



## Discusión

---

Tradicionalmente, se ha descrito que la familia de las HSP70 son proteínas citoprotectoras debido a su función como chaperonas participando en el correcto plegamiento de las proteínas, en la eliminación de proteínas mal plegadas y evitando la formación de agregados proteicos [168-170]. Por esta razón, las HSP70, y especialmente la forma inducible (o Hsp70), tienen un papel fundamental en situaciones de estrés celular para recuperar la homeostasis de la célula. Por otra parte, también se ha descrito que la Hsp70 es capaz de proteger las células mediante el bloqueo de múltiples puntos de la vía de la apoptosis [188-191].

Curiosamente, los genes que codifican la Hsp70 inducible (*HSPA1A* y *HSPA1B*) se localizan muy próximos a la región del MHC II, la cual está asociada a un mayor riesgo de padecer EM [282], indicando que quizás la Hsp70 podría estar relacionada con la respuesta inmunológica alterada que tiene lugar en la EM. En el contexto de la EM, los estudios histopatológicos han mostrado un aumento de la expresión de Hsp70 en las lesiones en el SNC de pacientes con EM [207-209], hecho que se ha interpretado como una respuesta citoprotectora de las células locales frente al ambiente inflamatorio [214]. Por el contrario, los estudios realizados con células de sangre periférica han demostrado una disminución en la expresión de uno de los genes inducibles de Hsp70, *HSPA1A*, en pacientes con EM en comparación con los CS [263,264,291].

Durante los últimos años la función de la Hsp70 ha sido ampliamente estudiada en diferentes contextos patológicos y ahora se sabe que esta proteína tiene muchas otras funciones a parte de la citoprotectora. Entre estas funciones, se ha descrito que la Hsp70 puede actuar como adyuvante y promover la presentación de complejos Hsp70-auto-antígeno así como inducir respuestas inmunológicas innatas y adaptativas (revisado en [281]). En el caso de la EM se ha descrito la presencia de complejos Hsp70-MBP o Hsp70-PLP en SNC [263].

## Discusión

---

Teniendo en cuenta el importante papel fisiológico y patológico de Hsp70 y los resultados de estudios previos sobre la expresión proteica de Hsp70 en SNC de pacientes con EM y ratones con EAE [176-178,182,183], nos planteamos estudiar la expresión génica de *HSPA1A* en PBMC, mediante PCR a tiempo real, y la expresión proteica, mediante citometría de flujo.

De forma sorpresiva, contrariamente a lo descrito en estudios previos [14–16], encontramos que la expresión génica de *HSPA1A* estaba aumentada de forma significativa en las PBMC de pacientes con EM comparada con la expresión en las PBMC de CS. En los estudios previos habían utilizado tanto células frescas como criopreservadas, en cambio nosotros únicamente habíamos utilizado PBMC frescas. Ya que la Hsp70 se puede inducir tras diferentes tipos de estrés celular, quisimos descartar que la discrepancia entre nuestros resultados y los previos se debiera a esto. No obstante, comprobamos que no había diferencias en la expresión génica de *HSPA1A* tras la criopreservación en nitrógeno líquido respecto de esas mismas muestras analizadas *ex vivo*. Sin embargo, existen otras justificaciones que podrían explicar estos resultados contradictorios:

La técnica utilizada: los trabajos previos en los que se había descrito una mayor expresión de *HSPA1A* en pacientes con EM habían realizado los estudios de expresión génica mediante *microarrays*. Esta técnica de alto rendimiento se utiliza para hacer una búsqueda de diferencias en la expresión de un número elevado de genes realizando por lo tanto, múltiples comparaciones. Por el contrario, en nuestro trabajo hemos utilizado la técnica de PCR a tiempo real, la cual permite analizar la expresión de un único gen en la misma muestra, pero de forma mucho más sensible y robusta. En consecuencia, está establecido que los resultados obtenidos con *microarrays* deben validarse posteriormente mediante otras técnicas más sensibles como la PCR a tiempo real. No obstante, en ninguno de los estudios previos con *microarrays* se realizó dicha validación.

Características clínicas de la muestra: como se ha comentado, la patogenia de la EM es compleja y varía durante la progresión de la enfermedad. De esta forma se ha descrito que las formas de EMRR están caracterizadas por un elevado componente inflamatorio y respuestas inmunes adaptativas, mientras que las formas progresivas, EMPP y EMSP, tienen un mayor componente neurodegenerativo mediado principalmente por respuestas innatas. En consecuencia, decidimos seleccionar el tipo de muestras para realizar nuestro estudio de forma que fuesen lo más homogéneas posible. Sin embargo, la selección de muestras es un paso poco habitual en los estudios de *microarrays* y ello puede ser un motivo de variabilidad en los resultados.

Los criterios de selección de muestras en nuestro estudio fueron los siguientes:

1. Pacientes con EM clínicamente activa y que por lo tanto, que fuesen a iniciar un tratamiento inmunomodulador. Estos pacientes presentarán una activación de las células inmunes (PBMC) que podría estar relacionada con el aumento de la expresión de *HSPA1A*, lo que podría justificar las diferencias observadas con los estudios previos.
2. Pacientes que nunca hubiesen recibido tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor. Por el contrario, muchos estudios de *microarrays* pueden incluir muestras de pacientes que hayan tenido un periodo de descanso de 1-2 meses sin tratamiento.

El siguiente paso, muy importante, era examinar si el aumento de la expresión génica de *HSPA1A* en pacientes con EM se correlacionaba con un aumento de la expresión proteica. Inicialmente estudiamos la expresión citoplasmática de Hsp70-1A/B, sin hallar diferencias entre pacientes con EM y CS. No obstante, debido a que Hsp70 se transloca a núcleo tras un estrés celular [177], posteriormente nos planteamos cuantificar la expresión celular total (citoplasmática + nuclear) de Hsp70-1A/B. En concordancia con los resultados

## Discusión

---

de expresión génica, los niveles de expresión proteica de Hsp70-1A/B totales estaban significativamente aumentados en los linfocitos T y los monocitos de los pacientes con EM en comparación con los de CS.

A pesar de que la causa de la EM es aún desconocida, muchos estudios indican que las células T CD4+, pero también las células T CD8+ y los monocitos/macrófagos, juegan un papel relevante en la patogenia de la EM [35]. En este sentido, el aumento de la expresión proteica de Hsp70-1A/B en las PBMC podría estar causado por el estrés asociado con la activación de la respuesta inmunológica que tiene lugar en la EM (revisado en [35,36]). En un trabajo publicado en 2010 por Cwiklinska y colaboradores, analizaron la expresión proteica basal de Hsp70 en PBMC de pacientes con EM y CS utilizando un kit de ELISA comercial. Aunque no hallaron diferencias en la expresión basal de Hsp70 entre pacientes de EM y CS, sí que detectaron que las PBMC de los pacientes con EM presentaban una mayor inducción de la expresión de Hsp70 tras un estímulo inflamatorio o de estrés térmico respecto a la inducción observada en las PBMC de los CS [274]. Utilizando un protocolo similar al descrito por los autores de la publicación, analizamos la inducción de la expresión de Hsp70-1A/B en los linfocitos T y los monocitos tras ser sometidos a un estrés térmico o inflamatorio (con LPS). El estrés térmico produjo una inducción significativa de la expresión proteica de Hsp70-1A/B en los linfocitos T CD4+ de los CS, alcanzando un nivel de expresión similar al observado de forma basal en los linfocitos T CD4+ de los pacientes con EM. Sin embargo, en los pacientes con EM la inducción de Hsp70-1A/B tras estrés térmico en los linfocitos T CD4+ fue moderada en comparación con la de los CS, probablemente por tener un nivel basal de Hsp70-1A/B mucho más elevado. Estos resultados parecen indicar que la expresión de Hsp70-1A/B está crónicamente inducida en las células T CD4+ de los pacientes con EM y, por consiguiente, el estrés térmico no logra producir una inducción significativa de

la misma. Curiosamente, observamos que la expresión total de Hsp70-1A/B en monocitos sometidos a estrés térmico se correlaciona con el número de lesiones basales en T2. La explicación a este hallazgo puede estar relacionada con el hecho de que los monocitos/macrófagos forman parte de los infiltrados inflamatorios presentes en el SNC de pacientes con EM y que el número de lesiones en T2 es un parámetro radiológico que se utiliza habitualmente para cuantificar la carga lesional en EM. Por otra parte, también examinamos las diferencias de expresión de Hsp70-1A/B en las PBMC estimuladas con LPS. Este estímulo activa principalmente a las células presentadoras de antígeno, entre ellas los monocitos, causando una inducción de la expresión total de Hsp70-1A/B en pacientes con EM y CS [274,311,312]. No obstante, nosotros observamos que el LPS indujo significativamente la expresión de Hsp70-1A/B en los monocitos de los CS, sin embargo, aunque se observó un ligero aumento de la expresión de Hsp70-1A/B en los monocitos de pacientes con EM, tras el estímulo con LPS, esta no fue significativa y mucho menor a la observada en los CS. Aunque no hemos estudiado los posibles mecanismos que expliquen esta inducción diferencial de la expresión de Hsp70-1A/B entre pacientes con EM y CS tras el estímulo inflamatorio, sería razonable pensar que el elevado nivel basal de expresión de Hsp70-1A/B en los monocitos, causado posiblemente por la activación de la respuesta inmune en los pacientes con EM, provoque que los monocitos presenten una respuesta menos efectiva (y por lo tanto menor inducción de Hsp70-1A/B) frente a un nuevo estímulo inmunológico como el LPS, tal como hemos observado en los linfocitos T CD4+ tras el estrés térmico. Otros factores como la menor expresión de TLR4, receptor del LPS, descrita en los monocitos de los pacientes con EM también podría contribuir en la diferencia en la inducción de Hsp70-1A/B entre los pacientes con EM y los CS [313].



## Discusión

---

A continuación, tras observar un aumento de la expresión basal de Hsp70 tanto a nivel de expresión génica como proteica en los pacientes con EM respecto a los CS y que podría estar relacionado con la activación del sistema inmunológico en los pacientes de EM, nos planteamos estudiar la función de esta proteína en la patogenia de la EM utilizando para ello un modelo animal, la EAE.

Hemos comparado el curso clínico, la respuesta inmunológica y la histopatología de ratones deficientes en *Hsp70.1* y ratones WT a los que se les ha inducido la EAE con MOG<sub>35-55</sub>. A nivel clínico, hemos observado que los ratones *Hsp70.1* KO son más resistentes a la inducción de la EAE que los ratones WT. No obstante, los animales *Hsp70.1* KO que sí desarrollaban EAE mostraron un curso clínico y una gravedad de la enfermedad similar a la del grupo control. Histopatológicamente, los ratones deficientes en Hsp70 que sí desarrollaron EAE no mostraron diferencias con los WT. Estos resultados parecen indicar que Hsp70 juega un papel muy importante aunque no decisivo en la aparición de la enfermedad en los ratones. En cambio, una vez se inicia la enfermedad, la deficiencia en Hsp70 no afecta ni clínica ni histopatológicamente a los ratones con EAE. Estos hallazgos son parcialmente consistentes con el estudio realizado por Mycko y colaboradores, en el cual observan que los ratones *Hsp70.1* KO desarrollan una forma menos severa de la EAE aunque son igual de susceptibles que los WT. Las diferencias en el protocolo de inducción de EAE podrían estar relacionadas con las diferencias clínicas así mismo como el mantenimiento de ambas colonias en lugares físicos diferentes [314]. No obstante, de forma coherente con nuestros resultados, estos autores demuestran que la transferencia pasiva de la EAE con linfocitos deficientes en *Hsp70.1* que han sido re-estimulados de forma antígeno específica, con MOG, o de forma inespecífica, con un estímulo policlonal, no consigue inducir la EAE en ratones C57BL/6 WT [268].

La tecnología de los ratones *knockout* es una herramienta muy útil para investigar la función de genes no esenciales durante la embriogénesis o el desarrollo del animal. No obstante, en algunas situaciones los ratones *knockout* pueden desarrollar mecanismos compensatorios para suplir dicha deficiencia genética [315]. Uno de los mecanismos compensatorios más habitual es la sobre-expresión de un gen o genes con la misma función o una función similar. La forma inducible de la Hsp70 está codificada por los genes *Hsp70.1* y *Hsp70.3*, pero se sabe que la delección del gen *Hsp70.1* es suficiente para eliminar la expresión de Hsp70 inducible en ratón [316]. Por lo tanto, ya que Hsp70 es una proteína relevante para la homeostasis celular en una situación de estrés, es posible que los ratones *Hsp70.1* KO desarrollen mecanismos compensatorios que enmascaren la función de Hsp70 en la EAE. Por este motivo, se realizó un experimento utilizando la tecnología de los siRNA para disminuir la expresión de *Hsp70.1* de forma puntual. Tras inducir la EAE en ratones WT y una vez empezaron a ser evidentes los primeros signos clínicos de la enfermedad, los animales se aleatorizaron en dos grupos y fueron tratados con siRNA específico para *Hsp70.1* o siRNA control (*non-targeting*). Debido a que el silenciamiento utilizando siRNA es transitorio, los animales recibieron una segunda dosis de siRNA una semana después de la primera administración. En comparación con el grupo de ratones tratados con siRNA control, los ratones a los que se les disminuyó la expresión de *Hsp70.1* mostraron un curso clínico de EAE menos severo e incluso, el tratamiento con siRNA de *Hsp70.1* consiguió frenar la aparición de signos clínicos en uno de los ratones.

Los resultados de los estudios en el modelo animal concuerdan con los hallazgos obtenidos en estudio de la expresión génica y proteica de Hsp70 en las PBMC de pacientes con EM. Como ya se ha comentado, el aumento de la expresión basal de Hsp70, tanto a nivel génico como proteico, en las PBMC de los pacientes con EM en comparación con los CS parece reflejar o ser consecuencia del estado de

## Discusión

---

activación crónica de la respuesta inmunológica que tiene lugar en la EM. Los experimentos en el modelo de la EAE nos han permitido confirmar la función relevante de Hsp70 en la inducción/desarrollo de la respuesta inmunológica ya que los animales que son deficientes en Hsp70 son menos susceptibles a la EAE o desarrollan una forma más leve de la enfermedad.

En relación con la función inmunológica de Hsp70, en la última década, diferentes estudios han demostrado que la Hsp70 puede liberarse al medio extracelular y actuar como un mediador pro-inflamatorio, induciendo de tal manera respuestas inmunológicas innatas por vía de los receptores *Toll-like* (TLR)2, TLR4 y de CD14 [240,249,251]. Por otra parte, la Hsp70 extracelular también puede actuar como adyuvante de proteínas y péptidos y promover respuestas inmunológicas adaptativas antígeno específicas. En este sentido, se han hallado complejos de Hsp70 y MOG o MBP en las lesiones de los pacientes con EM y complejos de Hsp70 y MOG o PLP en el SNC de ratones con EAE [262-264]. Contrariamente a lo que cabría esperar, los esplenocitos de los ratones deficientes en *Hsp70.1* no solo eran capaces de inducir una respuesta proliferativa antígeno específica, sino que además presentaban una respuesta MOG-específica incrementada en comparación con los esplenocitos de los ratones WT, tanto durante la fase inflamatoria como durante la fase crónica de la enfermedad. No obstante, el aumento esta respuesta proliferativa no se correspondía con un aumento en la producción de citocinas ni en la fase inflamatoria ni en la fase crónica de la EAE. Únicamente se observó una reducción de la producción de IL-2 en los esplenocitos *Hsp70.1* KO comparado con los de ratones WT, relacionado probablemente con su consumo a causa del aumento de la proliferación celular observada en los ratones *Hsp70.1* KO. Estos resultados fueron confirmados en los animales a los que se les silenció la expresión de *Hsp70.1* mediante la administración de siRNA. Por lo tanto, los datos parecen indicar que únicamente los animales que consiguen una

respuesta aumentada frente a MOG, logran un nivel de producción de citocinas suficiente para generar un ambiente inflamatorio adecuado para desarrollar la EAE. Por su parte, Mycko y colaboradores demostraron que los linfocitos T CD4+ deficientes en *Hsp70.1* eran más susceptibles a la apoptosis tras estimularse con anti-CD3 [268], lo cual podría corroborar nuestra hipótesis de que los ratones *Hsp70.1* KO necesitan un mayor número de células T antígeno específicas que los ratones WT para lograr inducir una respuesta inmunológica efectiva frente a los antígenos mielínicos.

Aunque nuestros resultados son consistentes y sugieren que el elevado nivel de expresión basal de Hsp70 en los linfocitos y monocitos de los pacientes con EM participa en la inducción de una respuesta (auto)inmune eficiente, no obstante, de forma sorprendente, unos estudios basados en la utilización de un compuesto llamado triptolide han logrado mejorar los signos clínicos de ratones con EAE mediante el aumento de la expresión de Hsp70 [301-303]. Dicha mejoría clínica se relacionó con un aumento de la expresión de Hsp70, la inhibición de la proliferación linfocitaria y la disminución de la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el triptoline posee una elevada toxicidad relacionada con la generación de especies reactivas del oxígeno, causando un elevado nivel de estrés oxidativo, una disfunción mitocondrial y, consecuentemente, la inducción de la apoptosis celular [317,318]. Estos datos sugieren que la inducción de Hsp70 y la inhibición de la respuesta inmune observada en el tratamiento de ratones con EAE estarían relacionadas con el estrés oxidativo y la inducción de apoptosis, respectivamente; siendo de este modo un efecto de la toxicidad del compuesto y no la causa de la mejoría en los animales.

Por otra parte, las HSP, incluyendo Hsp70, se han definido clásicamente como proteínas relacionadas con el correcto plegamiento proteico y funciones citoprotectoras en situaciones de estrés celular [168-171,176-178]. De esta

## Discusión

---

manera, se ha descrito que la sobre-expresión de Hsp70 en cultivos de neuronas y en modelos animales de algunas enfermedades neurodegenerativas ha tenido un efecto beneficioso reduciendo la cantidad de agregados de proteínas anómalas tales como de péptidos amiloides [192,193], de la proteína tau [194], de la huntintina [195] y de la formación de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína [196]. En la EM, la aparición de los signos clínicos está causada por el daño o deterioro del tejido del SNC, razón por la cual decidimos evaluar si la Hsp70 podría ejercer un papel beneficioso protegiendo las células del SNC frente al estrés inflamatorio. Con el objetivo de estudiar la función citoprotectora de la Hsp70 en el SNC evitando la influencia de la respuesta inmunológica que tiene lugar en el modelo de la EAE, generamos un modelo *in vitro* de estrés inflamatorio en un cultivo mixto de células del SNC. Los cultivos de células de SNC deficientes en Hsp70 no presentaron mayor vulnerabilidad a la inducción de apoptosis en las OPC (células O4+) en condiciones de estrés inflamatorio en comparación con los cultivos de células de SNC WT. De forma consistente, cuando se realizaron los estudios histopatológicos en ratones deficientes en Hsp70 que desarrollaron EAE, tanto los ratones *Hsp70.1* KO como los ratones tratados con siRNA de *Hsp70.1*, no presentaron alteración ni en el número de células NG2 (OPC) ni un aumento de la desmielinización. Además, el daño axonal y la astrogliosis también fueron comparables con los observados en los ratones WT o tratados con siRNA control.

En resumen, podemos concluir que los resultados del presente estudio sobre la caracterización de la expresión de la Hsp70 en PBMC de pacientes con EM y los resultados obtenidos con el modelo animal de la EAE y el modelo *in vitro* de estrés inflamatorio en células del SNC, indican que la Hsp70 tiene una función relevante, aunque no decisiva, en la respuesta inmunológica que acontece en la EM y en la EAE. De este modo, los resultados sugieren que la activación de la respuesta inmune que tiene lugar en los pacientes con EM y en la EAE provoca

la inducción de la expresión de Hsp70, la cual participaría en la correcta activación de los linfocitos para generar un ambiente pro-inflamatorio adecuado para el desarrollo de la EAE. En consecuencia, terapias específicas que disminuyan la expresión de la Hsp70 podrían ser una estrategia prometedora para reducir o controlar la respuesta autoinmune en los pacientes con EM ya que su déficit no ha demostrado tener un efecto negativo sobre su posible función citoprotectora a nivel de SNC.



## **Conclusiones**

---

# CONCLUSIONES

## **PARTE I. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE Hsp70 EN PACIENTES CON EM Y CONTROLES SANOS**

1. La expresión de Hsp70 se encuentra aumentada de forma basal en pacientes con EM activa comparado con CS, tanto a nivel de expresión génica (en las PBMC) como a nivel proteico (en los linfocitos T CD4+, CD8+ y los monocitos).
2. El elevado nivel de expresión basal de Hsp70 en pacientes con EM provoca que la inducción de la expresión de esta proteína en los linfocitos T CD4+ y los monocitos tras un estrés térmico o inflamatorio, respectivamente, sea menor que el observado en CS; indicando que estas células presentan de forma basal un estado de activación crónica que podría ser el resultado de la respuesta inmunológica que está teniendo lugar en los pacientes con EM.

## **PARTE II. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE Hsp70 *IN VITRO* Y EN UN MODELO ANIMAL DE EM**

3. La Hsp70 tiene una función clave aunque no decisiva en el desarrollo de respuesta inmunológica en la EAE ya que los ratones *Hsp70.1* KO son menos susceptible al desarrollo de la enfermedad y los ratones tratados con siRNA de *Hsp70.1* muestran un curso clínico más leve.
4. La Hsp70 participa promoviendo una respuesta auto-reactiva eficiente en los ratones con EAE. De este modo, los ratones capaces inducir una respuesta antígeno específica aumentada consiguen unos niveles de producción de citocinas inflamatorias similares a de los ratones WT y desarrollan la EAE.



5. La Hsp70 no ejerce funciones citoprotectoras relevantes en la EAE ya que los animales *Hsp70.1* KO no presentan un mayor grado de desmielinización o daño axonal comparado con los ratones WT. Además, los estudios en cultivos de células del SNC deficientes en *Hsp70.1* tampoco mostraron mayor vulnerabilidad que las células WT frente a un estímulo inflamatorio.



## Referencias

---

## REFERENCIAS

1. Fundació Esclerosi Múltiple, Observatorio Esclerosi Múltiple. <http://observatorioesclerosismultiple.com> Citado 2014.
2. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 2014; **83**: 278-286.
3. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol* 2012; **11**: 157-169.
4. Comabella M, Khoury SJ Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2012; **142**: 2-8.
5. Renz H, von Mutius E, Brandtzaeg P, Cookson WO, Autenrieth IB, et al. Gene-environment interactions in chronic inflammatory disease. *Nat Immunol* 2011; **12**: 273-277.
6. Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, Gusella JF, Kim DJ, et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat Genet* 1996; **13**: 469-471.
7. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dyment DA, et al. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2005; **37**: 1108-1112.
8. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; **357**: 851-862.
9. Goris A, Pauwels I, Dubois B Progress in multiple sclerosis genetics. *Curr Genomics* 2012; **13**: 646-663.
10. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011; **476**: 214-219.
11. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol* 2008; **194**: 7-17.
12. Lindberg C, Andersen O, Vahlne A, Dalton M, Runmarker B Epidemiological investigation of the association between infectious mononucleosis and multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 1991; **10**: 62-65.
13. Haahr S, Hollsberg P Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Virol* 2006; **16**: 297-310.
14. Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, et al. Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS)

- exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol* 2002; **8**: 250-256.
15. Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'Ambrosia J M, et al. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis* 2003; **187**: 1377-1387.
  16. Sotgiu S, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study. *Neurology* 2002; **59**: 1071-1073.
  17. Eaton WW, Rose NR, Kalaydjian A, Pedersen MG, Mortensen PB Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. *J Autoimmun* 2007; **29**: 1-9.
  18. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol* 2014.
  19. Pelfrey CM, Coteleur AC, Lee JC, Rudick RA Sex differences in cytokine responses to myelin peptides in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002; **130**: 211-223.
  20. Greer JM, Csurhes PA, Pender MP, McCombe PA Effect of gender on T-cell proliferative responses to myelin proteolipid protein antigens in patients with multiple sclerosis and controls. *J Autoimmun* 2004; **22**: 345-352.
  21. Confavreux C, Hutchinson M, Hours M, Cortinavis-Tourniaire P, Grimaud J, et al. [Multiple sclerosis and pregnancy: clinical issues]. *Rev Neurol (Paris)* 1999; **155**: 186-191.
  22. Marrie RA Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 2004; **3**: 709-718.
  23. Mohr DC, Lovera J, Brown T, Cohen B, Neylan T, et al. A randomized trial of stress management for the prevention of new brain lesions in MS. *Neurology* 2012; **79**: 412-419.
  24. O'Gorman C, Bukhari W, Todd A, Freeman S, Broadley SA Smoking increases the risk of multiple sclerosis in Queensland, Australia. *J Clin Neurosci* 2014.
  25. O'Gorman C, Broadley SA Smoking and multiple sclerosis: evidence for latitudinal and temporal variation. *J Neurol* 2014.
  26. Schmidt S Candidate autoantigens in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999; **5**: 147-160.
  27. Acarin N, Rio J, Fernandez AL, Tintore M, Duran I, et al. Different antiganglioside antibody pattern between relapsing-remitting and progressive multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1996; **93**: 99-103.

28. Sadatipour BT, Greer JM, Pender MP Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998; **44**: 980-983.
29. Kojima K, Berger T, Lassmann H, Hinze-Selch D, Zhang Y, et al. Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med* 1994; **180**: 817-829.
30. van Noort JM, van Sechel AC, Bajramovic JJ, el Ouagmiri M, Polman CH, et al. The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* 1995; **375**: 798-801.
31. Quintana FJ, Farez MF, Viglietta V, Iglesias AH, Merbl Y, et al. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 18889-18894.
32. Huizinga R, Linington C, Amor S Resistance is futile: antineuronal autoimmunity in multiple sclerosis. *Trends Immunol* 2008; **29**: 54-60.
33. Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 2007; **204**: 2363-2372.
34. Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, Schirmer L, Buck D, et al. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; **367**: 115-123.
35. Sospedra M, Martin R Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 683-747.
36. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; **343**: 938-952.
37. Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, et al. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *J Clin Invest* 1998; **101**: 725-730.
38. Wucherpfennig KW, Strominger JL Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; **80**: 695-705.
39. Fujinami RS, Oldstone MB Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985; **230**: 1043-1045.
40. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; **199**: 971-979.

41. Dore-Duffy P, Washington R, Dragovic L Expression of endothelial cell activation antigens in microvessels from patients with multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol* 1993; **331**: 243-248.
42. Brown KA Factors modifying the migration of lymphocytes across the blood-brain barrier. *Int Immunopharmacol* 2001; **1**: 2043-2062.
43. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 569-581.
44. Minagar A, Alexander JS Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2003; **9**: 540-549.
45. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; **354**: 899-910.
46. Baggiolini M Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; **392**: 565-568.
47. Hoffman LM, Karpus WJ Chemokine regulation of CNS T-cell infiltration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Res Immunol* 1998; **149**: 790-794; discussion 846-797, 855-760.
48. Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999; **103**: 807-815.
49. Holman DW, Klein RS, Ransohoff RM The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1812**: 220-230.
50. Hartung HP, Kieseier BC The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 2000; **107**: 140-147.
51. Waubant E, Goodkin DE, Gee L, Bacchetti P, Sloan R, et al. Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 1999; **53**: 1397-1401.
52. Lee MA, Palace J, Stabler G, Ford J, Gearing A, et al. Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. *Brain* 1999; **122 ( Pt 2)**: 191-197.
53. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; **2**: 201-211.
54. Slavin A, Kelly-Modis L, Labadia M, Ryan K, Brown ML Pathogenic mechanisms and experimental models of multiple sclerosis. *Autoimmunity* 2010; **43**: 504-513.
55. Sosa RA, Forsthuber TG The critical role of antigen-presentation-induced cytokine crosstalk in the central nervous system in multiple sclerosis

- and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Interferon Cytokine Res* 2011; **31**: 753-768.
56. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 2005; **175**: 5-14.
  57. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 485-517.
  58. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; **172**: 146-155.
  59. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007; **13**: 1173-1175.
  60. Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* 2007; **204**: 2803-2812.
  61. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; **52**: 65-70.
  62. Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 2008; **14**: 337-342.
  63. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009; **66**: 390-402.
  64. Montes M, Zhang X, Berthelot L, Laplaud DA, Brouard S, et al. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin Immunol* 2009; **130**: 133-144.
  65. Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol* 2003; **81**: 331-371.
  66. Tsaknaris L, Spencer L, Culbertson N, Hicks K, LaTocha D, et al. Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res* 2003; **74**: 296-308.
  67. Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 2005; **81**: 45-52.
  68. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active

- multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; **192**: 393-404.
69. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1983; **62**: 219-232.
  70. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000; **123 ( Pt 6)**: 1174-1183.
  71. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001; **159**: 809-815.
  72. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, et al. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001; **194**: 669-676.
  73. O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, et al. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol* 2005; **175**: 1974-1982.
  74. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; **69**: 292-302.
  75. Falip M, Tintore M, Jardi R, Duran I, Link H, et al. [Clinical usefulness of oligoclonal bands]. *Rev Neurol* 2001; **32**: 1120-1124.
  76. Link H, Huang YM Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006; **180**: 17-28.
  77. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, et al. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1045-1050.
  78. Obermeier B, Mentele R, Malotka J, Kellermann J, Kumpfel T, et al. Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat Med* 2008; **14**: 688-693.
  79. Villar LM, Sadaba MC, Roldan E, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 2005; **115**: 187-194.
  80. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007; **130**: 1089-1104.



81. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008; **358**: 676-688.
82. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 1992; **176**: 1355-1364.
83. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; **129**: 263-276.
84. Powrie F, Menon S, Coffman RL Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 2223-2229.
85. Prud'homme GJ, Piccirillo CA The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2000; **14**: 23-42.
86. Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, et al. TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J Immunol* 2009; **183**: 97-105.
87. Wyss-Coray T, Borrow P, Brooker MJ, Mucke L Astroglial overproduction of TGF-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. *J Neuroimmunol* 1997; **77**: 45-50.
88. Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, et al. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol* 1998; **161**: 3299-3306.
89. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996; **184**: 19-29.
90. Wildbaum G, Netzer N, Karin N Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading. *J Clin Invest* 2002; **110**: 701-710.
91. Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, Thewissen M, Menheere P, et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol* 2011; **239**: 80-86.
92. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 2014; **507**: 366-370.

93. Takahashi K, Aranami T, Endoh M, Miyake S, Yamamura T The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 2004; **127**: 1917-1927.
94. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, Packer A, Cerna M, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 5941-5946.
95. Lassmann H Multiple sclerosis: Lessons from molecular neuropathology. *Exp Neurol* 2013.
96. Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 1999; **12**: 295-302.
97. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001; **50**: 389-400.
98. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005; **128**: 2705-2712.
99. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2005; **81**: 363-373.
100. Frohman EM, Racke MK, Raine CS Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006; **354**: 942-955.
101. Frohman EM, Filippi M, Stuve O, Waxman SG, Corboy J, et al. Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis: evidence and new hypotheses for future directions. *Arch Neurol* 2005; **62**: 1345-1356.
102. Chari DM Remyelination in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007; **79**: 589-620.
103. Franklin RJ, Ffrench-Constant C Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 2008; **9**: 839-855.
104. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, et al. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 2001; **4**: 1116-1122.
105. Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, Van Rooijen N, Franklin RJ Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia* 2001; **35**: 204-212.
106. Bellmann-Strobl J, Stiepani H, Wuerfel J, Bohner G, Paul F, et al. MR spectroscopy (MRS) and magnetisation transfer imaging (MTI), lesion load and clinical scores in early relapsing remitting multiple sclerosis: a combined cross-sectional and longitudinal study. *Eur Radiol* 2009; **19**: 2066-2074.

107. Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med* 2011; **17**: 495-499.
108. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain* 2006; **129**: 1507-1516.
109. Minagar A, Toledo EG, Alexander JS, Kelley RE Pathogenesis of brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2004; **14**: 5S-10S.
110. Miller DM, Weinstock-Guttman B, Bethoux F, Lee JC, Beck G, et al. A meta-analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations. *Mult Scler* 2000; **6**: 267-273.
111. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993; **43**: 655-661.
112. Paty DW, Li DK Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993; **43**: 662-667.
113. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995; **45**: 1268-1276.
114. Yong VW Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology* 2002; **59**: 802-808.
115. Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A, Wiendl H, Then Bergh F, et al. Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 7452-7457.
116. Hartung HP, Gonsette R, Konig N, Kwiecinski H, Guseo A, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 2002; **360**: 2018-2025.
117. Rudick R, Polman C, Clifford D, Miller D, Steinman L Natalizumab: bench to bedside and beyond. *JAMA Neurol* 2013; **70**: 172-182.
118. Aktas O, Kury P, Kieseier B, Hartung HP Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2010; **6**: 373-382.
119. Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, et al. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by

- suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation* 2010; **7**: 30.
120. Rovaris M, Gambini A, Gallo A, Falini A, Ghezzi A, et al. Axonal injury in early multiple sclerosis is irreversible and independent of the short-term disease evolution. *Neurology* 2005; **65**: 1626-1630.
  121. Miron VE, Ludwin SK, Darlington PJ, Jarjour AA, Soliven B, et al. Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices. *Am J Pathol* 2010; **176**: 2682-2694.
  122. Hu Y, Lee X, Ji B, Guckian K, Apicco D, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) does not promote remyelination in vivo. *Mol Cell Neurosci* 2011; **48**: 72-81.
  123. Moharrehg-Khiabani D, Blank A, Skripuletz T, Miller E, Kotsiari A, et al. Effects of fumaric acids on cuprizone induced central nervous system de- and remyelination in the mouse. *PLoS One* 2010; **5**: e11769.
  124. Stromnes IM, Goverman JM Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006; **1**: 1952-1960.
  125. Stromnes IM, Goverman JM Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006; **1**: 1810-1819.
  126. Rodriguez M Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2007; **17**: 219-229.
  127. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med* 1933; **58**: 39-53.
  128. Weissert R, Wallstrom E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, et al. MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1265-1273.
  129. Batoulis H, Recks MS, Addicks K, Kuerten S Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *APMIS* 2011; **119**: 819-830.
  130. Paterson PY Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* 1960; **111**: 119-136.
  131. Miller SD, Karpus WJ Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* 2007; **Chapter 15**: Unit 15 11.
  132. Massacesi L, Vergelli M, Zehetbauer B, Liuzzi GM, Olivetto J, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats and immune response to myelin basic protein in lipid-bound form. *J Neurol Sci* 1993; **119**: 91-98.

133. Moreno B, Espejo C, Mestre L, Suardiaz M, Clemente D, et al. [Guidelines on the appropriate use of animal models for developing therapies in multiple sclerosis]. *Rev Neurol* 2012; **54**: 114-124.
134. Stepaniak JA, Wolf NA, Sun D, Swanborg RH Interstrain variability of autoimmune encephalomyelitis in rats: multiple encephalitogenic myelin basic protein epitopes for DA rats. *J Neuroimmunol* 1997; **78**: 79-85.
135. Lenz DC, Wolf NA, Swanborg RH Strain variation in autoimmunity: attempted tolerization of DA rats results in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1999; **163**: 1763-1768.
136. Polman CH, Matthaei I, de Groot CJ, Koetsier JC, Sminia T, et al. Low-dose cyclosporin A induces relapsing remitting experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 1988; **17**: 209-216.
137. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A 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. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 1951-1959.
138. Acha-Orbea H, Mitchell DJ, Timmermann L, Wraith DC, Tausch GS, et al. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 1988; **54**: 263-273.
139. Wraith DC, Smilek DE, Mitchell DJ, Steinman L, McDevitt HO Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. *Cell* 1989; **59**: 247-255.
140. Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, et al. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 1998; **8**: 681-694.
141. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 2000; **157**: 267-276.
142. Pomeroy IM, Matthews PM, Frank JA, Jordan EK, Esiri MM Demyelinated neocortical lesions in marmoset autoimmune encephalomyelitis mimic those in multiple sclerosis. *Brain* 2005; **128**: 2713-2721.
143. Storch MK, Bauer J, Linington C, Olsson T, Weissert R, et al. Cortical demyelination can be modeled in specific rat models of autoimmune encephalomyelitis and is major histocompatibility complex (MHC) haplotype-related. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; **65**: 1137-1142.

144. Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, krogsgaard M, Andersen CB, et al. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* 1999; **23**: 343-347.
145. Owens T, Wekerle H, Antel J Genetic models for CNS inflammation. *Nat Med* 2001; **7**: 161-166.
146. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA, Jr. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 1993; **177**: 57-68.
147. Segal BM, Shevach EM IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice. *J Exp Med* 1996; **184**: 771-775.
148. Misko TP, Trotter JL, Cross AH Mediation of inflammation by encephalitogenic cells: interferon gamma induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2. *J Neuroimmunol* 1995; **61**: 195-204.
149. Navikas V, Link H Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996; **45**: 322-333.
150. Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1995; **1**: 732-743.
151. Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, et al. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 2002; **169**: 7104-7110.
152. Becher B, Durell BG, Noelle RJ Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 2002; **110**: 493-497.
153. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 1996; **156**: 5-7.
154. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; **421**: 744-748.
155. Traugott U, Lebon P Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann Neurol* 1988; **24**: 243-251.
156. Link H, Sun JB, Wang Z, Xu Z, Love A, et al. Virus-reactive and autoreactive T cells are accumulated in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992; **38**: 63-73.
157. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002; **8**: 500-508.

158. Haak S, Croxford AL, Kreymborg K, Heppner FL, Pouly S, et al. IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest* 2009; **119**: 61-69.
159. O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, et al. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008; **181**: 3750-3754.
160. Abromson-Leeman S, Bronson RT, Dorf ME Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR gamma t consistently produce IFN $\gamma$  but have a spectrum of IL-17 profiles. *J Neuroimmunol* 2009; **215**: 10-24.
161. Peters A, Lee Y, Kuchroo VK The many faces of Th17 cells. *Curr Opin Immunol* 2011; **23**: 702-706.
162. McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001; **194**: 873-882.
163. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, et al. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007; **178**: 39-48.
164. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 2011; **12**: 568-575.
165. Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, et al. ROR $\gamma$  drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 2011; **12**: 560-567.
166. King IL, Dickendesher TL, Segal BM Circulating Ly-6C<sup>+</sup> myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 2009; **113**: 3190-3197.
167. Carrieri PB, Provitera V, De Rosa T, Tartaglia G, Gorga F, et al. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1998; **20**: 373-382.
168. Flynn GC, Chappell TG, Rothman JE Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 1989; **245**: 385-390.
169. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 1990; **248**: 850-854.
170. Hartl FU, Hayer-Hartl M Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; **295**: 1852-1858.

171. Murakami H, Pain D, Blobel G 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J Cell Biol* 1988; **107**: 2051-2057.
172. Shi Y, Thomas JO The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2186-2192.
173. Ritossa FA New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila* *Experientia* 1962; **18**: 571-573.
174. Li GC, Werb Z Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; **79**: 3218-3222.
175. Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 1988; **242**: 433-436.
176. Lindquist S, Craig EA The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; **22**: 631-677.
177. Welch WJ Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1993; **339**: 327-333.
178. Jaattela M Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 1999; **31**: 261-271.
179. Hunt C, Morimoto RI Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 6455-6459.
180. Tavaría M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1996; **1**: 23-28.
181. Daugaard M, Rohde M, Jaattela M The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007; **581**: 3702-3710.
182. Tytell M, Hooper PL Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets* 2001; **5**: 267-287.
183. Turturici G, Sconzo G, Geraci F Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem Res Int* **2011**: 618127.
184. Freedman MS, Buu NN, Ruijs TC, Williams K, Antel JP Differential expression of heat shock proteins by human glial cells. *J Neuroimmunol* 1992; **41**: 231-238.
185. Satoh J, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T Heterogeneous induction of 72-kDa heat shock protein (HSP72) in cultured mouse oligodendrocytes and astrocytes. *Brain Res* 1992; **573**: 37-43.



186. Satoh J, Kim SU HSP72 induction by heat stress in human neurons and glial cells in culture. *Brain Res* 1994; **653**: 243-250.
187. Foster JA, Brown IR Differential induction of heat shock mRNA in oligodendrocytes, microglia, and astrocytes following hyperthermia. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; **45**: 207-218.
188. Mosser DD, Morimoto RI Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 2004; **23**: 2907-2918.
189. Benn SC, Woolf CJ Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 2004; **5**: 686-700.
190. Beere HM "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2641-2651.
191. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* 2007; **1**: 53-60.
192. Evans CG, Wisen S, Gestwicki JE Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro. *J Biol Chem* 2006; **281**: 33182-33191.
193. Magrane J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J Neurosci* 2004; **24**: 1700-1706.
194. Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, et al. Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 721-726.
195. Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, et al. Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 7841-7846.
196. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science* 2002; **295**: 865-868.
197. McLaughlin B, Hartnett KA, Erhardt JA, Legos JJ, White RF, et al. Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 715-720.
198. Collins MA, Neafsey EJ, Wang K, Achille NJ, Mitchell RM, et al. Moderate ethanol preconditioning of rat brain cultures engenders neuroprotection against dementia-inducing neuroinflammatory proteins: possible signaling mechanisms. *Mol Neurobiol* 2010; **41**: 420-425.

199. Kwong JM, Lam TT, Caprioli J Hyperthermic pre-conditioning protects retinal neurons from N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat. *Brain Res* 2003; **970**: 119-130.
200. Heneka MT, Sharp A, Murphy P, Lyons JA, Dumitrescu L, et al. The heat shock response reduces myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Neurochem* 2001; **77**: 568-579.
201. Brown IR Expression of heat shock genes (hsp70) in the mammalian nervous system. *Results Probl Cell Differ* 1991; **17**: 217-229.
202. Tytell M, Greenberg SG, Lasek RJ Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res* 1986; **363**: 161-164.
203. Hightower LE, Guidon PT, Jr. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol* 1989; **138**: 257-266.
204. Sheller RA, Smyers ME, Grossfeld RM, Ballinger ML, Bittner GD Heat-shock proteins in axoplasm: high constitutive levels and transfer of inducible isoforms from glia. *J Comp Neurol* 1998; **396**: 1-11.
205. Guzhova I, Kislyakova K, Moskaliyova O, Fridlanskaya I, Tytell M, et al. In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res* 2001; **914**: 66-73.
206. Gao YL, Brosnan CF, Raine CS Experimental autoimmune encephalomyelitis. Qualitative and semiquantitative differences in heat shock protein 60 expression in the central nervous system. *J Immunol* 1995; **154**: 3548-3556.
207. Aquino DA, Klipfel AA, Brosnan CF, Norton WT The 70-kDa heat shock cognate protein (HSC70) is a major constituent of the central nervous system and is up-regulated only at the mRNA level in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem* 1993; **61**: 1340-1348.
208. Aquino DA, Capello E, Weisstein J, Sanders V, Lopez C, et al. Multiple sclerosis: altered expression of 70- and 27-kDa heat shock proteins in lesions and myelin. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**: 664-672.
209. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001; **294**: 1731-1735.
210. Rajdev S, Hara K, Kokubo Y, Mestril R, Dillmann W, et al. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol* 2000; **47**: 782-791.

211. Hoehn B, Ringer TM, Xu L, Giffard RG, Sapolsky RM, et al. Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 1303-1309.
212. Stadelmann C, Ludwin S, Tabira T, Guseo A, Lucchinetti CF, et al. Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Balo's type of multiple sclerosis. *Brain* 2005; **128**: 979-987.
213. Brosnan CF, Battistini L, Gao YL, Raine CS, Aquino DA Heat shock proteins and multiple sclerosis: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; **55**: 389-402.
214. Bajramovic JJ, Bsibsi M, Geutskens SB, Hassankhan R, Verhulst KC, et al. Differential expression of stress proteins in human adult astrocytes in response to cytokines. *J Neuroimmunol* 2000; **106**: 14-22.
215. D'Souza SD, Antel JP, Freedman MS Cytokine induction of heat shock protein expression in human oligodendrocytes: an interleukin-1-mediated mechanism. *J Neuroimmunol* 1994; **50**: 17-24.
216. Fleshner M, Johnson JD Endogenous extra-cellular heat shock protein 72: releasing signal(s) and function. *Int J Hyperthermia* 2005; **21**: 457-471.
217. Routsias JG, Tzioufas AG The role of chaperone proteins in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1088**: 52-64.
218. Lamb JR, Bal V, Mendez-Samperio P, Mehlert A, So A, et al. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int Immunol* 1989; **1**: 191-196.
219. Munk ME, Schoel B, Modrow S, Karr RW, Young RA, et al. T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *J Immunol* 1989; **143**: 2844-2849.
220. Abulafia-Lapid R, Elias D, Raz I, Keren-Zur Y, Atlan H, et al. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J Autoimmun* 1999; **12**: 121-129.
221. Perschinka H, Mayr M, Millonig G, Mayerl C, van der Zee R, et al. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 1060-1065.
222. Res PC, Schaar CG, Breedveld FC, van Eden W, van Embden JD, et al. Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. *Lancet* 1988; **2**: 478-480.
223. Salvetti M, Buttinelli C, Ristori G, Carbonari M, Cherchi M, et al. T-lymphocyte reactivity to the recombinant mycobacterial 65- and 70-kDa heat shock proteins in multiple sclerosis. *J Autoimmun* 1992; **5**: 691-702.

224. Salvetti M, Ristori G, Buttinelli C, Fiori P, Falcone M, et al. The immune response to mycobacterial 70-kDa heat shock proteins frequently involves autoreactive T cells and is quantitatively dysregulated in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1996; **65**: 143-153.
225. Stinissen P, Vandevyver C, Medaer R, Vandegaer L, Nies J, et al. Increased frequency of gamma delta T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. Reactivity, cytotoxicity, and T cell receptor V gene rearrangements. *J Immunol* 1995; **154**: 4883-4894.
226. Chiba S, Yokota S, Yonekura K, Tanaka S, Furuyama H, et al. Autoantibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2006; **241**: 39-43.
227. Jorgensen C, Gedon E, Jaquet C, Sany J Gastric administration of recombinant 65 kDa heat shock protein delays the severity of type II collagen induced arthritis in mice. *J Rheumatol* 1998; **25**: 763-767.
228. Wendling U, Paul L, van der Zee R, Prakken B, Singh M, et al. A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J Immunol* 2000; **164**: 2711-2717.
229. Chandawarkar RY, Wagh MS, Kovalchin JT, Srivastava P Immune modulation with high-dose heat-shock protein gp96: therapy of murine autoimmune diabetes and encephalomyelitis. *Int Immunol* 2004; **16**: 615-624.
230. Birnbaum G, Kotilinek L, Miller SD, Raine CS, Gao YL, et al. Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis. II: environmental infection and extra-neuraxial inflammation alter the course of chronic relapsing encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1998; **90**: 149-161.
231. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, et al. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 2001; **358**: 1749-1753.
232. Wieten L, Berlo SE, Ten Brink CB, van Kooten PJ, Singh M, et al. IL-10 is critically involved in mycobacterial HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. *PLoS One* 2009; **4**: e4186.
233. Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chaperones* 1999; **4**: 29-35.
234. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest* 1998; **27**: 367-377.

235. van Eden W, van der Zee R, Prakken B Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 318-330.
236. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem Sci* 2008; **33**: 71-79.
237. Binder RJ, Vatner R, Srivastava P The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 2004; **64**: 442-451.
238. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1113**: 28-39.
239. Van Eden W, Wick G, Albani S, Cohen I Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1113**: 217-237.
240. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; **12**: 1539-1546.
241. Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, et al. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **324**: 511-517.
242. Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 2005; **118**: 3631-3638.
243. Lancaster GI, Moller K, Nielsen B, Secher NH, Febbraio MA, et al. Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress Chaperones* 2004; **9**: 276-280.
244. Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, Asea A Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol* 2005; **175**: 2900-2912.
245. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002; **277**: 15028-15034.
246. Multhoff G, Mizzen L, Winchester CC, Milner CM, Wenk S, et al. Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol* 1999; **27**: 1627-1636.
247. Gross C, Schmidt-Wolf IG, Nagaraj S, Gastpar R, Ellwart J, et al. Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones* 2003; **8**: 348-360.
248. Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 5238-5247.

249. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000; **6**: 435-442.
250. Moroi Y, Mayhew M, Trcka J, Hoe MH, Takechi Y, et al. Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 3485-3490.
251. Lehner T, Bergmeier LA, Wang Y, Tao L, Sing M, et al. Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 594-603.
252. Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol* 2002; **168**: 2997-3003.
253. Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, et al. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 2211-2215.
254. Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, Nossner E, Ochmann O, et al. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 1602-1609.
255. Becker T, Hartl FU, Wieland F CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* 2002; **158**: 1277-1285.
256. Suto R, Srivastava PK A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995; **269**: 1585-1588.
257. Doody AD, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG, et al. Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J Immunol* 2004; **172**: 6087-6092.
258. Li Y, Subjeck J, Yang G, Repasky E, Wang XY Generation of anti-tumor immunity using mammalian heat shock protein 70 DNA vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine* 2006; **24**: 5360-5370.
259. Gong J, Zhang Y, Durfee J, Weng D, Liu C, et al. A heat shock protein 70-based vaccine with enhanced immunogenicity for clinical use. *J Immunol* 2010; **184**: 488-496.
260. Bausinger H, Lipsker D, Ziylan U, Manie S, Briand JP, et al. Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 3708-3713.
261. Gao B, Tsan MF Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of

- tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* 2003; **278**: 174-179.
262. Cwiklinska H, Mycko MP, Luvsannorov O, Walkowiak B, Brosnan CF, et al. Heat shock protein 70 associations with myelin basic protein and proteolipid protein in multiple sclerosis brains. *Int Immunol* 2003; **15**: 241-249.
263. Mycko MP, Cwiklinska H, Szymanski J, Szymanska B, Kudla G, et al. Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II. *J Immunol* 2004; **172**: 202-213.
264. Lund BT, Chakryan Y, Ashikian N, Mnatsakanyan L, Bevan CJ, et al. Association of MBP peptides with Hsp70 in normal appearing human white matter. *J Neurol Sci* 2006; **249**: 122-134.
265. Galazka G, Stasiolek M, Walczak A, Jurewicz A, Zylicz A, et al. Brain-derived heat shock protein 70-peptide complexes induce NK cell-dependent tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; **176**: 1588-1599.
266. Galazka G, Jurewicz A, Orłowski W, Stasiolek M, Brosnan CF, et al. EAE tolerance induction with Hsp70-peptide complexes depends on H60 and NKG2D activity. *J Immunol* 2007; **179**: 4503-4512.
267. Galazka G, Jurewicz A, Domowicz M, Cannella B, Raine CS, et al. HINT1 peptide/Hsp70 complex induces NK-cell-dependent immunoregulation in a model of autoimmune demyelination. *Eur J Immunol* 2014.
268. Mycko MP, Cwiklinska H, Walczak A, Libert C, Raine CS, et al. A heat shock protein gene (Hsp70.1) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen. *Eur J Immunol* 2008; **38**: 1999-2013.
269. Battistini L, Salvetti M, Ristori G, Falcone M, Raine CS, et al. Gamma delta T cell receptor analysis supports a role for HSP 70 selection of lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Mol Med* 1995; **1**: 554-562.
270. Freedman MS, Ruijs TC, Selin LK, Antel JP Peripheral blood gamma-delta T cells lyse fresh human brain-derived oligodendrocytes. *Ann Neurol* 1991; **30**: 794-800.
271. Lockhart E, Green AM, Flynn JL IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 2006; **177**: 4662-4669.
272. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009; **31**: 331-341.
273. Rachitskaya AV, Hansen AM, Horai R, Li Z, Villasmil R, et al. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and

- rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol* 2008; **180**: 5167-5171.
274. Cwiklinska H, Mycko MP, Szymanska B, Matysiak M, Selmaj KW Aberrant stress-induced Hsp70 expression in immune cells in multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2010; **88**: 3102-3110.
275. Wright BH, Corton JM, El-Nahas AM, Wood RF, Pockley AG Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels* 2000; **15**: 18-22.
276. Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, de Faire U, et al. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension* 2000; **36**: 303-307.
277. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegard J Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension* 2003; **42**: 235-238.
278. Birnbaum G, Kotilinek L Heat shock or stress proteins and their role as autoantigens in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1997; **835**: 157-167.
279. Quintana FJ, Farez MF, Izquierdo G, Lucas M, Cohen IR, et al. Antigen microarrays identify CNS-produced autoantibodies in RRMS. *Neurology* 2012; **78**: 532-539.
280. Yokota S, Chiba S, Furuyama H, Fujii N Cerebrospinal fluids containing anti-HSP70 autoantibodies from multiple sclerosis patients augment HSP70-induced proinflammatory cytokine production in monocytic cells. *J Neuroimmunol* 2010; **218**: 129-133.
281. Mansilla MJ, Montalban X, Espejo C Heat shock protein 70: roles in multiple sclerosis. *Mol Med* 2012; **18**: 1018-1028.
282. Dymant DA, Ebers GC, Sadovnick AD Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004; **3**: 104-110.
283. Milner CM, Campbell RD Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990; **32**: 242-251.
284. Favatier F, Bornman L, Hightower LE, Gunther E, Polla BS Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell Stress Chaperones* 1997; **2**: 141-155.
285. Wu B, Hunt C, Morimoto R Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 330-341.
286. Ramachandran S, Bell RB Heat shock protein 70 gene polymorphisms and multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 1995; **46**: 140-141.



287. Cascino I, Galeazzi M, Salvetti M, Ristori G, Morozzi G, et al. HSP70-1 promoter region polymorphism tested in three autoimmune diseases. *Immunogenetics* 1994; **39**: 291-293.
288. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, et al. Heat shock protein 70 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2001; **58**: 93-96.
289. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, et al. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2005; **18**: 537-550.
290. Mandel M, Gurevich M, Pauzner R, Kaminski N, Achiron A Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2004; **138**: 164-170.
291. Bompreszi R, Ringner M, Kim S, Bittner ML, Khan J, et al. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 2191-2199.
292. Dello Russo C, Polak PE, Mercado PR, Spagnolo A, Sharp A, et al. The heat-shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin suppresses glial inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem* 2006; **99**: 1351-1362.
293. Cudkovicz ME, Shefner JM, Simpson E, Grasso D, Yu H, et al. Arimoclomol at dosages up to 300 mg/day is well tolerated and safe in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2008; **38**: 837-844.
294. Traynor BJ, Bruijn L, Conwit R, Beal F, O'Neill G, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology* 2006; **67**: 20-27.
295. Kalmar B, Lu CH, Greensmith L The role of heat shock proteins in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The therapeutic potential of Arimoclomol. *Pharmacol Ther* 2014; **141**: 40-54.
296. Benn SC, Brown RH, Jr. Putting the heat on ALS. *Nat Med* 2004; **10**: 345-347.
297. Kieran D, Kalmar B, Dick JR, Riddoch-Contreras J, Burnstock G, et al. Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med* 2004; **10**: 402-405.
298. Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* 1992; **255**: 1243-1245.
299. Ohtsuka K, Kawashima D, Gu Y, Saito K Inducers and co-inducers of molecular chaperones. *Int J Hyperthermia* 2005; **21**: 703-711.

300. Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, et al. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *J Clin Invest* 2003; **112**: 440-449.
301. Fu YF, Zhu YN, Ni J, Zhong XG, Tang W, et al. (5R)-5-hydroxytriptolide (LLDT-8), a novel triptolide derivative, prevents experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibiting T cell activation. *J Neuroimmunol* 2006; **175**: 142-151.
302. Wang Y, Mei Y, Feng D, Xu L Triptolide modulates T-cell inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 2008; **86**: 2441-2449.
303. Kizelsztejn P, Komarnytsky S, Raskin I Oral administration of triptolide ameliorates the clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by induction of HSP70 and stabilization of NF-kappaB/IkappaBalpha transcriptional complex. *J Neuroimmunol* 2009; **217**: 28-37.
304. Liu Q, Chen T, Chen H, Zhang M, Li N, et al. Triptolide (PG-490) induces apoptosis of dendritic cells through sequential p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **319**: 980-986.
305. Westerheide SD, Kawahara TL, Orton K, Morimoto RI Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2006; **281**: 9616-9622.
306. Liu Q Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions. *Int Immunopharmacol* 2011; **11**: 377-383.
307. Kunitz M Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J Gen Physiol* 1950; **33**: 349-362.
308. Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408.
309. Espejo C, Penkowa M, Saez-Torres I, Xaus J, Celada A, et al. Treatment with anti-interferon-gamma monoclonal antibodies modifies experimental autoimmune encephalomyelitis in interferon-gamma receptor knockout mice. *Exp Neurol* 2001; **172**: 460-468.
310. Welch WJ, Feramisco JR Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J Biol Chem* 1984; **259**: 4501-4513.
311. Edelman DA, Jiang Y, Tyburski JG, Wilson RF, Steffes CP Lipopolysaccharide up-regulates heat shock protein expression in rat lung pericytes. *J Surg Res* 2007; **140**: 171-176.

312. Bernardini C, Zannoni A, Bacci ML, Forni M Protective effect of carbon monoxide pre-conditioning on LPS-induced endothelial cell stress. *Cell Stress Chaperones* 2010; **15**: 219-224.
313. Bustamante MF, Fissolo N, Rio J, Espejo C, Costa C, et al. Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011; **70**: 634-645.
314. deLuca LE, Pikor NB, O'Leary J, Galicia-Rosas G, Ward LA, et al. Substrain differences reveal novel disease-modifying gene candidates that alter the clinical course of a rodent model of multiple sclerosis. *J Immunol* 2010; **184**: 3174-3185.
315. Barbaric I, Miller G, Dear TN Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2007; **6**: 91-103.
316. Van Molle W, Wielockx B, Mahieu T, Takada M, Taniguchi T, et al. HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* 2002; **16**: 685-695.
317. Zhou J, Xi C, Wang W, Fu X, Jinqiang L, et al. Triptolide-induced oxidative stress involved with Nrf2 contribute to cardiomyocyte apoptosis through mitochondrial dependent pathways. *Toxicol Lett* 2014; **230**: 454-466.
318. Li J, Shen F, Guan C, Wang W, Sun X, et al. Activation of Nrf2 protects against triptolide-induced hepatotoxicity. *PLoS One* 2014; **9**: e100685.



# Publicaciones

---

## PUBLICACIONES

Los resultados derivados del trabajo experimental de esta tesis doctoral han dado lugar a la publicación de dos artículos originales y también se ha redactado una revisión de Hsp70 en la EM.

- **Mansilla MJ**, Montalban X, Espejo C. Heat Shock Protein 70: Roles in Multiple Sclerosis. *Mol Med*. 2012; 18(1): 1018–1028.

- **Mansilla MJ**, Comabella M, Río J, Castilló J, Castillo M, Martin R, Montalban X, Espejo C. Up-regulation of inducible heat shock protein-70 expression in multiple sclerosis patients. *Autoimmunity*. 2014 Mar;47(2):127-33.

- **Mansilla MJ**, Costa C, Eixarch H, Tepavcevic V, Castillo M, Martin R, Lubetzki C, Aigrot MS, Montalban X, Espejo C. Hsp70 regulates immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2014 Aug 25;9(8):e105737.

# Heat Shock Protein 70: Roles in Multiple Sclerosis

María José Mansilla, Xavier Montalban, and Carmen Espejo

Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (CEM-Cat), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Heat shock proteins (HSP) have long been considered intracellular chaperones that possess housekeeping and cytoprotective functions. Consequently, HSP overexpression was proposed as a potential therapy for neurodegenerative diseases characterized by the accumulation or aggregation of abnormal proteins. Recently, the discovery that cells release HSP with the capacity to trigger proinflammatory as well as immunoregulatory responses has focused attention on investigating the role of HSP in chronic inflammatory autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS). To date, the most relevant HSP is the inducible Hsp70, which exhibits both cytoprotective and immunoregulatory functions. Several studies have presented contradictory evidence concerning the involvement of Hsp70 in MS or experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the MS animal model. In this review, we dissect the functions of Hsp70 and discuss the controversial data concerning the role of Hsp70 in MS and EAE.

Online address: <http://www.molmed.org>

doi: 10.2119/molmed.2012.00119

## INTRODUCTION

Heat shock proteins (HSP) are a group of phylogenetically conserved proteins found in all prokaryotic and eukaryotic cells. These proteins are named according to their molecular weight, which range from 17 kDa to more than 100 kDa, and are classified into six families, namely the HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 and the small HSP families. In general, HSP expression can be constitutive or inducible, depending on cell conditions. Under physiological conditions, HSP exert housekeeping functions and act as molecular chaperones that assist in the proper folding of newly synthesized proteins. Moreover, HSP also play an important role in preventing protein aggregation, degrading unstable and misfolded proteins and transporting proteins between cellular compartments (1–5). Under conditions of stress, such as

heat shock, inducible HSP are highly up-regulated by heat shock factors (HSF), which are generated as part of the heat shock response (HSR), to maintain cellular homeostasis and to develop cell survival functions. The term “HSP” originated following their discovery in 1962 by Ritossa in response to thermal stress in *Drosophila* (6); however, other stress conditions, including nutrient deprivation, irradiation, hypoxia, heavy metals, oxidative and toxic stress, infections and exposure to inflammatory cytokines, also induce HSP expression (7–11). Therefore, HSP are also called stress proteins.

HSP70, the most conserved of the HSP families, includes the cytosolic and nuclear constitutive Hsc70 (Hsp73) and the stress-inducible Hsp70 (Hsp72) proteins, the endoplasmic reticulum (ER) Bip (Grp78), and the mitochondrial mt-Hsp70 (Grp75) protein (12–14). Hsp70

has been the subject of particularly extensive studies because it exhibits different functions in accordance with its location; intracellular Hsp70 exerts cytoprotective functions as a chaperone protein, whereas extracellular Hsp70 exerts immunomodulatory functions that trigger immunological responses (acting as danger signals) as well as tolerance responses.

Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic inflammatory disease associated with the demyelination of the central nervous system (CNS). Although the etiology of MS is not fully understood, current evidence suggests a critical role for the immune system in the pathogenesis of the disease. Autoreactive myelin-specific T cells and antibodies are present within MS plaques, and multiple mechanisms of myelin immune-mediated injury have been described in MS patients (reviewed in [15,16]).

The cytoprotection of CNS cells (mainly oligodendrocytes and neurons) and the immunomodulation of T-cell responses against myelin antigens are critical approaches in MS therapy. Recently, several reports have implicated HSP, mainly Hsp60 and -70, in different human autoimmune diseases, including arthritis and type I diabetes mellitus,

---

**Address correspondence to** Carmen Espejo, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (CEM-Cat), Vall d'Hebron Institut de Recerca, Ps. Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Phone: +34-934893599; Fax: +34-932746084; E-mail: [carmen.espejo@vhir.org](mailto:carmen.espejo@vhir.org).

Submitted March 15, 2012; Accepted for publication May 31, 2012; Epub ([www.molmed.org](http://www.molmed.org)) ahead of print June 1, 2012.

and their beneficial effect in Alzheimer's and Parkinson's diseases has been suggested (reviewed in [17–20]). In this review, we dissect the findings associated with Hsp70 in an attempt to better understand the role of this protein in MS, a neurodegenerative autoimmune disease.

## MS PATHOGENESIS

MS is a chronic and progressive neurodegenerative disease that is deemed to affect more than 2.1 million people worldwide (21). MS is considered an immune-mediated disease characterized by the presence of inflammatory demyelinating lesions in the CNS. Because of the destruction of the myelin sheath occurring in MS, the nerve action potential is disrupted, which leads to the apparition of neurological disability such as blurred vision, muscle weakness and spasm as well as motor symptoms. Disease onset usually occurs in young adults between 20 and 40 years of age, and affects women more frequently. Four clinical forms can be distinguished based on clinical onset and disease progression: Relapsing-Remitting (RRMS), the most frequent clinical form affecting approximately 80% to 85% of MS patients; Secondary Progressive (SPMS); Primary Progressive (PPMS); and Progressive Relapsing (PRMS) (16,22).

MS is a complex neurological disorder conditioned by both genetic and environmental factors including gender, sexual hormones, ethnic origin, geographical latitude of residence, smoking, pathogen exposure and vitamin D levels (23–27). The most important genes conferring susceptibility to MS (although with a weak effect) are the MCH class II (*HLA-DRB1\*1501* allele), and the interleukin (IL)-2 and IL-7 receptor genes, which are involved in the immune response (28,29).

Pathological hallmarks of MS include areas of focal demyelination characterized by inflammation, gliosis and both oligodendrocyte and neuronal loss (30). Based on the presence of inflammatory infiltrates in the CNS as well as on the data accumulated from experimental au-

toimmune encephalomyelitis (EAE) and its animal model (31), MS is considered a T-cell mediated autoimmune disorder, although its precise etiology is not yet fully comprehended. EAE is induced by immunizing susceptible animals with myelin-derived proteins (or peptides) such as proteolipid protein (PLP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) or myelin basic protein (MBP). Animals with EAE reproduce the major clinical and histopathological features of MS and it has been demonstrated that EAE can be transferred adoptively in healthy animals by injecting myelin-specific CD4<sup>+</sup> T cells (32–34). Taking into account the data gathered over the years, it is believed that a complex combination of genetic and environmental factors induces the activation of myelin-specific peripheral T cells in MS patients. Some mechanisms such as molecular mimicry (cross-reaction between pathogen-reactive T-cell epitopes and myelin antigens) (35) or deficient immunoregulatory control (failure of regulatory T-cell function) (36) have been proposed as trigger factors, although this issue is still controversial. As a consequence of T-cell activation, inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 are secreted, inducing the expression of adhesion molecules in endothelial cells from the blood vessels, thus driving lymphocyte transmigration across the blood brain barrier (BBB) (37). Once within the CNS, myelin-specific CD4<sup>+</sup> T cells are reactivated, initiating a complex inflammatory response that also includes CD8<sup>+</sup> T cells, B cells, antibodies, natural killer (NK) cells, complement and other soluble factors produced by innate immune cells that culminate in the injury of axons and oligodendrocytes (15,38).

Moreover, spontaneous remyelination occurs in MS. In this light, both in MS and EAE, axons with thinner myelin sheaths are found. Unfortunately, this remyelinating process is often insufficient to bring about functional recovery. Therefore, remyelination failure is considered another critical aspect in MS, and, consequently, new therapies might

be approached not only to block the immune response but also to promote neuroprotection and neuroregeneration. In this sense, Hsp70 represents a promising putative target molecule for MS treatment since it is involved in the immune response and has neuroprotective functions (discussed below).

## THE ROLE OF HSP IN NEUROPROTECTION

HSP play two neuroprotective roles. On the one hand, HSP prevent protein aggregation and misfolding through their chaperone activity, and on the other hand they can induce antiapoptotic mechanisms (Table 1). HSP not only exhibit housekeeping functions but also have an essential function in promoting cell survival following stressful or harmful conditions. Following conditions of cellular stress, the accumulation of unfolded or misfolded proteins triggers an HSR that promotes HSP expression with the purpose of refolding these proteins to their native state or, if that is not possible, transferring the proteins to the degradative pathway (reviewed in [39–41]). On the basis of the idea that the accumulation of abnormal protein aggregates is a common histopathological hallmark contributing to neuronal degeneration, the role of HSP in chronic neurodegenerative diseases has been extensively studied. In this context, the induction of Hsp70 expression in the CNS, mainly in reactive astrocytes, oligodendrocytes and microglia (42–45), following conditions of stress has been described. In addition, Hsp70 is considered a powerful antiapoptotic protein because it inhibits multiple steps of programmed cell-death signaling in both intrinsic and extrinsic pathways (reviewed in [46–49]).

The interconnection between the cytoprotective and antiapoptotic mechanisms remains unknown. Following stress or injury, two responses are triggered: the cytoprotective stress response, which induces HSP production, and the apoptotic pathway, which leads to cell death. Hsp70 exhibits a high affinity for hydrophobic peptides, and stress-induced,

newly generated Hsp70 binds to misfolded proteins. If the levels of the newly generated Hsp70 (and its cochaperone Hsp40) successfully achieve protein refolding, the excess Hsp70 or the Hsp70 released after protein refolding will then interact (with lower affinity) with different apoptotic mediators to prevent cell death. Conversely, stress conditions that cause serious cellular damage will exceed the capacity of Hsp70 to refold proteins; thus, the apoptotic pathway will not be arrested, and this will lead to cell death. Consequently, insufficient induction or production of Hsp70 and its cochaperones will cause the aggregation of misfolded proteins and apoptotic cell death typical of neurodegenerative diseases. Accordingly, the overexpression of Hsp70 in neuronal cell cultures and mouse models of neurodegenerative diseases has demonstrated the beneficial effect of Hsp70 in ameliorating the severity of disease phenotypes by reducing the number and size of inclusions and the accumulation of disease-causing proteins. Hsp70 overexpression prevents the intracellular aggregation of amyloid peptides (50,51), tau protein (52), huntingtin (53) and  $\alpha$ -synuclein fibril formation (54).

### Neuroprotective Role of Hsp70 in MS

Studies of ischemic, hyperthermic and excitotoxic preconditioning have been conducted to investigate the cytoprotective role of HSP in neurodegenerative diseases. These studies involved provoking a sub-lethal insult (preconditioning) followed by a second, more severe, stimulus. The preconditioning treatment is associated with a reduction in neuron and glial cell loss. Because preconditioning principally induces the expression of Hsp70, the neuroprotective effects were linked to Hsp70 induction. Similarly, heat shock preconditioning in rodents, prior to EAE induction, leads to Hsp70 upregulation; consequently, the incidence of disease and neuronal damage are reduced and clinical signs show improvement (55,56).

However, contrary to previous beliefs, apart from the cytoprotective functions

of HSP as intracellular proteins, HSP are also released into the extracellular milieu, where they trigger a wide variety of effects. In the CNS, glial cells produce and release HSP, including Hsc70 and Hsp70, which are rapidly absorbed by neurons. Because neurons express high levels of Hsc70, whereas Hsp70 is poorly induced after stress conditions (57), the glial-to-axon transfer of Hsp70 has been suggested as a compensatory neuroprotective maneuver in which glial cells protect adjacent neurons from acute stress or injury (58–61). Consequently, in light of this observation, the supply of exogenous Hsp70 into the CNS is a potential therapeutic strategy to reduce neuronal death in neurodegenerative diseases.

In MS, the immune response in the CNS leads to inflammatory and oxidative conditions that induce the overexpression of most HSP (including Hsp70) in the CNS lesions of MS patients and in the EAE animal model of the MS disease (62–65). Because Hsp70 provides neuroprotection from ischemia-induced cell death (66,67), the overexpression of this protein in MS lesions might protect CNS cells against the inflammatory environment that is typical of the disease (63,68–70). De Souza et al. reported that the stimulation of human glial cells with proinflammatory cytokines, such as IL-1, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , induces Hsp70 expression, predominantly in oligodendrocytes (71). Taken together, the data suggest that the inflammatory phase occurring at the initial stages of MS/EAE acts as a preconditioning stimulus to induce Hsp70 expression as well as Hsp70 release by glial cells to protect neurons in the subsequent neurodegenerative phase. Therefore, a failure to induce Hsp70 or the insufficient production of HSP in the CNS is a possible determining factor for MS development.

Data accrued over the years have demonstrated the cytoprotective functions of both intra- and extracellular HSP in the CNS. As a result, therapeutic strategies focusing on HSP upregulation have been proposed for different neuropathologies that generally are charac-

terized by misfolded protein aggregations. However, this characterization does not seem to apply to MS. The immune reaction that occurs in MS is thought to trigger a process of neurodegenerative damage that leads to clinical signs. In this scenario, extracellular HSP, namely Hsp70, might actually be harmful rather than beneficial. While the release of Hsp70 in Alzheimer's and Parkinson's diseases leads to a reduction in misfolded proteins, in MS, Hsp70 exacerbates the immune response by acting as an adjuvant for myelin peptides and as a proinflammatory cytokine (72). The mechanism by which Hsp70 promotes immune reactions is discussed in detail below.

### THE ROLE OF HSP IN IMMUNOMODULATION

HSP exhibit immunomodulatory functions that further promote immune responses by acting as proinflammatory cytokines and by mediating regulatory immune responses (Table 1). Understanding the mechanisms of HSP involvement in the balance of autoimmunity versus tolerance is essential for the establishment of HSP as potential therapeutic tools for the treatment of different autoimmune diseases and cancer.

### Cellular Response

To initiate a T-cell immune response, immunostimulatory antigen presentation by professional antigen presenting cells (APC), mainly dendritic cells (DC), but also monocytes and activated B cells, is required. Depending on the environmental signals present during APC maturation, T cell:APC interaction triggers either tolerance or immune responses. The literature describes two different types of HSP-APC interactions that trigger innate or adaptive immune responses based on the presence or absence of antigen binding (reviewed in [73–75]). Findings from *in vitro* studies have shown that HSP, including Hsp70, Hsp90, gp96 (ER Hsp90) and calreticulin, are released from necrotic cells (although not by apoptotic cells) after



**Table 1.** Intracellular and extracellular Hsp70 functions.

Location	Functions	References
Intracellular	Cytoprotection Chaperon function: Hsp70 assists proper protein folding and cellular compartment translocation and avoids protein aggregation	1–5,39–41
	Apoptosis inhibition: Hsp70 blocks multiple steps of both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways	46–49
Extracellular	Immune response mediator	
	Antigen adjuvant: Hsp70 binds peptides and misfolded proteins creating immune reactive complexes	91–93
	Danger signal: Hsp70 induces APC maturation and triggers innate immune response by TLR interaction	76,81–90

trauma or severe stress, and these HSP act as danger signals, promoting DC maturation and exerting immunostimulatory functions (76). Additionally, several studies have demonstrated that Hsp70 also can be released by glial cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) under acute psychological stress conditions or following physical exercise (77–79). In this regard, Bausero et al. demonstrated that the proinflammatory environment mediated by IFN- $\gamma$ , but not by the antiinflammatory cytokine TGF- $\beta$ 1, induces the active release of Hsp70 (80).

In contrast to the cytoprotective or homeostatic functions mediated by intracellular Hsp70, extracellular Hsp70 triggers both innate and adaptive immune responses. In innate immune responses, extracellular HSP, including Hsp60, Hsp70 and gp96, derived from pathogens or host cells, exert cytokinelike effects on APC maturation. In the case of Hsp70, the innate immune response is triggered through interaction with the toll-like receptor (TLR)-2, TLR-4 and CD14 costimulatory signaling (81). In addition to the activation and maturation of DC, Hsp70 acts as a chemoattractant and elicits the cytolytic effects of NK cells by mediating the interaction with CD94 (82–84). At the same time, released Hsp70 leads to the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor, which induces proinflammatory cytokine production (IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and GM-CSF) (76,85,86), chemokine secretion (MCP-1, RANTES, and MIP-1 $\alpha$ ) (87),

and nitric oxide (NO) production (88) by macrophages and/or DC. Finally, extracellular Hsp70 enhances the expression of CD83, CD86 and CD40 as well as the major histocompatibility complex (MHC) class II on DC and the migration of these cells to draining lymph nodes (76,89,90), thus priming adaptive immune responses. Considering these findings, it has been hypothesized that conditions of acute stress induce the release of Hsp70, which acts as a danger signal to prepare the immune system against a likely pathogen challenge.

Based on their activity as chaperones, the HSP released into the milieu can act as adjuvants that bind immunogenic peptides. In the adaptive immune response, HSP-antigen complexes are internalized efficiently via endocytosis mediated by CD40, CD91 ( $\alpha$ 2-macroglobulin receptor) or LOX-1 scavenger receptors. Thus, the complexes are processed in a proteasome-dependent manner in the cytosol and are presented via MHC class I or MHC class II molecules, which then induces the activation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T-cell responses, respectively (91–93). Because HSP-antigen complexes can induce the adaptive immune response, Hsp70 has been used as an adjuvant in vaccinations to enhance the immunogenicity of tumor antigens (94,95).

Chaperokine, a term coined by Asea, describes the dual role of HSP as chaperones and cytokines. However, the cytokine effect of HSP, including Hsp70, has been questioned based on the endotoxin contamination of recombinant HSP

that are used in experimental procedures. It has been speculated that the cytokine response induced by Hsp70 is triggered by LPS or other contaminating microbial compounds and not Hsp70 itself (96,97). Although this possibility cannot be excluded, studies have shown that highly purified HSP do activate DC and monocytes in vitro (88).

A significant upregulation of Hsp70 expression has been detected in CNS lesions from MS patients (63,64,68). Interestingly, Cwiklinska et al. detected the presence of Hsp70- MBP and Hsp70- PLP complexes in the brain tissue from MS patients. MBP and PLP have been proposed as possible target autoantigens in MS. Hsp70 binds MBP and PLP peptides to create highly immunogenic complexes, which are processed by APC and presented via MHC II, thus stimulating specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses in animals with EAE (98–100). Galazka et al. reported that SJL and C57BL/6 mice immunized with PLP<sub>139–151</sub> or MOG<sub>35–55</sub> peptides, respectively, presented Hsp70 complexed with a number of peptides (Hsp70-pc) generated in the CNS during the inflammatory phase of EAE. The preimmunization of mice with these Hsp70-pc complexes before the induction of EAE results in a tolerogenic reaction mediated by NK cells in SJL but not in C57BL/6 mice. It appears that in splenocytes from SJL mice, Hsp70-pc upregulates the expression of the H60 molecule, a ligand of the activating NK cell receptor NKG2D. However, the level of H60 is not increased in C57BL/6 splenocytes (101,102). By contrast, when compared with their littermates, C57BL/6 Hsp70-deficient (Hsp70KO) mice presented a milder form of EAE characterized by a light initial acute episode followed by a complete remission. This effect has been associated with poor MOG-stimulating CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation that fails to cause clinical signs (103). These data suggest that Hsp70 upregulation may increase susceptibility to autoimmune demyelinating disease.

There is a subpopulation of clonally expanded  $\gamma$ delta T cells that respond to

Hsp70 within demyelinated brain lesions of relapsing-remitting MS patients (104).  $\gamma\delta$  T cells possess potent cytotoxic activity and can kill oligodendrocytes in vitro (105). In addition,  $\gamma\delta$  T cells as well as CD4<sup>+</sup> T and NK cells produce large quantities of IL-17 (106), a proinflammatory cytokine that is involved in EAE and MS pathogenesis as well as in other autoimmune diseases (107,108).

Together, these findings demonstrate that aberrant/deregulated Hsp70 expression may be involved in the pathogenesis of MS and in other chronic inflammatory diseases by two possible mechanisms: exacerbating or contributing to the chronic inflammatory environment and/or eliciting the presentation of myelin autoantigens generated because of tissue injury and cell death. These hypotheses are supported by a recent study demonstrating the aberrant overexpression of Hsp70 following heat shock or inflammatory stress in PBMC from MS patients (109).

### Molecular Mimicry

HSP are the immunodominant antigens of many bacteria and are highly conserved proteins expressed in all prokaryote and eukaryote organisms. In particular, Hsp70 demonstrates a 60% to 78% homology among eukaryotic cells, and there is a 40% to 60% homology between eukaryotic Hsp70 and *E. coli* DnaK (9,110). The most immunogenic bacterial HSP are Hsp60 and Hsp70, which are considered harmful antigens capable of linking infection and autoimmunity. T cells and antibodies generated against microbial HSP may target self-HSP, either through the recognition of conserved epitopes or via cross-reactivity (molecular mimicry), thus leading to tissue inflammation (111,112). The responses induced by molecular mimicry between bacterial and mammalian Hsp60 and Hsp70 have been implicated in the pathogenesis of some autoimmune and inflammatory diseases, including type-1 diabetes (113), atherosclerosis (114), arthritis (115) and MS (116–119), and elevated levels of extracellular HSP

and anti-self HSP antibodies have been found in patients with these diseases. However, contrary to expectations, in several studies using animal models of arthritis (120,121), diabetes and MS (122,123) as well as in clinical trials (124), preimmunization with bacterial gp96, Hsp60 or Hsp70 abrogated the subsequently induced inflammatory disease. A study by Wieten et al. demonstrated that the spread of the regulatory capacity mediated by mycobacterial Hsp70 in proteoglycan-induced arthritis (PGIA), a chronic and relapsing T-cell-mediated murine model of arthritis, is dependent on IL-10 production and on specific regulatory self-HSP-cross-reactive T cells (125). The high degree of phylogenetic similarity between Hsp60 and Hsp70 as well as the presence of Hsp60 and Hsp70 in the peripheral circulation of healthy individuals (126,127) indicates that immune responses to HSP are highly controlled and regulated. However, the adult T-cell repertoire includes self-HSP-reactive T cells, which have escaped to central tolerance, thus traveling to the periphery where they are thought to play an important role in maintaining immune homeostasis. In light of this hypothesis, a number of mechanisms have been proposed. For example, under conditions of stress, nonprofessional APC may upregulate HSP expression and present self-HSP to T cells in the absence of costimulatory molecules, thus inducing anergy of self-HSP reactive T cells. It is possible that anergic self-HSP T cells have regulatory functions, either via the production of IL-10 or the induction of immunomodulatory APC (18). In an alternative mechanism, HSP-autoreactive T cells may be activated by the HSP from commensal bacteria in the gut. However, the tolerizing environment of the gut mucosa could lead to the production of self-HSP regulatory T cells (18). In a third possible mechanism, the low-affinity interaction of self-HSP peptides with self-HSP reactive T cells might generate a Th2 (IL-4 producing)–, Th3 (TGF $\beta$  producing)– or Tr1 (IL-10 producing)–mediated regulatory response (128).

### Humoral Response

A number of studies have demonstrated an increased level of circulating Hsp60 and Hsp70 in hypertension, atherosclerosis and renal disease (129–131). In addition to the cytokinelike function, extracellular Hsp70 as well as membrane Hsp70 may be a target for antibodies. Because soluble Hsp70 and anti-Hsp70 antibodies (126) have been found in the peripheral circulation of healthy individuals, these anti-HSP antibodies may act in an immunoregulatory capacity to remove excess extracellular Hsp70 following the resolution of a stress situation. The presence of Hsp70 antibodies in the CSF and serum of MS patients was reported for the first time by Birnbaum and Kotilinek in 1993 (reviewed in [132]). Although there were no differences in the serum levels of these antibodies in MS patients compared with healthy donors (133), it is possible that the humoral immune response to extracellular Hsp70 is increased in the CNS of MS patients. In this regard, Chiba et al. found high levels of CSF IgG autoantibodies against Hsp70 in MS patients compared with patients with motor neuron diseases (MND) (119). High levels of Hsp27, Hsp60 or Hsp90 autoantibodies were not detected in these patients. However, despite investigation into the function of anti-Hsp70 antibodies in MS (134), the effect of these antibodies remains to be elucidated.

### HSP GENETIC STUDIES

Genetic factors contribute to the development of MS. The MHC class II locus, the *HLA-DRB1\*1501* allele in particular, is the most important locus associated with susceptibility to developing MS (28). Interestingly, all three genes encoding Hsp70 (*HSPA1A*, *HSPA1B*, and *HSP-HOM*) are located within the MHC locus, namely in the MHC class III cluster close to the MHC II region (135). Similar to the Hsp70 gene in humans, the Hsp70 genes in other species, including the goat, mouse and rat also are located in the MHC region (reviewed in [136]), suggesting a possible relationship be-

tween Hsp70 and the altered immune response occurring in MS.

Analyses of Hsp70 genes have revealed a high degree of phylogenetic conservation. For example, *HSPA1A* and *HSPA1B* are 99% identical (137). Similarly, polymorphism in Hsp70 genes is low; therefore, polymorphisms found in coding regions lead to silent mutations (reviewed in [136]), suggesting that Hsp70 plays an essential role in cell physiology and in maintaining homeostasis following stress conditions. The relationship between different Hsp70 gene polymorphisms and MS has been investigated, and an effect on MS susceptibility/protection or an association with clinical data association was not established for different patient populations (138–140). Nevertheless, controversial differences between MS patients and healthy controls have been found in gene expression studies. Whereas earlier genetic studies showed *HSPA1A* overexpression in MS lesions (64,65,68), more recently *HSPA1A* expression was shown to be downregulated in the PBMC of MS patients (141–143). Histological studies in MS and EAE tissues have confirmed *HSPA1A* upregulation in CNS lesions; however, surprisingly, analysis of the baseline expression of Hsp70 genes in PBMC revealed no differences among MS patients, healthy controls or patients with rheumatoid arthritis. However, an aberrant overexpression of Hsp70 protein was detected in MS patients following an inflammatory event or thermal stress (109). These findings suggest that the role of Hsp70 could be context-dependent; thus, in the CNS, Hsp70 could be neuroprotective, whereas in PBMC, it could be proinflammatory. Further studies are needed to elucidate how these functions are interconnected in MS.

#### THERAPEUTIC POTENTIAL OF HSP

The beneficial effect of Hsp70 overexpression in reducing protein inclusions or aggregates suggests that the pharmacological induction of Hsp70 is a potential and feasible therapeutic approach for different neurodegenerative diseases,

**Table 2.** Putative Hsp70 roles in MS pathogenesis.

	Proposed Hsp70 roles in MS	References
CNS	Cytoprotection of neurons and oligodendrocytes after inflammatory stress conditions (cytokines, ROS, free radicals, etc.)	55,63,64,68–71
Immune system		
APC	Maturation (MHC and costimulatory molecules expression) Proinflammatory cytokine secretion triggered by Hsp70-TLR interaction (innate response) Presentation of MBP-Hsp70 and PLP-Hsp70 complexes by MHC-I or -II molecules (adaptive response)	76,89,90 76,85–88 98–100
T cells	Generation of Hsp70-specific T cells by cross-reactivity with bacterial and endogenous Hsp70 Induction of adaptive immune responses against MBP-Hsp70 and PLP-Hsp70 complexes presented by APC	116–119 98–100
B cells	Anti-Hsp70 humoral response (anti-Hsp70 antibodies)	119,132–134
$\gamma\delta$ T cells	Death of oligodendrocytes mediated by activation of $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity	104,105
NK cells	Immunoregulation mediated by NKG2D receptor	101,102

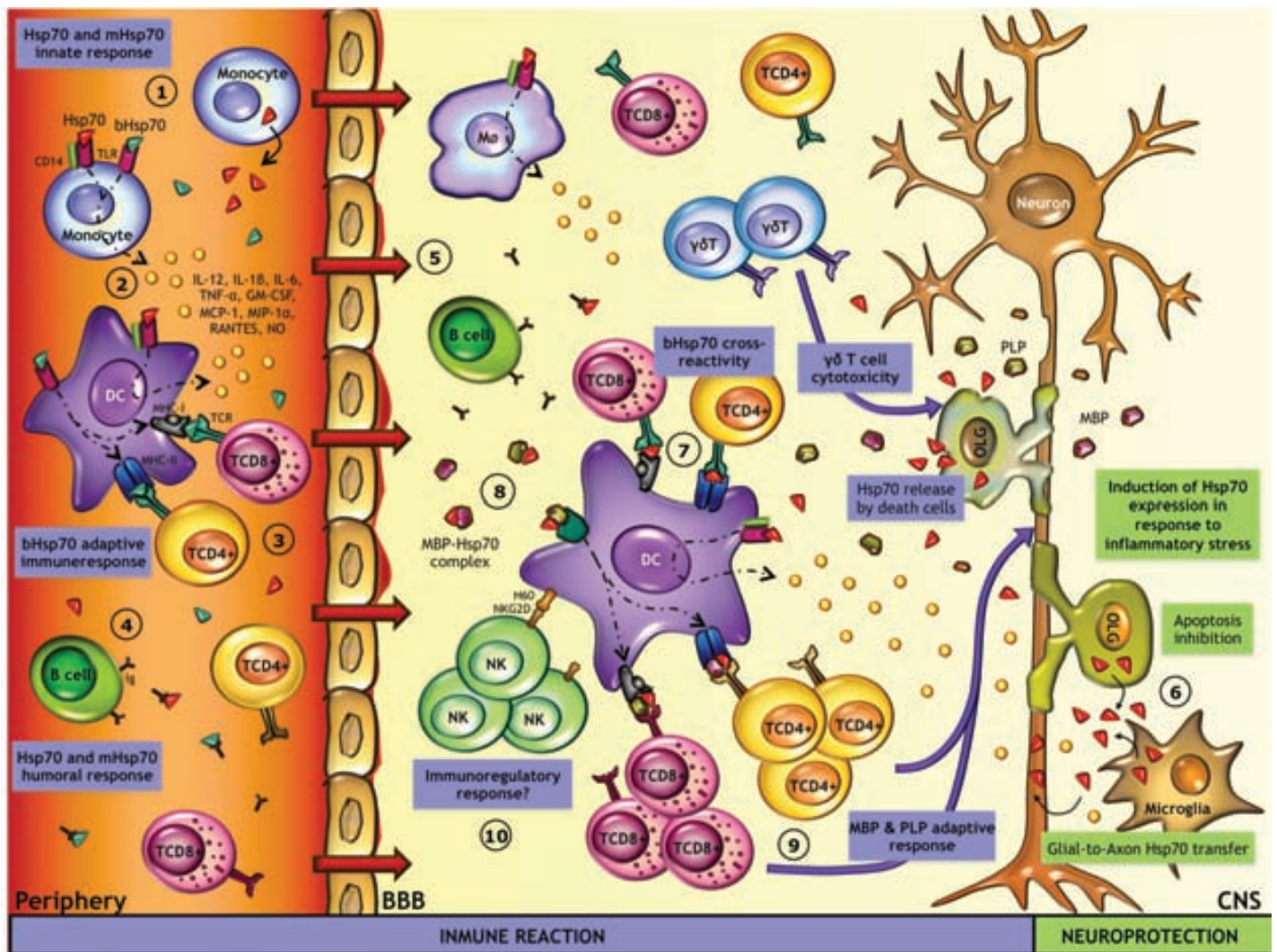
ROS, reactive oxygen species.

such as Parkinson's or Alzheimer's disease. In this light, a number of compounds have been shown to induce HSP expression. Arimoclolomol, an experimental drug that acts as an HSP coinducer, is in Phase II clinical trials for amyotrophic lateral sclerosis treatment (144,145). This drug has been shown to prolong the lifespan of the superoxide dismutase 1 (SOD1) enzyme in mice even when treatment was initiated after symptom onset (146,147). Inhibitors of Hsp90, such as geldamycin, lead to HSF1 release, which induces the expression of Hsp70 and other chaperones. In EAE, Hsp70 induction associated with geldamycin administration suppresses the glial inflammatory response and ameliorated EAE (148). Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAID), such as sodium salicylate, directly activate HSF1 (149). In addition, NSAID are especially interesting owing to their dual cytoprotectant (inducing HSP expression) and antiinflammatory roles (150). The main problem associated with NSAID treatment is that a high concentration is required to achieve therapeutic levels in the CNS owing to the low capacity of these drugs for crossing the BBB (151). Finally, celastrol and triptolide are medicinal plant-derived antiinflammatory substances that have

been used for centuries in traditional medicine to treat inflammatory and autoimmune diseases. The therapeutic effect of these compounds has been associated with the inhibition of NF- $\kappa$ B activation mediated by Hsp70 upregulation. Triptolide, when administered therapeutically or as a prophylactic, is a potent suppressor of EAE by inducing Hsp70 expression, which in turn avoids NF- $\kappa$ B activation, thus attenuating the proinflammatory response (152–154). On the other hand, at high concentrations, triptolide also exerts an antiproliferative effect, promoting apoptosis mediated by Hsp70 downregulation (155,156). However, the toxicity and water-insolubility of triptolide reduce the clinical feasibility of this drug. Triptolide derivatives have been designed and currently are being tested for cancer treatments (reviewed in [157]).

#### CONCLUSION

The pleiotropic functions of Hsp70, combined with the complexity of MS pathogenesis, make it difficult to elucidate the exact roles that Hsp70 plays in the disease. Hsp70 is associated with neurodegeneration and immunological deregulation in MS (Table 2 and Figure 1). A large number of studies have demon-



**Figure 1.** Proposed model of the role of Hsp70 in MS pathogenesis. After a stressful insult elicited by infectious pathogens, Hsp70 expression is induced and released by immune cells in the periphery (1). Acting as an alarm signal, endogenous Hsp70 as well as bacterial Hsp70 (bHsp70) may engage cell-surface signaling receptors, such as CD14, TLR2 and TLR4, to induce cytokines (IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and GM-CSF), chemokines (MCP1, MIP1 $\alpha$ , and RANTES) and NO production by DC and/or monocytes (2). On the other hand, bHsp70 is processed intracellularly and is presented by MHC-I and MHC-II molecules in APC, leading to the generation of bHsp70-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells (3) and the production of anti-bHsp70 antibodies by B lymphocytes (4). Despite the presence of the BBB, leukocytes enter into the CNS (5). In the CNS, the inflammatory environment triggers Hsp70 expression by CNS cells (6). Because of the high degree of homology between bacterial and eukaryotic Hsp70, bHsp70-specific lymphocytes cross-react against released endogenous Hsp70, causing an (auto)immune response against self-Hsp70 (7). In addition, myelin peptides, such as PLP and MBP, generated during myelin destruction, are chaperoned by Hsp70. Hsp70-PLP and Hsp70-MBP complexes are recognized by APC (8), triggering an adaptive immune response against the PLP and MBP peptides (9). Finally, Hsp70 might exhibit an immunoregulatory function mediated by NK cells (10); however, the mechanisms are still unclear.

strated that Hsp70 is overexpressed in the CNS of MS patients, and this phenomenon has been associated with a neuroprotective function of Hsp70 in neurons and oligodendrocytes in an inflammatory environment. However, when the overexpression of Hsp70 fails to prevent cell death, high quantities of

Hsp70 are released into the milieu, which indirectly promotes or exacerbates an immunological response mediated by its cytokinelike property as well as its myelin-peptide adjuvant capacity.

Conversely, in PBMC from MS patients, an aberrant upregulation of Hsp70 has been detected after heat shock or LPS

stimulation. In a variety of tumor cells, high levels of Hsp70 have been associated with an increased tumorigenic potential and a negative prognostic value that is related to the powerful Hsp70 antiapoptotic function. Because MS is characterized by a deregulated immunological response, a strong increase in Hsp70

expression in PBMC could make them more pathogenic (that is, resistant to regulatory cell action).

Hsp70 has been shown to induce not only proinflammatory but also immunoregulatory responses. However, the mechanisms underlying the antiinflammatory capacity of Hsp70 are poorly understood. At present, it is unclear if the roles of Hsp70 in MS are beneficial or harmful, and more studies are needed to clarify the mechanisms.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joseph A Graells for his help with editing the language in the manuscript. This study was supported by Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM) (RD07/0060) from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministry of Science and Innovation, Spain; and the Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya (2009 SGR 0793) from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain. CE is partially supported by the Miguel Servet program (CP07/00146) from the FIS, Ministry of Science and Innovation, Spain.

## DISCLOSURE

The authors declare that they have no competing interests as defined by Molecular Medicine, or other interests that might be perceived to influence the results and discussion reported in this paper.

## REFERENCES

- Flynn GC, Chappell TG, Rothman JE. (1989) Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science*. 245:385–90.
- Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. (1990) Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*. 248:850–4.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. 295:1852–8.
- Murakami H, Pain D, Blobel G. (1988) 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J. Cell Biol.* 107:2051–7.
- Shi Y, Thomas JO. (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.* 12:2186–92.
- Ritossa FA. (1962) New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 18:571–3.
- Li GC, Werb Z. (1982) Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79:3218–22.
- Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ. (1988) Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science*. 242:433–6.
- Lindquist S, Craig EA. (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631–77.
- Welch WJ. (1993) Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 339:327–33.
- Jaattela M. (1999) Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med.* 31:261–71.
- Hunt C, Morimoto RI. (1985) Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:6455–9.
- Tavaria M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. (1996) A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones*. 1:23–8.
- Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 581:3702–10.
- Sospedra M, Martin R. (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23:683–747.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. (2000) Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343:938–52.
- Rajaiah R, Moudgil KD. (2009) Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 8:388–93.
- van Eden W, van der Zee R, Prakken B. (2005) Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 5:318–30.
- Tytell M, Hooper PL. (2001) Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin. Ther. Targets*. 5:267–87.
- Turturici G, Sconzo G, Geraci F. (2011) Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem. Res. Int.* 2011:618127.
- National MS Society. About MS: who gets MS [Internet]? [cited 2012 Aug 27]. Available from: <http://www.nationalmssociety.org/about-multiple-sclerosis/what-we-know-about-ms/who-gets-ms/index.aspx>
- Compston A, Coles A. (2002) Multiple sclerosis. *Lancet*. 359:1221–31.
- Whitacre CC. (2001) Sex differences in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 2:777–80.
- Sundstrom P, et al. (2004) An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology*. 62:2277–82.
- Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. (2006) Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 296:2832–8.
- Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. (2008) Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J. Neuroimmunol.* 194:7–17.
- Handel AE, et al. (2011) Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PLoS One*. 6:e16149.
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. (2004) Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 3:104–10.
- Hafler DA, et al. (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 357:851–62.
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS. (2006) Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N. Engl. J. Med.* 354:942–55.
- Zamvil SS, Steinman L. (1990) The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu. Rev. Immunol.* 8:579–621.
- Pettinelli CB, McFarlin DE. (1981) Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J. Immunol.* 127:1420–3.
- Mokhtarian F, McFarlin DE, Raine CS. (1984) Adoptive transfer of myelin basic protein-sensitized T cells produces chronic relapsing demyelinating disease in mice. *Nature*. 309:356–8.
- van der Veen RC, Trotter JL, Clark HB, Kapp JA. (1989) The adoptive transfer of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis with lymph node cells sensitized to myelin proteolipid protein. *J. Neuroimmunol.* 21:183–91.
- Wucherpfennig KW, Strominger JL. (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*. 80:695–705.
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199:971–9.
- Dore-Duffy P, Washington R, Dragovic L. (1993) Expression of endothelial cell activation antigens in microvessels from patients with multiple sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 331:243–8.
- Comabella M, Khoury SJ. (2012) Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* 142:2–8.
- Morimoto RI. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes. Dev.* 12:3788–96.
- Mayer MP, Bukau B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:670–84.
- Voellmy R, Boellmann F. (2007) Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594:89–99.
- Freedman MS, Buu NN, Ruijs TC, Williams K, Antel JP. (1992) Differential expression of heat shock proteins by human glial cells. *J. Neuroimmunol.* 41:231–8.
- Satoh J, Yamamura T, Kunishita T, Tabira T.

- (1992) Heterogeneous induction of 72-kDa heat shock protein (HSP72) in cultured mouse oligodendrocytes and astrocytes. *Brain Res.* 573:37–43.
44. Satoh J, Kim SU. (1994) HSP72 induction by heat stress in human neurons and glial cells in culture. *Brain Res.* 653:243–50.
  45. Foster JA, Brown IR. (1997) Differential induction of heat shock mRNA in oligodendrocytes, microglia, and astrocytes following hyperthermia. *Brain Res. Mo Brain Res.* 1. 45:207–18.
  46. Mosser DD, Morimoto RI. (2004) Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene.* 23:2907–18.
  47. Benn SC, Woolf CJ. (2004) Adult neuron survival strategies—slamming on the brakes. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:686–700.
  48. Beere HM. (2004) “The stress of dying”: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 117:2641–51.
  49. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. (2007) Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion.* 1:53–60.
  50. Evans CG, Wisen S, Gestwicki JE. (2006) Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1–42) aggregation in vitro. *J. Biol. Chem.* 281:33182–91.
  51. Magrane J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW. (2004) Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J. Neurosci.* 24:1700–6.
  52. Dou F, et al. (2003) Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:721–6.
  53. Muchowski PJ, et al. (2000) Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:7841–6.
  54. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM. (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson’s disease. *Science.* 295:865–8.
  55. Heneka MT, et al. (2001) The heat shock response reduces myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J. Neurochem.* 77:568–79.
  56. Zhang JF, Huang R, Xu J, Jin SJ, Yang YJ. (2007) Protective effects of heat shock preconditioning on the experimental autoimmune encephalomyelitis rats [in Chinese]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 9:563–6.
  57. Brown IR. (1991) Expression of heat shock genes (hsp70) in the mammalian nervous system. *Results Probl. Cell Differ.* 17:217–29.
  58. Tytell M, Greenberg SG, Lasek RJ. (1986) Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res.* 363:161–4.
  59. Hightower LE, Guidon PT Jr. (1989) Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J. Cell Physiol.* 138:257–66.
  60. Sheller RA, Smyers ME, Grossfeld RM, Ballinger ML, Bittner GD. (1998) Heat-shock proteins in axoplasm: high constitutive levels and transfer of inducible isoforms from glia. *J. Comp. Neurol.* 396:1–11.
  61. Guzhova I, et al. (2001) In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res.* 914:66–73.
  62. Gao YL, Brosnan CF, Raine CS. (1995) Experimental autoimmune encephalomyelitis. Qualitative and semiquantitative differences in heat shock protein 60 expression in the central nervous system. *J. Immunol.* 154:3548–56.
  63. Aquino DA, Klipfel AA, Brosnan CF, Norton WT. (1993) The 70-kDa heat shock cognate protein (HSC70) is a major constituent of the central nervous system and is up-regulated only at the mRNA level in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 61:1340–8.
  64. Aquino DA, et al. (1997) Multiple sclerosis: altered expression of 70- and 27-kDa heat shock proteins in lesions and myelin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:664–72.
  65. Chabas D, et al. (2001) The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science.* 294:1731–5.
  66. Rajdev S, et al. (2000) Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann. Neurol.* 47:782–91.
  67. Hoehn B, et al. (2001) Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21:1303–9.
  68. Stadelmann C, et al. (2005) Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Balo’s type of multiple sclerosis. *Brain.* 128:979–87.
  69. Brosnan CF, Battistini L, Gao YL, Raine CS, Aquino DA. (1996) Heat shock proteins and multiple sclerosis: a review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55:389–402.
  70. Bajramovic JJ, et al. (2000) Differential expression of stress proteins in human adult astrocytes in response to cytokines. *J. Neuroimmunol.* 106:14–22.
  71. D’Souza SD, Antel JP, Freedman MS. (1994) Cytokine induction of heat shock protein expression in human oligodendrocytes: an interleukin-1-mediated mechanism. *J. Neuroimmunol.* 50:17–24.
  72. Fleshner M, Johnson JD. (2005) Endogenous extra-cellular heat shock protein 72: releasing signal(s) and function. *Int. J. Hyperthermia.* 21:457–71.
  73. Binder RJ, Vatner R, Srivastava P. (2004) The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens.* 64:442–51.
  74. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ Jr. (2007) Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1113:28–39.
  75. Van Eden W, Wick G, Albani S, Cohen I. (2007) Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1113:217–37.
  76. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* 12:1539–46.
  77. Hunter-Lavin C, et al. (2004) Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324:511–7.
  78. Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z. (2005) Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J. Cell Sci.* 118:3631–8.
  79. Lancaster GI, et al. (2004) Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress Chaperones.* 9:276–80.
  80. Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, Asea A. (2005) Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J. Immunol.* 175:2900–12.
  81. Asea A, et al. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277:15028–34.
  82. Multhoff G, et al. (1999) Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp. Hematol.* 27:1627–36.
  83. Gross C, et al. (2003) Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones.* 8:348–60.
  84. Gastpar R, et al. (2005) Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.* 65:5238–47.
  85. Asea A, et al. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 6:435–42.
  86. Moroi Y, et al. (2000) Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:3485–90.
  87. Lehner T, et al. (2000) Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* 30:594–603.
  88. Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. (2002) Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J. Immunol.* 168:2997–3003.
  89. Singh-Jasuja H, et al. (2000) The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur. J. Immunol.* 30:2211–5.
  90. Kuppner MC, et al. (2001) The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* 31:1602–9.
  91. Becker T, Hartl FU, Wieland F. (2002) CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J. Cell Biol.* 158:1277–85.
  92. Suto R, Srivastava PK. (1995) A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science.* 269:1585–8.

93. Doody AD, et al. (2004) Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J. Immunol.* 172:6087–92.
94. Li Y, Subjeck J, Yang G, Repasky E, Wang XY. (2006) Generation of anti-tumor immunity using mammalian heat shock protein 70 DNA vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine.* 24:5360–70.
95. Gong J, et al. (2010) A heat shock protein 70-based vaccine with enhanced immunogenicity for clinical use. *J. Immunol.* 184:488–96.
96. Bausinger H, et al. (2002) Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur. J. Immunol.* 32:3708–13.
97. Gao B, Tsan MF. (2003) Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 278:174–9.
98. Cwiklinska H, et al. (2003) Heat shock protein 70 associations with myelin basic protein and proteolipid protein in multiple sclerosis brains. *Int. Immunol.* 15:241–9.
99. Mycko MP, et al. (2004) Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II. *J. Immunol.* 172:202–13.
100. Lund BT, et al. (2006) Association of MBP peptides with Hsp70 in normal appearing human white matter. *J. Neurol. Sci.* 249:122–34.
101. Galazka G, et al. (2006) Brain-derived heat shock protein 70-peptide complexes induce NK cell-dependent tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 176:1588–99.
102. Galazka G, et al. (2007) EAE tolerance induction with Hsp70-peptide complexes depends on H60 and NKG2D activity. *J. Immunol.* 179:4503–12.
103. Mycko MP, et al. (2008) A heat shock protein gene (Hsp70.1) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen. *Eur. J. Immunol.* 38:1999–2013.
104. Battistini L, et al. (1995) Gamma delta T cell receptor analysis supports a role for HSP 70 selection of lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Mol. Med.* 1:554–62.
105. Freedman MS, Ruijs TC, Selin LK, Antel JP. (1991) Peripheral blood gamma-delta T cells lyse fresh human brain-derived oligodendrocytes. *Ann. Neurol.* 30:794–800.
106. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. (2006) IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol.* 177:4662–9.
107. Sutton CE, et al. (2009) Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* 31:331–41.
108. Rachitskaya AV, et al. (2008) Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J. Immunol.* 180:5167–71.
109. Cwiklinska H, Mycko MP, Szymanska B, Matysiak M, Selmaj KW. (2010) Aberrant stress-induced Hsp70 expression in immune cells in multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 88:3102–10.
110. Routsias JG, Tzioufas AG. (2006) The role of chaperone proteins in autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088:52–64.
111. Lamb JR, et al. (1989) Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int. Immunol.* 1:191–6.
112. Munk ME, et al. (1989) T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *J. Immunol.* 143:2844–9.
113. Abulafia-Lapid R, et al. (1999) T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J. Autoimmun.* 12:121–9.
114. Perschinka H, et al. (2003) Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:1060–5.
115. Res PC, et al. (1988) Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. *Lancet.* 2:478–80.
116. Salvetti M, et al. (1992) T-lymphocyte reactivity to the recombinant mycobacterial 65- and 70-kDa heat shock proteins in multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* 5:691–702.
117. Salvetti M, et al. (1996) The immune response to mycobacterial 70-kDa heat shock proteins frequently involves autoreactive T cells and is quantitatively dysregulated in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 65:143–53.
118. Stinissen P, et al. (1995) Increased frequency of gamma delta T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. Reactivity, cytotoxicity, and T cell receptor V gene rearrangements. *J. Immunol.* 154:4883–94.
119. Chiba S, et al. (2006) Autoantibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 241:39–43.
120. Jorgensen C, Gedon E, Jaquet C, Sany J. (1998) Gastric administration of recombinant 65 kDa heat shock protein delays the severity of type II collagen induced arthritis in mice. *J. Rheumatol.* 25:763–7.
121. Wendling U, et al. (2000) A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J. Immunol.* 164:2711–7.
122. Chandawarkar RY, Wagh MS, Kovalchin JT, Srivastava P. (2004) Immune modulation with high-dose heat-shock protein gp96: therapy of murine autoimmune diabetes and encephalomyelitis. *Int. Immunol.* 16:615–24.
123. Birnbaum G, et al. (1998) Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis. II: environmental infection and extra-neuraxial inflammation alter the course of chronic relapsing encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 90:149–61.
124. Raz I, et al. (2001) Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet.* 358:1749–53.
125. Wieten L, et al. (2009) IL-10 is critically involved in mycobacterial HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. *PLoS One.* 4:e4186.
126. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. (1998) Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol. Invest.* 27:367–77.
127. Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. (1999) Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chaperones.* 4:29–35.
128. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK. (2008) The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem. Sci.* 33:71–9.
129. Wright BH, Corton JM, El-Nahas AM, Wood RF, Pockley AG. (2000) Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels.* 15:18–22.
130. Pockley AG, et al. (2000) Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension.* 36:303–7.
131. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegard J. (2003) Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension.* 42:235–8.
132. Birnbaum G, Kotilinek L. (1997) Heat shock or stress proteins and their role as autoantigens in multiple sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 835:157–67.
133. Bustamante ME, et al. (2011) Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 70:634–45.
134. Yokota S, Chiba S, Furuyama H, Fujii N. (2010) Cerebrospinal fluids containing anti-HSP70 autoantibodies from multiple sclerosis patients augment HSP70-induced proinflammatory cytokine production in monocytic cells. *J. Neuroimmunol.* 218:129–33.
135. Milner CM, Campbell RD. (1990) Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics.* 32:242–51.
136. Favatier F, Bornman L, Hightower LE, Gunther E, Polla BS. (1997) Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell Stress Chaperones.* 2:141–55.
137. Wu B, Hunt C, Morimoto R. (1985) Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol. Cell. Biol.* 5:330–41.
138. Ramachandran S, Bell RB. (1995) Heat shock protein 70 gene polymorphisms and multiple sclerosis. *Tissue Antigens.* 46:140–1.
139. Cascino I, et al. (1994) HSP70-1 promoter re-

- gion polymorphism tested in three autoimmune diseases. *Immunogenetics*. 39:291–3.
140. Niino M, et al. (2001) Heat shock protein 70 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. 58:93–6.
  141. Satoh J, et al. (2005) Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 18:537–50.
  142. Mandel M, Gurevich M, Pautzner R, Kaminski N, Achiron A. (2004) Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 138:164–70.
  143. Bomprezzi R, et al. (2003) Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum. Mol. Genet.* 12:2191–9.
  144. Cudkowicz ME, et al. (2008) Arimoclomol at dosages up to 300 mg/day is well tolerated and safe in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 38:837–44.
  145. Traynor BJ, et al. (2006) Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology*. 67:20–7.
  146. Benn SC, Brown RH Jr. (2004) Putting the heat on ALS. *Nat. Med.* 10:345–7.
  147. Kieran D, et al. (2004) Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat. Med.* 10:402–5.
  148. Dello Russo C, et al. (2006) The heat-shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin suppresses glial inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 99:1351–62.
  149. Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI. (1992) Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science*. 255:1243–5.
  150. Ohtsuka K, Kawashima D, Gu Y, Saito K. (2005) Inducers and co-inducers of molecular chaperones. *Int. J. Hyperthermia*. 21:703–11.
  151. Eriksen JL, et al. (2003) NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *J. Clin. Invest.* 112:440–9.
  152. Fu YF, et al. (2006) (5R)-5-hydroxytriptolide (LLDT-8), a novel triptolide derivative, prevents experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibiting T cell activation. *J. Neuroimmunol.* 175:142–51.
  153. Wang Y, Mei Y, Feng D, Xu L. (2008) Triptolide modulates T-cell inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 86:2441–9.
  154. Kizelsztejn P, Komarnytsky S, Raskin I. (2009) Oral administration of triptolide ameliorates the clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by induction of HSP70 and stabilization of NF-kappaB/IkappaBalpha transcriptional complex. *J. Neuroimmunol.* 217:28–37.
  155. Liu Q, et al. (2004) Triptolide (PG-490) induces apoptosis of dendritic cells through sequential p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319:980–6.
  156. Westerheide SD, Kawahara TL, Orton K, Morimoto RI. (2006) Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 281:9616–22.
  157. Liu Q. (2011) Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions. *Int. Immunopharmacol.* 11:377–83.



## ORIGINAL ARTICLE

## Up-regulation of inducible heat shock protein-70 expression in multiple sclerosis patients

María José Mansilla<sup>1</sup>, Manuel Comabella<sup>1</sup>, Jordi Río<sup>1</sup>, Joaquín Castelló<sup>1</sup>, Mireia Castillo<sup>1</sup>, Roland Martin<sup>2</sup>, Xavier Montalban<sup>1</sup>, and Carmen Espejo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servei de Neurologia-Neuroimmunologia, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (CEM-Cat), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain and <sup>2</sup>Department of Neuroimmunology and Multiple Sclerosis Research, Neurology Clinic, University Hospital Zürich, Zürich, Switzerland

### Abstract

Inducible heat shock protein (HSP)70 (HSP70-1A and HSP70-1B proteins) is a chaperone responsible for assisting proper protein folding. Following stress conditions, HSP70 is highly up-regulated to mediate cytoprotective functions. In addition, HSP70 is able to trigger innate and adaptive immune responses that promote the immune recognition of antigens and to act as a cytokine when it is released. The data in the literature are controversial with regard to expression studies in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In the present study, we aimed to examine if alterations of HSP70-1A/B expression are involved in the autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis (MS). We determined both mRNA and protein expression in PBMCs of MS patients and healthy donors (HDs). We found a baseline increased expression of the *HSPA1A* gene in PBMCs from MS patients compared with HDs. Gene expression findings were associated with an increased protein expression of HSP70-1A/B in T lymphocytes (CD4+ and CD8+) and monocytes from MS patients under basal conditions that may reflect the immunological activation occurring in MS patients. We also provided evidence that heat shock (HS) stimulus induced HSP70-1A/B protein expression in HDs and MS patients, and that HS-induced HSP70-1A/B protein expression in monocytes correlated with the number of T2 lesions at baseline in MS patients. However, after lipopolysaccharide inflammatory stimulus, monocytes from MS patients failed to induce HSP70-1A/B protein expression. Our data hint at altered immune responses in MS and may indicate either a state of chronic stress or increased vulnerability to physiological immune responses in MS patients.

### Keywords

Autoimmunity, heat shock protein, HSPA1A, immune regulation, multiple sclerosis

### History

Received 2 August 2013  
Revised 7 November 2013  
Accepted 11 November 2013  
Published online 12 December 2013

### Introduction

Heat shock proteins (HSPs) are evolutionarily conserved chaperones that assist in the proper folding of newly synthesised proteins and are responsible for the quality control of misfolded proteins. Consequently, HSPs play an essential role in promoting cell survival following stress or harmful conditions such as heat shock (HS), nutrient deprivation, irradiation, hypoxia, oxidative and toxic stresses, infection and exposure to inflammatory cytokines. Under such stress conditions, inducible HSPs are highly up-regulated as the result of a HS response to maintain cellular homeostasis and to facilitate cell survival functions [1–5].

Among the HSPs, HSP70 is the most conserved and intensely studied family and includes the constitutively expressed HSC70 (HSP73) and the stress-inducible HSP70

(HSP70-1A and HSP70-1B) proteins [6–8]. HSP70 is located mainly in the cytosol. Adverse conditions trigger HSP70 expression, which then translocates to the nucleus and activates cytoprotective functions, acting as a chaperone and anti-apoptotic mediator. In addition to intracellular cytoprotective roles, HSP70 can be released actively via exosomes to the extracellular milieu, where it acts as a danger signal that induces immune responses. Furthermore, HSP70 can participate in the uptake and cross-presentation of antigens, and this role has been employed to improve tumor-specific vaccination protocols [9,10]. The above brief summary is far from complete, but indicates that HSP70 could be involved in chronic inflammatory and autoimmune conditions at multiple levels and by several different mechanisms.

Multiple sclerosis (MS) is considered a prototypic T cell-mediated autoimmune disease that is characterised by inflammation, and various degrees of demyelination, damage of axons and neurons and glial scarring in the central nervous system (CNS). The currently approved therapies of MS are all immunomodulatory or immunosuppressive, and neuroprotective approaches are being examined, but not yet

Correspondence: Carmen Espejo, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (CEM-Cat), Vall d'Hebron Institut de Recerca, Ps. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel: +34934893599. Fax: +34932746084. E-mail: carmen.espejo@vhir.org

Table 1. Demographic and baseline clinical characteristics of MS patients and HDs.

		<i>HSPA1A</i> gene expression		HSP70-1A/B protein expression	
		Fresh PBMCs	Frozen PBMCs	Non-stimulated PBMCs	Stress-induced PBMCs
<i>N</i>	MS	30	9	32	14
	HD	30	10	30	14
Age	MS	35.7 (9.0)	37 (10.9)	34.3 (9.1)	34.1 (9.4)
	HD	33.9 (8.3)	30.3 (6.2)	31.2 (7.6)	30.9 (6.5)
Ratio ♂/♀ (% females)	MS	13/17 (56.7%)	4/5 (55.6%)	11/21 (65.6%)	4/10 (71.4%)
	HD	11/19 (63.3%)	3/7 (70.0%)	9/21 (70.0%)	3/11 (78.6%)
EDSS	MS	1.7 (0.7)	1.9 (0.9)	1.8 (0.9)	1.8 (0.6)
Disease duration (years)	MS	4.2 (4.9)	3.4 (4.1)	3.5 (4.4)	4.8 (5.5)
T2 lesions	MS	2.0 (0.9)	2.0 (0.6)	1.9 (0.7)	2.0 (0.7)
Gd-enhancing lesions	MS	1.5 (3.1)	0.4 (1.1)	3.3 (6.5)	4.6 (7.0)
Clinical form	MS	27 RRMS / 3 CIS	8 RRMS / 1 CIS	23 RRMS / 9 CIS	10 RRMS / 4 CIS

CIS: clinical isolated syndrome; EDSS: Expanded Disability Status Scale; Gd: gadolinium; HD: healthy donor; MS: multiple sclerosis; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; RRMS: relapsing-remitting multiple sclerosis. Data are expressed as mean values (standard deviation).

available to patients. In CNS lesions in both MS patients and animals with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the prototypic animal model for MS, an up-regulation of HSP70 expression has been observed and interpreted as activation of endogenous neuroprotective mechanisms [11–13]. In contrast, Cwiklinska and co-workers (2003) detected HSP70–myelin basic protein (MBP) and HSP70–proteolipid protein (PLP) complexes in the CNS lesions of MS patients. Paradoxically, these MBP/PLP–HSP70 complexes are highly immunogenic and are able to induce specific T-cell responses in animals with EAE [13–15].

The genes coding for HSP70 (*HSPA1A* and *HSPA1B*) are located on chromosome 6 (6p21.3) within the HLA region. Gene expression studies using microarrays have reported a down-regulation of *HSPA1A* expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of MS patients compared to healthy donors (HDs) [16–19]. Although histopathological studies have demonstrated an up-regulation of HSP70 in MS and EAE lesions, protein analyses of HSP70 expression in PBMCs did not reveal differences between MS patients and HDs [20]. Despite the absence of differences in HSP70 protein expression in freshly isolated PBMCs, an increased induction of HSP70 expression was observed in PBMCs of MS patients following an inflammatory or HS stimulus [20]. The above data from previous studies as well as the known functions of HSP70 indicate that HSP70 itself and/or other family members of this fundamental cytoprotective pathway may be involved in the autoimmune pathogenesis of MS.

Based on the above in part controversial observations, we aimed to investigate the potential role of HSP70 in MS pathogenesis by determining its gene and protein expression under different experimental conditions in a well-characterized cohort of relapse-onset MS patients and age- and gender-matched HDs.

## Methods

### Patients

Patients with clinically isolated syndromes (CIS) and untreated relapsing-remitting MS (RRMS) were included in this study. No patient had clinical exacerbations or had received corticosteroid treatment during the month prior to

blood sample collection. An age- and gender-matched control group of HDs was also included. All patients and HDs gave their informed consent, and this study was approved by the local ethics committee. Demographic and baseline clinical characteristics of the MS patients and HDs included in the study are shown in Table 1.

### Sample collection

Blood samples from MS patients and HDs were collected by standard venipuncture in sodium citrate tubes, and PBMCs were isolated by Ficoll-Isopaque density gradient centrifugation (Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Paisley, UK) according to standard procedures. Isolated PBMCs were re-suspended in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 25 mM HEPES, 50 U/ml of penicillin and 50 mg/ml of streptomycin, all obtained from Gibco BRL. Aliquots of PBMCs from a subgroup of MS patients and HDs were cryopreserved and stored in liquid nitrogen.

### HSP70 gene expression

*HSPA1A* gene expression was analysed in fresh PBMCs (30 MS patients and 30 HDs) and in a subgroup of cryopreserved PBMC samples (9 MS patients and 10 HDs).

Total RNA was obtained from both fresh and frozen PBMCs using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). One microgram of RNA was retrotranscribed into cDNA using an Omniscript RT kit (Qiagen), and the gene expression levels of *HSPA1A* were assessed by real-time PCR relative quantification using Taqman expression assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). *PGK1* (phosphoglycerate-kinase 1; Applied Biosystems) was used as an endogenous control. To select the appropriate endogenous control for data normalisation, 11 endogenous genes were previously tested using the Taqman human endogenous control plate (Applied Biosystems) in four PBMC samples from both MS patients and HDs. Real-time PCR was performed in an ABI Prism 7000 thermal cycler (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. The threshold cycle ( $C_T$ ) value for each reaction was used to calculate the relative level of

gene expression for each sample using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [21]. Samples were tested in triplicate.

### HSP70 protein expression

The expression of intracellular HSP70-1A/B protein was assessed in CD4+ (CD3+CD8-) and CD8+ (CD3+CD8+) T lymphocytes and monocytes (CD14+) by flow cytometry from non-stimulated PBMCs or from PBMCs stimulated by either HS or an inflammatory challenge [20]. In brief, for the HS stimulus PBMCs were incubated at 40°C overnight in a water bath followed by a 30-min recovery period at 37°C. The inflammatory stress was induced incubating PBMCs in the presence of 5 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) for 24 h in humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C. Following stress stimuli, PBMCs were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with a saturating amount of PerCP-conjugated anti-human CD3 (Becton Dickinson (BD) Pharmingen, San Diego, CA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD8 (BD Pharmingen), and antigen presenting cell (APC)-conjugated anti-human CD14 (BD Pharmingen) or the corresponding isotype controls (BD Pharmingen) for 25 min at room temperature. Then, the cells were washed with PBS and fixed and permeabilised using two different commercial intracellular staining protocols following the manufacturer's instructions to quantify the cytoplasmic (Dako IntraStain, Fixation and Permeabilization kit; Dako, Glostrup, Denmark) and total (cytoplasmic plus nuclear) (BD Cytotfix/Cytoperm; BD Bioscience, San Diego, CA) HSP70-1A/B protein expression. During the permeabilisation process, the cells were incubated with a PE-conjugated monoclonal antibody against HSP70-1A/-1B (clone C92F3A-5, reference SPA-810PE, Stressgen, Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI), or an isotype control antibody (IgG1-PE, BD Pharmingen).

Data acquisition was performed on a FACSCanto™ flow cytometer and analysed with DIVA software (BD, Mountain View, CA). The mean fluorescence intensity (MFI) and percentage of HSP70-1A/B positive cells were calculated by

subtracting the isotype control signal from the HSP70-1A/B specific signal.

### Statistical analysis

Data are shown as mean values (standard deviation) unless otherwise stated. Statistical analysis was performed with SPSS 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL) and Prism software (GraphPad version 5.1 software Inc., San Diego, CA) both for MS-Windows. Parametric and nonparametric tests were used depending on the normality conditions. To compare data from two groups, Wilcoxon, Mann-Whitney *U* or *t* tests were applied. When more than two groups were compared, a Friedman test along with Dunn's *post-hoc* test was applied. Spearman correlations or generalized linear models were used to determine association between HSP70 expression and clinical or demographic variables of MS patients and HDs. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

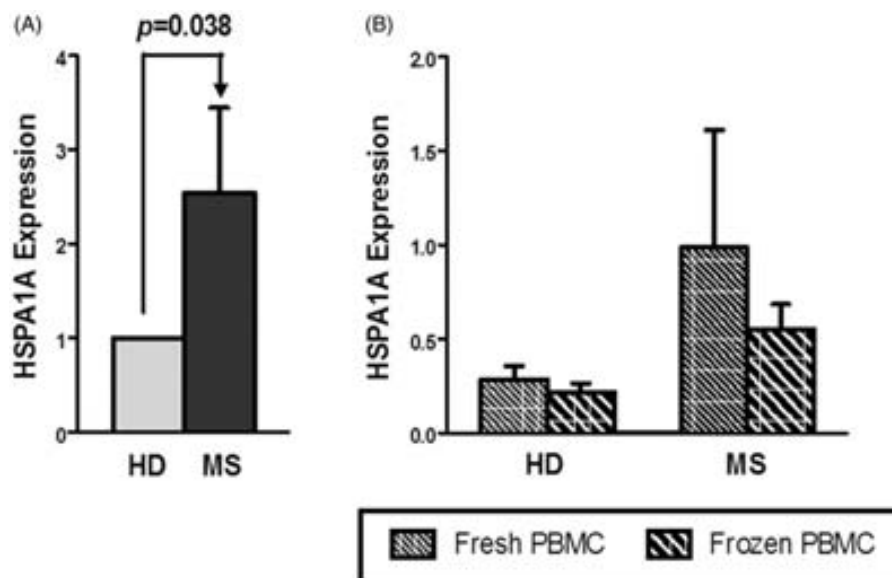
### Results

#### HSP70 gene expression is up-regulated in the PBMCs of MS patients

We first investigated differences in *HSPA1A* gene expression by means of real-time PCR in fresh PBMCs from 30 MS patients and 30 HDs. As shown in Figure 1(A), *HSPA1A* gene expression was increased 2.5-fold in PBMCs of MS patients compared to HDs ( $p = 0.038$ ). No associations of *HSPA1A* expression with either demographic or clinical variables of MS patients or HDs were found.

To evaluate whether sample cryopreservation could modify *HSP70* gene expression, *HSPA1A* mRNA expression levels were also determined in a subgroup of previously frozen/thawed PBMCs from 9 MS patients and 10 HDs. As depicted in Figure 1(B), *HSPA1A* expression did not significantly differ between fresh and cryopreserved PBMCs from MS patients or HDs.

Figure 1. *HSP70* gene expression is increased in MS patients. (A) *HSP70* (*HSPA1A*) relative gene expression was determined in total RNA from fresh PBMCs using real-time PCR, and *PGK1* gene expression was used as an endogenous control. The results were normalised to the gene expression of *HSP70* in HDs. MS patients showed 2.5-fold greater *HSPA1A* mRNA expression than HDs ( $N = 30$  in each group,  $p = 0.038$ ). (B) In a subgroup of MS patients and HDs, *HSPA1A* relative gene expression was also determined following PBMC cryopreservation. No alterations in *HSPA1A* expression were detected in cryopreserved PBMCs from either MS or HD ( $N = 9$  and  $N = 10$ , respectively). Error bars represent the standard error of the mean (SEM).



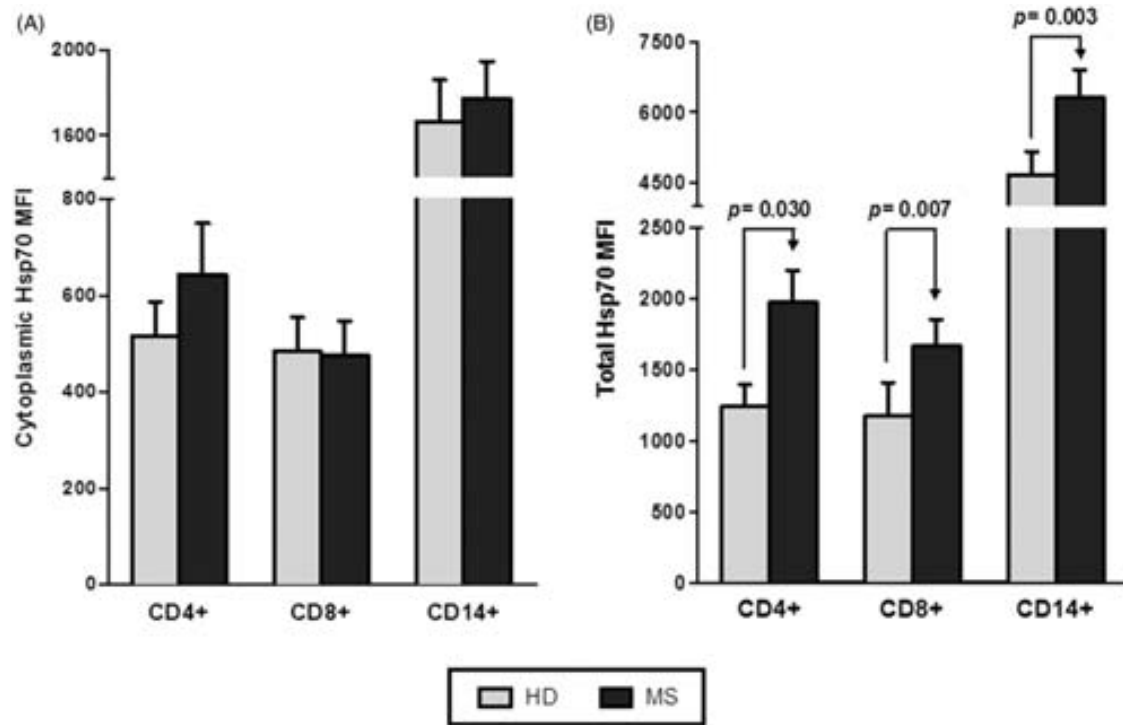


Figure 2. Total HSP70 protein expression is up-regulated in non-stimulated T lymphocytes and monocytes from MS patients. Cytoplasmic (A) and total (B) HSP70-1A/B protein expression was studied in CD4+ and CD8+ T lymphocytes and monocytes under baseline conditions. Although no differences were found in cytoplasmic HSP70-1A/B protein expression between groups ( $N=30$  HD and  $N=32$  MS patients), all cell types from MS patients showed increased total (cytoplasmic plus nuclear) HSP70-1A/B protein levels compared to HDs ( $N=14$  in each group). Error bars represent SEM.

### Total HSP70-1A/B expression is increased in T lymphocytes and monocytes from MS patients

We next examined HSP70-1A/B protein expression in CD4+ (CD3+CD8-) and CD8+ (CD3+CD8+) T lymphocytes and in monocytes (CD14+) from non-stimulated PBMCs of 32 MS patients and 30 age- and gender-matched HDs. Flow cytometry analysis showed no differences in the cytoplasmic MFI expression between MS patients and HDs (Figure 2A). Similarly, the percentage of HSP70-1A/B positive cells was comparable between groups (data not shown).

Because HSP70 translocates to the nucleus following stress conditions [22], we also analysed the total (cytoplasmic plus nuclear) cellular expression of HSP70-1A/B in a subgroup of 14 MS patients and 14 HDs. Interestingly, the PBMCs from MS patients exhibited a significant increase in total HSP70-1A/B protein expression compared to HDs in all cell types studied (for CD4,  $p=0.030$ ; for CD8,  $p=0.007$ ; for CD14,  $p=0.003$ ) (Figure 2B).

Neither HSP70-1A/B T cell nor monocyte expression was associated with baseline clinical or demographic variables of MS patients or HDs.

### Induction of HSP70-1A/B protein expression following HS or inflammatory stress

To study the induction of HSP70-1A/B protein expression after stress stimulus, PBMCs from 14 MS patients and 14 HDs were challenged with a thermal (HS) or an inflammatory (LPS) stimulus, and both the cytoplasmic and total HSP70-1A/B expression levels were analysed in T lymphocytes and in monocytes. As shown in Figure 3, HS stress induced a total

HSP70-1A/B expression in both T lymphocytes and monocytes in HDs (for CD4,  $p<0.001$ ; for CD8,  $p=0.013$ ; for CD14,  $p=0.003$ ). HS also induced HSP70-1A/B expression in PBMCs from MS patients, and differences reached statistical significance for CD8+ T cells ( $p=0.021$ ) and monocytes ( $p=0.001$ ) from MS patients but not in CD4+ T cells (Figure 3A). In addition, we found a positive correlation between total expression of HS-induced HSP70-1A/B protein in monocytes and the number of T2 lesions at baseline in MS patients ( $r=0.61$ ;  $p=0.034$ ). Interestingly, monocyte activation by LPS stimulation caused an increase in total HSP70-1A/B protein expression in HDs ( $p<0.001$ ) but not in MS patients (Figure 3B). No differences were observed when cytoplasmic HSP70-1A/B expression was analysed after either HS or LPS stimulus (data not shown).

### Discussion and conclusions

Traditionally, HSP70 has been considered to be involved in homeostatic functions and cytoprotection because it participates in proper protein folding, avoidance of folding mistakes, and hence in preventing protein aggregation [23–25]. In addition, it has also been reported that HSP70 blocks multiple steps of the cellular apoptosis pathway [26–29]. Its close location to the MHC class II region, which remains the genomic region most consistently associated with an increased genetic risk for MS [30], suggested that HSP70 may be implicated in the altered immune response that takes place in the disease. Histopathological studies in MS patients have shown an up-regulation in HSP70 expression within CNS lesions [11,12,31], findings that were interpreted as a

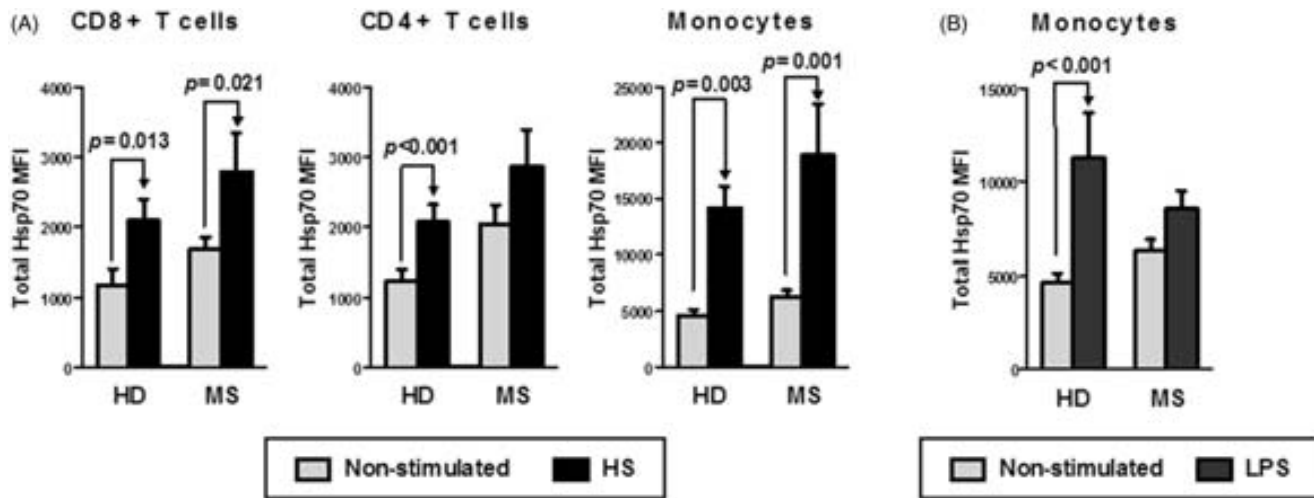


Figure 3. Induction of HSP70-1A/B protein expression following HS or LPS stimulus. Comparison of total HSP70-1A/B protein expression at baseline conditions and following HS in CD4+ and CD8+ T lymphocytes and in monocytes (A) or following LPS stimulus in monocytes (B) from MS patients and HDs ( $N = 14$  in each group). Error bars represent SEM.

protective response of local cells to the inflammatory environment [32]. Studies in peripheral blood cells, however, have revealed a lower expression of *HSPA1A*, one of the inducible genes for HSP70, in MS patients compared with HDs [14–16].

During recent years it has become clear that HSP70 serves a multitude of other functions than cytoprotection and could also be involved in autoantigen presentation of MBP/PLP–HSP70 complexes in MS patients [14] as well as more generally in eliciting innate and adaptive immune responses, which has recently been reviewed [33].

Based on the above previous studies on *HSPA1A* gene expression, the data from protein expression in CNS tissue in MS and EAE, and the broader understanding of the roles of HSP70 in physiological and also pathological contexts [3–5,34,35], we aimed here at re-addressing the question of *HSPA1A* expression in peripheral blood immune cells at the mRNA level by real-time PCR and also regarding protein expression by flow cytometry.

Contrary to previous studies [14–16], *HSPA1A* expression was found to be up-regulated in PBMCs from MS patients compared to HDs. When investigating the discrepancies across studies, it should be taken into account that in previous studies *HSPA1A* expression was determined with the microarray technology, and single gene validation of *HSPA1A* findings with more sensitive techniques, such as real-time PCR, was lacking in all cases. Differences between studies were not related to the sample storage conditions, as in the present study *HSPA1A* expression was comparable between fresh cells and cryopreserved samples. Other factors that could have contributed to the discrepancies may be related to the clinical characteristics of MS patients: (i) in the present study patients never received immunomodulatory or immunosuppressant treatment, whereas in previous studies patients with a washout period of 1–2 months between treatment and sample collection were considered eligible for gene expression profiling; (ii) in the present study, PBMCs were collected from MS patients with active disease activity that fulfilled the criteria for immunomodulatory treatment. In this regard,

differences in the activation status of PBMCs may also explain the differences observed across studies.

As a next step, we analysed whether the up-regulation in *HSPA1A* gene expression also correlated with the protein expression levels. Cytoplasmic HSP70-1A/B protein expression levels were similar between MS patients and HDs. However, because HSP70 translocates to the nucleus following stress [22], we also determined the total (cytoplasmic plus nuclear) HSP70-1A/B protein expression. In line with the *HSPA1A* gene expression data, total HSP70-1A/B protein expression levels were significantly increased in T lymphocytes and monocytes from MS patients compared with HDs.

Although MS etiopathogenesis is not yet fully understood, multiple lines of evidence support that CD4 + T cells, but also other cell types including CD8 + T lymphocytes and monocytes play important roles in the pathogenesis of MS [36]. In this regard, increased cellular levels of total HSP70-1A/B protein in PBMCs may be the result of stress associated with the immune cell activation that occurs in MS (reviewed in [36,37]). Cwiklinska and co-workers (2010) did not find differences in basal HSP70 protein expression in PBMCs from MS patients and HDs using a commercial ELISA kit. However, these authors reported an aberrant induction of HSP70 protein expression in PBMCs of MS patients following an inflammatory or heat stress [20]. Using a similar protocol, we assessed protein induction of total HSP70-1A/B in T lymphocytes and monocytes following HS and LPS stresses. The HS stimulus induced a significant increase in HSP70-1A/B protein expression in CD4 + T lymphocytes from HDs, that reached similar levels to those of non-stimulated CD4 + T cells from MS patients. However, in MS patients the induction of HSP70-1A/B expression showed by CD4 + T lymphocytes following HS stimulus was only moderate compared with that of HDs. These data seem to indicate HSP70-1A/B is chronically induced in CD4 + T cells from MS patients and, as a result, HS stimulus failed to trigger a significant HSP70-1A/B induction. Interestingly, we also found that the levels of total HSP70-1A/B protein expression by heat-shocked monocytes correlated with the

number of T2 lesions at baseline. This could be accounted by the fact that monocytes/macrophages are part of the inflammatory cuffs found in the CNS of MS patients and the T2-weighted MRI is commonly applied to quantify the accumulated MS lesion load. Furthermore, it has described that human HSPs might promote autoimmunity by peptidomimetic mechanism due to their similarity with bacteria HSP paralogs [38].

We also explore the differences in HSP70-1A/B expression in monocytes stimulated with LPS. This stimulation primarily activates monocytes and consequently triggers HSP70-1A/B expression in HDs and MS patients [20,39,40]. We found that monocytes from MS patients also exhibited reduced response to the inflammatory stimulus, since HSP70-1A/B up-regulation following LPS stimulation was restricted to the control population. The reasons behind this differential response to LPS stimulation in terms of HSP70-1A/B induction are unknown. However, it is tempting to speculate that the higher baseline HSP70-1A/B expression levels in monocytes from MS patients rendered the cells unresponsive to subsequent HSP70-1A/B-inducing stimuli. Other factors such a lower expression of TLR4, the LPS receptor, in monocytes from MS patients could also have contributed to these differential findings [41].

In summary, we found a baseline increased expression of *HSPA1A* gene in PBMCs from MS patients compared with HDs. Gene expression findings were associated with an increased protein expression of HSP70-1A/B in T lymphocytes (CD4+ and CD8+) and monocytes from MS patients under basal conditions that may reflect the immunological activation that occurs in MS patients. We also provided evidence that after a stress stimulus CD4+ T lymphocytes as well as monocytes from MS patients showed reduced induction of HSP70-1A/B protein expression. This points out that immune response is altered in MS and it may indicate a state of chronic stress in MS patients.

These data suggest that strategies for reducing or inhibiting HSP70-1A/B expression may be beneficial for MS patients, and, in support of this possibility, it has been reported that HSP70-deficient mice are resistant to EAE [42]. However, the side effects associated with the essential cytoprotective functions of HSP70-1A/B should be taken into account.

## Acknowledgements

We are grateful to the patients and healthy donors who agreed to participate in this study and to our nurses, Mrs. R. Horno and M. J. Vicente, for their efficient clinical/basic coordination in the provision of patient material. We thank the “Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM)” (RD12/0032) – sponsored by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministry of Economy and Competition Spain – and the “Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya (2009 SGR 0793)”, sponsored by the “Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca” (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain. CE is partially supported by the “Miguel Servet” program (CP07/00146) from the FIS, Ministry of Economy and Competition, Spain.

## Declaration of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Li, G. C., and Z. Werb. 1982. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 3218–3222.
- Riabowol, K. T., L. A. Mizzen, and W. J. Welch. 1988. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242: 433–436.
- Lindquist, S., and E. A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631–677.
- Welch, W. J. 1993. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 339: 327–333.
- Jaattela, M. 1999. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med.* 31: 261–271.
- Hunt, C., and R. I. Morimoto. 1985. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6455–6459.
- Tavaria, M., T. Gabriele, I. Kola, and R. L. Anderson. 1996. A hitchhiker’s guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1: 23–28.
- Daugaard, M., M. Rohde, and M. Jaattela. 2007. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 581: 3702–3710.
- Li, Y., J. Subjeck, G. Yang, et al. 2006. Generation of anti-tumor immunity using mammalian heat shock protein 70 DNA vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine* 24: 5360–5370.
- Gong, J., Y. Zhang, J. Durfee, et al. 2010. A heat shock protein 70-based vaccine with enhanced immunogenicity for clinical use. *J. Immunol.* 184: 488–496.
- Aquino, D. A., E. Capello, J. Weisstein, et al. 1997. Multiple sclerosis: altered expression of 70- and 27-kDa heat shock proteins in lesions and myelin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56: 664–672.
- Chabas, D., S. E. Baranzini, D. Mitchell, et al. 2001. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294: 1731–1735.
- Cwiklinska, H., M. P. Mycko, O. Luvsannorov, et al. 2003. Heat shock protein 70 associations with myelin basic protein and proteolipid protein in multiple sclerosis brains. *Int. Immunol.* 15: 241–249.
- Mycko, M. P., H. Cwiklinska, J. Szymanski, et al. 2004. Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II. *J. Immunol.* 172: 202–213.
- Lund, B. T., Y. Chakryan, N. Ashikian, et al. 2006. Association of MBP peptides with Hsp70 in normal appearing human white matter. *J. Neurol. Sci.* 249: 122–134.
- Bomprezzi, R., M. Ringner, S. Kim, et al. 2003. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum. Mol. Genet.* 12: 2191–2199.
- Mandel, M., M. Gurevich, R. Pauzner, et al. 2004. Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 138: 164–170.
- Satoh, J., M. Nakanishi, F. Koike, et al. 2005. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 18: 537–550.
- Comabella, M., and R. Martin. 2007. Genomics in multiple sclerosis – current state and future directions. *J. Neuroimmunol.* 187: 1–8.
- Cwiklinska, H., M. P. Mycko, B. Szymanska, et al. 2010. Aberrant stress-induced Hsp70 expression in immune cells in multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 88: 3102–3110.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402–408.
- Welch, W. J., and J. R. Feramisco. 1984. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 259: 4501–4513.

23. Flynn, G. C., T. G. Chappell, and J. E. Rothman. 1989. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245: 385–390.
24. Beckmann, R. P., L. E. Mizzen, and W. J. Welch. 1990. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850–854.
25. Hartl, F. U., and M. Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852–1858.
26. Mosser, D. D., and R. I. Morimoto. 2004. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23: 2907–2918.
27. Benn, S. C., and C. J. Woolf. 2004. Adult neuron survival strategies – slamming on the brakes. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 686–700.
28. Beere, H. M. 2004. ‘‘The stress of dying’’: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 117: 2641–2651.
29. Lanneau, D., A. de Thonel, S. Maurel, et al. 2007. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* 1: 53–60.
30. Dymont, D. A., G. C. Ebers, and A. D. Sadovnick. 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 3: 104–110.
31. Aquino, D. A., A. A. Klipfel, C. F. Brosnan, and W. T. Norton. 1993. The 70-kDa heat shock cognate protein (HSC70) is a major constituent of the central nervous system and is up-regulated only at the mRNA level in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 61: 1340–1348.
32. Bajramovic, J. J., M. Bsibsi, S. B. Geutskens, et al. 2000. Differential expression of stress proteins in human adult astrocytes in response to cytokines. *J. Neuroimmunol.* 106: 14–22.
33. Mansilla, M. J., X. Montalban, and C. Espejo. 2012. Heat shock protein 70: roles in multiple sclerosis. *Mol. Med* 18: 1018–1028.
34. Tytell, M., and P. L. Hooper. 2001. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin. Ther. Target.* 5: 267–287.
35. Turturici, G., G. Sconzo, and F. Geraci. 2011. Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem. Res. Int.* 2011: 618127.
36. Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 683–747.
37. Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez, and B. G. Weinshenker. 2000. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343: 938–952.
38. Van Eden, W., G. Wick, S. Albani, and I. Cohen. 2007. Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1113: 217–237.
39. Edelman, D. A., Y. Jiang, J. G. Tyburski, et al. 2007. Lipopolysaccharide up-regulates heat shock protein expression in rat lung pericytes. *J. Surg. Res.* 140: 171–176.
40. Bernardini, C., A. Zannoni, M. L. Bacci, and M. Forni. 2010. Protective effect of carbon monoxide pre-conditioning on LPS-induced endothelial cell stress. *Cell Stress Chaperones* 15: 219–224.
41. Bustamante, M. F., N. Fissolo, J. Rio, et al. 2011. Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 70: 634–645.
42. Mycko, M. P., H. Cwiklinska, A. Walczak, et al. 2008. A heat shock protein gene (Hsp70.1) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen. *Eur. J. Immunol.* 38: 1999–2013.



# Hsp70 Regulates Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

M. José Mansilla<sup>1,2</sup>, Carme Costa<sup>1,2</sup>, Herena Eixarch<sup>1,2</sup>, Vanja Tepavcevic<sup>3</sup>, Mireia Castillo<sup>1,2</sup>, Roland Martin<sup>4</sup>, Catherine Lubetzki<sup>3</sup>, Marie-Stéphane Aigrot<sup>3</sup>, Xavier Montalban<sup>1,2</sup>, Carmen Espejo<sup>1,2\*</sup>

**1** Servei de Neurologia-Neuroimmunologia, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, **2** Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain, **3** Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, UM-75, ICM-GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France, Inserm, U1127, Paris, France, CNRS, UMR 7225, Paris, France, **4** Department of Neuroimmunology and Multiple Sclerosis Research, Neurology Clinic, University Hospital Zürich, Zürich, Switzerland

## Abstract

Heat shock protein (Hsp)70 is one of the most important stress-inducible proteins. Intracellular Hsp70 not only mediates chaperone-cytoprotective functions but can also block multiple steps in the apoptosis pathway. In addition, Hsp70 is actively released into the extracellular milieu, thereby promoting innate and adaptive immune responses. Thus, Hsp70 may be a critical molecule in multiple sclerosis (MS) pathogenesis and a potential target in this disease due to its immunological and cytoprotective functions. To investigate the role of Hsp70 in MS pathogenesis, we examined its immune and cytoprotective roles using both *in vitro* and *in vivo* experimental procedures. We found that Hsp70.1-deficient mice were more resistant to developing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) compared with their wild-type (WT) littermates, suggesting that Hsp70.1 plays a critical role in promoting an effective myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cell response. Conversely, Hsp70.1-deficient mice that developed EAE showed an increased level of autoreactive T cells to achieve the same production of cytokines compared with the WT mice. Although a neuroprotective role of HSP70 has been suggested, Hsp70.1-deficient mice that developed EAE did not exhibit increased demyelination compared with the control mice. Accordingly, Hsp70 deficiency did not influence the vulnerability to apoptosis of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) in culture. Thus, the immunological role of Hsp70 may be relevant in EAE, and specific therapies down-regulating Hsp70 expression may be a promising approach to reduce the early autoimmune response in MS patients.

**Citation:** Mansilla MJ, Costa C, Eixarch H, Tepavcevic V, Castillo M, et al. (2014) Hsp70 Regulates Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. PLoS ONE 9(8): e105737. doi:10.1371/journal.pone.0105737

**Editor:** Fernando de Castro, Hospital Nacional de Paraplégicos – SESCAM, Spain

**Received:** December 21, 2013; **Accepted:** July 28, 2014; **Published:** August 25, 2014

**Copyright:** © 2014 Mansilla et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** "Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM)" (RD12/0032) sponsored by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministry of Economy and Competition, Spain. "Ajuts per donar Suportals Grups de Recerca de Catalunya (2009 SGR 0793)", sponsored by the "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris de Recerca" (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain. CE is partially supported by the "Miguel Servet" program (CP07/00146) from the FIS, Ministry of Economy and Competition, Spain. HE is supported by the Sara Borrell program (CD09/00363) from the FIS, Ministry of Economy and Competition, Spain. VT was supported by "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: carmen.espejo@vhir.org

## Introduction

Heat shock proteins (HSPs) are widely known as conserved cytoprotective proteins due to their function as chaperones, in which they help to properly fold newly synthesised proteins, prevent protein aggregation and degrade unstable and misfolded proteins [1–5]. Under stressful conditions, the expression of specific HSPs is induced to control cellular damage and restore cellular homeostasis [6–8]. In the HSP70 family, Hsp70 (encoded by the Hsp72, Hsp70.1 and Hsp70.3 genes) is one of the most important stress-inducible proteins [9]. Intracellular Hsp70 not only mediates chaperone-cytoprotective functions but also can block multiple steps in the apoptosis pathway [10–12]. In addition, Hsp70 is actively released into the extracellular milieu where it can act as cytokine and peptide adjuvant, thereby promoting both the innate and adaptive immune responses [13–16].

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disorder in which activated CD4+ T cells initiate an inflammatory response in the central nervous system (CNS). This activation results in inflam-

mation, gliosis, demyelination as well as oligodendrocyte and neuronal loss [17]. Accordingly, immunomodulation and cytoprotection of specific cell populations in the CNS have been established as two key aspects of MS therapeutics. Nevertheless, MS treatments have mainly focused on controlling the immune response due to the lack of effective neuroprotective treatments.

Previous studies have indicated that Hsp70 is a critical molecule in MS pathogenesis [18] and a potential disease target due to its immunological and cytoprotective functions.

The inflammatory and oxidative environment taking place in the CNS of MS patients and in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal model induces the overexpression of most of HSP, including Hsp70 [19–23]. This inflammatory-Hsp70 induction occurs predominantly in oligodendrocytes [24] and, as in other experimental models of neuropathological diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases [25,26], Hsp70 overexpression in the CNS of MS patients and EAE animals suggests a neuroprotective role for this protein. By contrast,



because Hsp70 can act as an adjuvant Hsp70–myelin basic protein (MBP) and Hsp70–proteolipid protein (PLP) complexes have been found in MS lesions, which have been considered highly immunogenic [19,27,28].

Recently, our group has shown a baseline increase in *HSPA1A* gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from MS patients compared with those of healthy donors (HDs). Gene expression analyses were confirmed by Hsp70.1 protein expression in both T lymphocytes (CD4+ and CD8+) and monocytes from MS patients under basal conditions, which could reflect immunological activation in MS patients. Our data suggested altered immune responses in MS and may indicate a state of chronic stress or increased vulnerability to physiological immune responses in MS patients [29].

In this study, we aimed to investigate the role of Hsp70 in MS pathogenesis using both *in vitro* and *in vivo* experimental procedures. *In vitro* studies showed that subjecting mixed CNS cultures to inflammatory stress resulted into oligodendrocyte precursor cells (OPCs) apoptosis. However, this OPC vulnerability was not influenced by Hsp70 deficiency. In the EAE model we demonstrated that Hsp70 is one of the molecules that promote an efficient antigen-specific immune response required to develop EAE, but it is not crucial to protect CNS cells from the inflammatory damage. Thus, Hsp70.1 inhibition/down-regulation may be an effective therapeutic strategy to reduce the early autoimmune response in MS patients.

## Materials and Methods

### Mice

C57BL/6J Hsp70.1 knock-out (KO) mice [30] and age- and sex-matched WT littermates were purchased from Macrogen (Seoul, Korea) and used to establish mouse colonies that were bred in our animal facility at Vall d'Hebron Research Institute. Seven-week-old female C57BL/6J mice were purchased from Harlan Laboratories (Italy) for the Hsp70.1 knock-down studies. The mice were housed under standard light- and climate-controlled conditions, and standard chow and water were provided *ad libitum*. All experiments were performed in strict accordance with EU and governmental regulations (Generalitat de Catalunya Decret 214/97 30th July). The Ethics Committee on Animal Experimentation of the Vall d'Hebron Research Institute approved all procedures described in this study (protocol number: 11/06 CEEA). Measures to improve welfare assistance and clinical status as well as endpoint criteria were established to minimise suffering and ensure animal welfare. Briefly, wet food pellets are placed on the bed-cage when the animals begin to develop clinical signs to facilitate access to food and hydration. If weight loss was greater than 15%, mice received subcutaneously 0.5 ml of 10% glucose. Mice suffering severe disease (score 5) or 30% weight loss were euthanized in accordance with our governmental ethical guidelines.

### EAE induction and follow-up analyses

Anaesthetised mice were immunised with subcutaneous injections of 200  $\mu$ l of phosphate buffered saline (PBS) containing 200  $\mu$ g of 35–55 myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG<sub>35–55</sub>) (Proteomics Section, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain) emulsified in complete Freund's Adjuvant (CFA) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) containing 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). At day 0 and 2 post-immunisation (p.i.), the mice received 250 ng of pertussis toxin intravenously (Sigma Chemical). A total of 51 Hsp70.1 KO and 36 WT mice were immunised in three independent experiments. A group of 3–4

animals per group were used as control mice, which were immunised in the same manner using PBS in the absence of the peptide. All animals were weighed and examined daily for welfare and clinical status as well as neurological signs according to the following criteria: 0, no clinical signs; 0.5, partial loss of tail tonus for at least two consecutive days; 1, paralysis of the whole tail; 2, paresis of one or both hind limbs; 3, hind limb paraplegia; 4, tetraparesis; 5, tetraplegia; and 6, death [31]. Clinical follow-up analyses were performed in a blinded manner by two observers. All data presented are in accordance with the guidelines suggested for EAE publication [32].

### *In vivo* siRNA administration

The C57BL/6J WT mice were immunised as previously described. At day 7 p.i., once the first EAE clinical symptoms were detected, the animals were randomised into two groups (n = 5 mice in each group) and then were intravenously injected with either 200  $\mu$ l of PBS containing 2 mg/kg of a pool of four specific mouse Hsp70.1 (HSPA1B, ref. E-065710) siRNAs or non-targeting siRNAs (control, ref. D-001910) (accell SMART pool siRNA, Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). At day 14 p.i., when the disease had already been established, the mice received a second dose of Hsp70.1 or non-targeting siRNA. The administration of the siRNAs was performed in a blinded manner.

### Splenocyte proliferation and cytokine production

At day 12 p.i. and at the end of the experiment (day 29 p.i.), a subgroup of Hsp70.1 KO and WT mice (day 12pi: n = 4 in each group and day 29pi: WT n = 3, Hsp70.1 KO n = 5) were euthanized using carbon dioxide (>70%), and the spleens were removed. Spleen cell suspensions were prepared by grinding the spleens through a wire mesh, and the resulting cells were cultured in 96-well plates at  $2 \times 10^5$  cells/well in a total volume of 200  $\mu$ l of Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) supplemented with 10% HyClone® FetalClone I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical), 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin, all of which were obtained from Gibco BRL (Paisley, UK). The cultures (five replicas for each condition) were stimulated with 5  $\mu$ g/ml MOG<sub>35–55</sub>. The supernatants (50  $\mu$ l/well) were harvested after 48 h of culture and stored to further assess the cytokine release. Next, 1  $\mu$ Ci/well of [<sup>3</sup>H]-thymidine (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) was added to each well. The cultures were maintained under the same conditions for an additional 18 h, and the levels of incorporated radioactivity were determined using a scintillation counter (Wallac, Turku, Finland). The stimulation index (SI) values for each sample were calculated as the mean counts per minute (cpm) of the five replicas of MOG<sub>35–55</sub>-stimulated cultures divided by the mean cpm of the five replicas from the non-stimulated cultures. The cytokine secretion was determined in the culture supernatants using the FlowCytomix Th1/Th2/Th17 10 plex kit (Bender MedSystems Inc., Burlingame, CA) and FacsCanto cytometer (Becton Dickinson) according to the manufacturer's instructions.

### Primary antibodies

For the histopathological studies, the following primary antibodies and dilutions were used: anti-CD45 (pan-leukocyte marker) (rat IgG2b, 1:300, R&D Systems, Abingdon, OX, UK), anti-CD3 (T lymphocytes) (rabbit polyclonal, 1:100, Dako, Glostrup, Denmark), anti-GFAP (astrocytes) (rabbit polyclonal, 1:500, Dako), *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA, microg-

lia/macrophages) (1:100, Sigma), anti-neurofilament H non-phosphorylated (SMI32, axonal damage) (mouse IgG, 1:100, Covance Inc.), anti-NG2 (oligodendrocyte progenitor cells) (rabbit polyclonal, 1:200, Merck Millipore, Billerica, MA, USA), anti-malondialdehyde (MDA, lipid-oxidation) (rabbit polyclonal, 1:100, Alpha Diagnostic Int., San Antonio, TX, USA), anti-nitrotyrosine (NITT, protein-oxidation) (rabbit polyclonal, 1:100, Alpha Diagnostic Int.), anti-heme oxygenase 1 (HOx, oxidative stress) (rabbit polyclonal, 1:100, Enzo Life Sciences, Lausen CH, Switzerland) and anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS2, oxidative stress) (rabbit polyclonal, 1:100, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA).

For immunostaining of the CNS cultures, the following primary antibodies were used: anti-O4 (OPC) (mouse IgM, 1:5, hybridoma generously donated by Dr. Sommer), anti-myelin basic protein (MBP, mature oligodendrocytes) (chicken IgY, 1:200, Millipore), anti-cleaved Caspase 3 (Casp3) (rabbit polyclonal, 1:500, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA), anti-NeuN (neurons) (mouse IgG1, 1:300, Merck Millipore), anti-GFAP (astrocytes) (rabbit polyclonal, 1:500, Dako), isolectin B4 conjugated to fluorescein-isothiocyanate (FITC) (mouse microglial cells) (1:1000, Sigma), anti-CD11b/c (rat microglial cells) (mouse IgG2a, 1:100, BD Pharmingen, San Diego, CA) and anti-CD68 (activated rat microglial cells) (mouse IgG1 1:200, AbD Serotec, UK).

### Histopathology

For the histopathological studies, Hsp70.1 KO and WT mice were euthanised at day 12 p.i. (WT:  $n = 3$  and Hsp70.1 KO:  $n = 6$ ) or at the end of the experiment, day 29 p.i. (WT:  $n = 7$  and Hsp70.1 KO:  $n = 13$ ). The mice treated with Hsp70.1 ( $n = 5$ ) or non-targeting siRNAs ( $n = 5$ ) were euthanised at the end of the experiment. The brains and spinal cords were removed, fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin wax. Four-micrometre-thick tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and Klüver-Barrera (KB) to assess the degree of inflammation and demyelination, respectively. Immunostaining was also performed. Briefly, endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the tissue sections in 2% hydrogen peroxide, 70% methanol and PBS for 20 min. Antigen unmasking was performed in 10 mM citrate (pH = 6) for anti-CD45, SMI32, NG2, NITT, HOx and iNOs or protease type XIV (Sigma Chemical) for anti-CD3 antibody. Non-specific protein binding was blocked using 2% bovine albumin in PBS (blocking solution) at room temperature for 1 h. The sections were incubated overnight at 4°C using the primary antibodies detailed in the Primary antibodies section. Next, all of the samples were incubated at room temperature for 1 h with biotinylated anti-rabbit, anti-rat or anti-mouse IgG (all from DakoCytomation) (1:200 dilution in blocking solution) secondary antibodies. Finally, the avidin-biotin-peroxidase complex (ImmunoPure ABC Peroxidase Staining Kits, Pierce, IL, USA), which was diluted 1:100 in PBS, was added for 1 h at room temperature. The peroxidase reaction was visualised with 2.5 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine and 0.05% hydrogen peroxide. The primary antibodies were omitted in the negative controls. No signal was observed in any of the control slides.

Cell infiltration was evaluated using HE staining according to the following criteria: 0, no lesion; 1, cellular infiltration only in the meninges; 2, very discrete and superficial infiltrates in the parenchyma; 3, moderate infiltration (less than 25%) in the white matter; 4, severe infiltration (less than 50%) in the white matter; and 5, more severe infiltration (greater than 50%) in the white matter. Demyelination (KB staining) was scored as follows: 0, no demyelination; 1, little demyelination, only around the infiltrates

and involving less than 25% of the white matter; 2, demyelination involving less than 50% of the white matter; and 3, diffuse and widespread demyelination involving more than 50% of the white matter. Quantification of the stained cells was performed in three matched areas (0.25 mm<sup>2</sup>) along the spinal cord. The HE and KB staining and all immunostaining markers were evaluated in a blinded manner.

### CNS cell cultures

Brains were obtained from 1- to 2-day-old postnatal Hsp70.1 KO or WT mice and dissected in Hanks buffer (Hanks 10x, Gibco), supplemented with 0.01 M HEPES buffer, 0.75% sodium bicarbonate (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin. A pool of 3-5 WT or Hsp70.1 KO dissected brains was enzymatically dissociated with papain (30 µg/ml in DMEM with 0.24 µg/ml L-cysteine and 40 µg/ml DNase I) and then mechanically dissociated using 150 µm and 65 µm filters. To obtain CNS preparation enriched in oligodendrocyte lineage cells, a percoll density gradient was performed as previously described [33] to obtain the fraction of cells enriched in oligodendroglial precursor cells. The cells were resuspended in modified Bottenstein Sato medium (DMEM containing 0.5% foetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 10 µM insulin, 5 ng/ml sodium selenite, 100 µg/ml transferrin, 0.28 µg/ml albumin, 60 ng/ml progesterone, 16 µg/ml putrescine, 40 ng/ml triiodothyronine and 30 ng/ml L-thyroxine), and 40,000 cells per well were seeded onto poly-L-lysine-coated (40 µg/ml, Sigma) glass coverslips in 24-well plates.

### Preparation of microglial cells

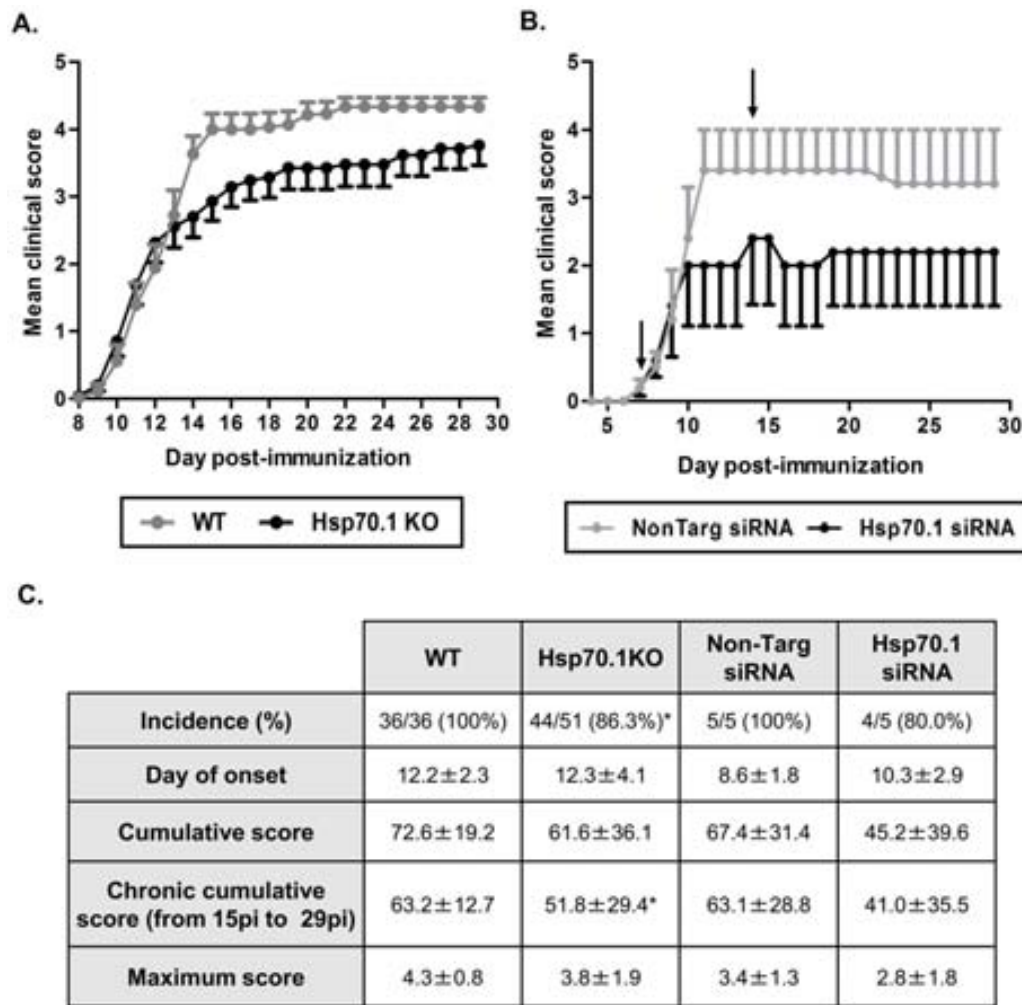
Rat microglial cells were obtained from Wistar neonatal glial mix cultures. Brains were dissected and dissociated using the papain and mechanical procedure (as indicated above). After filtration, cells were cultured in DMEM containing 10% FCS in T125 flasks coated with polyethylenimine. At 10 days in vitro, the flasks were subjected to 1 h of shaking at 180 rpm. This procedure detaches preferentially microglial cells that were then washed, counted, and used for induction of inflammatory stress in mixed CNS cultures.

### Induction of inflammation in mixed CNS cell cultures

The CNS cell cultures were challenged with an inflammatory stress stimulus for 24 h. The inflammatory stimulus consisted on the replacement of 50% of the cultured medium by culture medium containing 20,000 or 16,000 microglial cells and different concentrations of LPS and IFN- $\gamma$  (10 µg/ml LPS plus 150 ng/ml IFN- $\gamma$ , 1 µg/ml LPS plus 100 ng/ml IFN- $\gamma$  or 100 ng/ml LPS plus 100 ng/ml IFN- $\gamma$ ). CD11b/c and CD68 staining was performed to confirm microglial activation. Cells co-cultured with the same amount of microglial cells without LPS and IFN- $\gamma$  stimulus were used as control CNS cultures.

### Immunocytochemistry and detection of apoptosis

Following 24 h of inflammatory or non-stimulated culture conditions, the CNS cells were stained with anti-O4 (marker for late OPCs), anti-MBP (marker for mature oligodendrocytes), anti-NeuN (marker for neurons), and anti-Casp3 (marker for apoptotic cells) antibodies (see the Primary antibodies section). The cells were washed and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. After washing, the cells were incubated in blocking solution (0.1% Triton X100, 10% horse serum) for 20 min at room temperature. The samples were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C or for 1 h at room temperature in blocking solution. After several washes, Alexa-488-



**Figure 1. Role of Hsp70 in EAE development and clinical course.** A. Hsp70.1 knock-out (Hsp70 KO) mice showed a reduced susceptibility to EAE compared with the wild-type (WT) mice after immunisation with the MOG<sub>35–55</sub> peptide (86.3% vs. 100%,  $p=0.038$ ;  $n=51$  and  $n=36$ , respectively) resulting in less disease severity in the Hsp70.1 KO mice compared with the WT mice during the chronic phase of EAE ( $p=0.029$ ). B. When Hsp70.1 expression was down-regulated using the systemic administration of siRNA on days 7 and 14 after immunisation, the mice developed a milder clinical course compared with the mice administered non-targeting siRNA ( $n=5$  in each group). The arrows indicate when the siRNA was administered. The data were expressed as the mean of the clinical score. The error bars correspond to the standard error of the mean (SEM). C. Summary of the EAE clinical data in WT and Hsp70.1 KO mice and in WT mice treated with Hsp70.1 or non-targeting siRNA. The data were expressed as the mean±SD. \* $p<0.05$ .

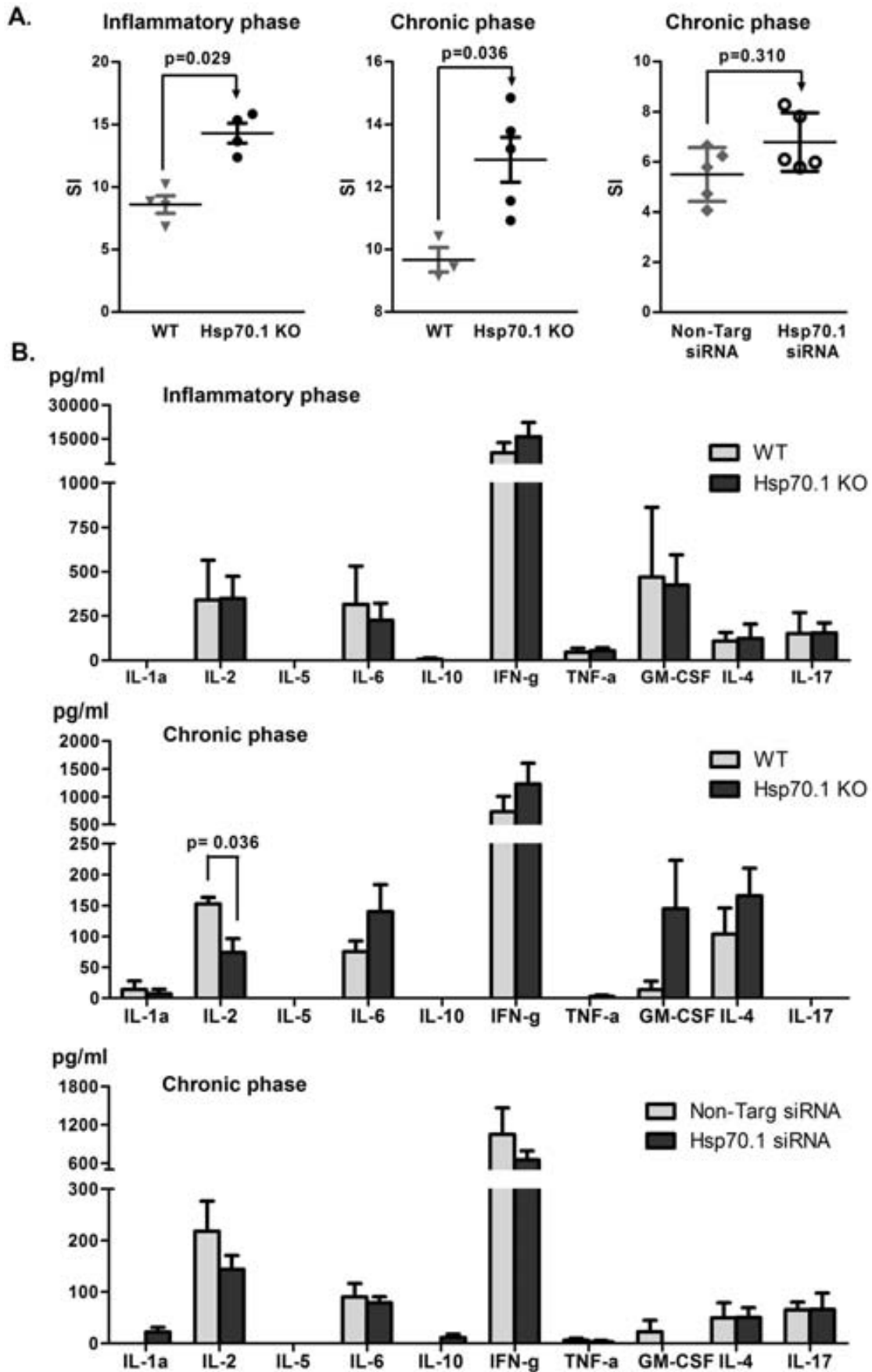
doi:10.1371/journal.pone.0105737.g001

or Alexa-568-conjugated-secondary antibodies were incubated for 90 min at room temperature. Secondary antibodies obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy, Pontoise, France) were used at a 1:1000 dilution. The cell nuclei were stained with Hoechst solution (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and the immunocytochemistry preparations were mounted in Fluoromount-G (Clinisciences, France). For the O4 staining, *in vivo* immunocytochemistry was performed by incubation with the anti-O4 antibody for 30 min at 37°C in DMEM containing 10% horse serum followed by fixation of the cells with 4% paraformaldehyde. Negative controls were performed by omitting the primary antibodies. The stainings were observed by using a fluorescence microscope Zeiss Imager.Z1. Images were acquired with an AxioCam camera equipped with an ApoTome module and analysed using ImageJ software. The percentage of Casp3+ cells from each culture was calculated as the sum of the number of positive cells obtained from three representative microscope fields divided by the sum of the total number of cells (cells positive for Hoechst staining). The

percentage of O4+Casp3+, MBP+Casp3+, and NeuN+Casp3+ cells was calculated as the sum of double positive cells divided by the sum of the total number of each population (O4+, MBP+, and NeuN+ cells). To determine the effect of the inflammatory stimulus, the fold change values of each population was calculated in WT and Hsp70.1 KO mice with respect to their matched non-stimulated control cultures.

#### Statistical analysis

The data were expressed as the mean ± standard deviation (SD) values unless otherwise stated. Statistical analyses were performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) for MS-Windows and Graphpad Prism 5. The Mann-Whitney test was applied to compare the mean values between groups; however, for large samples ( $n\geq 30$ ) and very small samples ( $n\leq 3$ ), an unpaired t-test was performed [34]. A paired t-test was used to analyse the effect of the inflammatory stress on the cell cultures. Fisher's exact test



**Figure 2. Increased MOG-proliferative response in the splenocytes of Hsp70.1-deficient mice.** A. MOG-induced proliferative response of Hsp70.1-deficient and control splenocytes. The data were expressed as the mean of the stimulatory indices (SI). The error bars correspond to the SEM. Splenocytes from WT (▼) and Hsp70.1 KO (●) mice were obtained during the inflammatory phase [day 12 p.i., (left graph), n = 4 in each group] and chronic phase of EAE [day 29 p.i. (middle graph), WT: n = 3 and KO: n = 5]. Hsp70.1 KO splenocytes showed increased MOG-specific proliferation at day 12 p.i. ( $p = 0.029$ ) and at day 29 p.i. ( $p = 0.036$ ) compared with the WT splenocytes. The MOG-specific proliferation of splenocytes of non-targeting (◆) or Hsp70.1 (○) siRNA-treated mice (right graph) was assessed at day 29 p.i. (n = 5 in each group). B. Determination of the cytokine Th1/Th2/Th17 profile secretion following MOG-specific stimulation of splenocytes from Hsp70.1-deficient (black columns) and WT (grey columns). The increased cell proliferation of Hsp70.1-deficient splenocytes following antigen-specific stimulation was not related to an increase in cytokine production. A reduced IL2 level was only detected at day 29 p.i. in the Hsp70.1 KO splenocytes, probably due to the increased proliferative splenocyte response observed in these mice. The error bars represent the SEM.  
doi:10.1371/journal.pone.0105737.g002

was used to compare qualitative variables. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### Reduced EAE susceptibility in Hsp70.1-deficient mice

To study the role of the inducible Hsp70 protein in EAE pathogenesis, we immunised a total of 51 Hsp70.1 KO mice and 36 WT littermates with MOG<sub>35–55</sub>, in three independent experiments. Mice developed a chronic non-remitting EAE clinical course. We observed a reduction in the incidence of EAE in the Hsp70.1 KO mice compared with their WT littermates (86.3% *vs.* 100%,  $p = 0.038$ ). Because WT mice were 100% incident and remaining without clinical symptoms is the best improvement of the disease, EAE incident and non-incident mice were included in the statistical analysis. The severity of the disease in the Hsp70.1 KO mice was reduced during the chronic phase of EAE (from day 15 p.i. to day 29 p.i.), being the chronic cumulative clinical score reduced in the Hsp70.1 KO mice compared with the WT mice ( $51.79 \pm 29.40$  *vs.*  $63.22 \pm 12.70$ ,  $p = 0.029$ ) (Fig. 1A and C).

To guarantee that Hsp70.1 KO mice do not have any compensatory mechanisms to supply Hsp70 lacking that could mask its real role in EAE, C57BL/6J WT mice were immunised with MOG<sub>35–55</sub>. At day 7 p.i., once the first EAE clinical symptoms were detected, the animals were randomised into two groups and then intravenously injected with Hsp70.1-specific siRNA or non-targeting siRNA (n = 5 in each group, 3 mice with clinical score = 0 and 2 mice with clinical score = 0.5 in both groups). At day 14 p.i., when the disease had already been established, the mice received a second dose of Hsp70.1 or non-targeting siRNA. Consistent with previous results, Hsp70.1 knock-down mice showed milder EAE progression compared to control mice administrated with non-targeting siRNA, as before EAE incident and non-incident mice were included in the statistical analysis (Fig. 1B and C).

### Increased MOG-specific proliferative response in Hsp70.1-deficient mice

To determine the role of inducible Hsp70 in the immune response, we investigated the proliferative capacity of Hsp70.1 KO splenocytes. Spleens were removed at day 12 p.i. (inflammatory phase) and at day 29 p.i. (chronic phase). Hsp70 deficiency strongly enhanced the *in vitro* MOG-specific splenocyte proliferation compared with the WT cells in both the inflammatory ( $14.31 \pm 1.60$  *vs.*  $8.60 \pm 1.39$   $p = 0.029$ ) and chronic ( $12.87 \pm 1.61$  *vs.*  $9.67 \pm 0.68$   $p = 0.036$ ) phases of the disease (Fig. 2A). Similarly, WT mice administered with Hsp70.1-specific siRNA exhibited an increased but not significant ( $p = 0.310$ ) MOG-specific proliferative response in the chronic phase compared with the mice administered with non-targeting siRNAs, although these differences were not significant (Fig. 2A).

### Hsp70.1 deficiency did not alter the cytokine profile

To study whether the differential proliferative T cell response between the Hsp70.1-deficient and control mice was associated with a specific Th profile, cytokine release was analysed during the inflammatory (day 12 p.i.) and chronic (day 29 p.i.) phases of the disease. At day 12 p.i., we did not find any difference in the examined cytokines potentially involved in the increase of the MOG-specific cell proliferative response in Hsp70.1 KO mice. At day 29 p.i., only a reduced production of IL-2 was detected in the Hsp70.1 KO splenocytes, probably related with its consumption due to the increased proliferative cell response observed in Hsp70.1 KO mice. No differences were found between mice treated with either Hsp70.1 or non-targeting siRNA (Fig. 2B).

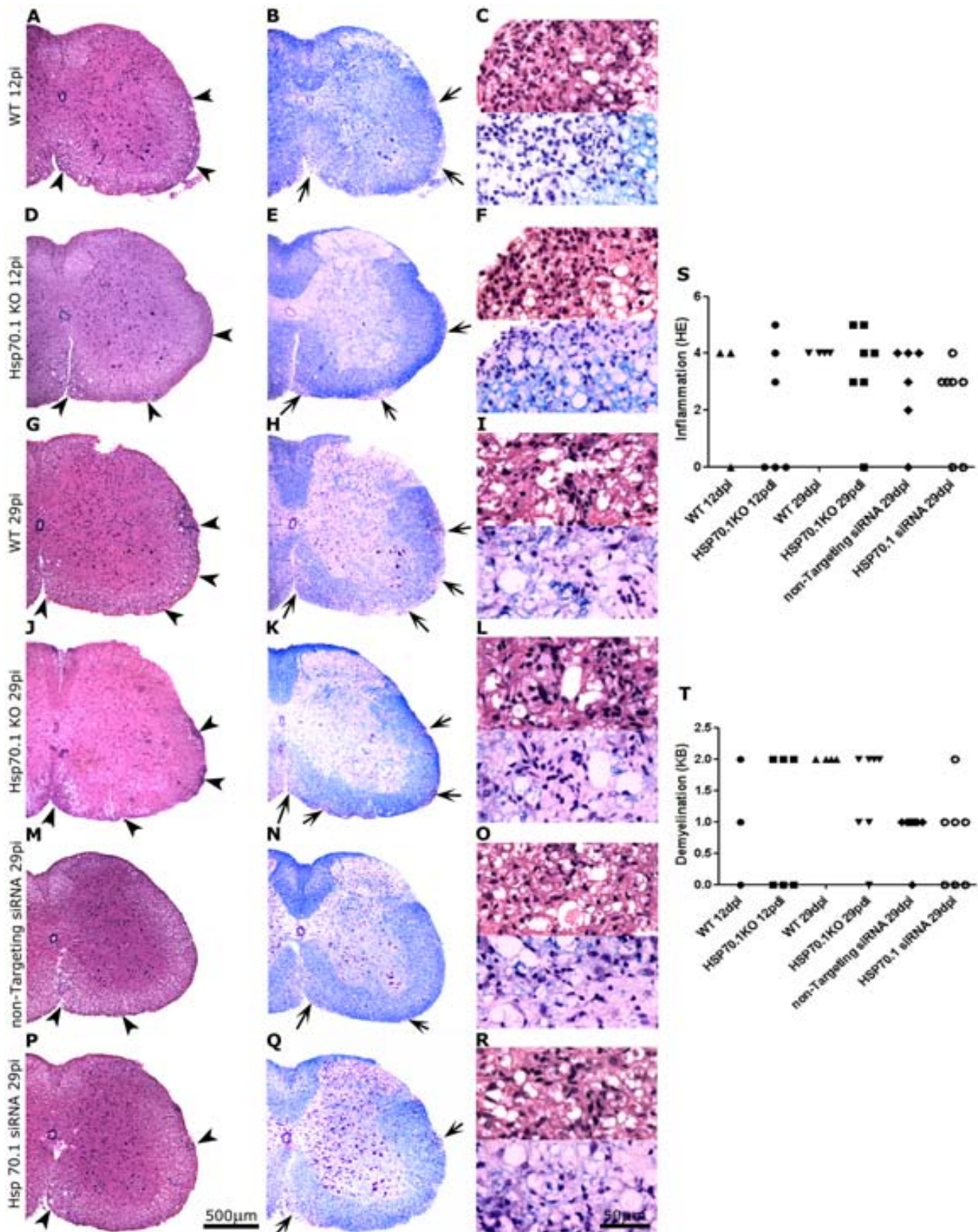
### Similar neuropathological alterations in Hsp70.1-deficient and control mice

A histopathological study of Hsp70.1 KO and WT mice during the inflammatory phase of EAE (day 12 p.i.) revealed the presence of inflammatory infiltrates (consisting of neutrophils, lymphocytes and a few macrophages) in the white matter of the spinal cord and subarachnoidal space of the brain, with discrete demyelination of the brain stem. In the spinal cord, the inflammatory infiltration (mainly consisting of macrophages and lymphocytes) was higher and the demyelination was more extensive during the chronic phase of the disease (day 29 p.i.) than during the inflammatory phase of EAE. However, no differences were observed with regards to inflammation or demyelination between the Hsp70.1 KO and WT mice at any phase of the disease (Fig. 3). As expected, the Hsp70.1 KO mice that did not develop EAE did not demonstrate inflammatory infiltration or demyelination in the CNS (data not shown). Otherwise, the EAE mice with matched clinical scores administered with either Hsp70.1 or non-targeting siRNAs did not exhibit any differences in either inflammatory infiltration or demyelination (Fig. 3).

Immunohistochemical studies using oxidative stress markers revealed that the Hsp70.1 KO mice showed a significantly higher expression of HOx (HOx:  $66.34 \pm 3.30$  *vs.*  $38.50 \pm 3.54$ ,  $p = 0.015$ ) at day 12 p.i., although the levels of MDA, NIT2 and iNOS remained similar in both groups. In contrast, no differences were observed in the numbers of infiltrating cells (CD45+ and CD3+ cells), macrophages/microglia (LEA+ cells) and astrocytes (GFAP+ cells) or in the axonal damage (SMI32+ cells) and remyelination (NG2+ cells) in the spinal cord of the Hsp70.1 KO and WT mice (Fig. 4).

### *In vitro* model of CNS inflammation

A mixed culture of CNS cells consisting of 40.5% of neurons, 25.3% of oligodendroglial cells [20.9% O4+ cells (OPCs) and 4.4% MBP+ cells (mature oligodendrocytes)] and 34.2% astrocytes was obtained from the Hsp70.1 KO or WT mice, as previously described in the Material and Methods section. No intrinsic microglia (isolectin B4+ cells) was detected in the CNS cell cultures



**Figure 3. Histopathological study of the spinal cords of Hsp70.1 KO, WT and siRNA-treated mice.** HE staining (A, D, G, J, M, P) shows inflammatory infiltration (arrow heads), and KB staining (B, E, H, K, N, Q) demonstrates demyelination (arrows) in the white matter of the spinal cord. Detail of inflammatory infiltration and demyelination are shown. Similar levels of inflammation (A, D) and demyelination (B, E) were observed in the WT and Hsp70.1 KO mice at day 12 p.i., when neutrophils and lymphocytes were detected and scanty demyelination was observed (C, F). At day 29 p.i.,

WT and Hsp70.1 KO mice had similar degree of inflammation (G, J), mainly composed by lymphocytes and macrophages (I, L), with evident demyelination (H, K, I, L). No differences were observed in inflammation (M, P, O, R) and demyelination (N, Q, O, R) in the mice treated with non-targeting siRNA compared with those treated with Hsp70.1 siRNA. Representative mice with a clinical score of 4 are shown in the figure. Graphs represent qualitative inflammatory (S) and demyelination (T) scores, assessed by HE and KB respectively, for WT and Hsp70.1 KO mice at day 12 p.i. and 29 p.i., and also for mice treated with either non-targeting or Hsp70.1 siRNA at day 29 p.i.  
doi:10.1371/journal.pone.0105737.g003

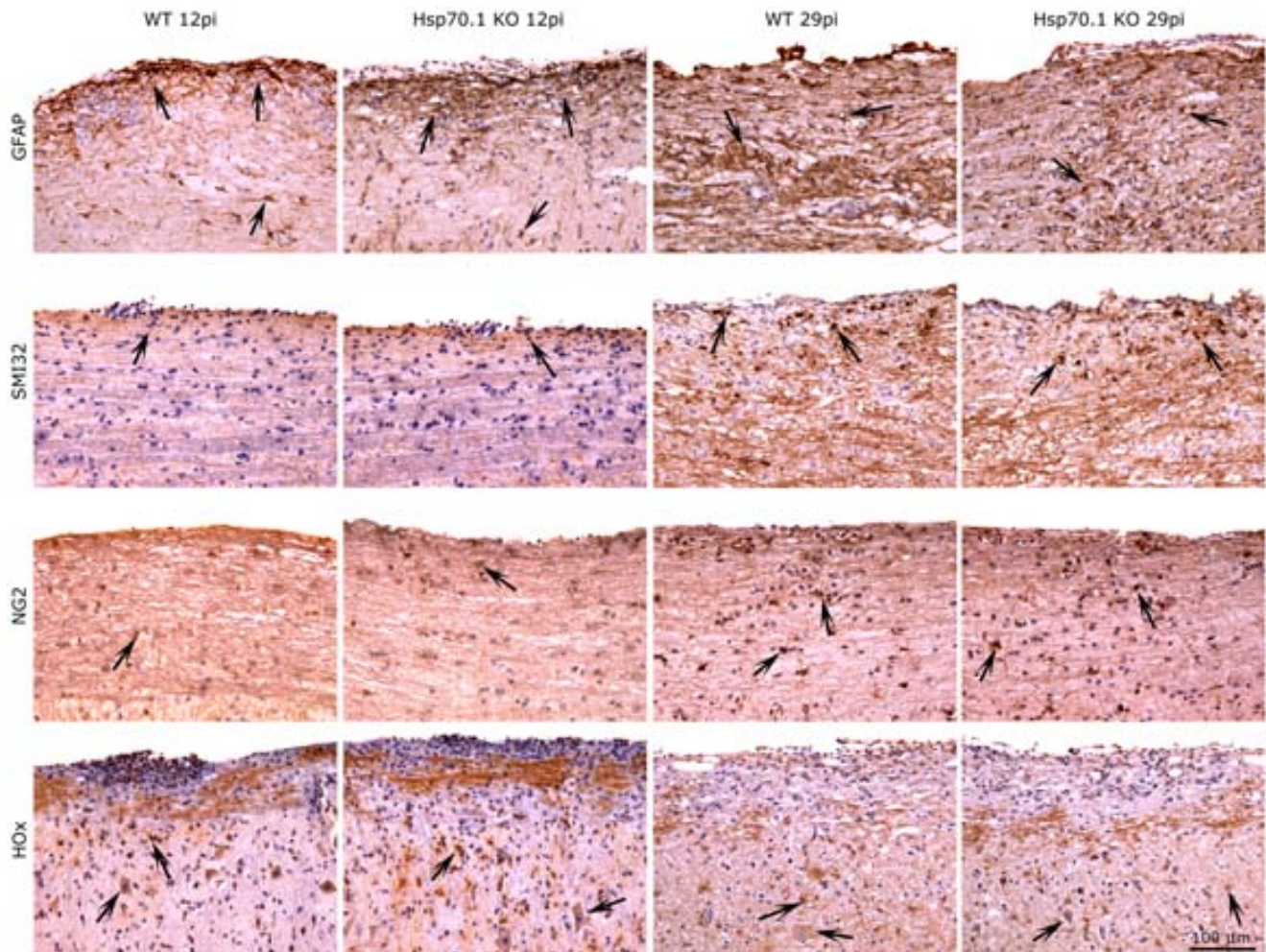
(data not shown). To determine the optimal conditions to induce apoptosis after 24 or 48 h of incubation, the culture medium was replaced with fresh medium containing a different number of microglial cells in combination with increased concentrations of LPS and IFN- $\gamma$ . We established that after 24 h of incubation 16,000 microglial cells activated with 100 ng/ml LPS and 100 ng/ml IFN- $\gamma$  induced apoptosis (Casp3+ cells) while those cultures containing non-activated microglia hardly showed apoptotic cells (Table 1 and Fig. 5).

#### Effect of the inflammatory stimulus in the CNS cell cultures

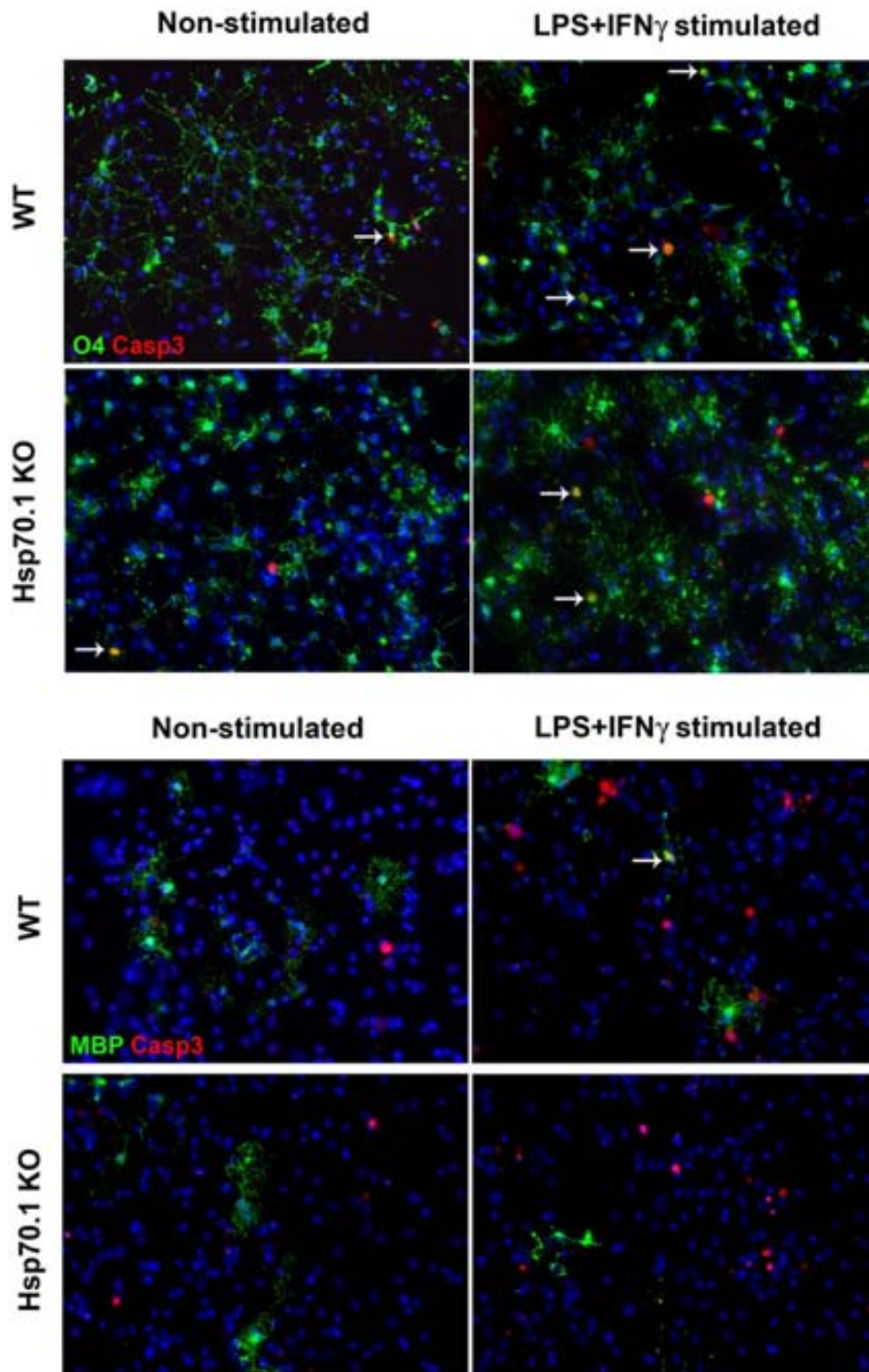
As shown in Table 1, after an inflammatory stimulus we observed a significant increase in the percentage of apoptotic cells (Casp3+ cells) in both Hsp70.1 KO ( $p < 0.001$ ) and WT ( $p = 0.025$ )

CNS cell cultures. Among the different apoptotic cells, OPCs (O4+Casp3+ cells) were the most affected in both groups. We were not able to detect apoptotic mature oligodendrocytes (MBP+Casp3+ cells) or apoptotic neurons (NeuN+Casp3+ cells) (data not shown). Altogether these data suggest that OPCs are susceptible to the induction of apoptosis upon an inflammatory stimulus.

To investigate the cytoprotective functions of Hsp70.1, we studied the vulnerability of OPCs to the inflammatory stress in Hsp70.1 KO compared with WT CNS cell cultures. When the apoptotic induction was analysed, we did not observe a statistically significant difference in the fold change of apoptotic OPCs (O4+Casp3+) in Hsp70.1 KO respect to WT CNS cell cultures (Table 1, Fig. 6). These data suggest that the absence of Hsp70 did not influence the susceptibility of OPCs (O4+ cells) to inflammation-induced apoptosis.



**Figure 4. Immunohistochemical staining for GFAP, SMI32, NG2 and HOx of the spinal cord of Hsp70.1 KO and WT mice.** Immunohistochemical staining for GFAP (astrocytes), SMI32 (axonal damage) and NG2 (oligodendrocyte progenitor cells) was performed in Hsp70.1 KO and WT mice at days 12 p.i. or 29 p.i. Hsp70.1 KO mice showed higher expression of oxidative stress marker HOx than WT mice at day 12 p.i. Arrows indicate positive stained cells.  
doi:10.1371/journal.pone.0105737.g004



**Figure 5. Apoptotic induction in CNS cell cultures.** Apoptotic immunocytochemical detection in oligodendrocyte precursor cells (OPCs, O4+ cells) and mature oligodendrocytes (MBP+ cells) in mixed CNS cell cultures of WT and Hsp70.1 KO mice under non-stimulated (left column) and LPS plus IFN- $\gamma$ -stimulated (right column) culture conditions. A. Detection of apoptotic OPCs cells (O4+Casp3+ cells). The rows indicate the O4+Casp3+ cells. B. Detection of apoptotic mature oligodendrocytes (MBP+Casp3+ cells). doi:10.1371/journal.pone.0105737.g005



**Table 1.** Characterisation of the non-stimulated CNS cell cultures and following an inflammatory stimulus.

		Non-stimulated	LPS+IFN- $\gamma$ stimulation	Fold change
% O4+ cells	WT	20.94 $\pm$ 0.09	15.87 $\pm$ 0.22	0.76 $\pm$ 0.01
	Hsp70.1 KO	15.09 $\pm$ 5.43	10.09 $\pm$ 3.23	0.67 $\pm$ 0.03
% MBP+ cells	WT	4.37 $\pm$ 0.75	2.85 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.13
	Hsp70.1 KO	2.93 $\pm$ 0.13	1.15 $\pm$ 0.97	0.39 $\pm$ 0.32
% Casp3+ cells	WT	1.80 $\pm$ 0.63	4.01 $\pm$ 1.66	2.51 $\pm$ 0.86
	Hsp70.1 KO	2.31 $\pm$ 0.58	3.57 $\pm$ 0.63	1.60 $\pm$ 0.33
% O4+Casp3+ cells	WT	0.51 $\pm$ 0.43	2.19 $\pm$ 0.28	6.45 $\pm$ 4.96
	Hsp70.1 KO	0.97 $\pm$ 0.36	1.64 $\pm$ 0.58	1.70 $\pm$ 0.13

The percentage of O4+, MBP+ and Casp3+ cells from the total number of cells of non-stimulated or LPS plus IFN- $\gamma$ -stimulated cultures from wild-type (WT) and Hsp70.1 knock-out (KO) mice after 24 h. Fold change induced by inflammatory stimulus of each population was calculated referred to matched non-stimulated cultures. The results were expressed as the mean $\pm$ SD.

doi:10.1371/journal.pone.0105737.t001

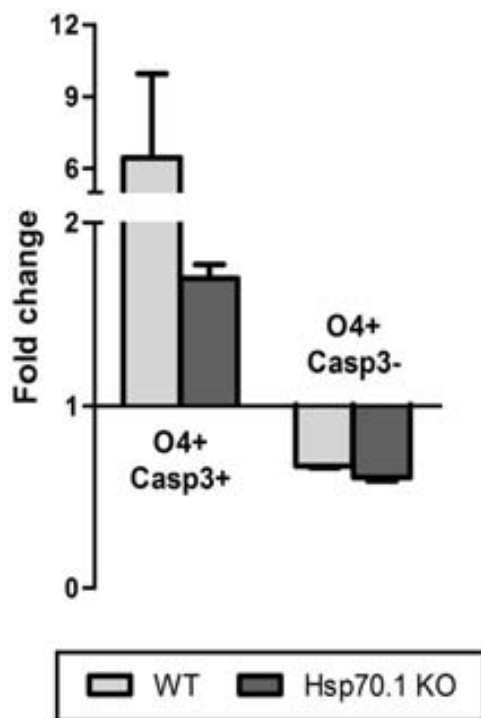
## Discussion

Several recent studies have described the important role of Hsp70 not only as an essential chaperone but also as an anti-apoptotic mediator and promoter of both innate and adaptive immune responses [11–13,15,16,18,35–37]. To study the role of Hsp70 in the pathogenesis of MS, we used a MOG-induced EAE animal model. We observed that Hsp70.1 KO mice were significantly more resistant to EAE development compared with their WT littermates. Nevertheless, the Hsp70.1 KO mice that developed clinical symptoms of EAE showed the same clinical

course and histopathological characteristics as the WT mice. Thus, Hsp70.1 appears to be relevant, but not crucial, for the EAE outcome. These results are partially consistent with previous studies performed by Mycko and colleagues, in which all animals developed clinical signs of the disease but the Hsp70.1 KO mice developed a milder form of EAE. Furthermore, these authors also demonstrated that the passive transference of Hsp70.1-deficient lymphocytes with either MOG antigen- or polyclonal restimulation did not induce EAE in C57BL/6 WT mice [38].

Knock-out mouse technology is an important approach used to investigate the function of genes that are not essential for embryogenesis and development in the animal. However, under some circumstances, KO mice develop compensatory mechanisms that overcome the genetic deficiency [39]. One of the most common compensatory mechanisms consists of the up-regulation of genes with the same or similar functions. The inducible form of Hsp70 is encoded by the Hsp70.1 and Hsp70.3 genes, although the Hsp70.1 gene deletion is well known to be sufficient to abrogate inducible Hsp70 activity in mice [40]. As Hsp70 is a relevant protein for homeostatic functions following stressful situations, it would be plausible that Hsp70.1 KO mice would develop some compensatory mechanisms. For this reason, we performed an experiment using siRNA technology to down-regulate the Hsp70.1 protein expression after EAE induction. To achieve this outcome, we first immunised WT mice with the MOG<sub>35–55</sub> peptide. When the first EAE clinical symptoms were detected, the animals were randomised into two groups and then injected with either Hsp70.1 or non-targeting siRNA. The mice also received a second dose of siRNA on day 14 p.i. Compared with the mice administered with non-targeting siRNAs, mice in which Hsp70.1 expression was down-regulated showed an improved EAE clinical course, and one mouse even remained disease-free. In agreement with these data, we previously demonstrated a baseline-increased expression of the HSPA1A gene in PBMCs from MS patients compared with HDs. In addition, we observed an increase in the protein expression of inducible Hsp70 in T lymphocytes (CD4+ and CD8+) and monocytes from MS patients under basal conditions that may reflect the immunological activation occurring in MS patients [29]. Taken together, these data confirmed and further supported the Hsp70.1 KO mice results and indicate a relevant role of Hsp70.1 in the EAE outcome.

Previous studies have shown that Hsp70 released into the milieu can act as a danger signal or proinflammatory mediator, thereby inducing innate immune responses via the TLR2/4 and CD14



**Figure 6. Oligodendrocyte precursor cell susceptibility to apoptotic induction following inflammatory stress.** Analysis of Casp3 expression in O4+ cells following an inflammatory stress. The fold change of apoptotic (Casp3+) and viable (Casp3-) O4+ cells was similar in the WT and Hsp70.1 KO CNS cell cultures after 24 h of stimulation with LPS plus IFN- $\gamma$ . The error bars correspond to the SEM. doi:10.1371/journal.pone.0105737.g006

receptors [13,35,37]. Furthermore, extracellular Hsp70 can act as an adjuvant that promotes adaptive immune responses against specific antigens. In this context, complexes of Hsp70 and either MOG or MBP were found in MS lesions, and complexes of Hsp70 and either MOG or PLP were present in the CNS of mice with EAE [19,27,28]. In contrast to our expectations, splenocytes lacking Hsp70.1 were able to induce an antigen-specific proliferative response, and Hsp70.1 KO mice with EAE also exhibited a higher MOG-specific proliferative response compared with WT mice in the inflammatory and chronic phases of the disease. Nevertheless, the high proliferative response observed in the incident Hsp70.1 KO mice was not related to an increased cytokine production in either the inflammatory or chronic phase of the disease. We only observed a reduction of the IL-2 levels in the Hsp70.1 KO splenocytes compared with the WT cells, probably related with its consumption due to the increased proliferative cell response observed in Hsp70.1 KO mice. We confirmed these results using siRNA technology to abrogate Hsp70.1 protein expression after EAE induction. Otherwise, the differences in the proliferative response did not involve differences in the extension of the inflammatory infiltrate observed in the spinal cords of incident Hsp70.1 KO and WT mice in both the inflammatory and chronic phases of EAE, and the same was observed when siRNAs were used. However, it is remarkable to note that although we observed a higher clinical improvement in the Hsp70.1 siRNA treated mice than in Hsp70.1 KO mice, the differences in splenocyte proliferation were milder using siRNAs. siRNA technology allows to avoid compensatory mechanisms that Hsp70.1 KO mice could have developed. Thus, the clinical effect of Hsp70.1 deficiency would be more potent in mice treated with Hsp70.1 siRNA than in Hsp70.1 KO mice. However the effect of siRNA is transitory and we performed splenocyte proliferation studies in siRNA-treated mice only at the end of the experiment (day 29 p.i.), 15 days after the last siRNA administration. The fact that at this time we were not able to detect down-regulation of Hsp70.1 protein expression could explain the differences in splenocyte proliferation between the two approaches that we used to inhibit the expression of Hsp70.1. Taken together, these data might indicate that only animals that developed an enhanced MOG-response achieved a sufficient level of cytokine production to properly establish an inflammatory environment to develop EAE. Mycko and colleagues reported that Hsp70.1-deficient CD4+ T cells were more susceptible to apoptosis following anti-CD3

stimulation [38], thereby supporting our hypothesis that Hsp70.1 KO mice required a higher number of antigen-specific T cells compared with the WT mice to induce an effective response against myelin antigens.

Classically, HSPs, including Hsp70, have been defined as proteins involved in proper protein folding with cytoprotective functions under stressful conditions [1–4,6–8]. However, Hsp70 over-expression in neuronal cell cultures and mouse models of some neurodegenerative diseases have demonstrated a beneficial reduction in abnormal protein aggregation, such as amyloid peptides [41,42], tau protein [43], huntingtin [44] and  $\alpha$ -synuclein fibril formation [45]. To study the function of inducible Hsp70 as a cytoprotective molecule in the CNS under inflammatory conditions occurring in EAE and MS, we established an *in vitro* model consisting of a mixed CNS cell culture in which an inflammatory stimulus was induced. We observed that Hsp70.1 deficient CNS cell cultures did not present a higher vulnerability to the induction of apoptosis in OPCs (O4+ cells) under inflammatory conditions compared with WT CNS cell cultures. Accordingly, when histopathological studies were performed in Hsp70.1-deficient mice that developed EAE, in both Hsp70.1 KO mice and Hsp70.1 siRNA-treated mice, neither the number of NG2+ cells (OPCs) nor the extent of demyelination were affected. In addition, the amount of axonal damage or astrogliosis were comparable to those observed in the WT or non-targeted siRNA-treated mice.

## Conclusions

Our results indicated that although Hsp70.1 could play a role in both the immune response and cytoprotection of CNS cells, in the MOG-induced EAE model, Hsp70.1 seems to play a more relevant role in promoting an effective T cell response against the auto-antigen compared with its role in protecting CNS cells from inflammatory injury. Consequently, specific therapies down-regulating the expression of Hsp70 may be a promising approach to reduce or control the early autoimmune response in MS patients.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RM CL XM CE. Performed the experiments: MJM CC HE VT MC MSA CE. Analyzed the data: MJM CE. Contributed reagents/materials/analysis tools: CE CL. Wrote the paper: MJM CC HE RM CL XM CE.

## References

1. Flynn GC, Chappell TG, Rothman JE (1989) Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245: 385–390.
2. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ (1990) Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850–854.
3. Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852–1858.
4. Murakami H, Pain D, Blobel G (1988) 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J Cell Biol* 107: 2051–2057.
5. Shi Y, Thomas JO (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* 12: 2186–2192.
6. Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631–677.
7. Welch WJ (1993) Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 339: 327–333.
8. Jaattela M (1999) Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 31: 261–271.
9. Hunt CR, Gasser DL, Chaplin DD, Pierce JC, Kozak CA (1993) Chromosomal localization of five murine HSP70 gene family members: Hsp70-1, Hsp70-2, Hsp70-3, Hsc70t, and Grp78. *Genomics* 16: 193–198.
10. Mosser DD, Morimoto RI (2004) Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23: 2907–2918.
11. Benn SC, Woolf CJ (2004) Adult neuron survival strategies—slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 5: 686–700.
12. Beere HM (2004) "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 117: 2641–2651.
13. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12: 1539–1546.
14. Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, et al. (2004) Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 511–517.
15. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, et al. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277: 15028–15034.
16. Becker T, Hartl FU, Wieland F (2002) CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* 158: 1277–1285.
17. Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354: 942–955.
18. Mansilla MJ, Montalban X, Espejo C (2012) Heat shock protein 70: roles in multiple sclerosis. *Mol Med* 18: 1018–1028.

19. Cwiklinska H, Mycko MP, Luvsannonov O, Walkowiak B, Brosnan CF, et al. (2003) Heat shock protein 70 associations with myelin basic protein and proteolipid protein in multiple sclerosis brains. *Int Immunol* 15: 241–249.
20. Gao YL, Brosnan CF, Raine CS (1995) Experimental autoimmune encephalomyelitis. Qualitative and semiquantitative differences in heat shock protein 60 expression in the central nervous system. *J Immunol* 154: 3548–3556.
21. Aquino DA, Klipfel AA, Brosnan CF, Norton WT (1993) The 70-kDa heat shock cognate protein (HSC70) is a major constituent of the central nervous system and is up-regulated only at the mRNA level in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem* 61: 1340–1348.
22. Aquino DA, Capello E, Weisstein J, Sanders V, Lopez C, et al. (1997) Multiple sclerosis: altered expression of 70- and 27-kDa heat shock proteins in lesions and myelin. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 664–672.
23. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, et al. (2001) The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294: 1731–1735.
24. D'Souza SD, Antel JP, Freedman MS (1994) Cytokine induction of heat shock protein expression in human oligodendrocytes: an interleukin-1-mediated mechanism. *J Neuroimmunol* 50: 17–24.
25. Tytell M, Hooper PL (2001) Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets* 5: 267–287.
26. Turturici G, Sconzo G, Geraci F (2011) Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem Res Int* 2011: 618127.
27. Mycko MP, Cwiklinska H, Szymanski J, Szymanska B, Kudla G, et al. (2004) Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II. *J Immunol* 172: 202–213.
28. Lund BT, Chakryan Y, Ashikian N, Mnatsakanyan L, Bevan CJ, et al. (2006) Association of MBP peptides with Hsp70 in normal appearing human white matter. *J Neurol Sci* 249: 122–134.
29. Mansilla MJ, Comabella M, Río J, Castelló J, Castillo M, et al. (2013) Up-regulation of Inducible Heat Shock Protein-70 Expression in Multiple Sclerosis Patients. *Autoimmunity*: (in press).
30. Kwon SB, Young C, Kim DS, Choi HO, Kim KH, et al. (2002) Impaired repair ability of hsp70.1 KO mouse after UVB irradiation. *J Dermatol Sci* 28: 144–151.
31. Espejo C, Penkowa M, Saez-Torres I, Xaus J, Celada A, et al. (2001) Treatment with anti-interferon-gamma monoclonal antibodies modifies experimental autoimmune encephalomyelitis in interferon-gamma receptor knockout mice. *Exp Neurol* 172: 460–468.
32. Baker D, Amor S (2012) Publication guidelines for refereeing and reporting on animal use in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 242: 78–83.
33. Lubetzki C, Goujet-Zalc C, Gansmuller A, Monge M, Brillat A, et al. (1991) Morphological, biochemical, and functional characterization of bulk isolated glial progenitor cells. *J Neurochem* 56: 671–680.
34. Bland JM, Altman DG (2009) Analysis of continuous data from small samples. *BMJ* 338: a3166.
35. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, et al. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6: 435–442.
36. Multhoff G, Mizzen L, Winchester CC, Milner CM, Wenk S, et al. (1999) Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol* 27: 1627–1636.
37. Lehner T, Bergmeier LA, Wang Y, Tao L, Sing M, et al. (2000) Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *Eur J Immunol* 30: 594–603.
38. Mycko MP, Cwiklinska H, Walczak A, Libert C, Raine CS, et al. (2008) A heat shock protein gene (Hsp70.1) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen. *Eur J Immunol* 38: 1999–2013.
39. Barbaric I, Miller G, Dear TN (2007) Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6: 91–103.
40. Van Molle W, Wielockx B, Mahieu T, Takada M, Taniguchi T, et al. (2002) HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* 16: 685–695.
41. Evans CG, Wisen S, Gestwicki JE (2006) Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1–42) aggregation in vitro. *J Biol Chem* 281: 33182–33191.
42. Magrane J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW (2004) Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J Neurosci* 24: 1700–1706.
43. Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, et al. (2003) Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 721–726.
44. Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, et al. (2000) Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7841–7846.
45. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science* 295: 865–868.



# **Agradecimientos**

---

## AGRADECIMIENTOS

No podía acabar sin agradecer a todas las personas que han estado conmigo y me han ayudado durante el largo camino de la tesis doctoral porque **sin vosotros no habría sido posible.**

En primer lugar me gustaría agradecerle a Carmen Espejo por haber confiado en mí y haberme ofrecido la oportunidad de iniciar mi carrera profesional junto a ella. Gracias por enseñarme a ser crítica, rigurosa y constante (sobre todo constante), y por escucharme y ayudarme tanto profesional como personalmente siempre que lo he necesitado. También quiero agradecerle a Xavier Montalban por brindarme la oportunidad de formar parte del grupo Cemcat. A Manuel Comabella, por acogerme en el laboratorio y por sus aportaciones a este trabajo. Y también, a pesar del corto tiempo que coincidimos, me gustaría agradecerles a Roland Martin y a Mireia Sospedra el apoyo que me ofrecieron y todo lo que me enseñaron durante mi etapa inicial en el laboratorio.

En todos estos años, que han sido bastantes, he tenido la suerte de coincidir con muchos compañeros, algunos de ellos, grandes amigos hoy en día.

Me gustaría empezar agradeciendo a los veteranos del grupo: Montse, Mireia, Cristina, Eva, Jero, Hammad y Zoraida. Con vosotros empecé a hacer ciencia. Gracias por esos protocolos indispensables del laboratorio, por la ayuda con citometría y con los ratones. Cuántas horas habremos pasado en la sala de cultivos (compartiendo campana), el estabulario o el citómetro... pero también hemos pasado muy buenos momentos de charla con un café o de cervecitas arreglando un poco el mundo.

Gracias también a Carme, compañera de grandes batallas con los ratones y con los cultivos. Has sido un gran apoyo en momentos difíciles, gracias por tu sabiduría, tu paciencia y tus ánimos. A Lara, por esos desayunos de tostadas con tomate a las 8h de la mañana. A Marta, Nico, Sunny y Luis por ser tan espontáneos y por esos temas de conversación tan curiosos a la hora de comer.

A Núria y a Pilar, por esas ganas de trabajar y ayudar.

A Ester, mi compañera de risas escandalosas y de viajes. Gracias por ser siempre tan alegre y crear buen ambiente de trabajo. Y gracias por esas charlas de despacho y por sacar tiempo de no sé dónde para hacer tus montajes de Photoshop, eres una crack.

A la peque, Ana. Muchas gracias por ser tan divertida, cariñosa y animarme en la distancia. Por ese gran espíritu de superación que tanto admiro. Eres muy grande.

A los muchos alumnos de prácticas de técnico, universidad y máster (Andrés, Cristina Vergara, Víctor, Montse, Sílvia) y, especialmente, a mis primeras alumnas, María y a Mireia Vega, por pasar el verano conmigo, por vuestra energía positiva y buena predisposición.

A los neurólogos de la unidad Mar, Jordi, Jaume y a Carlos por vuestros conocimientos clínicos y vuestros comentarios críticos. A Carmen Tur, Mari Edo, Paco y Joaquín por sus esfuerzos reclutando pacientes, y a Mila y a las enfermeras Rosalía y M<sup>a</sup> José por ayudarme con los datos de los pacientes y por las extracciones de sangre.

A las chicas de ensayos clínicos, Marta y Silvia, por vuestra complicidad.

Al grupo de terapia génica, sois como una familia de la cual estoy muy contenta de haber formado parte. Jordi, gracias por tu confianza y tu apoyo. Herena, gracias por lo mucho que me has enseñado siempre. Y gracias ti, Alba, compañera de carrera, de trabajo y amiga, que más se puede pedir. Nunca olvidaré que tú fuiste la razón por la que me entrevisté con Carmen. Y gracias a Sílvia, Sergio, Gemma y a Lluís, habéis sido unos compañeros increíbles. Sólo vosotros podéis conseguir que la estadística sea tan divertida como los videos de APM.

También me gustaría agradecer al laboratorio C-05 del Instituto Cajal de Madrid, por acogerme durante un mes y tratarme como una más del grupo. Gracias, Carmen Guaza por tu ayuda y tu trato tan cercano. A Miri, Mirian, Leyre y Paula gracias por todo lo que me enseñasteis dentro y fuera del laboratorio.

A Catherine Lubezki por recibirme en su laboratorio. A Vanja, Sabah y Elodie por su compañerismo y amistad en los momentos que más lo necesitaba.

A Eva Martínez Cáceres, por confiar en mí y ofrecerme la oportunidad de trabajar en un proyecto muy prometedor hace ya casi dos años. Al equipo de gente trabajadora, responsable y siempre dispuesta a ayudar del que actualmente formo parte. Gracias Aroa, Alex, María, Amanda, Olga, Albert y Camila. Gracias a Aina y a Bibi por esos pequeños momentos de terapia tan necesarios para luego poder continuar trabajando.

A mis ayudantes, los alumnos de máster. A “mis Joans y Juanes”: Joan Amoedo, Juan Bautista, Juan Navarro y Joan Punyet. Y también a las chicas de EAE, Sara y Alba. Gracias por vuestra energía, positivismo y ganas de trabajar. Más que alumnos, habéis sido compañeros de trabajo y un apoyo para mí, gracias EQUIPO.

Al grupo de Diabetes. Marta Vives, gracias por tus consejos, por ser tan cercana y por tus historias tan divertidas. A Rosa, Arnau y Sílvia, por vuestro apoyo y vuestra alegría. A Irma, por ser tan natural, cariñosa (*molt dolça* ;D) y detallista. Gracias por tu ayuda desde que llegué al lab y gracias por tus ánimos y por compartir esta recta final tan dura, *Yes, we can!!!*

A Marta, por esa actitud positiva, por esa energía que desprendes en todo lo que haces, pero sobretodo, por ser imparable. Vales mucho. Gracias por estar ahí apoyándome. A Anna, por tener las cosas tan claras, ser tan trabajadora y responsable, te admiro mucho. A Inés, por ser tal cual, sin tapujos. Gracias por esos cafés y comidas tan entretenidos.

A mi ex-compañero de despacho y reciente incorporación al grupo, Jorge. Gracias por escucharme, animarme y estar dispuesto a ayudar en lo que haga falta. Me alegro que todo te vaya bien, te lo mereces.

A mis amigas Alba y Vanessa, mis psicólogas más incondicionales. Vuestro apoyo y consejos han sido fundamentales todos estos años. Gracias por haberme aguantado y por estar siempre que os necesito. Ahora sí, esto ya llega al final!!!

Para acabar, quiero agradecer especialmente a toda mi familia. A mis padres, por los valores que me habéis enseñado desde pequeña y porque siempre me habéis apoyado en todas mis decisiones; aun cuando no sabíais ni pronunciar la carrera que quería estudiar y os lo tenía que apuntar en un papel. Gracias también por aguantar los momentos menos agradables de este trabajo y gracias mamá por esas noches esperándome con un plato de sopa cuando llegaba tan tarde. A mi hermano, por nuestras “peleas” y por esas risas de los domingos. A mi cuñada que también ha tenido que sufrir mis horarios y fines de semana de trabajo. A la peque de la casa, Ainhoa, que me ha ayudado mucho en la recta final en la cual he combinado la redacción de la tesis con videos de Pocoyó o con



carreras por el pasillo de casa. También quiero agradecerles a mis tías, especialmente a mi tía Mari Paz, por estar siempre pendientes de si tenía que “ir a ver a los ratones”. Tengo mucha suerte de tener una familia muy unida y sé que puedo contar con vosotros siempre que lo necesite, gracias.