

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche , Sperimentali e Cliniche

Corso di Dottorato in Neuroscienze (XXV ciclo)



CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI: POTENZIALI MODULATORI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Guido CVALETTI

Tutore: Dott.ssa Silvia COCO

Tesi di:

Mario Mauri

Matr. 029310

Anno Accademico 2011/2012

Riassunto:	p.1
Abstract:	p.3
Introduzione:	p.5
1 LE CELLULE STAMINALI:	p.6
1.1 Definizione e classificazione base delle cellule staminali:	p. 6
1.1.1 Cellule staminali embrionali:	p.7
1.1.2 Cellule staminali adulte:	p.8
1.1.3 Dai fenomeni di trans-differenziamento alle cellule staminali “indotte”:	p. 10
1.2 Le cellule staminali mesenchimali (MSC):	p. 11
1.2.1 Fenotipizzazione e isolamento delle MSC:	p. 12
1.2.2 Il midollo osseo e le altre fonti per l’isolamento delle MSC:	p. 14
1.3 Le MSC e un loro possibile contributo al sistema nervoso centrale: il trans-differenziamento:	p. 15
1.3.1 Studi in vitro che non supportano il trans-differenziamento neurale delle MSC:	p. 17
1.3.2 Le MSC trans-differenziate danno origine a neuroni funzionali?:	p. 19
1.3.3 Una possibile alternativa al trans-differenziamento: la fusione cellulare:	p. 20
1.4 Le proprietà immunomodulatorie delle cellule staminali mesenchimali:	p. 20
1.5 Le MSC e un loro possibile contributo al sistema nervoso centrale: MSC come mediatori trofici:	p. 21
1.6 Potenziali utilizzi clinici delle MSC:	p. 23
2. I NEURONI:	p. 25
2.1 Brevi accenni sulla neuro genesi:	p. 25
2.2 Caratteristiche morfologiche del neurone e sviluppo di modelli in vitro:	p. 26
2.2.1 Caratterizzazione dei differenti stadi di sviluppo neuronale <i>in vitro</i> :	p. 28
2.3 La comunicazione tra i neuroni: le “sinapsi”:	p. 31
2.3.1 La formazione dei contatti tra i neuroni: la sinaptogenesi:	p. 32
2.3.2 L’interazione con gli astrociti nella stabilizzazione e funzionalità delle sinapsi: la sinapsi tripartita:	p. 33
2.3.3 Funzionalità delle vescicole neurosecretorie:	p. 35
2.3.4 I trasportatori vescicolari:	p. 37

2.3.4.1 Trasportatori vescicolari del glutamato e dell'acido γ -amminobutirrico:	p. 37
2.4 Molecole coinvolte nella sinaptogenesi:	p. 38
2.4.1 La sinaptogenesi glutamatergica:	p. 38
2.4.2 La sinaptogenesi GABAergica:	p. 40
2.4.3 Le sinapsi GABAergiche modificano la loro risposta funzionale durante la maturazione:	p. 40
2.5 I recettori post sinaptici responsabili della trasmissione eccitatoria e inibitoria:	p. 41
2.5.1 I recettori glutamatergici:	p. 41
2.5.2 I recettori GABAergici:	p. 44
2.6 Il coinvolgimento di fattori trofici nello sviluppo neuronale sinaptico: l'azione svolta dalle neurotrofine:	p. 46
2.6.1 Azione del BDNF sui terminali GABAergici:	p. 47
2.6.2 Il coinvolgimento dei neurosteroidi nella regolazione dello sviluppo delle sinapsi:	p. 48
3 LE CELLULE GLIALI:	p. 50
3.1 Gli Astrociti:	p. 50
3.2 Caratteristiche generali degli astrociti:	p. 51
3.2.1 Marcatori molecolari tipicamente utilizzati per l'identificazione degli astrociti:	p. 52
3.3 Funzioni di supporto al SNC svolte dagli astrociti:	p.53
3.3.1 Coinvolgimento degli astrociti nello sviluppo neuronale:	p. 54
3.3.2 Coinvolgimento degli astrociti nell'omeostasi delle sinapsi:	p. 54
3.3.3 Coinvolgimento degli astrociti nella regolazione del metabolismo del SNC:	p. 56
3.4 Gli oligodendrociti:	p. 56
3.4.1 Oligodendrogenesi e origine dei precursori degli oligodendrociti (OPC)	p. 57
3.4.2 Meccanismi molecolari alla base della migrazione degli OPC:	p. 57
3.4.3 Molecole regolatorie coinvolte nelle proliferazione degli OPC:	p. 59
3.4.4 Molecole regolatorie coinvolte nelle maturazione degli OPC a OL:	p. 60
3.5 La mielinizzazione: il principale compito funzionale degli OL:	p. 63
3.5.1 Il coinvolgimento delle neurotrofine nella mielinizzazione	p. 66
3.5.2 La rimielinizzazione degli assoni dopo un danno neuronale:	p. 67

Scopo:	p. 70
Materiali e metodi:	p. 73
1. Colture cellulari:	p. 74
1.1 Estrazione e messa in coltura delle cellule staminali mesenchimali:	p. 74
1.2 Estrazione e messa in coltura dei neuroni ippocampali:	p. 75
1.3 Estrazione e messa in coltura degli astrociti corticali:	p. 75
1.4 Isolamento degli oligodendrociti a partire dagli astrociti corticali:	p. 76
2 Allestimento delle co-colture cellulari:	p. 76
2.1 Preparazione e utilizzo del medium condizionato:	p. 77
3 Terreni utilizzati:	p. 78
4 Sterilizzazione dei vetrini e preparazione degli spaziatori di paraffina:	p. 78
5. Metodiche di analisi utilizzate:	p. 79
5.1 Citofluorimetria a flusso:	p. 79
5.2 Immunofluorescenza:	p. 80
5.3 Analisi SDS-PAGE e Western immunoblotting:	p. 81
5.4 Test ELISA:	p. 81
6 Anticorpi utilizzati:	p. 82
7 Trattamenti sul medium delle co-colture:	p. 84
7.1 Trattamento con ArabinosideC (AraC):	p. 84
7.2 Trattamento con tripsina:	p. 84
7.3 Trattamento con K252a:	p. 84
7.4 Trattamento con TrkB-Fc:	p. 85
8 Metodi utilizzati per l'analisi dei dati ottenuti:	p. 85
9. Analisi statistiche:	p. 86
Risultati:	p. 87
1 Valutazione degli effetti delle cellule staminali mesenchimali sui neuroni ippocampali:	p. 88
1.1 Controllo dei marcatori tipici delle cellule staminali espressi dalle MSC in coltura:	p. 88
1.1.2 Controllo dei marcatori delle cellule staminali espressi dalle MSC in co-coltura:	p. 89

2 Le MSC potenziano la trasmissione GABAergica:	p. 92
2.1 Le MSC non variano la trasmissione glutamatergica nei neuroni in co-coltura:	p. 94
2.2 L'aumento delle pre-sinapsi GABAergiche è un effetto diretto della comunicazione bidirezionale tra neuroni e MSC:	p. 95
2.3 L'aumento delle pre-sinapsi GABAergiche si correla ad un aumento della trasmissione inibitoria dei neuroni in coltura:	p. 98
2.4 Identificazione di alcuni fattori rilasciati nel medium responsabili dell'aumento della trasmissione inibitoria GABAergica:	p. 101
2.4.1 Gli effetti delle MSC sulla sinaptogenesi GABAergica sono mediati dal rilascio di proteine nel medium:	p. 101
2.4.2 Le neurotrofine sono tra le proteine coinvolte in questi meccanismi:	p. 103
3 Valutazione degli effetti delle MSC sugli oligodendrociti:	p. 109
3.1 Valutazione degli effetti delle MSC sulle fasi di proliferazione dei precursori degli OL:	p. 109
3.1.1 Le MSC aumentano il numero di OPC NG2 positivi:	p. 109
3.1.2 Le MSC aumentano il numero di OPC O4 positivi:	p. 111
3.2 Le MSC promuovono un precoce differenziamento degli OPC in OL maturi:	p. 113
3.3 Analisi molecolare dei possibili fattori responsabili dell'azione delle MSC sulla proliferazione e il differenziamento degli OL: coinvolgimento del pathway di ERK:	p. 117
Discussione e conclusioni:	p. 120
1. L'azione delle MSC è garantita da meccanismi paracrini:	p. 121
2. Le MSC inducono un aumento della sinaptogenesi GABAergica e della trasmissione inibitoria in neuroni ippocampali:	p. 122
3. Le MSC modulano in modo positivo sia la proliferazione che il differenziamento degli oligodendrociti:	p. 124
4. Conclusioni	p. 126
Bibliografia:	p. 127

RIASSUNTO

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) rappresentano una piccola popolazione di cellule della componente non ematopoietica del midollo osseo. Le MSC sono cellule staminali adulte multipotenti dotate sia di proprietà immunoregolatorie, che di un potenziale neurotrofico. Tali proprietà le rendono un promettente strumento terapeutico sia per la cura di malattie neurodegenerative, sia per il miglioramento, ad esempio, di danni ischemici provocati a seguito di traumi cerebrali, come già riportato in alcuni recenti studi preclinici. Sebbene i meccanismi con cui le MSC agiscono sono ancora in gran parte sconosciuti, è stato ipotizzato che esse possano agire sia attraverso trans-differenziazione verso cellule del sistema nervoso centrale (SNC), sia attraverso il rilascio di sostanze neurotrofiche andando a cooperare e regolare i processi di neurosviluppo e di riparazione in seguito a danni tissutali. Lo studio svolto si è focalizzato sulle capacità neurotrofiche delle MSC, impiegando un modello sperimentale che prevede l'utilizzo di colture cellulari primarie di ratto per valutare gli effetti esercitati dalle MSC su neuroni ippocampali e sugli oligodendrociti. A tale scopo è stato utilizzato un sistema di co-coltura in vitro che impedisce un contatto diretto tra i diversi tipi cellulari presi in esame.

L'analisi degli effetti che le MSC svolgono a livello neuronale (i) sulla sinaptogenesi ippocampale, (ii) sul riciclo delle vescicole sinaptiche e (iii) sulla loro attività elettrica (indice del grado di funzionalità dei neuroni) hanno mostrato che le cellule staminali sono in grado di supportare in modo diretto ed efficiente la funzionalità neuronale alterando il rapporto tra presinapsi eccitatorie e inibitorie. Tale variazione genera colture neuronali che mostrano un'aumentata segnalazione di tipo inibitorio. Le nostre osservazioni dimostrano infatti che le MSC aumentano selettivamente le presinapsi ippocampali GABAergiche e determinano una più alta espressione del cotrasportatore per il cloro (KCC2), responsabile a livello dei neuroni del ruolo inibitorio svolto dalle sinapsi GABAergiche. Questi dati correlano inoltre con un effettivo aumento della trasmissione inibitoria misurata mediante registrazioni elettrofisiologiche (configurazione *patch clamp*) di correnti, che mostrano un aumento sia in termini di frequenza che di ampiezza degli impulsi inibitori generati dai neuroni. La diminuzione di sinapsi GABAergiche nelle nostre colture sia dopo il trattamento con un bloccante (K252a), che riconosce in maniera non selettiva tutti i recettori tirosin chinasi (TrK) per le neurotrofine, che dopo l'utilizzo di uno scavenger più selettivo per il ligando specifico del recettore TrKB, ci hanno permesso di individuare nel *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) una delle molecole potenzialmente coinvolte negli effetti regolatori mostrati dalle MSC.

Il coinvolgimento di questa specifica neurotrofina è stato ulteriormente supportato anche da una valutazione quantitativa tramite test ELISA da cui è emersa una concentrazione maggiore di BDNF

nei terreni di coltura in cui i neuroni erano stati posti in co-coltura con le MSC rispetto ai terreni delle co-culture di controllo tra astrociti e neuroni.

I risultati fin qui ottenuti indicano che l'aumentata espressione del BDNF, verosimilmente correlabile ad altri fattori trofici rilasciati dalle MSC, inducono sia una sopravvivenza neuronale dipendente dagli effetti indiretti che queste svolgono sugli astrociti, sia una regolazione diretta dell'attività neuronale che determina un'aumentata trasmissione GABAergica nelle culture ippocampali prese in esame. Questo potrebbe suggerire uno dei possibili meccanismi con cui le MSC cooperano nei processi di riparazione del SNC.

Da recenti lavori pubblicati in letteratura emerge, inoltre, che le MSC sono in grado di migliorare anche il decorso clinico di patologie demielinizzanti e promuovere la riparazione dei tessuti attraverso meccanismi immunologici ed effetti neuroprotettivi favorendo il reclutamento di cellule precursori degli oligodendrociti. Partendo da queste evidenze siamo andati a verificare se e come le MSC, grazie alle loro proprietà immunologiche e neurotrofiche, fossero in grado di supportare la sopravvivenza degli oligodendrociti (OL) e dei loro precursori e partecipare attivamente alla regolazione dei loro processi di proliferazione e mielinizzazione. Attraverso l'immunomarcatura, sia in immunocitochimica che in Western blotting, di proteine specifiche del lineage oligodendrocitico tipicamente utilizzate come marcatori delle diverse fasi di proliferazione, differenziazione e maturazione (in particolare, la glicoproteina di membrana O4, il proteoglicano NG2 e la proteina basica della mielina MBP), si è visto che le MSC sono in grado di prolungare la fase proliferativa e di anticiparne il differenziamento. Inoltre abbiamo indagato sul possibile meccanismo molecolare alla base di questi fenomeni concentrandoci sugli effetti mediati dai recettori Trk. Le neurotrofine infatti sono descritte come una componente importante delle fasi di sviluppo e maturazione degli oligodendrociti. A tal proposito siamo andati a osservare se ci fossero dei cambiamenti nello stato di fosforilazione della MAPKinasi ERK, poichè questa chinasi è uno degli effettori attivati dall'interazione tra le neurotrofine e i loro recettori. Risultati preliminari mostrano che negli OL in co-coltura con le MSC, ERK risulta molto più fosforilata in confronto ai livelli registrati su OL in co-coltura con astrociti, suggerendo una maggiore attivazione delle vie di segnalazione legate a questa proteina e un conseguente coinvolgimento delle neurotrofine negli effetti osservati.

Resta comunque da chiarire se tale aumento nella fosforilazione di ERK sia da attribuire almeno in parte all'attivazione dei recettori specifici per le neurotrofine come TrKA, TrKB o TrKC. Questi dati, sebbene in una fase iniziale di uno studio che richiede una più approfondita indagine anche di altri meccanismi molecolari, suggeriscono che le MSC sono in grado di agire positivamente anche sulla regolazione della proliferazione e maturazione degli OL e, se aggiunti a quelli ottenuti sulla regolazione della sinaptogenesi, rendono queste cellule un modello interessante per l'identificazione di molecole coinvolte nello studio delle potenziali vie utilizzate dalle MSC nello svolgere le loro funzioni di supporto sul SNC in processi neuroprotettivi.

ABSTRACT

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) account for a small population of cells of the non-hematopoietic component of bone marrow. MSCs are multipotent stem cells endowed with neurotrophic potential combined to immunological properties, making them a promising therapeutic tool for neurodegenerative disorders. Although the mechanisms by which they act are still largely unknown, trans-differentiation, paracrine and autocrine actions have been hypothesized. Here we focus on the study of the effects exerted by rat MSCs on CNS neurons and oligodendrocytes by using a simplified *in vitro* co-culture system that precludes any direct contact between different cell types.

The analysis of hippocampal synaptogenesis, synaptic vesicle recycling and electrical activity show that MSCs by themselves, efficiently support morphological and functional neuronal differentiation. Our observations demonstrate that MSCs selectively and directly increased hippocampal GABAergic presynapses and inhibitory transmission. In fact, this increment correlated to a higher expression of the potassium/chloride KCC2 cotransporter and to an enhancement of both the frequency and the amplitude of mIPSC and sIPSC. The decreased of GABA synapses following the treatment with a widely used Trk-neurotrophin receptor blocker, K252a, and the more specific TrkB receptor bodies prompt for the involvement of the brain derived neurotrophic factor (BDNF) in mediating such effects. The involvement of this neurotrophin is also strengthened by test ELISA on the culture medium collected from MSC-neuron co-cultures in which an higher BDNF concentration was detected, when compared to astrocyte-neuron co-cultures.

The results obtained indicate that MSC-secreted factors induce glial-dependent neuronal survival and directly trigger an augmented GABAergic transmission in hippocampal cultures, highlighting a new effect by which MSCs could cooperate in CNS repair.

Additionally, MSCs have been described to improve the clinical course of some demyelinating pathologies and to promote tissue repair through immunological mechanisms and neuroprotective effects. Following these evidences we performed *in vitro* and *in vivo* experiments to assess whether MSCs exert their actions through the support of oligodendrocytes (OLs), the myelinating CNS cells, and participate in the regulation of their proliferation and maturation. Through the analysis of specific proteins typically used as markers of the different stages of proliferation, maturation and differentiation (specifically, the membrane glycoprotein O4, the proteoglycan NG2 and myelin basic protein MBP, respectively), it has been noticed that MSCs are capable to prolong the proliferation phase of OPCs and also to anticipate OL differentiation, with respect to standard astrocyte/OL co-cultures. Moreover we investigated a possible molecular mechanism underlying

these phenomena focusing on neurotrophin pathways. Trk receptors activation was analyzed in order to find out a possible role of neurotrophins in MSC-mediated effects on OLs, as it happens in neuronal cultures. We focused on the changes in the phosphorylation level of ERK (Extracellular signaling-regulated kinases), one of the activated effectors by TrK receptors. Our observations show that, in OLs co-cultured with MSCs, ERK is highly phosphorylated with respect to astrocyte/OL co-cultures, suggesting a MSC-induced activation of the pathways regulated by this protein. These data, although preliminary, suggest that MSCs positively act on the regulation of proliferation and maturation of OLs and, due to the observed effects on the regulation of synaptogenesis (see above), make these cells an interesting model for the identification of molecules involved in MSC neuroprotective processes. This may open new therapeutic approaches in the treatment of neurodegenerative diseases involving not only a synaptic imbalance, as it happens in various forms of epilepsy, but also in demyelinating diseases. Thus, in this research project, we aimed at characterising the molecular mechanisms underlying MSC actions that could participate in the recovery of neurological disorders or demyelinating pathologies.

INTRODUZIONE

1 LE CELLULE STAMINALI

1.1 Definizione e classificazione base delle cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate che partecipano al mantenimento della corretta omeostasi cellulare. Queste cellule sono in grado di dividersi sia in maniera simmetrica (“divisione espansiva”), producendo due cellule figlie identiche fra loro e alla madre, sia in maniera asimmetrica (“divisione differenziativa”), dando origine ad una cellula figlia identica alla madre e a una cellula figlia progenitrice in grado di differenziare in uno o più tipi cellulari.

Non esistono a oggi dei precisi parametri morfologici o funzionali in grado di identificare in modo univoco e tramite una specifica classificazione una popolazione di cellule staminali, ma ci si può basare solo sulla combinazione delle loro caratteristiche di proliferazione e differenziamento in seguito a determinati stimoli e capacità di autorinnovamento.

Queste cellule vengono inoltre classificate in base alla loro capacità di differenziare in diversi tipi cellulari.

Sulla base di questa classificazione possiamo trovare cellule staminali definite (Fig. 1):

- Totipotenti:

queste cellule hanno la capacità di differenziare in qualsiasi tipo cellulare e potenzialmente di ricreare, da sole, un embrione. Si tratta di cellule staminali derivate dalla fusione del gamete femminile e maschile (cellula uovo e spermatozoo), quindi rappresentate, innanzitutto, dallo zigote e successivamente dalle cellule prodotte nelle prime divisioni mitotiche. Si può parlare di cellule totipotenti fino alla quarta divisione dello zigote, dopo la quale le cellule cominciano ad assumere delle caratteristiche differenti a seconda del tipo di foglietto embrionale che formeranno.

- Pluripotenti:

sono in grado di differenziare in tutti i tipi cellulari dei tre foglietti embrionali, quindi in tutte le cellule di un organismo adulto fatta eccezione per gli annessi extra-embrionali.

- Multipotenti:

Queste cellule possono dare origine a svariate linee cellulari appartenenti a diversi tessuti anche in base al differente livello di multipotenza che sono in grado di esprimere. Non esiste infatti un unico grado di multipotenza, ma differenti linee di staminali possono avere

dei potenziali di differenziamento maggiori o minori a seconda del tessuto in cui risiedono e delle funzioni a cui sono preposte.

- Unipotenti:

Sono le cellule staminali maggiormente presenti nell'organismo adulto e hanno la peculiarità di dare origine a una sola linea cellulare. Queste cellule sono infatti comunemente deputate al solo mantenimento dell'omeostasi di uno specifico tessuto.

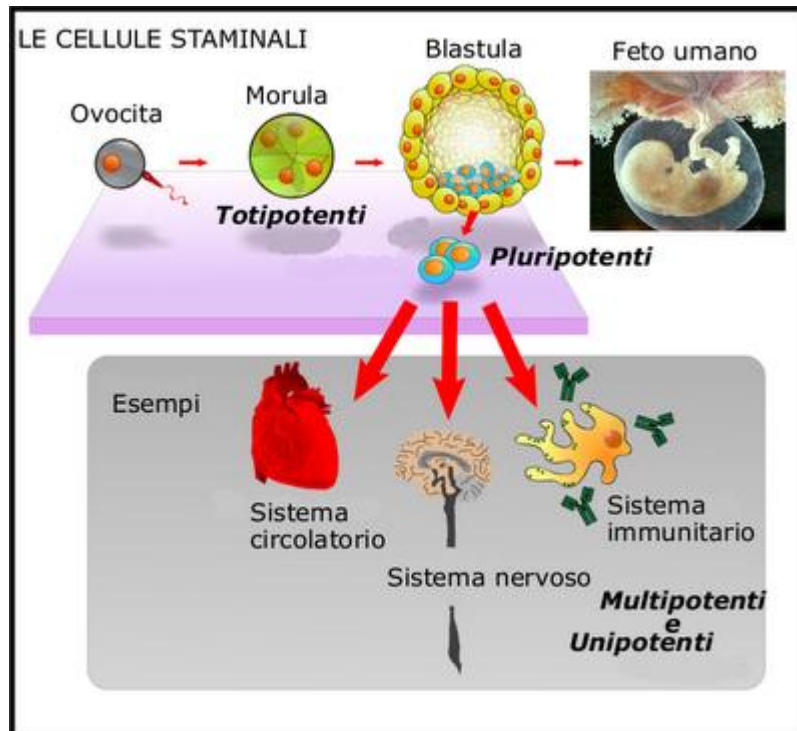


Fig 1: potenzialità differenziate delle cellule staminali nei vari stadi dello sviluppo

[Immagine rivista sulla base di The National Institutes of Health (NIH), <http://www.nih.gov/health/infoline.htm>]

1.1.1 Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (ESC, embryonic stem cell) sono le uniche cellule staminali pluripotenti conosciute e sono localizzate all'interno della massa cellulare della blastocisti, stadio precoce dello sviluppo embrionale. Una delle problematiche legate alle possibilità di ricerca e utilizzo di queste cellule risiede nella necessità di sacrificare l'embrione di provenienza per poterle isolare, sollevando notevoli problemi di natura etica all'interno della comunità scientifica. Va però tenuto in considerazione che le ESC sono tra le cellule staminali dotate della più ampia potenzialità di sviluppo e di differenziamento, essendo in grado di dare origine a qualsiasi tipo cellulare dell'organismo derivante dai tre foglietti embrionali. Questa loro capacità differenziativa le ha rese oggetto di intensivi studi volti a

trovare un loro possibile utilizzo terapeutico con la finalità di poter curare numerose patologie, tra cui ad esempio il diabete di tipo I (Pan and Wright, 2011) o alcune malattie neurodegenerative (Di Giorgio et al., 2007, Kim et al., 2012). Sfortunatamente, qualsiasi terapia basata sull'utilizzo di ESC comporta notevoli rischi di formazione di tumori e teratomi a partire dalle cellule trapiantate, proprio in virtù del loro stato altamente indifferenziato, della loro elevata capacità proliferativa e delle scarse attuali conoscenze dei loro processi di regolazione. Nonostante si stiano ottenendo dei risultati promettenti in studi preclinici utilizzando sia modelli *in vitro* che modelli animali e sia stata prodotta una cospicua serie di lavori scientifici sul differenziamento e trapianto delle ESC, esistono impedimenti di tipo tecnico, procedurale e di biosicurezza che stanno mettendo parzialmente in discussione il progresso della sperimentazione in questa direzione. Oltretutto in seguito a trapianti di cellule staminali embrionali umane (hESC) si sono registrati dei fenomeni di rigetto da parte del sistema immunitario ospite (Brustle et al., 1997, Gruen and Gabel, 2006).

1.1.2 Cellule staminali adulte

Le cellule staminali somatiche o adulte (ASC, Adult Stem Cell) sono cellule presenti sia nei tessuti fetali dopo la gastrulazione che nei tessuti adulti. Rispetto alle ESC, le ASC sono caratterizzate da un ridotto e più specifico potenziale proliferativo e differenziativo.

Durante lo sviluppo fetale le ASC hanno il compito di generare le cellule mature del tessuto in cui risiedono, garantendo il suo accrescimento fino al raggiungimento del pieno sviluppo dell'organismo. In età adulta esse invece si localizzano in specifici microambienti, definiti nicchie tissutali, dove restano in uno stato di quiescenza o di limitata attività fino a quando non vengono riattivate in risposta a diversi stimoli.

Le cellule staminali adulte possono essere isolate da diversi organi o tessuti di organismi adulti, quali midollo osseo (Bianco and Robey, 1999), sangue (Domen and Weissman, 1999), epidermide (Gandarillas and Watt, 1997), intestino (May et al., 2008), pancreas (Lechner and Habener, 2003), fegato (Sell, 1990), cornea (Wu et al., 2001), muscolo (Seale and Rudnicki, 2000), cervello (Davis and Temple, 1994), tessuto adiposo (da Silva Meirelles et al., 2006), placenta (In 't Anker et al., 2004) e altri ancora. Inoltre, alcuni tipi di ASC possono essere prelevate dal sangue del cordone ombelicale (Erices et al., 2000) e dal liquido amniotico (De Coppi et al., 2007). A supporto dei potenziali applicativi di queste cellule, negli ultimi anni, in molti reparti di maternità è prassi conservare una piccola quota

di staminali dal cordone ombelicale, in previsione di un loro futuro utilizzo da parte dei pazienti, nel caso in cui si arrivasse a standardizzare un maggior numero di protocolli terapeutici che ne prevedano l'utilizzo.



Fig 2: differenti destini differenziativi delle cellule staminali adulte.

Una volta “innescate” da svariati processi infiammatori e chemiotattici causati da danni tissutali o cambiamenti fisiologici dell'organismo, le ASC ricominciando a produrre sia una progenie ad elevato tasso mitotico, in grado di prevenire l'esaurimento del pool di cellule staminali, sia a dar origine a tutti i tipi cellulari dello specifico tessuto di appartenenza.

Queste cellule, per la loro presenza in specifici tessuti e le loro potenzialità differenziative anche in età adulta, hanno la capacità di garantire il corretto mantenimento di importanti funzioni fisiologiche ma la loro funzione è sempre stata limitata all'esclusivo mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale del tessuto stesso di appartenenza.

Inoltre, studi che hanno valutato il comportamento di queste cellule hanno portato a considerare che la loro segregazione durante l'embriogenesi possa progredire in una sola e unica direzione e che una volta intrapreso un preciso destino differenziativo siano impossibilitate a invertire tale processo rendendo impossibile la modificazione del loro destino verso lineage cellulari diversi (Fig.2).

Durante gli ultimi anni sono invece emerse forti evidenze sperimentali che dimostrano la capacità di alcune cellule staminali adulte di acquisire un'identità funzionale diversa da quella che solitamente mostrano durante lo sviluppo embrionale, differenziando in fenotipi maturi non riscontrabili nel tessuto o nell'organo d'appartenenza dando origine a fenomeni definiti di plasticità fenotipica o trans-differenziamento (Karaoz et al., 2011, Huang et al., 2012).

1.1.3 Dai fenomeni di trans-differenziamento alle cellule staminali “indotte”

Come precedentemente accennato, alcune cellule staminali adulte mostrano un'elevata capacità nel differenziare in tipi cellulari non solo appartenenti a tessuti diversi da quelli in cui esse stesse solitamente risiedono e svolgono i loro ruoli di regolazione omeostatica, ma anche originati da foglietti embrionali distinti. Il fenomeno del trans-differenziamento avviene grazie a una ri-programmazione genetica che modula l'attivazione o la soppressione di geni essenziali, definiti “*master genes*”, essenziali per permettere a queste cellule di modificarsi esprimendo un nuovo fenotipo.

Alla fine degli anni novanta alcuni studi basati su analisi di biologia molecolare hanno dimostrato che cellule staminali ematopoietiche, trapiantate in topi con gravi patologie muscolari, erano in grado di migrare attraverso il circolo sanguigno nelle aree degenerate, andare incontro a differenziamento miogenico e partecipare, così, alla rigenerazione delle fibre danneggiate (Ferrari et al., 1998). Tale plasticità è stata inizialmente ricondotta a fenomeni di “memoria ontogenetica” nel tentativo di giustificare un comune sviluppo da parte di cellule staminali aventi la medesima origine. Già negli anni successivi sono però stati descritti fenomeni di trans-differenziamento di cellule staminali derivanti da differenti foglietti embrionali, come descritto in un modello murino in cui le staminali neurali, la componente staminale del SNC, trapiantate in topi irradiati erano in grado di ripopolare le nicchie proprie delle staminali ematopoietiche all'interno del midollo osseo, dando origine sia ai precursori immaturi del sangue, sia alle cellule mature della linea mieloide e linfoide (Bjornson et al., 1999). A queste prime evidenze nel corso degli anni si sono aggiunte molte altre osservazioni a supporto delle potenzialità trans-differenziate di altre linee di cellule staminali, come le mesenchimali (Bossolasco et al., 2005, Leong et al., 2012). Questi esempi, e altre numerose evidenze riportate in letteratura, supportano la capacità di alcune cellule staminali adulte di trans-differenziare implementando e modificando quelle che sono le definizioni base di multi- e pluri-potenzialità tipiche delle staminali.

Le migliori prospettive terapeutiche e applicative che possono nascere dai fenomeni di trans-differenziamento devono però ancora essere affiancate da una più profonda conoscenza sia dei meccanismi che stanno alla base della loro regolazione sia dei fenomeni che innescano i processi di modulazione di *master genes* coinvolti.

Sulla base della sempre più ampia conoscenza dei *master genes* preposti alla regolazione delle cellule staminali, sono inoltre stati eseguiti degli studi volti a individuare il corredo di geni attivati in linee cellulari non staminali, in modo da indurle a esprimere un differente

fenotipo che possa o dare origine a cellule staminali pluripotenti (Kim et al., 2008, Tat et al., 2010) o esprimere proteine e meccanismi di interazione differenti che rendano queste cellule utili in possibili applicazioni terapeutiche.

L'ingegnerizzazione di queste cellule ha dato origine a quelle che vengono chiamate "cellule staminali pluripotenti indotte" (iPSC).

Le iPSC si ottengono in seguito alla riprogrammazione di cellule staminali somatiche di pazienti attraverso l'introduzione di particolari fattori trascrizionali, come per esempio, c-Myc, Klf4, Oct4 e Sox2 (Woltjen et al., 2009). Un esempio che si può riportare è quello dei fibroblasti endometriali umani, che sono stati "riprogrammati" in cellule dotate di caratteristiche molto vicine a quelle delle staminali, acquisendo la capacità di differenziare in cellule di tipo neuronale, adipocitico e osteocitico (Chen et al., 2012) L'utilizzo di queste cellule staminali apre una nuova prospettiva in quanto offrirebbe la possibilità di sviluppare protocolli terapeutici mirati in base alle esigenze e alle caratteristiche geniche dei singoli pazienti, creando la prospettiva di eseguire un trapianto di cellule geneticamente identiche a quelle del paziente riducendo notevolmente i rischi legati a fenomeni di rigetto. L'unica considerazione da fare sul loro utilizzo è che non si è ancora in grado di avere un pieno controllo delle iPSC che attualmente presentano alta similarità, sia molecolare che funzionale, con le cellule staminali embrionali lasciando aperto il problema del controllo delle loro potenzialità teratogeniche e tumorali (Liras, 2010).

1.2 Le cellule staminali mesenchimali (MSC)

La linea cellulare staminale presa in esame in questa tesi è quella delle cellule staminali mesenchimali che verranno quindi analizzate più nel dettaglio.

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) appartengono a una popolazione eterogenea costituita da cellule staminali e da progenitrici con caratteristiche di pluripotenza, sono infatti in grado di differenziare nelle linee cellulari del mesoderma, come per esempio osteoblasti (Haynesworth et al., 1992, Donzelli et al., 2007), adipociti (Justesen et al., 2002), condrociti (Johnstone et al., 1998), cellule muscolari scheletriche (Wakitani et al., 1995) e cardiache (Makino et al., 1999), ma anche di differenziare in cellule di origine embrionale differenti quali cellule epiteliali e in alcuni studi ne viene descritto il potenziale trans-differenziamento verso un lineage neuronale (Liu et al., 2009, Caplan and Correa, 2011). Le cellule staminali mesenchimali risiedono soprattutto nel midollo osseo, ma sono state anche isolate a partire da tessuto adiposo, dal fegato e da tessuti fetali. Come tutte

le staminali adulte in seguito a specifici stimoli si spostano dalle nicchie di appartenenza per raggiungere il tessuto bersaglio nel quale vanno incontro a un processo di differenziamento in modo da poterne rinnovare le cellule o sostituire le cellule danneggiate (Uchida et al., 2007).

1.2.1 Fenotipizzazione e isolamento delle MSC

Il midollo osseo di un adulto contiene quattro tipi distinti di cellule staminali deputate a differenti funzioni che costituiscono una popolazione cellulare eterogenea e di difficile isolamento tramite parametri morfologici. Questa popolazione cellulare contiene le cellule staminali ematopoietiche (*HSC, Hematopoietic Stem Cell*), le cellule precursori endoteliali (EPC, Endothelial Precursor Cell) (Reyes et al., 2002), le cellule staminali mesenchimali (MSC), anche definite cellule stromali del midollo osseo, e una sotto-popolazione di MSC costituita dalle cellule progenitrici multipotenti adulte (*MAPC, Multipotent Adult Progenitor Cell*). Queste cellule sono anche in grado di dar origine, *in vitro* e in particolari condizioni di crescita, a sottotipi cellulari riconducibili per alcune caratteristiche ad astrociti, oligodendrociti e neuroni (Jiang et al., 2002).

I primi tentativi di isolamento e di caratterizzazione delle MSC sono stati fatti all'inizio degli anni settanta (Luria et al., 1971) e a oggi, pur avendo raccolto un cospicuo numero di informazioni, la loro caratterizzazione è ancora oggetto di studi sempre più approfonditi. Le MSC, quando isolate e poste in coltura, hanno un tempo medio di replicazione (*population doubling*) che varia dalle 12h alle 60h, in base al metodo di isolamento utilizzato, alla loro densità iniziale nel midollo osseo e all'età del donatore. Durante le fasi di crescita nel loro stato indifferenziato le MSC mostrano una morfologia fusiforme, simile a quella dei fibroblasti e durante la loro espansione *in vitro* danno origine a colonie.

Proprio a causa delle loro caratteristiche morfologiche e funzionali il primo nome coniato per questo tipo di cellule è stato quello di *fibroblasti del midollo osseo* o *fibroblasti-unità formanti colonie* (CFU-f), successivamente sostituito dal termine di *cellule stromali del midollo osseo* (BMSC), *cellule staminali scheletriche*.

Solo dopo svariato tempo si è arrivati alla loro attuale definizione di *cellule staminali mesenchimali* (MSC) ben definita dalla società internazionale per la terapia cellulare (ISCT, *International Society for Cellular Therapy*) che ha cercato di colmare l'assenza di una definizione comune (Dominici et al., 2006). La ISCTT ha proposto una terminologia standardizzata in modo da uniformare lo scambio di informazioni tra gruppi scientifici ed

evitare aspettative poco realistiche sulle potenzialità di queste cellule staminali: il termine *cellule stromali mesenchimali* dovrebbe definire, in generale, la popolazione eterogenea di cellule isolate da midollo osseo che mostrano una capacità rigenerativa tessutale, senza alcun riferimento alle possibili implicazioni biologiche e terapeutiche; il termine *cellule staminali mesenchimali*, invece, dovrebbe essere riservato alla sottopopolazione omogenea di cellule stromali che mostrano più elevate caratteristiche rispondenti alla classificazione delle cellule staminali sopra riportata (par. 1.1).

Il primo metodo utilizzato per l'isolamento e l'espansione in vivo delle MSC a partire da estratti cellulari del midollo osseo si basa sulla loro tendenza ad aderire su superfici in plastica.

Questo metodo, sebbene sia tra quelli ancora maggiormente utilizzati, mostra l'inconveniente di dare origine a colture cellulari eterogenee, a causa dell'inevitabile contaminazione da parte di cellule ematopoietiche; inconveniente che però si esaurisce con i primissimi passaggi in vitro, dopo i quali la componente ematopoietica, che cresce preferenzialmente in sospensione, si riduce drasticamente (Kassem et al., 1993, Rickard et al., 1996). Sono stati fatti anche studi per cercare di mettere a punto metodiche più specifiche che permettano di ottenere una popolazione di MSC più omogenea, sfruttando, ad esempio, anticorpi in grado di selezionare in modo specifico i precursori del midollo osseo (anticorpi diretti contro gli antigeni CD133, CD90, N-CAM) (Bossolasco et al., 2005) e/o le cellule staminali (anticorpi contro l'antigene Stro-1) (Simmons and Torok-Storb, 1991).

Anche la crescita e la loro espansione in vitro su piastre appositamente trattate in condizioni di bassa percentuale di siero ha inizialmente dato buoni risultati sul loro isolamento, permettendo inoltre di isolare in modo più specifico le MAPC, anche se attualmente questa tecnica è stata soggetta a critiche procedurali e quasi totalmente abbandonata (Reyes et al., 2001, 2009).

Un'ulteriore tecnica di selezione si basa sulla parziale conoscenza fenotipica delle MSC: sapendo che queste cellule sono CD45⁻ e la glicoforinaA (GlyA), si possono eseguire purificazioni che sfruttano l'esclusione o selezione negativa utilizzando anticorpi anti-CD45 e anti- GlyA in modo da selezionare ed eliminare dalla coltura tutte le cellule positive per questi marcatori e quindi sicuramente non MSC (Bossolasco et al., 2005).

Le tecniche di immunoisolamento o immunoesclusione sono molto interessanti e precise nel loro utilizzo, ma purtroppo, ad oggi, non esistono marcatori di superficie che possano

identificare le MSC in maniera specifica ed inequivocabile, quindi la loro caratterizzazione trova, in letteratura, poca consistenza e univocità.

L'unico modo per poter caratterizzare in modo affidabile una cultura di MSC prevede quindi l'utilizzo combinato di differenti approcci che rispondano a tutti i parametri descritti sopra e che sono stati approvati da un apposito comitato scientifico che ne ha sancito la validità:

- cellule aderenti alla plastica in condizioni standard di coltura.
- cellule negative per marcatori di superficie quali CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 e HLA-DR, ma positive per CD105, CD73 e CD90.
- cellule capaci di autorinnovarsi e differenziare in osteoblasti, adipociti e condrociti in vitro.

Negli ultimi anni si sono ben definiti anche i protocolli da utilizzare per il differenziamento in vitro delle MSC garantendo una più precisa caratterizzazione di queste ultime.

È stato visto che le MSC in presenza di β -glicerolo-fosfato, acido ascorbico, desametasone e siero fetale bovino sono in grado di differenziare in senso osteogenico dando origine a noduli ossei con una matrice extracellulare mineralizzata contenente idrossiapatite (Haynesworth et al., 1992, Piek et al., 2010)

Invece il differenziamento adipogenico delle MSC viene indotto aggiungendo al medium di coltura desametasone, insulina, isobutilmetilxantina e indometacina; in queste condizioni infatti le MSC sono in grado di generare adipociti e vacuoli ricchi di lipidi (Majumdar et al., 2000, Ninomiya et al., 2010).

Il differenziamento condrocitico viene infine indotto utilizzando matrice di supporto tridimensionale in presenza di un medium di coltura senza siero e l'aggiunta di specifici membri della famiglia di TGF- β . In queste condizioni le MSC cambiano morfologia e iniziano a sintetizzare componenti specifici della matrice extracellulare come il glicosamminoglicano (Worster et al., 2001, Alves da Silva et al., 2010).

1.2.2 Il midollo osseo e le altre fonti per l'isolamento delle MSC

Il midollo osseo rappresenta la fonte più utilizzata e universalmente riconosciuta per l'isolamento delle MSC. Particolari periciti dei sinusoidi midollari, infatti, chiamati cellule reticolari avventizie, rappresenterebbero i corrispettivi più probabili delle MSC *in vivo* (Jones and McGonagle, 2008). Tale ipotesi è sostenuta da due precedenti considerazioni: le MSC derivate dal midollo osseo esprimono marcatori specifici tipici dei periciti, quali

CD146 e 3G5 (Brachvogel et al., 2005) e inoltre le cellule reticolari avventizie sono considerati elementi critici per il supporto mieloide, in grado di differenziare direttamente in adipociti e generare osteoblasti *in vivo* (Shi and Gronthos, 2003).

Oltre che da midollo osseo, però, sono state isolate MSC con caratteristiche biologiche simili a quelle derivate dal midollo osseo anche da molti altri organi e tessuti (tessuto adiposo, aorta, vena cava, cervello, rene, glomerulo renale, fegato, polmoni, muscoli, pancreas, milza, timo) e quindi riconducibili tutte alla stessa famiglia (da Silva Meirelles et al., 2006). Una così vasta distribuzione all'interno dell'organismo suggerisce una possibile relazione tra le differenti popolazioni di MSC, sia in termini di funzioni, che di derivazione a seguito dello sviluppo embrionale. Tale estensione del compartimento delle MSC è stata descritta come una riserva di cellule indifferenziate per rispondere alle richieste del tessuto a cui appartengono, ma che al contempo dà la possibilità alle MSC, dotate di grandi capacità migratorie, di acquisire differenti caratteristiche fenotipiche locali assicurando una più ampia potenzialità di rinnovamento di molti tessuti.

In considerazione del fatto che la frequenza e la capacità differenziativa di tali cellule sembra ridursi al crescere dell'età dell'individuo (In 't Anker et al., 2004), diventa promettente la possibilità poter isolare MSC a partire da differenti tessuti fetali, in modo da poterne sfruttare al massimo il loro potenziale staminale. Tra questi tessuti fetali il più utilizzato è il cordone ombelicale (Jang et al., 2006), ma vi sono anche sangue, fegato, midollo osseo e polmoni fetali (Campagnoli et al., 2001, Fan et al., 2005).

1.3 Le MSC e un loro possibile contributo al sistema nervoso centrale: il trans-differenziamento.

Per giustificare gli effetti neuroprotettivi (si veda par.1.5) che sono stati descritti in letteratura a carico delle MSC, si pensa che questi possano essere dovuti, in parte, a una loro capacità di differenziare a favore di un fenotipo neuronale, sostituendo in tal modo i neuroni danneggiati. A tal proposito, i primi studi effettuati sul sistema nervoso centrale (SNC) sono stati compiuti su modelli animali *in vivo* al fine di verificare la sopravvivenza, l'integrazione e il differenziamento delle MSC, una volta trapiantate in zone danneggiate del SNC.

Studi pilota hanno dimostrato che MSC murine iniettate nel SNC di topi neonati sono in grado di mimare il comportamento dei progenitori neurali, partecipando a molteplici meccanismi del normale sviluppo cerebrale, come la migrazione attraverso il proencefalo

e il cervelletto (senza distruzione della normale architettura del SNC), la proliferazione e un possibile differenziamento in astrociti e neuroni (Kopen et al., 1999). Il differenziamento delle MSC verso un *lineage* neuronale è stato suggerito dall'espressione di proteine gliali, come la proteina fibrillare acida della glia (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), e neuronali, come quelle che compongono i neurofilamenti a livello delle regioni dello striato e dell'ippocampo. Sono stati svolti anche studi di localizzazione di queste cellule dopo il trapianto di MSC ingegnerizzate in modo da esprimere una proteina fluorescente come la GFP (*Green Fluorescent Protein*), per una più facile individuazione. Attraverso questi esperimenti si è visto che l'infusione endovenosa di MSC murine marcate con GFP in topi adulti irradiati determina, a livello cerebrale, lo sviluppo di cellule derivate dal donatore ed esprimenti proteine astrogliali e neuronali (Brazelton et al., 2000). Altri lavori hanno dimostrato che il trapianto di MSC, nel cervello di topi a cui era stato provocato un infarto cerebrale focale, garantisce la sopravvivenza di un numero rilevante di cellule trapiantate in grado di persistere a lungo nella parte sana del cervello ospite, per poi migrare nella regione lesionata e probabilmente differenziare in neuroni o astrociti (Chen et al., 2001a, Lee et al., 2003).

Purtroppo in sistemi sperimentali *in vivo* risulta difficile seguire con precisione il destino differenziativo e la localizzazione di MSC trapiantate, quindi è diventato cruciale verificarne la plasticità fenotipica e comprenderne i meccanismi mediante studi *in vitro*.

Evidenze scientifiche iniziali sul trans-differenziamento hanno riportato che solo una piccola porzione di MSC murine e umane potrebbe essere indotta ad esprimere marcatori tipici di neuroni immaturi (0.5%), in particolare nestina (proteina dei filamenti intermedi espressa nei precursori neurali) e Neu-N (proteina nucleare specifica dei neuroni), nonché di cellule gliali (1%), come GFAP, quando messe in coltura in presenza del fattore di crescita epidermico (EGF, *Epidermal Growth Factor*) e di acido retinoico (RA) o di una combinazione dei fattori neurotrofici come il BDNF (*Brain Derived Growth Factor*) e RA (Lu et al., 2006). Sono stati messi a punto anche dei protocolli specifici in grado di indurre circa l'80% di MSC di ratto e umane a differenziare in cellule esprimenti caratteristiche neuronali, utilizzando un terreno costituito da DMEM (*Dulbecco's minimal essential medium*) e diverse combinazioni di β -mercaptoetanololo (BME), dimetilsolfossido (DMSO) e idrossianisolo butilato (BHA). Le MSC trattate in questo modo esprimevano proteine neuronali quali Neu-N, NF-M (neurofilamenti M) e Tau1 (proteina neurofibrillare specifica degli assoni che ha un ruolo chiave nell'assemblamento dei microtubuli cerebrali) (Jiang et al., 2010).

Nonostante tutti i dati fin qui forniti mostrino una serie di evidenze piuttosto solide e convincenti, una buona parte dei ricercatori che lavorano su queste cellule nutre, tuttora, seri dubbi sulle reali potenzialità trans-differenziative delle MSC. Le obiezioni mosse più frequentemente riguardano il fatto che la plasticità fenotipica attribuita a queste cellule venga dedotta, quasi esclusivamente, sulla base di evidenze di tipo morfologico o antigenico e che l'ambiente esterno, attraverso il rilascio di fattori neurotrofici, giochi invece un ruolo fondamentale nel differenziamento neurale delle staminali mesenchimali. Attualmente, inoltre, non ci sono solide evidenze che dimostrano, dal punto di vista funzionale, tramite registrazioni di correnti o specifiche risposte a stimoli, la reale identità neuronale delle MSC aventi le caratteristiche che hanno portato i ricercatori a definirle cellule trans-differenziate.

1.3.1 Studi in vitro che non supportano il trans-differenziamento neurale delle MSC

Nonostante i numerosi studi precedentemente citati che mostrano il potenziale trans-differenziamento delle MSC in tipi cellulari neurali, i risultati ottenuti e la loro interpretazione non ha portato a una conferma inequivocabile di questo fenomeno e infatti parallelamente ci sono numerosi studi che sostengono l'incapacità di queste cellule di trans-differenziare verso un lineage neuronale.

Per quanto riguarda gli studi *in vitro*, le principali critiche sono rivolte ai metodi utilizzati per promuovere il differenziamento neurale e per identificare la biologia delle cellule differenziate.

Molti gruppi hanno, infatti, dimostrato che l'esposizione ad agenti chimici riducenti o antiossidanti, causano un elevato aumento dei livelli intracellulari di cAMP, forzando le MSC ad adottare una morfologia simil-neurale e a esprimere varie proteine neurali, tra cui nestina, GFAP, β III-tubulina e catena pesante del neurofilamento (NF-H). Questa condizione però risulta essere di natura reversibile e con delle tempistiche che discordano con un reale processo fisiologico che potrebbe avvenire all'interno delle MSC trapiantate *in vivo* (Neuhuber et al., 2004). L'utilizzo di questi agenti ossidanti promuove inoltre il ritiro del citoplasma cellulare attraverso la distruzione della rete di actina nelle MSC dando alle cellule una morfologia simile ai neuroni, ma senza generare una crescita spontanea di neuriti, come avviene nei neuroni. Inoltre i risultati ottenuti sottoponendo le MSC ad agenti che inducono uno stress cellulare quali detergenti, alto pH, alta concentrazione di cloruro di sodio, sono riscontrabili anche sottoponendo altri tipi cellulari allo stesso trattamento:

anche i fibroblasti e i cheratinociti, infatti, mostrano un fenotipo simil-neurale una volta messi a contatto con le stesse sostanze ossidanti (Lu et al., 2004).

Anche a livello del loro profilo proteico e di geni attivati si è visto che le MSC sottoposte a trattamenti che ne inducono il trans-differenziamento attivano dei geni e esprimono delle proteine differenti rispetto a quanto riscontrato nelle cellule neuronali (Bertani et al., 2005, Davydova et al., 2009, Fox et al., 2010).

Da queste osservazioni è ragionevole pensare che la morfologia simil-neurale mostrata dalle MSC è imputabile agli effetti citotossici degli agenti impiegati, piuttosto che a un loro reale trans-differenziamento.

Tralasciando gli aspetti morfologici, anche l'espressione di specifiche proteine neuronali è stata in parte criticata, in quanto i marcatori presi in considerazione non mostrano un elevato grado di specificità. La nestina, ad esempio, non è espressa solo nel tessuto neurale, ma anche in diversi tessuti mesodermici, quali il muscolo (Sejersen and Lendahl, 1993) e l'endotelio durante il loro sviluppo. Analogamente proteine come la GFAP e i neurofilamenti sono espressi dai condrociti della cartilagine fibrosa ed elastica e in alcuni fibroblasti in vari tessuti connettivi (Hainfellner et al., 2001).

Va inoltre sottolineato che l'espressione di alcune proteine neurali da parte delle MSC non può essere una prova sufficiente del loro differenziamento in neuroni. Bisogna, infatti, tenere in considerazione che a causa della loro elevata eterogeneità molecolare e funzionale, le MSC, e alcune cellule in cui esse solitamente differenziano, sono in grado di esprimere un'ampia gamma di proteine regolatorie riscontrate anche nei neuroni. È infatti risaputo che gli osteociti mostrano l'espressione di recettori del glutammato, principale neurotrasmettitore eccitatorio, inclusi i recettori ionotropici N-metil-D-aspartato (NMDA) e che l'antagonista farmacologico di tali recettori inibisce il riassorbimento osseo (Chenu et al., 1998). È stato anche dimostrato che cellule stromali del midollo osseo sono in grado di esprimere catecolamine, neuropeptidi (Maestroni, 2000) e canali del calcio voltaggio dipendenti simili a quelli presenti nei neuroni (Preston et al., 1996).

Risulta quindi facile contestare che l'espressione di proteine neuronali sia da addurre a fenomeni di trans-differenziamento, ma che tale espressione potrebbe essere semplicemente ricondotta all'attivazione errata di specifici *master genes* presenti nelle MSC e deputati ad altre funzioni biologiche che solitamente si verificano nei lineage cellulari propri del differenziamento di queste staminali.

1.3.2 Le MSC trans-differenziate danno origine a neuroni funzionali?

Come detto, una delle critiche maggiori sui fenomeni di trans-differenziamento delle MSC risiedono nella loro reale capacità di originare cellule che non solo siano morfologicamente affini ai neuroni e ne esprimano delle proteine caratteristiche ma che siano anche in grado di mostrare una funzionalità paragonabile.

Sono ormai ben riportati in letteratura dei criteri essenziali per poter identificare inequivocabilmente neuroni differenziati funzionali (Reh, 2002):

- i) devono essere cellule post-mitotiche;
- ii) devono essere cellule polarizzate con un singolo assone e molteplici dendriti;
- iii) devono generare scariche di potenziali d'azione;
- iv) devono comunicare con altri neuroni e/o tipi cellulari attraverso sinapsi, mediante il rilascio di neurotrasmettitori e l'espressione dei relativi recettori postsinaptici.

A partire dal 2001 sono stati condotti studi che hanno cercato di mettere a punto analisi elettrofisiologiche per testare la funzionalità di questi "putativi" neuroni. Tuttavia, tali cellule non erano in grado di generare potenziali d'azione ed erano assenti correnti di Na^+ e di K^+ voltaggio-dipendenti, così come recettori per i neurotrasmettitori funzionali (Kohyama et al., 2001, Hung et al., 2002, Park et al., 2011). Questi studi elettrofisiologici hanno inoltre dimostrato che il potenziale di membrana a riposo di tali cellule simil-neuronali era più alto rispetto ai neuroni maturi funzionali e che non si verifica un innalzamento delle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare indotto da glutammato o da alte concentrazioni di K^+ paragonabile a quello registrato nei neuroni.

Anche nei rari casi in cui si è registrata un'attività elettrica nelle colture trans-differenziate, il potenziale d'azione generato ha indotto solo una modesta depolarizzazione della membrana, che non mostra segni di recupero, né la capacità di generare potenziali d'azione ripetuti (Wislet-Gendebien et al., 2005, Jiang et al., 2010).

Pertanto, facendo riferimento ai 4 criteri sopraelencati, risulta difficile confermare in pieno le abilità di trans-differenziamento delle MSC in quanto mancano da verificare, nei "putativi" neuroni, due caratteristiche peculiari, ovvero la formazione di sinapsi e la generazione di scariche di potenziali d'azione (Jackson et al., 2007, Somoza et al., 2008, Montzka et al., 2009).

1.3.2 Una possibile alternativa al trans-differenziamento: la fusione cellulare

Un'ipotesi proposta per spiegare la plasticità fenotipica delle MSC che non prevede il loro trans-differenziamento, presuppone il verificarsi di *eventi di fusione* tra le cellule estratte dal midollo osseo e i neuroni maturi del tessuto dell'ospite. La fusione cellulare non è un fenomeno raro, infatti, si verifica già durante il normale sviluppo tissutale, ad esempio nella formazione di cellule muscolari scheletriche così come degli osteoclasti dell'osso e delle cellule giganti a partire dai fagociti mononucleati. Le MSC sono già note come cellule in grado di andare incontro a fusione cellulare: in condizioni stringenti le MSC murine sono infatti in grado di fondere spontaneamente con le ESC, adottando il fenotipo di queste ultime mantenendo in parte la loro identità di staminale mesenchimale (Terada et al., 2002).

Studi basati sul sistema di ricombinazione Cre-Lox, dimostrano che cellule derivanti dal midollo osseo trapiantate in topi precedentemente irradiati, fondono spontaneamente con cellule del Purkinjje nel cervelletto, ma anche con gli epatociti del fegato e con fibre muscolari cardiache, dando origine a cellule plurinucleate (Alvarez-Dolado et al., 2003). Ulteriori analisi hanno dimostrato, utilizzando MSC marcate con GFP, che il loro trapianto in topi irradiati dava origine, dopo alcuni mesi, a cellule del Purkinjje dell'ospite GFP positive e caratterizzate dalla presenza di più nuclei (Weimann et al., 2003, Wright et al., 2011).

Da questi studi sembrerebbe che la fusione sia un evento più probabile rispetto all'evento differenziativo quando le MSC sono trapiantate in ospiti irradiati, rendendo necessari ulteriori studi prima di poter comprendere appieno il destino delle MSC una volta trapiantate in un sistema complesso come il SNC.

1.4 Le proprietà immunomodulatorie delle cellule staminali mesenchimali

Oltre alla loro principale funzione di supporto dell'ematopoiesi, le MSC mostrano anche un coinvolgimento nella regolazione del sistema immunitario, come dimostrato da recenti studi (Uccelli et al., 2012a).

Sebbene i meccanismi che regolano l'azione immunomodulatoria delle MSC non siano ancora del tutto chiari, sono stati individuati alcuni tratti fenotipici di queste staminali che possono far pensare ad un loro coinvolgimento nei fenomeni di infiammazione e aprono quindi nuove prospettive terapeutiche per queste cellule.

È stato infatti dimostrato che le MSC sono in grado di inibire la proliferazione dei linfociti T e B bloccandone il ciclo cellulare a livello della fase di transizione G0/G1 (Jones et al., 2007), e delle cellule *natural killer* (NK), attraverso diversi meccanismi come la produzione di specifici fattori solubili e l'interazione cellula-cellula.

È stato infatti osservato che in presenza di MSC e aggiungendo al medium di coltura le interleuchine IL-2 e IL-5, le cellule NK interrompevano la propria proliferazione e bloccavano la produzione di interferone- gamma (INF- γ), (Kassis et al., 2011).

Sembrerebbe inoltre che le MSC siano in grado di interferire con il differenziamento, la maturazione e la funzione delle cellule dendritiche mediante il rilascio di fattori solubili come IL-6 e M-CSF (Corcione et al., 2006).

Infine, è stato dimostrato che le MSC se messe a contatto con ambienti in cui sono in atto processi infiammatori, esprimono costitutivamente sulla superficie cellulare bassi livelli delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (MHC-I). Ad avvalorare queste considerazioni va considerato anche il fatto che le MSC sono in grado di proteggere i tessuti danneggiati rilasciando molecole antinfiammatorie e antiapoptotiche (Le Blanc and Ringden, 2007).

Queste potenzialità immunomodulatorie richiedono una più attenta indagine sui loro meccanismi d'azione negli effetti benefici che queste svolgono a livello del SNC, aprendo nuove prospettive sui meccanismi molecolari che ne stanno alla base.

Le proprietà immunomodulatorie mostrate da queste cellule sono in ogni caso oggetto di intensi studi e recentemente si sono aperte delle prospettive per un loro utilizzo in terapia per la cura di malattie in cui è presente una forte componente infiammatoria (par 1.6).

1.5 Le MSC e un loro possibile contributo al sistema nervoso centrale: MSC come mediatori trofici.

Oltre a differenziare in risposta a stimoli tissutali, mostrando delle modificazioni dipendenti dall'ambiente esterno, le MSC loro volta di rispondono e modificano l'ambiente circostante, attraverso la sintesi di un ampio spettro di fattori di crescita e citochine, in grado di influenzare sensibilmente le dinamiche cellulari locali. A causa di queste loro caratteristiche le MSC hanno destato l'attenzione di numerosi ricercatori e studiosi, in quanto sono anche in grado di fornire un supporto trofico alle cellule vicine, anche in aree distinte dal tessuto di appartenenza (Chen et al., 2001b).

Nel midollo osseo le MSC sono in grado di secernere citochine di tipo ematopoietico come IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14 e IL-15, svolgendo un importante compito nel facilitare la crescita delle cellule staminali ematopoietiche e favorendone i processi di ematopoiesi (Bouffi et al., 2010).

Le MSC, soprattutto in condizioni di danno tissutale e di infiammazione, sono in grado di superare la barriera ematoencefalica, così da raggiungere e cooperare al ripristino della zona cerebrale danneggiata da eventi ischemici, danni meccanici o infiammazioni (Guan et al., 2004, Chao et al., 2009). Questa loro capacità migratoria in seguito a specifici stimoli era stata dimostrata in precedenti esperimenti effettuati su ratti, in cui era stato indotto un danno cerebrale tramite occlusione arteriosa (MCAO, *Middle Cerebral Artery Occlusion*), modello sperimentale dell'ictus cerebrale. In queste condizioni si è visto che la loro somministrazione per via endovenosa, tanto quanto il loro trapianto direttamente nel sito di danno, portava ad un complessivo miglioramento del quadro clinico, sia rispetto ai livelli di infiammazione, che di riparazione tissutale, senza però dare un'indicazione precisa sui loro meccanismi d'azione (Chen et al., 2001b).

Esistono evidenze che anche a livello del SNC, le MSC sembrerebbero in grado di agire da mediatori trofici (Park et al., 2010). Dalla letteratura risulta che queste cellule sono in grado di rilasciare determinati fattori che contribuiscono al recupero di tessuti danneggiati e solitamente sono rilasciati direttamente dalle cellule del SNC, come gli astrociti, gli oligodendrociti o i neuroni stessi.

Alcune tra queste molecole sono per esempio il fattore di crescita dell'endotelio vascolare VEGF, il quale permette di minimizzare il danno celebrale indotto da ischemia riducendo la formazione dell'edema e il volume della zona lesionata (Lutton et al., 2012). Altri fattori secreti dalle MSC sono bFGF, BDNF e NGF (Choi et al., 2010), il cui rilascio da parte delle MSC viene incrementato, *in vitro*, dalla presenza di un terreno condizionato da estratti cerebrali danneggiati. Queste evidenze suggeriscono la presenza di precisi meccanismi di regolazione in risposta a definiti stimoli extracellulari a cui le MSC rispondono regolando la produzione di specifiche molecole (Chen et al., 2002).

E' altresì improbabile che la produzione di neurotrofine sia da sola in grado di mediare tutti gli effetti imputabili alle MSC, in quanto esse sono in grado di produrre altre molecole, come per esempio fattori coinvolti nell'induzione della crescita neuritica, molecole che facilitano l'adesione delle cellule neuronali, molecole che guidano lo sviluppo assonale e recettori per i neurotrasmettitori in grado di completare il panorama delle molecole che

potrebbero essere alla base degli effetti trofici svolti da queste cellule (Crigler et al., 2006b, Boregowda and Phinney, 2012).

Infine, un possibile effetto del trattamento con MSC di topi cerebralmente lesionati potrebbe coinvolgere il potenziamento della risposta degli astrociti reattivi a lungo termine: il maggior reclutamento e l'aumentata proliferazione di tali astrociti potrebbe essere coinvolto, ad esempio, nella rigenerazione assonale della zona sottoventricolare (Li et al., 2005).

1.6 Potenziali utilizzi clinici delle MSC

Le MSC possono essere considerate, come già detto, cellule che possono essere indirizzate nel loro differenziamento verso una specifica linea cellulare a seconda delle condizioni del microambiente che le circonda. Queste caratteristiche aprono svariate prospettive nel loro uso terapeutico, come il supporto della rigenerazione tissutale, la correzione di patologie ereditarie e l'attenuazione dell'infiammazione cronica (Liu et al., 2009).

Sono già stati eseguiti trapianti con MSC in pazienti affetti da patologie cardiovascolari (Abdelwahid et al., 2011) e immunologiche (Yi and Song, 2012), mentre sono in corso studi preclinici su modelli animali per il loro utilizzo in malattie neurodegenerative (Freedman and Uccelli, 2012, Morando et al., 2012, Park et al., 2012, Uccelli et al., 2012a, van Velthoven et al., 2012). Il loro più consapevole impiego necessita però di una maggiore comprensione dei meccanismi d'azione per prevedere effetti a lungo termine nel paziente, accentuando quelli positivi e tenendo sotto controllo eventuali effetti collaterali negativi. Tra i possibili rischi in cui si potrebbe incorrere durante il trapianto delle MSC si potrebbero verificare (Parekkadan and Milwid, 2010):

- i) un differenziamento imprevisto delle MSC, ovvero un loro differenziamento ectopico;
- ii) effetti immunosoppressivi che potrebbero determinare una perdita delle capacità di controllo immunitario dell'organismo nei confronti di agenti patogeni;
- iii) la promozione di una crescita tumorale causata dal differenziamento in cellule tumorali, dal rilascio di fattori che promuovono la proliferazione delle cellule circostanti in modo sregolato o dalla riduzione apportata alle difese immunitarie dell'ospite.

Alcuni studi individuano nella segnalazione paracrina svolta dalle MSC un buon meccanismo d'azione che da solo potrebbe giustificare gli effetti terapeutici svolti da queste cellule. A tale proposito, alcuni di questi studi hanno dimostrato come l'iniezione diretta delle molecole secrete dalle staminali mesenchimali possa portare dei benefici paragonabili a quelli ottenuti con l'utilizzo diretto di queste cellule senza incorrere in tutte le problematiche legate al loro trapianto (Parekkadan and Milwid, 2010). È da tenere in considerazione, però, il fatto che tali cellule rilasciano sia dei fattori in modo costitutivo, indipendentemente dall'ambiente in cui si trovano, sia altri fattori che dipendono dalla segnalazione dell'ambiente extracellulare in cui sono localizzate, richiedendo una profonda conoscenza dell'ambiente in cui esse si localizzeranno.

Va, infatti, tenuto in considerazione che l'instaurarsi di una comunicazione bidirezionale tra le MSC e le cellule limitrofe regola il rilascio di specifici fattori trofici a seconda delle esigenze e del microambiente che si viene a creare (Collino et al., 2011).

Per tutti questi motivi, le staminali mesenchimali sono oggetto di svariati studi nel tentativo di migliorarne l'impiego clinico, sfruttando le loro diverse funzioni fisiologiche al fine di regolare vari processi tra cui, ad esempio, l'immunomodulazione, la promozione della proliferazione delle cellule epiteliali e della neovascolarizzazione dei tessuti ischemici.

Come recente applicazione, inoltre, sono stati pubblicati studi per l'uso clinico delle staminali mesenchimali come sistema di trasporto dei farmaci nell'organismo. Esse, infatti, attraverso le loro proprietà migratorie, in seguito a stimoli chemiotattici, sono in grado di raggiungere il tessuto di interesse una volta iniettate nel paziente, come già discusso, e una loro specifica ingegnerizzazione potrebbe renderle un promettente veicolo per il trasporto o la produzione di specifiche sostanze. Per poter portare a termine questo tipo di studi, però, è necessario approfondire le attuali conoscenze anche relative alle proprietà farmacocinetiche delle MSC, come recentemente commentato in letteratura (Parekkadan and Milwid, 2010).

2 I NEURONI

Il sistema nervoso si suddivide in due parti funzionali distinte: il sistema nervoso centrale (SNC) e il sistema nervoso periferico (SNP).

Mentre il SNP è preposto alla raccolta e all'invio degli stimoli provenienti dalla periferia dell'organismo e dall'esterno, il SNC è quella parte deputata alla ricezione, all'elaborazione e all'immagazzinamento di tali stimoli nonché all'invio di risposte funzionali verso la periferia dell'organismo. Il SNC è costituito a sua volta da due parti: l'encefalo, racchiuso all'interno della scatola cranica, e il midollo spinale contenuto nel canale vertebrale. In entrambe troviamo la presenza di due distinte parti funzionali: la sostanza grigia e la sostanza bianca. La prima è composta da cellule nervose disposte su sei strati (che vanno a formare la corteccia cerebrale), mentre la sostanza bianca è formata dall'insieme delle fibre nervose che dalla superficie dell'encefalo si dirigono verso il resto del corpo, o che mettono in comunicazione tra loro parti dei due emisferi o di uno stesso emisfero.

Il SNC è costituito da unità cellulari chiamate neuroni, che si combinano con altre cellule deputate al loro supporto e al loro controllo chiamate cellule gliali, gli astrociti e gli oligodendrociti. Si calcola che ogni individuo possieda circa 30 miliardi di neuroni: queste cellule hanno la fondamentale caratteristica di poter generare, ricevere, condurre ed elaborare segnali.

2.1 Brevi accenni sulla neurogenesi

Il sistema nervoso a livello embrionale ha origine in una regione dell'ectoderma (lo strato più esterno del disco embrionale) chiamata *neuroepitelio* e il suo sviluppo è regolato da segnali biochimici provenienti dai due foglietti embrionali adiacenti, in particolare dal mesoderma. Durante lo sviluppo, l'ectoderma si inspessisce formando una *placca neuronale*, i cui bordi successivamente si avvolgono su se stessi dando così origine al *tubo neurale*, che sarà la base della spina dorsale e dell'encefalo. All'interno del tubo neurale i neuroni sono generati nella cosiddetta *zona di proliferazione* (che circonda il *ventricolo centrale* del cervello embrionale) dal differenziamento di cellule precursori chiamate neuroblasti (Sakai and Wakamatsu, 2005). A supporto della formazione e della

corretta redistribuzione dei neuroni neoformati si riscontra la presenza di specifiche cellule gliali radiali, presenti principalmente durante queste prime fasi del neurosviluppo, che ne garantiscono la corretta rilocalizzazione nelle zone di interesse (Hunter-Schaedle, 1997, Pinto and Gotz, 2007). Durante lo sviluppo del cervello embrionale le cellule gliali radiali garantiscono infatti un preciso posizionamento dei neuroni che va dall'interno all'esterno: i primi neuroni generati migrano negli strati più interni della placca neurale, mentre quelli generati successivamente si posizionano in strati più superficiali. Durante, o immediatamente dopo questa migrazione, inizia il processo di differenziamento (o maturazione) neuronale, con l'emissione, dal corpo cellulare, delle lunghe estensioni citoplasmatiche, i neuriti, destinati a diventare assoni e dendriti. E' interessante sottolineare che le cellule gliali radiali, pur essendo principalmente riscontrabili nelle prime fasi dello sviluppo, sono state studiate anche come un possibile strumento per migliorare i processi di riparazione del SNC, in cervelli adulti, dopo danno ischemico inducendo il differenziamento di cellule staminali embrionali in questo specifico *lineage* (Liour and Yu, 2003).

2.2 Caratteristiche morfologiche del neurone e sviluppo di modelli *in vitro*

I neuroni sono cellule altamente specializzate e polarizzate, costituite da diverse regioni subcellulari capaci di svolgere differenti funzioni. La loro principale caratteristica è quella di essere in grado di rispondere a stimoli fisici e chimici mediante modificazioni della concentrazione di ioni sui due lati della membrana plasmatica. Sono anche in grado di produrre segnali sotto forma di variazioni di potenziale elettrico (trasduzione), di condurre segnali dal punto di insorgenza ad altre parti della cellula e di trasmettere segnali ad altre cellule mediante le sinapsi.

A livello morfologico il neurone si divide in domini strutturalmente e funzionalmente distinti, ovvero il corpo cellulare (soma), i dendriti e l'assone (Fig. 3), a cui si aggiungono dei sottodomini più specializzati e meno identificabili a livello macroscopico come i terminali assonali (o pre-sinaptici), i compartimenti post-sinaptici, posti sui dendriti, e i nodi di Ranvier, presenti sull'assone e derivanti da una stretta sinergia tra il neurone e gli oligodendrociti. Oltre che a livello morfologico, i vari domini che compongono il neurone mostrano una caratteristica composizione di organelli citoplasmatici e componenti della membrana plasmatica che li rende in grado di svolgere funzioni diversificate garantendo

anche differenti modalità nel prender contatto con altri tipi cellulari (Bartlett and Banker, 1984a, b).

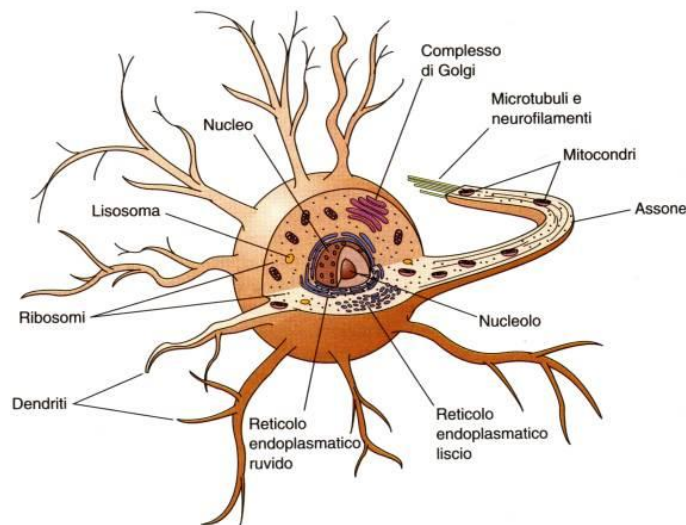


Fig. 3: Schema dei domini strutturali che caratterizzano il neurone.

Per definire in modo preciso le varie fasi di maturazione delle cellule neuronali, sono state allestite colture cellulari, al fine di seguire *in vitro* lo sviluppo morfologico anche di singoli neuroni. Durante le prime fasi di sviluppo dei neuroni posti in coltura, è impossibile discriminare i processi in fase di formazione, pertanto è stato coniato in termine *neuriti* per riferirsi, in generale, ad assone e dendriti (Bray, 1973).

Lo studio dei neuriti e una loro più precisa distinzione in dendriti ed assoni, ha preso consistenza in seguito a esperimenti condotti agli inizi degli anni ottanta grazie alla messa a punto di un metodo di coltura *in vitro* che consentisse di poter lavorare su colture di cellule neuronali pressoché pure (Banker and Cowan, 1977, Bartlett and Banker, 1984a).

Il modello sperimentale proposto da Banker e colleghi si basa sull'allestimento di una co-coltura, definita "a sandwich", che consiste nel piastrare neuroni, derivati dall'ippocampo embrionale di ratto, su vetrini pre-trattati che vengono posti in presenza di un monostrato di cellule gliali. Queste ultime vengono utilizzate come supporto trofico permettendo una comunicazione tra le due popolazioni cellulari mediante il rilascio di fattori solubili nel terreno di coltura che condividono garantendo la sopravvivenza del neurone per diversi giorni in queste condizioni di crescita.

Il modello proposto consente inoltre di avere una popolazione di neuroni con una bassa contaminazione da parte di cellule gliali, sia a causa dei terreni in cui sono mantenuti, specifici per i neuroni, che per il tipo di estrazione delle cellule neuronali utilizzato: prelevando l'ippocampo da embrioni al diciottesimo giorno di gestazione la componente

astrocitaria è molto ridotta. La possibilità di poter disporre di neuroni isolati e pressoché privi di cellule gliali contaminanti ha consentito di effettuare analisi dettagliate mediante tecniche di microscopia ottica ed elettronica per rilevare le principali differenze ultrastrutturali e morfologiche presenti nei neuriti. A livello morfologico si è infatti osservato che i dendriti cresciuti in questo tipo di co-cultura, mostrano un inspessimento vicino al corpo cellulare (dendriti prossimali), man mano che si allontanano dal soma del neurone il loro diametro si assottiglia fino a raggiungere circa i 0.5 μm (dendriti distali). Per tutta la lunghezza del dendrite è inoltre possibile apprezzare la presenza a livello citoplasmatico di poliribosomi, probabilmente deputati a garantire una veloce sintesi di nuove proteine indispensabili per il corretto funzionamento dei terminali sinaptici presenti sui dendriti.

Per quanto riguarda l'assone invece, questo mostra prolungamenti decisamente più estesi e più sottili rispetto ai dendriti, hanno un diametro uniforme e sono privi di ribosomi. I processi neuronali, inoltre, differiscono nella composizione della membrana plasmatica, nella presenza di componenti sinaptici in grado di ricevere o trasmettere le informazioni (Bartlett and Banker, 1984b) e anche nella composizione del loro citoscheletro (Shaw et al., 1985, Caceres et al., 1986). A livello assonale infatti i microtubuli hanno tutti l'estremità positiva rivolta verso la sua terminazione mostrando un preciso orientamento, mentre nei dendriti non si riscontra un orientamento preferenziale del citoscheletro.

Attraverso una loro caratterizzazione basata su analisi della loro funzionalità è stato postulato che le colture ippocampali sviluppano dendriti, così come avviene *in situ*, che svolgono un ruolo esclusivamente post-sinaptico di ricezione degli stimoli, mentre gli assoni hanno il compito di propagare gli stimoli rielaborati dal neurone mostrando quindi una funzionalità pre-sinaptica (Schierwagen, 1990, Hirschberg et al., 1996).

2.2.1 Caratterizzazione dei differenti stadi di sviluppo neuronale *in vitro*

Al fine di una migliore comprensione dello sviluppo dei neuroni è importante identificare con precisione la sequenza temporale degli eventi responsabili della trasformazione morfologica dei neuroni ippocampali, da neuroblasti apolari a cellule polarizzate con distinti processi.

Per quanto riguarda i neuroni ippocampali, il tipo di neuroni che verrà poi preso in esame durante gli esperimenti mostrati in questa tesi, questa caratterizzazione si basa su osservazioni realizzate a partire dalla fine degli anni ottanta, e tuttora ritenute valide, che scandiscono con precisione le varie modificazioni che queste cellule subiscono durante il

loro sviluppo inserendo tali cambiamenti su una scala temporale ben definita (Dotti et al., 1988, Bradke and Dotti, 2000, Kaech and Banker, 2006).

Lo sviluppo dei neuroni ippocampali può essere suddiviso in 4 fasi fondamentali (Fig. 4): i) formazione di lamellipodi; ii) sviluppo di processi minori; iii) formazione e sviluppo dell'assone; iv) crescita dei dendriti. Dopo la formazione dell'assone (iii) e lo sviluppo dei dendriti (iv), si assiste alla maturazione e al consolidamento di tali processi (fase v) che richiede un tempo variabile a seconda del metodo di coltura e dello stato di salute del neurone.

(i): formazione di lamellipodi

I neuroni ippocampali posti in coltura dopo estrazione e dissociazione meccanica hanno un aspetto sferico, privi delle caratteristiche morfologiche tipiche del neurone maturo. Dopo alcune ore, queste cellule sono in grado di aderire al substrato utilizzato (plastica o vetro pretrattato) e cominciano a mostrare delle strutture appiattite lungo i loro bordi, definite lamellipodi.

Successivamente i lamellipodi si raggruppano in regioni più discrete alla periferia cellulare. Dal momento che tali strutture non sono riscontrabili in neuroni in fase di formazione *in situ*, la loro comparsa in coltura potrebbe essere considerata come un adattamento adottato dalle cellule neuronali in risposta a una crescita su un substrato artificiale e bidimensionale.

(ii): sviluppo di processi minori

Successivamente, dai lamellipodi si generano corti e distinti processi che, in poche ore, raggiungono i 10-15 μm di lunghezza. Questi processi mostrano un'elevata motilità pur non evidenziando differenze significative attraverso la loro analisi microscopica. Dall'osservazione delle loro sezioni trasversali, questi processi minori appaiono cilindrici e spesso dotati di coni di crescita a livello delle terminazioni. E' frequente la formazione di prolungamenti transitori tra i lamellipodi e i processi minori, che risultano appiattiti e più espansi a livello prossimale, ma che acquistano l'aspetto di neuriti a livello distale.

(iii): formazione e crescita assonale

Dopo circa 24 ore dalla comparsa dei processi minori si assiste ad un netto differenziamento di uno di essi che inizia a crescere con una velocità 5-10 volte maggiore rispetto agli altri, definendo quello che in seguito sarà il processo che darà origine all'assone.

La comparsa di questo prolungamento permette di individuare il momento in cui si può cominciare a definire il neurone "polarizzato" (entro i primi 2 giorni in coltura)(Witte and Bradke, 2008, Stuessi and Bradke, 2011). L'assone neoformato mostra inoltre numerose e sottili protrusioni per tutta la sua lunghezza, denominate filopodi e possiede alla sua estremità un inspessimento del citoplasma definito cono di crescita.

E' inoltre importante sottolineare che tutti i processi minori emessi dal neurone durante le prime fasi di crescita possiedono la capacità intrinseca di diventare assone. Solo a seguito di precisi stimoli interni al neurone viene stabilita definitivamente l'identità assonale e i rimanenti prolungamenti perdono tale potenzialità.

(iv): crescita di dendriti

Tutti i processi minori che la cellula non ha destinato alla crescita assonale subiscono uno sviluppo di tipo dendritico.

Questa loro specializzazione avviene circa 4 giorni dopo la piastratura, come confermato da studi effettuati *in situ* (Nowakowski and Rakic, 1979).

I dendriti inoltre possono mostrare due differenti tempistiche di crescita: alcuni crescono con una velocità paragonabile a quella assonale, mentre altri mostrano uno sviluppo molto più rallentato nel tempo.

La formazione di sinapsi funzionali derivanti dall'interconnessione tra dendriti e neuroni posti in coltura avviene solo dopo il settimo giorno di sviluppo.

E' inoltre importante sottolineare che la polarizzazione e la crescita dei neuriti sembra essere un processo intrinseco dello sviluppo neuronale basato sull'organizzazione interna della cellula stessa. Questo è stato documentato grazie a osservazioni effettuate in *in vitro*, che mostrano come la presenza di specifici segnali esterni può solo partecipare alla modulazione della crescita neuronale, ma non è in grado di bloccare completamente lo sviluppo morfologico (Akoev et al., 1992, Spencer et al., 1998, Koshimizu et al., 2009, Neukirchen and Bradke, 2011).


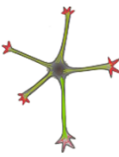

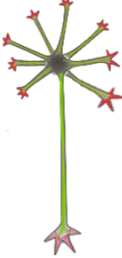

Caratteristiche morfologiche	i: lamellipodi	ii: processi minori	iii: sviluppo assonale	iv: sviluppo denndritico	v: maturazione
					
Giorni in coltura	0.25	1.5	2	4	>7

Fig. 4: Caratterizzazione morfologica dello sviluppo neuronale durante i primi giorni di coltura

2.3 La comunicazione tra i neuroni: le “sinapsi”

L'unità funzionale attraverso cui i neuroni comunicano e sono in grado di propagare gli stimoli sono le sinapsi.

Con il termine sinapsi si indicano le giunzioni intercellulari altamente specializzate, che possono essere, secondo la definizione di Gray sia asimmetriche (tipiche delle sinapsi glutamatergiche), che simmetriche (tipiche delle sinapsi GABAergiche) , caratterizzate da una stretta apposizione tra *membrana plasmatica pre-sinaptica* (appartenente a un neurone) e *post-sinaptica* (appartenente a un neurone adiacente), separate da uno spazio di 20-30 nm che prende il nome di *fessura sinaptica* e nel quale avviene il rilascio e l'eventuale ricaptazione degli specifici neurotrasmettitori. La componente pre-sinaptica, deputata al rilascio di neurotrasmettitori è localizzata a livello dell'assone, sul quale si formano rigonfiamenti del citoplasma definiti compartimenti pre-sinaptici o *bottoni sinaptici*. Tali bottoni sono caratterizzati da un elevato numero di mitocondri, dalla presenza di *clusters* di vescicole contenenti neurotrasmettitori, definite *vescicole sinaptiche* e tutta una serie di proteine di membrana e strutture cellulari più complesse che garantiscono il corretto indirizzamento e posizionamento della presinapsi verso le zone di contatto dendritiche della post-sinapsi.

Il compartimento post-sinaptico, si distingue tra sinapsi eccitatorie e inibitorie ed è caratterizzato dalla presenza di recettori che legano specificatamente i neuromodulatori, una volta che questi vengono rilasciati nello spazio sinaptico.

Tali contatti si formano in corrispondenza di piccole protrusioni citoplasmatiche, denominate *spine*, generalmente presenti sui dendriti periferici dei neuroni formanti il bottone sinaptico (De Camilli and Takei, 1996, Saheki and De Camilli, 2012). Le spine sono strutture tipiche delle sinapsi glutamatergiche e mostrano una precisa caratterizzazione in base alla loro forma (tipo I, II e III) e alle funzioni svolte dalle pre-sinapsi che le contattano (Hering and Sheng, 2001).

In alcuni casi sono state descritte a livello cerebrale delle sinapsi *dendro-dendritiche* e *asso-assonali*, la cui funzione non è tuttora stata chiarita, anche se si presume possano svolgere delle funzioni di fine regolazione sulla risposta generata dal singolo neurone (Sloper and Powell, 1978, Campbell et al., 2009).

In linea generale quindi si può riassumere il meccanismo di trasmissione del segnale tra diversi neuroni nel seguente modo: a seguito di uno specifico stimolo (tipicamente la generazione di un potenziale d'azione elettrico), il neurone tramite la pre-sinapsi rilascia nello spazio sinaptico, il suo neurotrasmettitore attraverso le vescicole sinaptiche; una volta rilasciati, i neurotrasmettitori si legano a specifici recettori posti sulla membrana post-sinaptica trasmettendo informazioni che, una volta raccolte e processate dal neurone post-sinaptico, generano l'attivazione di specifiche vie di segnalazione che possono determinare l'ulteriore propagazione (segnale eccitatorio) oppure l'inibizione (segnale inibitorio) del segnale, generando così la risposta finale nell'organismo,.

2.3.1 La formazione dei contatti tra i neuroni: la sinaptogenesi

Con il termine sinaptogenesi si individuano tutti quei processi messi in atto dal neurone per creare e stabilizzare in modo altamente strutturato il punto di contatto con un altro neurone. Una volta che si instaura il contatto tra i due neuroni, attorno al sito di adesione sulla membrana circostante si assiste all'accumulo delle proteine deputate al corretto funzionamento della sinapsi. Nella formazione del terminale sinaptico intervengono anche le cellule della glia, in particolar modo gli astrociti, che consentono la corretta strutturazione, funzionamento e stabilizzazione della stessa (Fig. 5) (Bolton and Eroglu, 2009, Colon-Ramos, 2009).

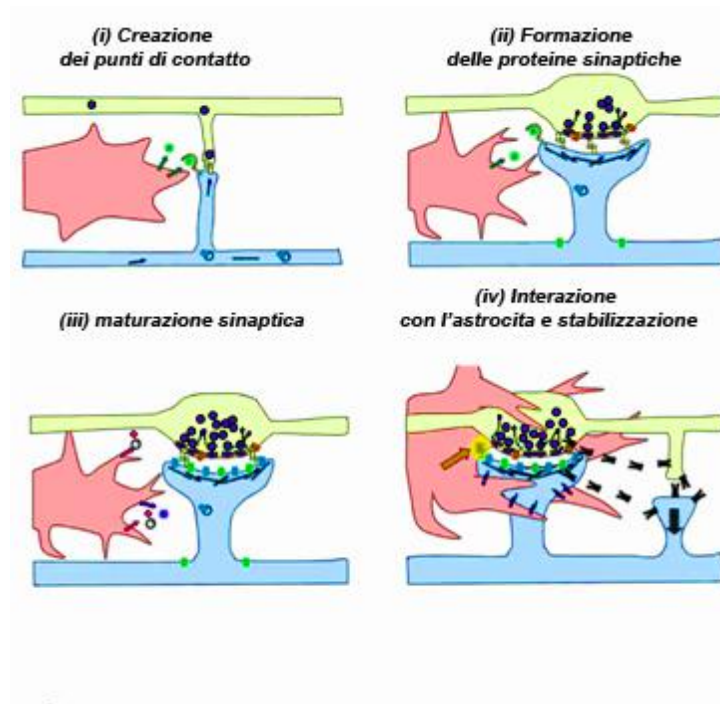


Fig. 5: Schema dello sviluppo di una sinapsi e coinvolgimento degli astrociti per la stabilizzazione della stessa.

La scansione temporale che definisce la formazione delle sinapsi, soprattutto a livello ippocampale, mostra come inizialmente avvenga un precoce sviluppo delle sinapsi GABAergiche rispetto a quelle glutamatergiche. Da questo momento in poi la formazione e il rimodellamento delle sinapsi diventa un processo continuo che perdura per tutta la vita dell'individuo. Nell'organismo adulto infatti si osserva la continua formazione di contatti transienti tra gli assoni e i dendriti che, una volta trovato il corretto equilibrio in base al tipo di attività neuronale svolta e a specifici stimoli esterni, si consolidano esprimendo sia i componenti pre- che post-sinaptici specifici per la trasmissione GABAergica o glutamatergica (Kuzirian and Paradis, 2011).

2.3.2 L'interazione con gli astrociti nella stabilizzazione e funzionalità delle sinapsi: la sinapsi tripartita

Nell'ultimo decennio si è evidenziata una cooperazione delle cellule gliali nella stabilizzazione e nel corretto funzionamento della sinapsi, individuando negli astrociti la terza componente coinvolta. E' ormai comune considerare che le funzioni cerebrali derivino da una stretta sinergia tra l'azione combinata di neuroni e glia: oltre allo scambio di neurotrasmettitori, infatti, si è visto che gli astrociti, posti in stretta vicinanza della

sinapsi, partecipano allo scambio di informazioni cooperando attivamente nella regolazione dell'attività sinaptica (Halassa et al., 2007).

All'interno degli astrociti, durante l'attività sinaptica, si registrano infatti variazioni dei livelli di calcio e l'incremento intracellulare di questi ioni genera delle segnalazioni tra astrociti (onde di calcio). Tale aumento può verificarsi sia spontaneamente anche in assenza di attività neuronale sostenuta: questo fenomeno evidenzia l'esistenza di una comunicazione tra gli astrociti e i neuroni (Fig.6) (Perea et al., 2009).

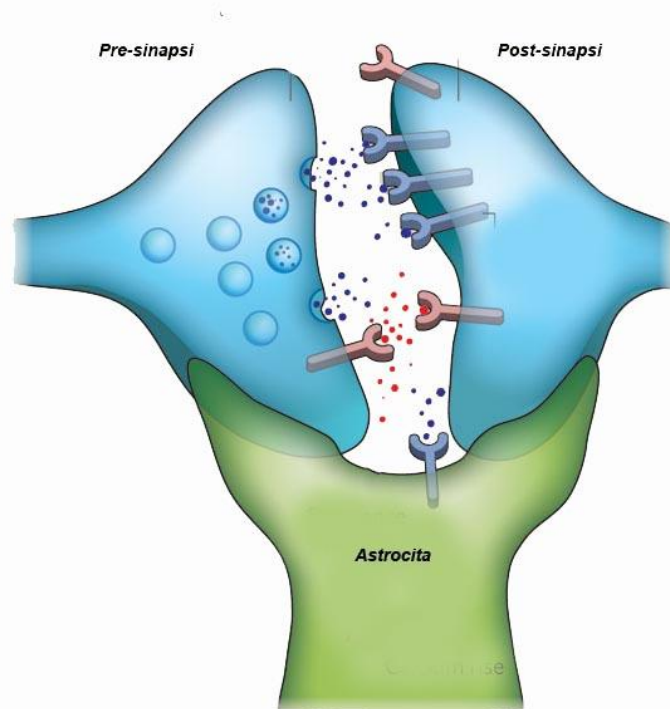


Fig. 6: Riproduzione schematica di una sinapsi tripartita con il coinvolgimento dell'astrocita
[Immagine rieditata da fonte internet]

La presenza di vari recettori per i neurotrasmettitori presenti sulle membrane degli astrociti (si veda par. 3.3), suggerisce uno dei possibili meccanismi tramite i quali la funzionalità sinaptica modula i livelli di calcio intracellulare: questa segnalazione coinvolge numerose cellule astrocitarie adiacenti, grazie alle comunicazioni intercellulari ottenute tramite gap junction che sono in grado di propagare gli stimoli derivanti da una singola sinapsi attiva, come dimostrato attraverso numerosi studi che utilizzano l'imaging *in vivo* delle cellule (Nadkarni and Jung, 2007).

Gli astrociti sono in grado, a loro volta, di rilasciare diverse molecole neuroattive, quali il glutamato, la D-serina, il GABA, l'ATP, l'adenosina, le prostaglandine, e peptidi che sono

in grado di modulare la risposta fisiologia neuronale e sinaptica. Tale comunicazione viene definita “gliotrasmissione” (Zorec et al., 2012).

Tuttavia, sono stati realizzati esperimenti in vitro, che mostrano come non tutte le sinapsi che si formano sono poste a stretto contatto con cellule gliali o sono in grado di rispondere ad uno stimolo da parte degli astrociti, portando a presumere che questa struttura tripartita non sia propria di tutti i tipi di sinapsi (Perea et al., 2009).

La comprensione degli eventi cellulari che regolano la sinapsi tripartita e il ruolo degli astrociti nella comunicazione tra neuroni e glia resta ancora un campo di studio aperto che potrebbe portare nel prossimo futuro alla scoperta di meccanismi molecolari utili alla comprensione e alla modulazione della trasmissione sinaptica (Santello et al., 2012).

2.3.3 Funzionalità delle vescicole neurosecretorie

Il rilascio di neurotrasmettitore a livello della sinapsi è regolato dalla presenza di vescicole neurosecretorie, che si possono suddividere in due distinte tipologie: le vescicole sinaptiche (VS) e le grandi vescicole a contenuto elettron-denso (LDCV, *large dense core vesicles*). Entrambe sono sottoposte a processi di esocitosi finemente regolati, ma differiscono tra loro sia per il contenuto, sia per il sito e la modalità di rilascio dello stesso.

Le LDCV sono vescicole del diametro di 70-200nm, solitamente deputate al rilascio di peptidi neuromodulatori, fattori di crescita e alcuni trasmettitori classici come le monoammine (De Camilli and Jahn, 1990).

Queste vescicole vengono assemblate direttamente a livello del *trans-Golgi network* e, quindi, a livello del soma rendendo il loro trasporto e il loro rilascio al terminale pre-sinaptico un evento relativamente più lento rispetto a quanto osservato per i neurotrasmettitori non peptidici, come vedremo in seguito (Kelly and Grote, 1993, Park and Kim, 2009). Inoltre le LDCV, non si localizzano solo a livello delle porzioni di membrana in cui si verifica il rilascio e la ricaptazione dei neurotrasmettitori, dove avvengono i reali scambi di informazioni tra i neuroni, ma spesso svolgono la loro azione di rilascio anche in prossimità della membrana pre-sinaptica, più lateralmente rispetto alla giunzione sinaptica.

A differenza delle LDCV, le VS, compongono un apparato secretorio altamente specializzato caratterizzato da strutture vescicolari con un diametro di 25-50nm, responsabili del rilascio rapido di neurotrasmettitori non peptidici nello spazio intersinaptico.

Le VS solitamente sono raggruppate in *clusters*, localizzati a livello del bottone sinaptico e, tramite specifici stimoli, vanno incontro a cicli di fusione sulla membrana e rilascio nello spazio sinaptico (esocitosi) o di ricaptazione da parte della sinapsi stessa attraverso la formazioni di invaginazioni della membrana e la conseguente formazione di vescicole di riciclo (endocitosi). Ad ogni ciclo, tali vescicole si svuotano e vengono localmente rifornite di neurotrasmettitori, sfruttando sia i meccanismi di endocitosi, che la presenza dei poliribosomi presenti in prossimità delle sinapsi e deputati alla neosintesi del neurotrasmettitore (De Camilli and Takei, 1996, Martin, 1997).

Tra le popolazioni di VS si possono riconoscere due sottopopolazioni funzionalmente distinguibili in base alla velocità di rilascio dei mediatori chimici durante l'attivazione della sinapsi (Rosenmund and Stevens, 1996, Amaral and Pozzo-Miller, 2012):

(i): vescicole pronte al rilascio, (RRP, *Readily Releasable Pool of Vesicles*), sono vescicole immediatamente disponibili al rilascio del neurotrasmettitore, localizzate a stretto contatto con le *zone attive*;

(ii) vescicole di riserva: (*riserve pool of vescicles*), che hanno una localizzazione più distale rispetto al sito di rilascio. Queste vescicole intervengono nella segnalazione principalmente durante prolungate stimolazioni andando a integrare le RRP.

I fattori che controllano il traffico vescicolare dal pool di riserva a quello di immediato rilascio sono poco conosciuti, soprattutto a causa della mancanza di adeguati modelli di studio. Ci sono comunque evidenze che supportano una diretta correlazione tra il numero di vescicole contenute nell'RRP, la probabilità di rilascio del neurotrasmettitore e la plasticità sinaptica sia a lungo che a breve termine (Tyler et al., 2006, Lee et al., 2010).

Le VS possiedono un corredo proteico di membrana specifico, che comprende sia proteine deputate alla regolazione dei processi di eso-endocitosi, che di regolazione dell'attività sinaptica come la sinaptofisina I e II, la sinapsina I, II e III, la sinaptobrevina/VAMP I e II, la sinaptotagmina I e II (coinvolte nel corretto rilascio del neurotrasmettitore anche in base a processi calcio-dipendenti) e rab3A coinvolta nel corretto reindirizzamento delle SV dopo l'endocitosi. (Sudhof, 1995, Newell-Litwa et al., 2008).

Queste proteine sono presenti durante tutte le fasi di sviluppo neuronale e una loro specifica localizzazione a livello presinaptico si verifica in seguito alle fasi di maturazione

del neurone dove si assiste alla formazione di regioni con una maggiore concentrazione di queste proteine che andranno poi a formare la sinapsi (Fletcher et al., 1991).

2.3.4 I trasportatori vescicolari

Per consentire il corretto rilascio di neurotrasmettitori a livello della sinapsi, le VS devono essere opportunamente “riempite” con specifici neurotrasmettitori, per poter garantire le adeguate risposte fisiologiche. Il trasporto dei neurotrasmettitori dal citoplasma neuronale, dove vengono sintetizzati all'interno delle vescicole stesse, viene compiuto da specifiche proteine della membrana vescicolare. Questo processo non è passivo, ma dipende da un gradiente elettrochimico di ioni H^+ , generato dalla pompa protonica vacuolare (ATPasi) presente sulla membrana delle VS. L'accoppiamento dell'idrolisi di ATP citoplasmatico al trasporto di ioni H^+ all'interno delle vescicole, consente lo scambio di protoni luminali, precedentemente accumulati all'interno delle VS, con i rispettivi neurotrasmettitori citoplasmatici (Schuldiner et al., 1995, Fei et al., 2008).

Dal momento che a livello del SNC sono presenti svariati neurotrasmettitori in grado di innescare una serie di risposte differenti, anche a livello vescicolare possiamo distinguere differenti tipi di trasportatori responsabili del “riempimento” delle VS:

- (i) la famiglia dei trasportatori specifici per acetilcolina (vACh) e per le monoammine (VMAT), che riconoscono serotonina, adrenalina, noradrenalina, dopamina e istidina;
- (ii) la famiglia di trasportatori ad alta affinità per il glutamato (vGlut);
- (iii) la famiglia di trasportatori specifici per il GABA, acido γ -amminobutirrico, (vGAT).

2.3.4.1 Trasportatori vescicolari del glutamato e dell'acido γ -amminobutirrico

All'interno di questa tesi verranno presi in considerazione soprattutto i trasportatori per il glutamato e il GABA, in quanto rappresentano i principali neurotrasmettitori utilizzati dal SNC per la propagazione degli stimoli eccitatori e inibitori.

Il glutamato si può legare a tre distinti trasportatori vescicolari, inizialmente identificati come membri della famiglia dei trasportatori del fosfato inorganico dipendenti da Na^+ e solo successivamente è stata evidenziata la specificità funzionale per il glutamato (Ni et al., 1994, Aihara et al., 2000).

Esistono tre differenti trasportatori ad oggi conosciuti per il glutamato: vGlut1 (Aihara et al., 2000), vGlut2 (Bai et al., 2001) e vGlut3 (Fremeau et al., 2002).

Questi trasportatori non differiscono tra loro per il profilo e la cinetica di legame con il glutamato, ma le differenze maggiori risiedono nella specifica distribuzione tissutale a livello del SNC. Nel cervello adulto infatti vGlut1 e vGlut2 mostrano una localizzazione complementare: il primo è distribuito prevalentemente a livello della corteccia cerebrale, cerebellare e dell'ippocampo, mentre il secondo soprattutto a livello del ponte, del talamo e del midollo spinale (Herzog et al., 2001, Varoqui et al., 2002).

Va inoltre sottolineato che a livello dell'ippocampo, del cervelletto e in parte minore a livello della corteccia, durante lo sviluppo postnatale si assiste a uno *switch* d'espressione dei trasportatori del glutamato da vGlut2 a vGlut1. L'espressione di vGlut1 subisce, infatti, un drastico incremento dei livelli di espressione dopo la nascita, diventando l'isoforma predominante nelle regioni teleencefaliche solo dopo la seconda settimana postnatale.

Infine, a differenza degli altri due trasportatori sopra citati, l'espressione di vGlut3 è predominante a livello dei neuroni serotoninergici e colinergici e delle terminazioni GABAergiche, suggerendo un suo possibile ruolo all'interno di una trasmissione glutamatergica non convenzionale (Fremeau et al., 2002, Schafer et al., 2002).

Per quanto riguarda il trasporto vescicolare del GABA, l'organismo sfrutta un trasportatore, definito vGat, il cui isolamento e la successiva caratterizzazione sono avvenuti pressoché contemporaneamente sia in *C. elegans* (McIntire et al., 1997) che in un modello murino (Sagne et al., 1997). Esso non è solo implicato nel trasporto del GABA, ma presenta anche degli alti livelli di affinità per la glicina, caratteristica che lo rende il principale trasportatore di neurotrasmettitori inibitori a livello cerebrale (McIntire et al., 1997, Sagne et al., 1997, Bedet et al., 2000). In letteratura comunque non risulta del tutto chiaro se esistano due distinti trasportatori vescicolari selettivi per i due neurotrasmettitori inibitori o se vGat sia l'unico preposto a questo tipo di funzione (Charlton et al., 2008).

2.4 Molecole coinvolte nella postsinapsi

2.4.1 La sinaptogenesi glutamatergica

Già poche ore dopo la comparsa dei primi contatti deputati alla formazione della sinapsi, a livello pre-sinaptico avviene il rilascio di neurotrasmettitori specifici che, a seguito del loro riconoscimento a livello post-sinaptico, innescano la sintesi e la strutturazione della post-

sinapsi glutamatergica. Il complesso di proteine deputato al corretto funzionamento della post-sinapsi viene trasportato sottoforma di complessi proteici preassemblati a livello citoplasmatico contenenti molecole specifiche come PSD-95, GKAP e Shank la cui espressione è affiancata dalla localizzazione in membrana dei recettori ionotropici per il glutamato (GLU-R), i recettori AMPA e quelli NMDA (Kuzirian and Paradis, 2011).

Il differenziamento sinaptico verso una segnalazione glutamatergica è un processo regolato dal coinvolgimento di svariate molecole che indirizzano e modulano il funzionamento della sinapsi.

Non esistono delle proteine che si possano definire indispensabili per la specificazione glutamatergica, in quanto è basato su un bilanciamento di interazioni tra differenti proteine, ma il legame che si instaura tra la neuroligina post-sinaptica e la neuressina pre-sinaptica gioca sicuramente un ruolo importante nello sviluppo di queste sinapsi, se opportunamente affiancato dalla comparsa di altre proteine come efrinaB (Irie et al., 2005), Narp (neuronal activity-regulated pentraxin)(O'Brien et al., 2002), Wnt-7a (Lucas and Salinas, 1997), il legame tra la trombospondina e il suo specifico recettore (Eroglu et al., 2009). Tali interazioni sono affiancate inoltre da quelle che coinvolgono anche altre molecole di adesione meno specifiche per questo tipo di sinapsi (Ziv and Garner, 2001).

Neuressina e neuroligina sono due classi di proteine transmembrana all'interno delle quali sono state individuate numerose molecole di adesione trans-sinaptica deputate alla corretta strutturazione e identità funzionale della sinapsi (Lise and El-Husseini, 2006, Shapiro et al., 2007).

All'interno della famiglia delle neuroligine, la neuroligina1 è l'isoforma deputata alla promozione della maturazione funzionale delle sinapsi glutamatergiche, mentre la neuroligina2 agisce in modo più specifico a livello di quelle GABAergiche. Inoltre, oltre a stabilizzare il contatto sinaptico le neuroligine sono in grado di modulare la localizzazione sinaptica di specifici neurotrasmettitori o recettori (Kuzirian and Paradis, 2011).

Per quanto riguarda altre molecole coinvolte, possiamo ricordare ad esempio che l'efrina B, legandosi al suo recettore tirosin chinasi (EphB) promuove la formazione di complessi recettoriali NMDA per il glutamato. Anche Narp, una molecola solubile espressa da una popolazione di neuroni ippocampali e del midollo spinale, appartiene alla classe di proteine coinvolte in questo sviluppo agisce in senso positivo sulla localizzazione in *clusters* dei recettori AMPA (Ziv and Garner, 2001).

2.4.2 La sinaptogenesi GABAergica

Proprio come riportato per la formazione delle sinapsi glutamatergiche, anche le sinapsi GABAergiche si formano nell'arco di poche ore dopo i primi contatti instaurati tra due neuroni coinvolgendo, oltre a tutta una serie di molecole comuni con le sinapsi glutamatergiche, una serie di proteine differenti.

A livello GABAergico giocano un ruolo preponderante proteine come la neuroligina2, le semaforine della classe4 e i fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), che vengono riconosciuti a livello post-sinaptico e sono tre le molecole coinvolte nel differenziamento delle sinapsi GABAergiche (Terauchi et al., 2010).

Il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF), gioca invece un ruolo fondamentale nella sinaptogenesi sia glutamatergica che GABAergica, come verrà successivamente discusso più nel dettaglio (par 2.6.1), insieme ad alcuni fattori trofici rilasciati dagli astrociti, importanti per la formazione e per lo sviluppo di entrambi i tipi di sinapsi (Kuzirian and Paradis, 2011).

2.4.3 Le sinapsi GABAergiche modificano la loro risposta funzionale durante la maturazione

L'attivazione dei recettori GABAergici nei neuroni maturi genera un'iperpolarizzazione cellulare a seguito del legame con i suoi recettori specifici, determinando l'ingresso di ioni Cl^- nel neurone e generando così il classico effetto inibitorio promosso dalla segnalazione GABAergica. Nei neuroni immaturi, però, il GABA, agendo attraverso i medesimi recettori, determina una depolarizzazione con conseguente azione eccitatoria. Tale fenomeno dipende da un differente gradiente di ioni cloro e potassio a livello intracellulare che viene regolato da specifici co-trasportatori ionici espressi sulla membrana del neurone. Durante lo sviluppo embrionale, e nelle prime fasi postnatali, i neuroni esprimono preferenzialmente il co-trasportatore per gli ioni sodio, potassio e cloro (NKCC1), causando un incremento della concentrazione intracellulare di cloro. Per questo motivo, l'attivazione dei recettori GABA provoca una fuoriuscita di ioni Cl^- dalla cellula verso l'ambiente extracellulare secondo gradiente di concentrazione inducendo una depolarizzazione della cellula.

Durante le fasi di maturazione si assiste invece a una diminuzione dell'espressione di NKCC1 e a un sensibile aumento del co-trasportatore degli ioni cloro e potassio, KCC2.

Quest'ultimo, trasportando in modo attivo gli ioni Cl^- e K^+ all'esterno della cellula mantiene la concentrazione di Cl^- intracellulare più bassa. In questo caso, l'attivazione dei recettori ionotropici per il GABA, e la conseguente apertura, determina l'ingresso netto di cloro nei neuroni, iperpolarizzazione e quindi un effetto finale di tipo inibitorio (Fig.7) (Kuzirian and Paradis, 2011).

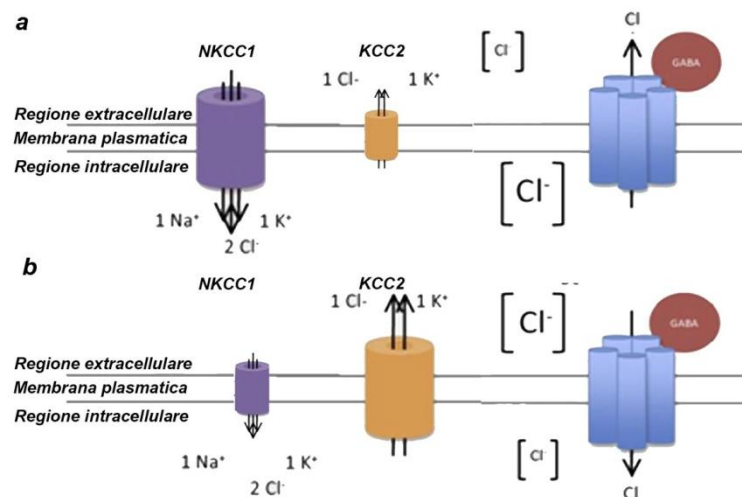


Fig. 7: Espressione di NKCC1 e di KCC2 durante lo sviluppo (a) e sui neuroni maturi (b), con conseguente cambiamento del flusso di cloro in seguito all'attivazione dei recettori GABA

La corretta modulazione temporale dei due co-trasportatori è di cruciale importanza durante lo sviluppo del SNC in quanto una precoce o tardiva espressione del KCC2 potrebbe danneggiare il delicato equilibrio tra segnalazione di tipo eccitatorio e inibitorio e che nell'adulto caratterizza una "circuiteria neuronale" funzionalmente efficiente (Lee et al., 2005, Zhu et al., 2008, Horn et al., 2010).

2.5 I recettori post sinaptici responsabili della trasmissione eccitatoria e inibitoria

2.5.1 I recettori glutamatergici

Il neurotrasmettitore principalmente deputato alla segnalazione eccitatoria a livello cerebrale è sicuramente il glutamato. Questo agisce tramite interazione con diversi tipi di recettori post-sinaptici sia ionotropici che metabotropici.

Tra i recettori ionotropici, denominati iGluR, troviamo tre distinti recettori che rispondono in modo selettivo al N-metil-D-aspartato (NMDA), all'acido α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isoazolepropionico (AMPA) e al 2-carbossi-3-carbossimetil-4-isopropenil pyrrolidine (Kainato) (Oswald, 2004, Kew and Kemp, 2005, Petralia, 2012).

Tutti i recettori di questa famiglia mostrano una struttura comune caratterizzata da quattro diverse subunità dotate di un dominio N-terminale extracellulare, seguito da un primo dominio transmembrana, un dominio che non attraversa la membrana ma contribuisce alla creazione di un poro per il passaggio di ioni, e da altri due domini transmembrana ai quali fa seguito una corta coda citoplasmatica. Il sito di legame per il glutamato è localizzato in una tasca tra la regione extracellulare N-terminale e il loop extracellulare tra i domini transmembrana due e tre (Fig.8) (Kew and Kemp, 2005).

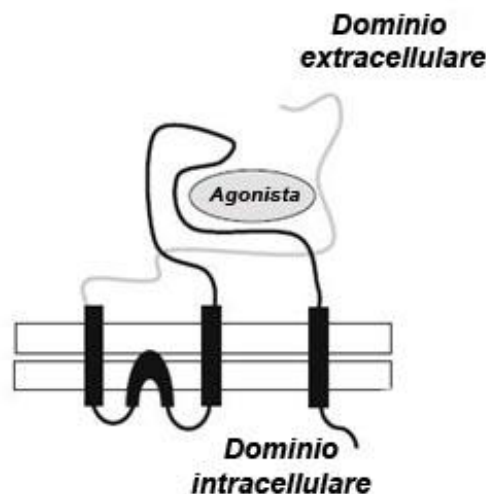


Fig. 8: Struttura di un tipico recettore ionotropico con i suoi differenti domini

Per quanto riguarda la famiglia dei recettori NMDA, essa è costituita da sette differenti subunità funzionali che si assemblano in modo differente generando risposte distinte. Studi funzionali e di elettrofisiologia hanno evidenziato che questi recettori per essere funzionali devono essere composti almeno da 4 subunità funzionali, due di tipo NR1 leganti la glicina, modulatore allosterico, e due di tipo NR2 leganti il glutamato. L'attivazione di questi recettori richiede l'occupazione contemporanea sia dei due siti per la glicina che di quelli per il glutamato (Mori and Mishina, 1995).

I recettori AMPA sono invece una famiglia di recettori composti da quattro subunità, codificate da geni separati e che si assemblano per formare un tetramero eterodimerico. Una caratteristica di questi recettori è che la presenza della subunità GluR2 nel tetramero

lo rende permeabile al calcio: i recettori AMPA privi di questa subunità consentono infatti il passaggio del calcio.

I recettori Kainato, invece, sono formati da due famiglie correlate, una composta dalle subunità GluR5-7 e l'altra dalle KA-1 e KA-2. Anche questi recettori funzionano come complessi omodimerici o eterodimerici di quattro subunità consentendo il passaggio di specifici ioni in seguito alla loro attivazione e in particolar modo gli ioni Ca^{2+} e K^+ (Kubo and Ito, 2004, Kew and Kemp, 2005).

Al contrario dei recettori precedentemente descritti, i recettori metabotropici (mGluR) del glutamato non svolgono la loro funzione attraverso l'attivazione di un poro che consente la permeabilità cellulare a ioni, ma sono associati a proteine G e svolgono la loro funzione attivando una cascata di secondi messaggeri che ne trasducono il segnale.

Ad oggi se ne sono identificati otto membri, divisi in tre gruppi sulla base dell'omologia di sequenza, al secondo messaggero ad essi associato e alla loro farmacologia:

- (i) il gruppo I (mGluR1 e mGluR5),
- (ii) il gruppo II (mGluR2 e mGluR3)
- (iii) il gruppo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8).

In particolare, i recettori appartenenti al primo gruppo sono associati alla fosfolipasi C (PLC) tramite G_q/G_{11} , mentre quelli del gruppo II e III sono accoppiati a G_i/G_o e sono responsabili dell'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi.

Ad eccezione del recettore mGluR6 espresso solo a livello della retina, tutti gli altri sono ubiquitariamente espressi in tutto il SNC, sia sui neuroni che sugli astrociti.

A livello neuronale, i recettori del primo gruppo sono tipicamente post-sinaptici e svolgono la reale funzione di trasmissione dell'informazione, mentre quelli del secondo e terzo gruppo sono soprattutto localizzati a livello pre-sinaptico, e hanno il compito di regolare il rilascio di neurotrasmettitori (Zakharenko et al., 2002).

Tutte le isoforme dei recettori mGluR sono classificate come recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G. Questi presentano un dominio N-terminale extracellulare deputato al legame con il glutamato e sette segmenti transmembrana che, insieme alla loro coda carbossi-terminale modulano l'attivazione della proteina G. Il dominio C-terminale gioca inoltre un ruolo importante nella regolazione dell'attività di questi recettori tramite l'interazione con proteine specifiche come la calmodulina (Fig.9) (Scheschonka et al., 2008).

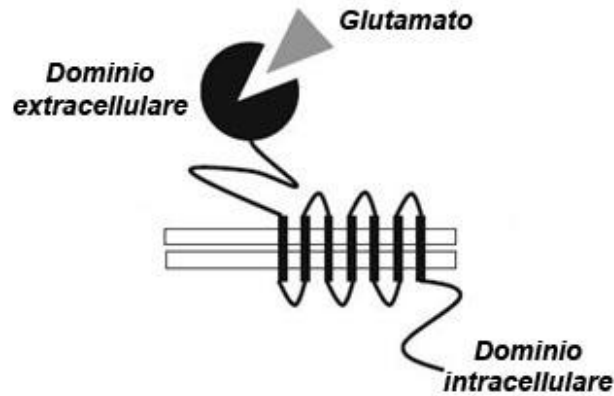


Fig. 9: Struttura di un tipico recettore metabotropico per il glutamato con i suoi differenti domini [Immagine riedita da fonte internet]

A livello funzionale questi recettori sono attivi solo quando formano dei complessi omodimerici: in assenza di ligando, i domini extracellulari dei due recettori sono fisicamente separati, mentre, in seguito al legame con l'agonista, essi modificano la loro conformazione attivando le varie vie di trasduzione del segnale ad essi associate (Yanagawa et al., 2011).

2.5.2 I recettori GABAergici

I recettori che a livello sinaptico legano il GABA si suddividono in due classi: quelli ionotropici, inseriti nella sottofamiglia dei recettori GABA_A, e quelli della sottofamiglia recettoriale dei metabotropici, i GABA_B.

I recettori ionotropici GABA_A mediano la trasmissione neuronale inibitoria tramite la regolazione del passaggio del cloro attraverso la formazione di un canale integrato a livello della membrana plasmatica nelle regioni post-sinaptiche (Sieghart, 2000). Questi recettori svolgono le loro funzioni formando dei complessi pentamerici costituiti da diverse subunità, le quali danno origine a un complesso multirecettoriale funzionale solo quando opportunamente combinate tra di loro (Fig. 10). La forma più diffusa a livello sinaptico è il pentamero contenente due subunità α , due subunità β e una subunità γ nelle loro diverse varianti. In particolare il recettore più comunemente espresso è il pentamero $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, seguito dalla combinazione $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ e $\alpha_3\beta_3\gamma_2$.

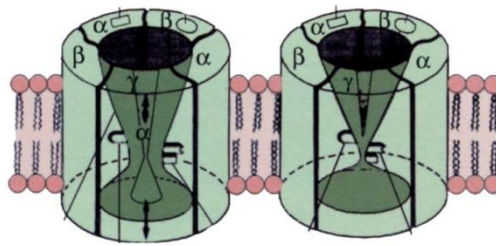


Fig. 10: Schema di un tipico complesso pentamerico di un recettore ionotropico GABAergico nello stato attivo (sinistra) e inattivo (destra)

L'espressione dei diversi sottotipi di complessi recettoriali è specifica e ben caratterizzata per specifiche regioni cerebrali, nelle quali le varie combinazioni svolgono la stessa funzione primaria di scambiatori ionici, ma possono dar luogo a segnalazioni secondarie più finemente regolate, dovute a modificazioni conformazionali dei recettori attivati e alla differente attivazione di effettori a livello citoplasmatico o in membrana (Luscher and Keller, 2004, Tretter and Moss, 2008, Kuzirian and Paradis, 2011).

La classe dei recettori metabotropici GABA_B, invece, segnala a livello post-sinaptico attraverso le proteine G_o e G_i, le quali attivano diverse vie trasduzione del segnale, come l'attivazione dei canali ionici permeabili al potassio o l'inibizione dell'adenilato ciclasi con la conseguente diminuzione dell'attivazione della protein chinasi A (PKA).

A differenza dei recettori ionotropici GABA_A, i recettori GABA_B si distinguono solo in due sottofamiglie: GABA_{B1} e GABA_{B2} (Fig.11).

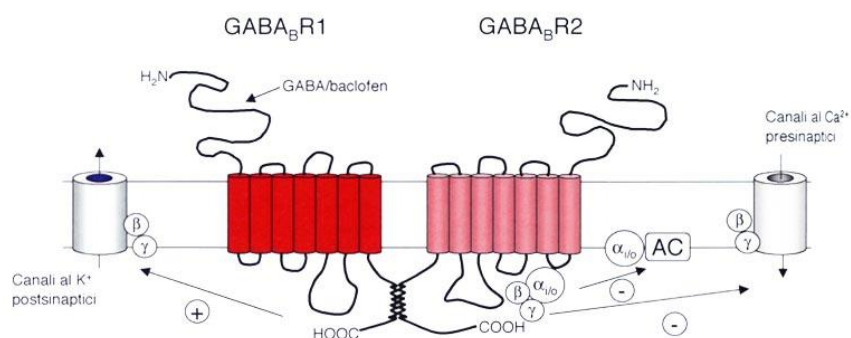


Fig. 11: Schema dei due recettori metabotropici GABAergici con l'indicazione di alcuni effetti da loro mediati

I recettori GABA_B post-sinaptici non sono espressi propriamente a livello della zona attiva, ma a livello di siti extrasinaptici e vengono attivati solo dal rilascio di elevate quantità di GABA (Bettler and Tiao, 2006). Nei neuroni ippocampali piramidali l'attivazione dei

recettori GABA_B può avere come conseguenza l'iperpolarizzazione delle cellule post-sinaptiche, la quale differisce da quella indotta dai recettori GABA_A ed è necessaria per regolare l'attività neuronale. Altri recettori GABA_B sono stati identificati anche a livello dei terminali pre-sinaptici delle sinapsi glutamatergiche e degli assoni GABAergici. Questi recettori pre-sinaptici possono svolgere numerose funzioni di regolazione della segnalazione nervosa attraverso specifici meccanismi molecolari come la regolazione dei canali per il potassio e indirettamente limitando il rilascio di neurotrasmettitore (Bormann, 2000, Kuzirian and Paradis, 2011).

2.6 Il coinvolgimento di fattori trofici nello sviluppo neuronale sinaptico: l'azione svolta dalle neurotrofine

All'interno dei processi che regolano il corretto sviluppo morfologico e funzionale del neurone va sicuramente presa in considerazione una classe di molecole molto ampia: le neurotrofine.

Queste molecole, rilasciate sia dal neurone stesso che dalle cellule gliali circostanti, hanno la capacità di interagire con il neurone attivando diversi processi e modulandone sia la crescita che la plasticità sinaptica.

Le neurotrofine appartengono alla famiglia dei fattori di crescita e tra le più importanti possiamo citare il *nerve growth factor* (NGF), il *brain derived growth factor* (BDNF), la neurotrofina 3 (NT₃) e la neurotrofina 4/5 (NT_{4/5}). Queste molecole espletano la loro attività attraverso un legame ad elevata affinità con la famiglia dei recettori chinasi legati alla tropomiosina (TrK): in particolare, l'NGF lega preferenzialmente TrkA, il BDNF e l'NT_{4/5} legano TrkB, mentre l'NT₃ si lega a TrkC. L'attivazione dei recettori TrK può portare a un rapido cambiamento della struttura e della funzione di proteine locali o, se il segnale è propagato fino al nucleo, può andare a modulare l'espressione genica del neurone. Il legame della neurotrofina al suo specifico recettore ne provoca la dimerizzazione e l'autofosforilazione, attivando una cascata di segnali intracellulari tra cui, ad esempio, l'attivazione della via delle protein-chinasi attivate da mitogeno (MAPK) e l'attivazione di ERK 1 e 2 (Chao, 2003). Tutte le neurotrofine, sia nella loro forma matura, sia nello stato precursori molecolari immaturi (pro-neurotrofine), legano anche il *pan neurotrophic receptor p75* (p75NTR). Tale interazione può portare a differenti eventi coinvolti nella sopravvivenza neuronale, morte cellulare e mielinizzazione, sia in base al tipo di neurotrofina che vi si lega, sia in base allo stato del p75 stesso: questo recettore infatti può

formare complessi dimerici con gli altri recettori Trk andando a modificare il tipo di risposte generate.

Come detto, all'interno del sistema nervoso, le neurotrofine partecipano a diversi processi, tra i quali apoptosi cellulare, formazione dei dendriti, rilascio di neurotrasmettitori e plasticità sinaptica.

Nello specifico, il BDNF e il NT₃, hanno un ruolo chiave nella crescita, nel rimodellamento e nella stabilità di neuriti ippocampali, corticali e cerebellari intervenendo anche nella regolazione del bilancio netto della trasmissione neuronale in senso inibitorio o eccitatorio (Frerking et al., 1998, Drake-Baumann, 2005, Jacobi et al., 2009). Studi condotti su colture di neuroni ippocampali embrionali hanno, inoltre, evidenziato che queste neurotrofine non solo regolano in modo positivo il numero di connessioni sinaptiche, ma che sono anche in grado di incrementare il numero di VS giustapposte alle *zone attive* (Tyler and Pozzo-Miller, 2001). A livello delle sinapsi eccitatorie, il BDNF sembra promuovere la maturazione dei terminali pre-sinaptici e il turnover delle VS glutamatergiche e generare anche un aumento della frequenza delle correnti post-sinaptiche eccitatorie in miniatura (mEPSC) (Rutherford et al., 1998).

L'interazione tra il BDNF e il suo specifico recettore Trk (TrkB) mostra però anche la capacità di modulare e potenziare i meccanismi inibitori cerebrali: il BDNF è infatti in grado di promuovere la crescita di rami assonali GABAergici e di aumentare la formazione di contatti sinaptici inibitori a livello dell'ippocampo, corteccia e cervelletto *in vivo* e *in vitro* (Marty et al., 2000, Seil and Drake-Baumann, 2000, Yamada et al., 2002a).

Resta pertanto complesso assegnare al BDNF un ruolo specifico, ma sembra piuttosto che questa neurotrofina sia in grado di partecipare attivamente a moltissimi processi neuronali anche contrapposti tra di loro.

2.6.1 Azione del BDNF sui terminali GABAergici

Il BDNF, attraverso l'attivazione di TrkB, incrementa a livello presinaptico l'espressione della decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD), responsabile della sintesi del GABA, e il rilascio e l'internalizzazione del GABA stesso.

A livello post-sinaptico invece esso interviene promuovendo la crescita e l'arborizzazione dendritica e l'incremento del numero dei cluster di recettori presenti agendo anche sull'attivazione e la regolazione di alcuni fattori trascrizionali come CREB (Jin et al., 2003, Sanchez et al., 2006, Kwon et al., 2011).

Utilizzando topi BDNF^{-/-} è stata infatti riscontrata una riduzione dei terminali inibitori (Aguado et al., 2003a), mentre la somministrazione esogena di questa neurotrofina o l'utilizzo di animali che sovraesprimono il BDNF causa un aumento nel numero delle sinapsi GABAergiche e della trasmissione inibitoria (Studer et al., 1996, Frerking et al., 1998, Jo, 2012).

E' anche interessante sottolineare come una prolungata e frequente stimolazione neuronale promuova la sintesi e in rilascio di BDNF e come, di contro, questa neurotrofina possa promuovere il potenziamento a lungo termine (long term potentiation, LTP), indicando un suo ruolo chiave non solo nella formazione, ma anche nella stabilizzazione e nella regolazione della funzionalità delle sinapsi GABAergiche (Lu et al., 2008, Diogenes et al., 2011, Mei et al., 2011).

Anche il rilascio di BDNF da parte degli astroцити sembra coinvolto nell'aumento del numero di terminali pre-sinaptici delle sinapsi inibitorie, aumentando i livelli di sinaptofisina e del trasportatore vescicolare del GABA (v-GAT) (Elmariah et al., 2005b).

2.6.2 Il coinvolgimento dei neurosteroidi nella regolazione dello sviluppo delle sinapsi

Come accennato, esiste una vasta serie di molecole coinvolte nella regolazione sinaptica. Tra queste troviamo i neurosteroidi, ritenuti importanti modulatori dei processi di formazione e rimodellamento delle sinapsi GABAergiche.

E' stato recentemente dimostrato, ad esempio, che la produzione di estradiolo a livello ippocampale è in grado di modulare la trasmissione GABAergica: durante il neurosviluppo infatti, esso è in grado di potenziare i segnali generati dall'attivazione del GABA, mentre nell'ippocampo adulto promuove la formazione di un maggior numero di terminali sinaptici inibitori e modula inoltre la formazione delle spine sui dendriti dei neuroni eccitatori (Wojtowicz et al., 2008, Wojtowicz and Mozrzymas, 2010).

Effetti di potenziamento sulla trasmissione inibitoria GABAergica sono stati visti anche in pazienti che fanno abuso di steroidi e anabolizzanti, nei quali si assiste all'insorgenza di stati di depressione o ansia, riconducibili a uno squilibrio tra la trasmissione eccitatoria e inibitoria a livello del SNC, come dimostrato da studi su modelli murini in cui la somministrazione di questi steroidi causa un aumento della trasmissione inibitoria (Oberlander and Henderson, 2012).

L'utilizzo di queste molecole è stato considerato anche come possibile trattamento di malattie del SNC, come l'epilessia del lobo temporale (TLE) dove, si assiste a uno

squilibrio nella trasmissione neuronale a favore della componente eccitatoria. La comprensione dei meccanismi d'azione e l'utilizzo dei neurosteroidi in modelli animali suggerisce che queste molecole potrebbero essere in grado di ripristinare, almeno in parte, il corretto bilancio della trasmissione degli impulsi nervosi in pazienti affetti da TLE (Biagini et al., 2009, Joshi et al., 2011).

Queste informazioni suggeriscono un importante ruolo dei neurosteroidi a livello della regolazione delle sinapsi GABAergiche, ampliando lo spettro delle molecole che devono essere analizzate per una migliore comprensione dei meccanismi che stanno alla base della modulazione dei segnali prodotti dal SNC.

3 LE CELLULE GLIALI

Le cellule gliali rappresentano la popolazione cellulare più abbondante a livello del SNC. Esse sono circa 30 volte più numerose rispetto ai neuroni e sono cellule deputate al supporto della funzionalità neuronale tramite il loro coinvolgimento nei processi di migrazione, stabilizzazione dei contatti sinaptici e trasmissione degli impulsi nervosi attraverso i processi di mielinizzazione degli assoni.

La prima caratteristica riscontrata in queste cellule è quella di supporto, da cui ne deriva anche il nome (dal greco glia=colla).

Un più approfondito studio delle loro funzioni ha permesso di dividere le cellule gliali in due classi principali:

(i) *Le cellule della microglia*

Sono cellule di derivazione mesodermica che originano in zone esterne rispetto al SNC e che solo in seguito, tramite processi di migrazione cellulare, vanno a localizzarsi e a svolgere le loro funzioni all'interno dello stesso.

Tipicamente queste cellule hanno un ruolo fondamentale durante i processi di infiammazione, attivandosi ad esempio in caso di lesioni, infezioni o danni ipossici. Si pensa che questi tipi cellulari vadano incontro ad attivazione nel corso di numerose patologie, fra cui la sclerosi multipla, la demenza da AIDS e in numerose altre forme neurodegenerative croniche come il morbo di Parkinson e la malattia di Alzheimer (Crews and Masliah, 2010, Qiao et al., 2012).

(ii) *Le cellule della macroglia*

Questa classe delle cellule gliali è composta dai due tipi cellulari che sono predominanti nel SNC: gli oligodendrociti e gli astrociti.

3.1 Gli Astrociti

Queste cellule mostrano una morfologia ben caratterizzata e sono riconoscibili anche attraverso l'espressione di specifiche proteine.

Nello specifico gli astrociti si possono suddividere in due sottotipi differenti in base alla loro morfologia e localizzazione anatomica. Il primo sottotipo è quello degli *astrociti protoplasmatici (o di tipo I)*, situati nella materia grigia e caratterizzati da numerosi prolungamenti corti e spessi. Questi creano delle interazioni sia con i vasi sanguigni

(creando uno dei pochi punti di interscambio tra il sistema circolatorio e quello nervoso) sia con le sinapsi svolgendo un ruolo di stabilizzazione e regolazione della loro funzionalità (par 2.4.2). Il secondo sottotipo di astrociti invece è quello degli *astrociti fibrosi (o di tipo II)*, localizzati prevalentemente nella materia bianca e caratterizzati da numerosi prolungamenti sottili e lunghi. Questo sottotipo, oltre che a mantenere un contatto con il sistema circolatorio, interagisce con i nodi di Ranvier svolgendo anche in questo caso funzioni di supporto strutturale e funzionale. (Sofroniew and Vinters, 2010).

3.2 Caratteristiche generali degli astrociti

La formazione e la corretta strutturazione delle cellule della macroglia ha inizio durante le fasi tardive dell'embriogenesi, dopo la formazione dei foglietti embrionali e del tubo neurale e prosegue per tutto il periodo neo e post natale (Wang and Bordey, 2008).

In particolare, astrociti generano a partire dalla glia radiale, localizzata nella zona ventricolare embrionica e dai progenitori della zona sub ventricolare radiale nonché in minor parte da specifici precursori gliali.

Nello specifico, gli astrociti protoplasmatici originano dalla glia radiale embrionica e, in minor misura, dai progenitori intermedi provenienti dalla zona subventricolare neonatale, mentre gli astrociti fibrosi derivano principalmente dai progenitori della zona subventricolare neonatale.

Va inoltre sottolineato che gli astrociti continuano a rinnovarsi e a modellare la struttura di sostegno deputata al supporto dei neuroni durante tutta la vita dell'individuo (Freeman, 2010).

Come accennato nel paragrafo introduttivo, gli astrociti hanno il compito di garantire una corretta citoarchitettura a livello del SNC e di prendere contatto sia con i neuroni, regolandone in parte la funzionalità sinaptica, che con i vasi sanguigni, creando anche in questo caso un sistema in grado di fare da tramite tra il circolo sanguigno e il SNC.

Queste loro proprietà sono garantite da una fitta rete di interconnessioni tra gli astrociti mediante *gap junction*, giunzioni della membrana plasmatica che consentono la comunicazione e il passaggio di numerose molecole biologicamente importanti, come i nucleotidi, gli zuccheri, gli amminoacidi, i piccoli peptidi, il cAMP, il calcio e l'inositolo trifosfato (fino a un massimo di 2 KDa).

La corretta comunicazione intercellulare è considerata di vitale importanza per coordinare le attività elettriche e biochimiche di ciascuna cellula in relazione a quelle adiacenti,

equilibrando le loro concentrazioni ioniche intracellulari e regolandone l'attività (Magistretti and Ransom 2002).

Oltre alla comunicazione tramite gap junction, le cellule gliali comunicano anche con i neuroni attraverso molecole rilasciate nello spazio extracellulare modulando le concentrazioni ioniche e la presenza di specifiche sostanze neuromodulatorie o trofiche nello spazio extracellulare adiacente al neurone. A loro volta gli astrociti sono influenzati dai segnali rilasciati dai neuroni adiacenti grazie alla presenza sulla loro membrana di recettori, inclusi quelli specifici per i neurotrasmettitori, per le varie molecole segnalatorie presenti nello spazio sinaptico (Ben Achour and Pascual, 2012).

Sulla membrana degli astrociti sono infatti presenti: recettori metabotropici associati a proteine G, recettori che rispondono a specifici fattori di crescita, chemochine e steroidi. Sono inoltre presenti recettori coinvolti nella regolazione dello sviluppo degli astrociti stessi e nella risposta a danni neuronali (Magistretti and Ransom 2002).

Un'ulteriore caratteristica importante degli astrociti è che sono le uniche cellule, a livello cerebrale, a contenere il glicogeno, considerata un'importante molecola di riserva energetica (Dinuzzo et al., 2012).

Infine, un'altra proprietà importante che caratterizza gli astrociti è data dalla presenza, sulla loro membrana cellulare, di diversi canali voltaggio dipendente, selettivi per il calcio, per il potassio e per il sodio. L'attivazione dei canali voltaggio-dipendente risulta importante per la comunicazione sia tra gli astrociti stessi, che tra gli astrociti e le cellule neuronali. L'aumento del calcio, ad esempio, è indotto dall'interazione tra l'astrocita e i neurotrasmettitori, come il glutammato, che possono essere rilasciati sia durante l'attività neuronale sia da parte degli astrociti stessi.

Infine, il calcio può essere responsabile della propagazione di segnali agli astrociti vicini (Sofroniew and Vinters, 2010) attraverso "onde di calcio" che vengono trasmesse da una cellula all'altra e che possono modulare la funzionalità di astrociti posti anche a distanza rispetto allo stimolo di origine.

3.2.1 Marcatori molecolari tipicamente utilizzati per l'identificazione degli astrociti

A livello sperimentale sono state individuate diverse proteine specifiche che caratterizzano gli astrociti e che vengono spesso utilizzate per la loro identificazione e caratterizzazione.

Tra i marcatori molecolari comunemente utilizzati (sebbene alcuni di questi non siano esclusivamente espressi in queste cellule) ci sono la proteina fibrillare acida della glia

(GFAP) (Martin et al., 1991), la glutamina sintetasi, S100 (Antunez et al., 1991) e i trasportatori gliali del glutamato.

Tra queste la GFAP è sicuramente la proteina più utilizzata come marcatore astrocitario.

Questa proteina viene tipicamente utilizzata per poter identificare gli astrociti in immunistochemica anche se la sua espressione non può essere correlata a tutti gli astrociti in quanto spesso non è rilevabile in tessuti del SNC sano, dal momento che molti astrociti non esprimono sufficienti livelli di questa proteina. Inoltre, la GFAP non è espressa in tutto il citoplasma degli astrociti ed è assente in molti prolungamenti sottili non permettendo quindi una marcatura dell'intera struttura della cellula.

Per questi motivi una completa caratterizzazione di queste cellule richiede l'utilizzo contemporaneo di marcatori diversi in modo da avere una panoramica più precisa della distribuzione di queste cellule (Sofroniew and Vinters, 2010).

3.3 Funzioni di supporto al SNC svolte dagli astrociti

Queste cellule sono tipicamente implicate in una vasta serie di processi che garantiscono il corretto funzionamento del SNC (Fig. 12) come la promozione della maturazione neuronale, la stabilizzazione e la regolazione dell'attività sinaptica, il mantenimento di un corretto microambiente extracellulare vitale per i neuroni e la regolazione dell'angiogenesi (Wang and Bordey, 2008); inoltre alcune loro disfunzioni comportano la progressione di specifiche patologie, come riportato per le forme familiari della sclerosi laterale amiotrofica (Diaz-Amarilla et al., 2011).

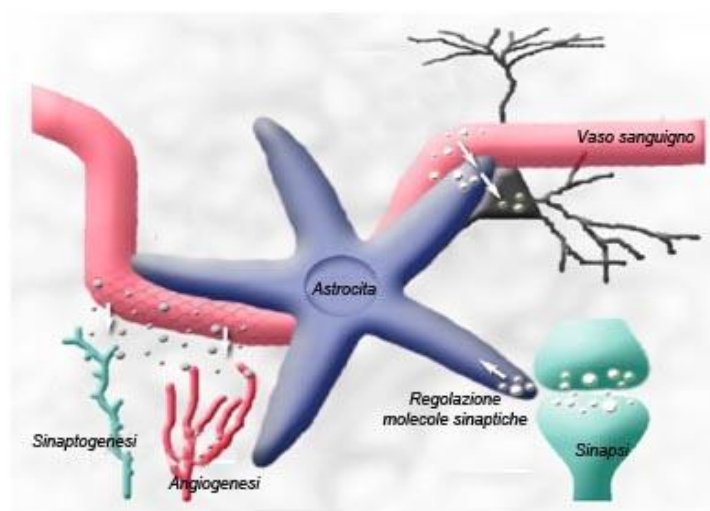


Fig.12 Rappresentazione schematica delle principali funzioni svolte dagli astrociti.

3.3.1 Coinvolgimento degli astrociti nello sviluppo neuronale

Durante lo sviluppo neuronale queste cellule svolgono un ruolo chiave, supportando e modulando l'indirizzamento assonale verso le zone di contatto con altri neuroni: questa funzione viene svolta grazie all'adesione dei prolungamenti assonali con la matrice extracellulare che è anche in grado di regolarne la lunghezza. (Webb et al., 2001, TC et al., 2011)

Gli astrociti sono essenziali anche per la formazione e la funzionalità delle sinapsi nascenti attraverso il rilascio di molecole segnale, come il fattore di crescita nervoso (NGF), il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), o la famiglia delle trombospondine, che sono in grado di controllare la maturazione, la sopravvivenza dei neuroni. In caso di danno cerebrale, intervengono anche nel rimodellamento delle giunzioni sinaptiche attraverso il rilascio di segnali che inducono l'espressione del complemento C1q, in modo da stimolare la loro eliminazione da parte della microglia (Vaccharino et al., 2007, Wang and Bordey, 2008, Sofroniew and Vinters, 2010).

3.3.2 Coinvolgimento degli astrociti nell'omeostasi delle sinapsi

Data la stretta vicinanza e l'interazione diretta con i neuroni, gli astrociti sono in grado di partecipare al mantenimento dell'omeostasi dei fluidi e dei livelli di pH extracellulari, indispensabile per la corretta funzionalità sinaptica. Queste funzioni sono svolte grazie alla modulazione delle concentrazioni di ioni, neurotrasmettitori e molecole regolatorie che vengono rilasciati nello spazio intersinaptico durante questi processi di segnalazione (Wang and Bordey, 2008, Sofroniew and Vinters, 2010).

Inizialmente si riteneva che gli astrociti svolgessero principalmente un ruolo di sequestro dei neurotrasmettitori a livello della fessura sinaptica (Balazs et al., 1997) e solo negli ultimi anni si è invece visto come queste cellule siano anche in grado di rilasciare direttamente alcuni neurotrasmettitori, come il GABA o il glutammato, rendendo ancora più importante il loro ruolo a livello sinaptico (Hamilton and Attwell, 2010).

Per quanto riguarda la loro azione sulle sinapsi di tipo eccitatorio, la sintesi di glutammato neuronale, si sa che esso può derivare dal metabolismo del glucosio a livello del soma, ma diversi esperimenti rivelano che il principale precursore del glutammato rilasciato nella zona attiva è rappresentato dalla glutammina rilasciata dagli astrociti e ricaptata tramite un

trasportatore specifico dai neuroni, supportando ulteriormente i ruoli funzionali descritti a carico di queste cellule (Fig. 13) (Torgner and Kvamme, 1990, Magistretti and Alonso, 2002, Sershen, 2012).

Il glutamato rilasciato viene rimosso dalla zona attiva principalmente dagli astrociti adiacenti. Negli astrociti esso viene convertito in glutammina attraverso l'enzima glutammina sintetasi, localizzato soprattutto a livello dei prolungamenti astrocitari che circondano le sinapsi glutamatergiche. La glutammina viene a sua volta rilasciata a livello della terminazione sinaptica e ricaptata a livello pre-sinaptico dai neuroni permettendo la sintesi di nuovo glutamato per implementare il pool di neurotrasmettitore vescicolare (Chaudhry et al., 2002, Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2011).

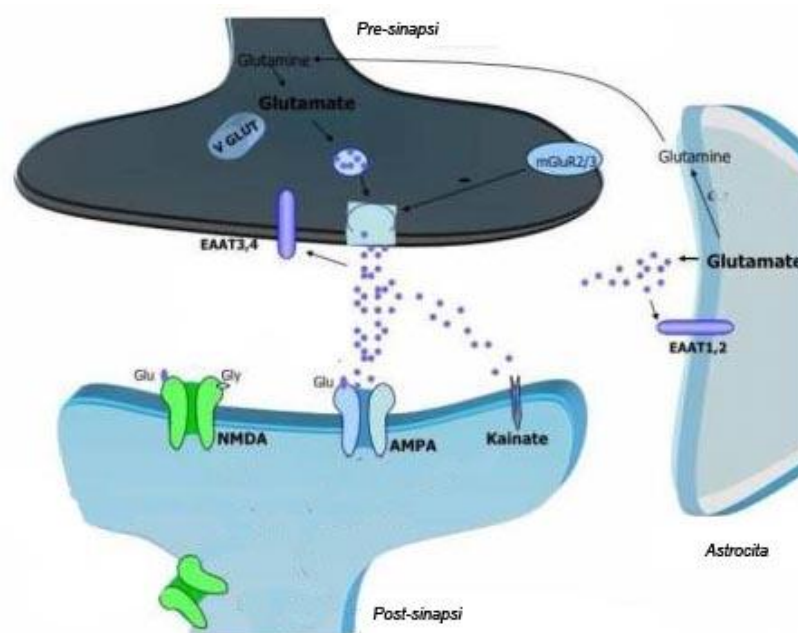


Fig. 13 Coinvolgimento degli astrociti nella sintesi e rimozione del glutammato a livello sinaptico: ciclo glutammato-glutammina.

Anche a livello delle sinapsi inibitorie gli astrociti giocano un ruolo importante, svolgendo le stesse funzioni descritte per le sinapsi glutamatergiche (Le Meur et al., 2012).

In definitiva queste cellule sono essenziali, non solo per la sintesi, ma anche per la rimozione dei neurotrasmettitori, GABA e glutammato, rilasciati nello spazio sinaptico. In particolare, essi esprimono numerosi trasportatori ad alta affinità per il glutamato e il GABA, localizzati vicino allo spazio sinaptico.

In assenza di questi meccanismi di regolazione delle concentrazioni di neurotrasmettitori a livello sinaptico, da parte degli astrociti, si verrebbero infatti a creare degli effetti citotossici e dannosi per i neuroni (Magistretti and Alonso, 2002, Wang and Bordey, 2008).

3.3.3 Coinvolgimento degli astrociti nella regolazione del metabolismo del SNC

Gli astrociti sono in grado di contribuire attivamente alla regolazione del metabolismo del SNC anche attraverso il contatto con i vasi sanguigni.

Attraverso la presenza di numerosi trasportatori per il glucosio, queste cellule hanno il compito trasportare nel sistema nervoso il glucosio presente nel sistema circolatorio, in modo da garantire i metaboliti energetici alle varie popolazioni neuronali. Il trasporto di glucosio dal sistema circolatorio verso il SNC è correlato con l'attività dello stesso: più intensa è l'attività neuronale, più gli astrociti interagiscono con i vasi sanguigni garantendo il trasporto del glucosio e un adeguato supporto metabolico (Sofroniew and Vinters, 2010). Recentemente, lo studio dei meccanismi attraverso cui gli astrociti forniscono un supporto energetico ai neuroni ha portato alla luce nuove molecole, oltre al glucosio, importanti a tale scopo (Dinuzzo et al., 2012). È noto ad esempio che gli astrociti rappresentano la principale fonte di glicogeno del SNC e recenti evidenze hanno proposto l'uso di questa riserva energetica come valido sostegno dell'attività neuronale durante episodi di ipoglicemia e periodi di elevata attività (Matsui et al., 2012). Anche in questo caso i livelli di glicogeno assorbito a livello sanguigno e rilasciato nel SNC sono influenzati dall'attività neuronale e dalle concentrazioni di neurotrasmettitori ricaptate dagli astrociti stessi (Sofroniew and Vinters, 2010). Infine, alcuni lavori sembrerebbero supportare un meccanismo attraverso il quale, durante i periodi di ipoglicemia, le riserve di glicogeno degli astrociti vengono convertite in lattato, il quale è trasferito ai neuroni adiacenti, dove viene utilizzato in condizioni anaerobiche come fonte energetica. (Wang and Bordey, 2008).

3.4 Gli oligodendrociti

Gli oligodendrociti (OL) appartengono alla macroglia e sono localizzati principalmente a livello della sostanza bianca del cervello. Queste cellule durante il loro sviluppo vanno incontro a maturazione attraverso degli stadi sequenziali ben caratterizzati che prevedono:

- (i) Origine dei precursori degli OL (OPC) dalle cellule del neuroepitelio
- (ii) Migrazione attraverso il SNC verso la corretta localizzazione
- (iii) Proliferazione
- (iv) Differenziamento in OL maturi

L'ultima fase di differenziamento verso la completa maturazione coincide con la capacità di produrre la mielina, deputata ad avvolgere l'assone e responsabile della trasmissione saltatoria degli impulsi nervosi (Jackman et al., 2009). In realtà nel SNC sono presenti anche degli OL che non producono mielina, detti "OL satellite", che sembrano essere strettamente coinvolti nella regolazione del microambiente in cui risiedono i neuroni (Takasaki et al., 2010).

3.4.1 Oligodendrogenesi e origine dei precursori degli oligodendrociti (OPC)

Gli OL nell'adulto sono localizzati sia a livello del midollo spinale che del cervello, ma seguono diversi processi di maturazione e migrazione.

Nel midollo spinale, gli OL presenti derivano da un pool di OPC appartenenti a regione specializzata e localizzata a livello della zona ventricolare ventrale o in minor parte (10-15%) dalle aree dorsali del midollo spinale (Lu et al., 2002, Cai et al., 2005).

A livello cerebrale, invece, si ritrovano tre popolazioni distinte di OPC che differiscono tra loro per la zona di origine dei loro precursori, ma che poi si dispongono in tutto il telencefalo e la corteccia cerebrale (Kessaris et al., 2006):

- (i) OPC1: hanno origine dall'eminenza ganglionica mediale e dall'area anteriore entopeduncolare del cervello anteriore ventrale.
- (ii) OPC2: originano a livello dell'eminenza ganglionica laterale e/o caudale.
- (iii) OPC3: Originano dalla corteccia postnatale.

Queste diverse linee di OPC pur ricoprendo tutte le zone del cervello, competono tra di loro occupando delle zone specifiche. Va altresì sottolineato che in caso di un grave danno sia di natura meccanica che infiammatoria a una di queste popolazioni durante lo sviluppo, le altre popolazioni di OPC sono in grado di sostituire in modo efficiente la popolazione danneggiata garantendo una corretta funzionalità della regione cerebrale interessata. Restano comunque ancora da chiarire i meccanismi alla base della competizione e della compensazione selettiva di queste popolazioni (Bradl and Lassmann, 2010).

3.4.2 Meccanismi molecolari alla base della migrazione degli OPC

La migrazione degli OPC dalle zone di origine è un processo fondamentale per la corretta funzionalità del SNC, ma a oggi i meccanismi molecolari che regolano il processo di

migrazione non sono ancora del tutto chiari, sebbene siano state individuate diverse molecole coinvolte. Tra queste, la famiglia delle molecole di adesione calcio-dipendente costituita dalle caderine ricopre un ruolo importante. Esse hanno una struttura modulare che permette la loro interazione con altre proteine segnale, le catenine, deputate al corretto indirizzamento degli OPC (Balsamo et al., 1996, Ninomiya et al., 2010, Thibault et al., 2010).

Nel processo di migrazione degli OPC è stato anche descritto il coinvolgimento del fattore di crescita di derivazione piastrinico (PDGF) e quello dei fibroblasti (FGF).

Il PDGF è costituito da un omodimero o eterodimero di due catene A e B codificate da due geni diversi. Nel SNC il PDGF-A viene rilasciato dai neuroni e dagli astrociti, mentre il PDGF-B da cellule capillari endoteliali. Il PDGF lega e attiva due recettori di superficie PDGFR β e PDGFR α , ed è proprio il legame con questi ultimi a mediare la proliferazione degli OPC (Fruttiger et al., 1999).

In particolare PDGF-A ha un'azione mitogenica sugli OPC e gioca un ruolo cruciale nel processo di embriogenesi. Studi recenti hanno dimostrato che l'attivazione del recettore per il PDGF-A sugli OPC (PDGFR α) porta all'attivazione di numerose vie di segnalazione, tra cui la via di ERK con conseguente stimolazione della migrazione degli OPC (Sugimoto et al., 2001, Frost et al., 2009).

Anche FGF è un fattore coinvolto nella migrazione degli OPC e coopera in modo diretto con il PDGF. In particolare la via attivata da FGF attraverso il suo recettore (FGFR) innesca diverse vie di segnalazione intracellulare tra cui quelle indotte dalle chinasi attivate da mitogeni (MAPK), dalla fosfolipasi C gamma (PLC γ) e dalla fosfoinositide-3 chinasi (PI $_3$ K) che contribuiscono a garantire agli OPC la motilità necessaria per la migrazione (Osterhout et al., 1997, de Castro and Bribian, 2005, Yun et al., 2010).

Oltre a molecole coinvolte nella promozione della migrazione degli OPC, sono state individuate anche molecole che ne inibiscono la migrazione, come ad esempio la chemochina CXCL1, espressa dagli astrociti della materia bianca, a livello del midollo spinale. Le chemochine, oltre a bloccare la migrazione degli OPC, impediscono al fattore chemiotattico PDGF di indurre tale processo, regolando la distribuzione spaziale degli OL nel SNC (Tsai et al., 2002). Sempre in relazione al processo di migrazione degli OPC sono state studiate alcune molecole chemiotropiche in grado di svolgere delle funzioni inibitorie sulla migrazione di queste cellule come le netrine e le semaforine (Sugimoto et al., 2001, Tsai et al., 2003).

Anche la tenascina-C ha un effetto inibitorio sulla migrazione degli OPC come descritto nel ratto a livello della giunzione ottica nella retina e nel tratto finale del nervo ottico (Bartsch et al., 1994). Questa proteina inibisce la migrazione degli OPC sia con un meccanismo adesione-indipendente (Kiernan et al., 1996) che con un meccanismo adesione-dipendente.

3.4.3 Molecole regolatorie coinvolte nella proliferazione degli OPC

Al completamento dei processi di migrazione e il conseguente raggiungimento delle corrette zone cerebrali gli OPC cominciano a proliferare, sia grazie a stimoli intrinseci che a molecole presenti nell'ambiente circostante.

Anche in questo processo il PDGF sembra svolgere un ruolo importante: esperimenti realizzati su topi transgenici PDGFA^{-/-}, hanno rivelato che il fattore di crescita PDGF-A regola i processi di divisione cellulare degli OPC e che la loro uscita dal ciclo cellulare si verifica in seguito a una diminuzione del PDGF-A. Al contrario, una sua *over-espressione*, in un modello di topi transgenici PDGFA^{+/+}, induce una iperproliferazione degli OPC (Calver et al., 1998).

Inoltre PDGF-A, agendo in modo sinergico con il fattore di crescita basico fibroblastico (bFGF), promuove, attraverso una *up*-regolazione del recettore PDGFR α , la proliferazione degli OPC (Robinson et al., 1998).

Nel processo di proliferazione degli OPC ritroviamo anche un coinvolgimento delle chemochine e del fattore di crescita insulinico I (IGF-I). In particolare è stato visto, in esperimenti *in vitro*, che somministrazioni di IGF-I a OPC porta ad un aumento della proliferazione di questi ultimi, attraverso l'attivazione delle vie di segnalazione, fosforilazione-dipendente, mediate da PI₃K, MEK1 e Src (Cui and Almazan, 2007).

Anche una serie di inibitori trascrizionali sembrano essere coinvolti nella proliferazione di queste cellule come ad esempio Hes5, Id4, e Tcf4. Questi fattori infatti, inibendo il differenziamento, permettono agli OPC di continuare a proliferare andando a posticipare il momento in cui le cellule escono dalla fase proliferativa del ciclo cellulare e iniziano il loro processo maturativo (Nave, 2010).

Per mantenere un adeguato numero di OPC è inoltre necessario che venga finemente regolato anche il loro processo di morte cellulare attraverso l'eliminazione dei precursori in eccesso (Robinson et al., 1998); a questo proposito giocano un ruolo importante il fattore TGF β (*Transforming Growth Factor*) e TNF α (*Tumor Necrosis Factor*) (Arnett et al., 2001).

3.4.4 Molecole regolatorie coinvolte nelle maturazione degli OPC a OL

Al termine della fase di proliferazione gli OPC vanno incontro alla loro definitiva maturazione in OL, attraverso un processo che prevede differenti fasi, ognuna identificata dall'espressione di marcatori biochimici specifici. Una caratterizzazione fatta *in vitro* individua le cellule positive per la proteina O2-A, riconosciuta dall' anticorpo monoclonale A2B5, come gli OPC al più alto stadio indifferenziato. Questi OPC, A2B5-positivi, presentano una morfologia bipolare, differenziano in maniera costitutiva in OL, ma sono in grado di dare origine anche ad astrociti di tipo II se opportunamente stimolati da specifici segnali extracellulari (Gard and Pfeiffer, 1990, Baracska et al., 2007).

E' importante comunque ricordare che una piccola popolazione di OPC resta presente anche nei tessuti cerebrali adulti, garantendo un potenziale sistema di risposta a eventuali insulti che si possono verificare a carico degli OL (Wolswijk et al., 1991).

La maturazione degli OPC è caratterizzata da modificazioni morfologiche e funzionali, attivate da specifici segnali derivanti sia dagli OPC stessi, che dal microambiente nel quale si localizzano. Subito dopo l'espressione di O2-A, gli OPC risultano positivi per il proteoglicano NG2, una proteina transmembrana (Trotter et al., 2010), che cooperando con il recettore PDGFR α risulta coinvolta in diversi meccanismi di trasduzione del segnale (Kucharova and Stallcup, 2010).

Lo stadio successivo di maturazione degli OPC coincide con la diminuzione dei livelli di PDGF, precedentemente descritta (par 3.4.1), con una ridotta capacità migratoria e con una modificazione morfologica caratterizzata da processi cellulari più complessi e ramificati. A questo stadio di maturazione le cellule vengono definite pre-oligodendrociti (pre-OL) in quanto perdono la capacità di differenziare in astrociti di tipo II, riducono i livelli di espressione di NG2 e cominciano a esprimere una nuova proteina, O4, che è localizzata sia a livello del corpo cellulare che di tutti i processi dei pre-OL (Sommer and Schachner, 1981).

Una volta completato il processo di maturazione, i pre-OL vanno incontro a una nuova fase in cui divengono OL immaturi, tipicamente positivi per l'espressione del Galattocerebroside (GalC).

In questo stadio gli OL necessitano anche del fattore di crescita IGF per garantire la loro sopravvivenza (Barres et al., 1992).

Solo al superamento di tutti questi differenti passaggi, in cui si assiste a diversi cambiamenti morfologici, metabolici e del corredo proteico, si arriva a completamento della maturazione di queste cellule e all'effettiva comparsa di proteine specifiche deputate alla mielinizzazione.

Questa fase è caratterizzata dall'espressione di proteine tra cui la proteina proteolipidica (PLP) (Bradl and Lassmann, 2010), l'*adenomatous polyposis coli* (APC), una proteina in grado di regolare l'azione delle β -cetenine nei processi di proliferazione e adesione cellulare e la proteina basica della mielina (MBP) (Bradl and Lassmann, 2010), una glicoproteina che è strettamente coinvolta nei processi di mielinizzazione svolti da queste cellule (Neshati et al.).

L'espressione e lo spegnimento delle proteine tipiche dei vari stadi di maturazione degli OL è regolata da diversi fattori trascrizionali come *Nkx2*, *Nkx6.2*, *Sox10*, *Olig1* e *Nkx2.2* che mostrano diversi siti di legame per i promotori di MBP e PLP e sembrano essere coinvolti anche nella regolazione genica dell'espressione di NG2 e PDGFR α (Xu et al., 2000, Qi et al., 2001, Stolt et al., 2002).

L'attività di questi fattori trascrizionali inoltre sembra essere specifica per differenti processi a seconda del grado di maturazione degli OL: *Nkx2.2*, ad esempio, viene progressivamente *down*-regolato durante gli stadi finali del differenziamento per poi essere nuovamente *up*-regolato durante la mielinizzazione, suggerendo un'espressione di tipo bifasico che indica un suo coinvolgimento in processi funzionali che avvengono in tempi differenti (Cai et al., 2010).

La fase di maturazione degli OL normalmente si conclude dopo 13 giorni dalla nascita (P13) con la comparsa delle strutture della guaina mielinica sugli assoni (Fig. 14).

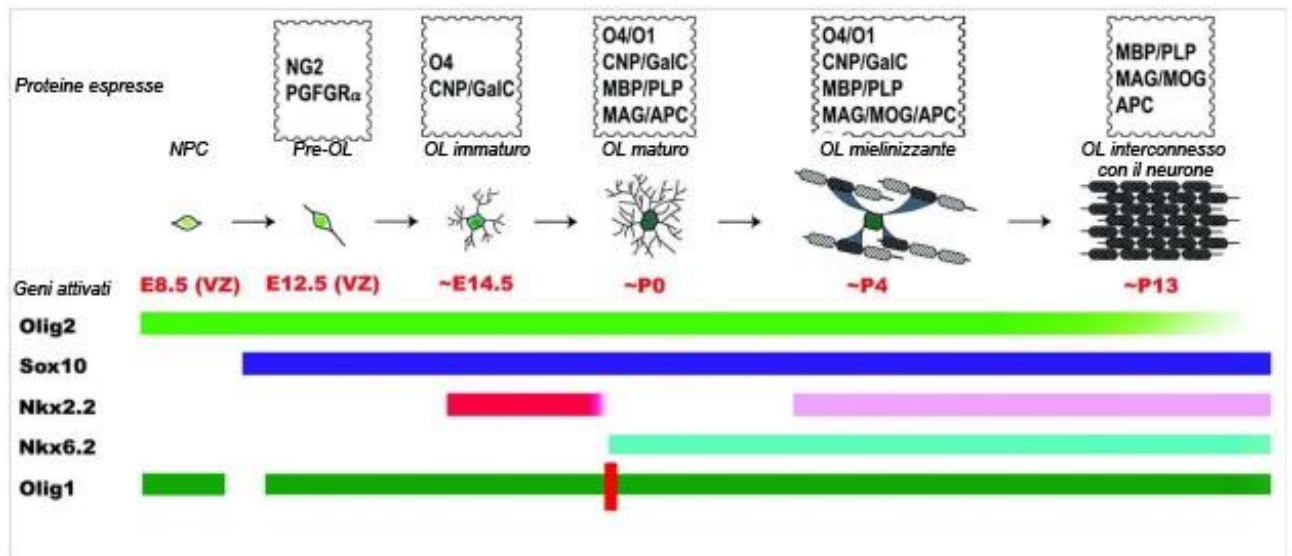


Fig. 14: Rappresentazione temporale della maturazione degli OL con l'attivazione dei fattori trascrizionali e l'espressione di marcatori specifici dei singoli stadi di sviluppo.

L'attivazione e la regolazione dei processi di maturazione negli OPC è anche influenzata da una serie di microRNA (miRNA), una superfamiglia di molecole di RNA a singolo filamento di circa 20-24 nucleotidi che hanno la capacità di regolare diversi fattori trascrizionali (Nave, 2010).

Attraverso studi eseguiti su topi transgenici in cui è stato bloccato il corretto processamento di alcuni miRNA (miRNA-219, miRNA-138 e miRNA 338), si è dimostrato che un loro malfunzionamento causa, nel SNC, la perdita delle capacità mielinizzanti e, *in vitro*, il blocco dei processi di differenziamento degli OPC. Questi studi hanno dimostrato, in particolare, che il miRNA-219 inibisce direttamente l'espressione di PDGFR α , Sox6, FoxJ3 e ZFP238, tutte proteine normalmente coinvolte nell'attivazione della proliferazione degli OPC (Dugas et al., 2010) (Fig. 15).

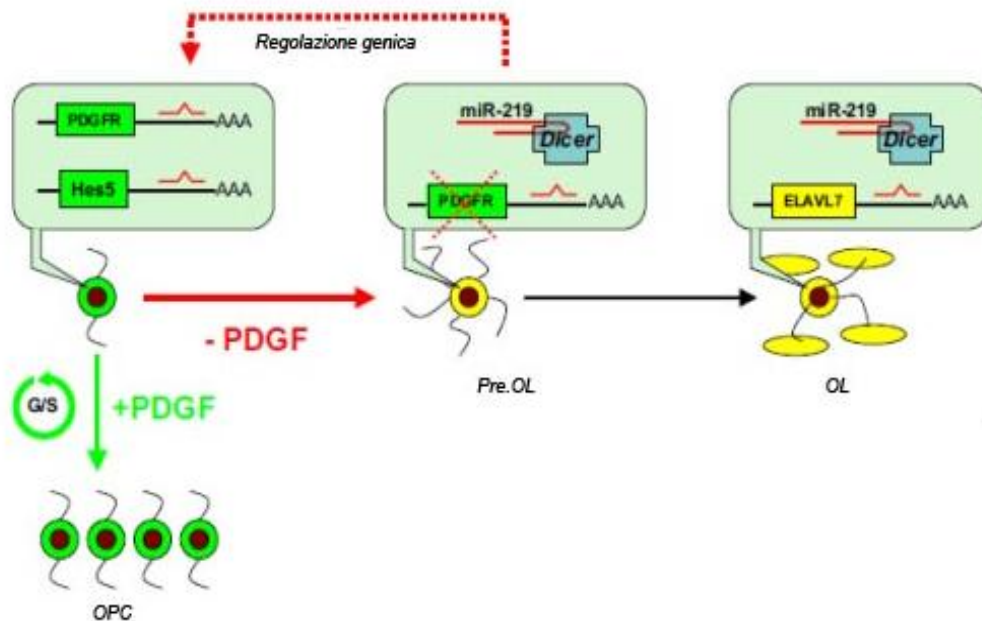


Fig. 15: Schema rappresentativo dell'attivazione e della regolazione dei miRNA-129 durante i processi di maturazione degli OL.

3.5 La mielinizzazione: il principale compito funzionale degli OL

La funzione biologica peculiare e maggiormente studiata degli OL è sicuramente la formazione della guaina mielinica attorno all'assone dei neuroni, processo che prende il nome di mielinizzazione.

La guaina mielinica è una struttura lipoproteica costituita per il 30% da proteine e per il 70% da lipidi tra cui un'alta percentuale di colesterolo; questa struttura, integrando in modo diretto con la membrana plasmatica dell'assone, garantisce la corretta conduzione saltatoria degli impulsi nervosi trasmessi sotto forma di potenziale d'azione.

La proteina maggiormente coinvolta nella corretta formazione di questa struttura è la mielina, prodotta dagli OL in base a specifici stimoli derivanti dal neurone e dal microambiente circostante.

Gli OL selezionano gli assoni da mielinizzare non solo attraverso segnali chemiotattici, ma anche in base al loro diametro, il quale deve essere di circa 0.2 μm .

Come accennato, quindi, si può affermare che la mielinizzazione sia un processo che prevede delle strette interazioni cellula-cellula tra i neuroni e gli OL e in particolare è stato dimostrato che un'aumentata o ridotta attività neuronale sia in grado di variare i livelli di mielinizzazione degli stessi a carico degli OL (Tauber et al., 1980).

Nel SNC l'innesco di un potenziale d'azione porta al rilascio di ATP e adenosina, i quali sono in grado di mediare una vasta serie di risposte da parte sia degli astrociti che degli OL. (Fig. 16). Nello specifico, l'adenosina inibisce la proliferazione degli OPC stimolandone il differenziamento e successivamente inducendo la mielinizzazione (Spiegel and Peles, 2006), mentre il rilascio di ATP da neuroni attivi non agisce direttamente sugli OL, ma promuove il rilascio, da parte degli astrociti, del fattore LIF (*leukemia inhibitory factor*) che induce la mielinizzazione da parte degli OL maturi (Ishibashi et al., 2009).

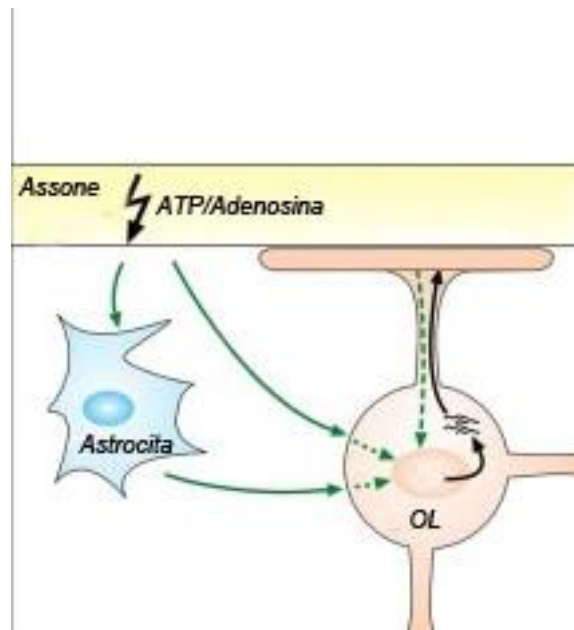


Fig. 16: Schema dell'attivazione della mielinizzazione in seguito a rilascio di molecole da un neurone attivato.

Tra le varie molecole che sembrano regolare negativamente la formazione della mielina possiamo ricordare: (i) le molecole di adesione neuronale NCAM, coinvolte nei processi di indirizzamento della crescita assonale e solo in seguito a una loro *down*-regolazione hanno inizio i processi di mielinizzazione (Landmesser et al., 1990, Nait Oumesmar et al., 1995); (ii) LINGO-1, una proteina transmembrana espressa sia sui neuroni che sugli OL caratterizzata da porzioni ripetute di leucine e da un dominio per le immunoglobuline. L'inibizione dell'espressione di LINGO-1 induce un aumento della mielinizzazione, mentre una sua sovra-espressione ne determina l'inibizione (Mi et al., 2005); (iii) la famiglia delle glicoproteine Notch di cui fanno parte quattro recettori (Notch 1-4) che sono coinvolti in svariati processi cellulari, tra cui processi di mielinizzazione degli OL.

In particolare, gli OL esprimono il recettore Notch1 sia nella fase di sviluppo che in quella di maturazione. In risposta al legame con i suoi ligandi classici (Jagged1 e Delta) Notch1

subisce un taglio proteolitico che attiva la traslocazione nel nucleo di un specifico dominio responsabile della regolazione trascrizionale di diversi geni che svolgono un effetto inibitorio sulla differenziazione degli OL e sulla mielinizzazione (Wang et al., 1998).

Va sottolineato però che Notch1 svolge un'azione inibitoria solo durante le fasi finali del differenziamento degli OL: è stato infatti descritto che il legame con Jagged1 induce l'espressione della proteina Hes5, la quale, bloccando la maturazione delle cellule Notch1 positive, promuove la migrazione degli OPC (Kondo and Raff, 2000) e che se attivato da altri ligandi non specifici, come per esempio NB-3, Notch1 può anche avere effetti contrari a quelli descritti precedentemente, stimolando la differenziazione degli OL (Cui et al., 2004).

Tutti i processi che regolano la mielinizzazione svolgono le loro funzioni in una finestra temporale piuttosto ristretta (12-18 ore), in cui si assiste alla formazione di diversi strati di mielina attorno agli assoni inducendo gli OL a una considerevole sintesi di proteine specifiche quali MBP, PLP e DM20 (Ainger et al., 1993).

Nel sistema nervoso periferico (SNP) il processo di mielinizzazione non è svolto dagli OL ma dalle cellule di Schwann (Mirsky and Jessen, 1996), che vengono regolate da altri meccanismi molecolari come l'interazione tra la proteina neuronale neuregulina-1 (NGR1) e il recettore gliale ErbB (Heermann et al., 2011).

Durante la mielinizzazione, si verifica anche la formazione di domini altamente specializzati come i nodi di Ranvier, che consistono in corte interruzioni della guaina mielinica posizionate ad intervalli precisi (circa 100 volte il diametro dell'assone).

I nodi di Ranvier presentano pressappoco la medesima struttura sia nel SNC che nel SNP, pur conservando delle differenze (Fig. 17). Nel SNP, infatti, sono le cellule di Schwann a garantire la mielinizzazione dell'assone con delle differenze peculiari. In primo luogo queste cellule non prendono contatti con più assoni, come succede a livello del SNC per gli OL e a livello dei nodi di Ranvier si registra la presenza di una lamina basale che va a ricoprire i nodi. Lo spazio perinodale, posizionato tra l'axolemma e la lamina basale, contiene inoltre i microvilli e la matrice filamentosa. Nel SNC invece, non c'è la lamina basale e i nodi interagiscono con gli astrociti perinodali (Rumsey et al., 2009). I nodi di Ranvier sono essenziali per mantenere una corretta conduzione della corrente saltatoria. Studi recenti hanno dimostrato che la formazione dei nodi di Ranvier a livello del SNC vede coinvolte diverse molecole e sembra essere influenzata non solo dalla presenza degli OL ma anche dalle interazioni tra gli assoni e le cellule gliali.

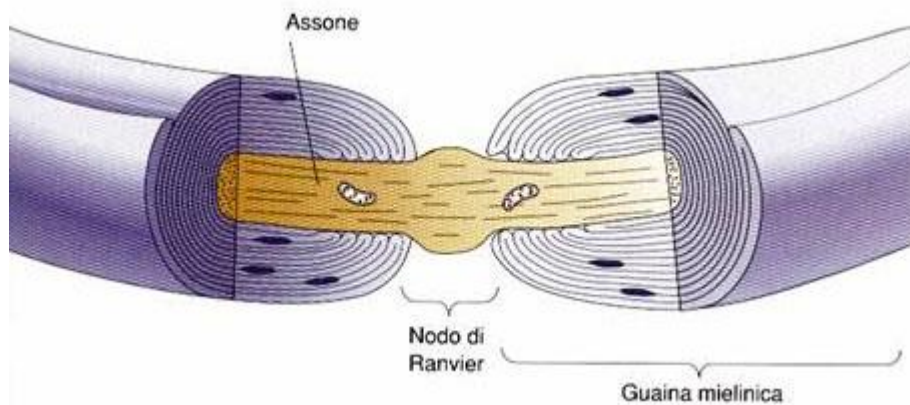


Fig. 17: rappresentazione schematica di un nodo di Ranvier.

3.5.1 Il coinvolgimento delle neurotrofine nella mielinizzazione

Le neurotrofine (NT), oltre che a regolare la funzionalità e lo sviluppo del neurone (par 2.6), sono ampiamente coinvolte anche nei processi di proliferazione e differenziamento degli OL (Althaus et al., 2008).

Sulla membrana degli sono espressi i recettori TrK, la cui espressione varia a seconda del loro stadio di maturazione, regolando gli effetti che le neurotrofine hanno su queste cellule. In particolare è stato dimostrato, attraverso studi effettuati sia *in vivo* che *in vitro*, che gli OL di ratto esprimono alti livelli di p75NTR nella fase di precursori e, al contrario, una sua diminuita espressione durante le fasi finali della loro maturazione, quando queste cellule prendono contatto con i neuroni. Inoltre sugli OL maturi non è presente il recettore TrKA, indicando che questo è coinvolto solo nelle prime fasi della loro maturazione, in cui, viceversa, viene espresso. Durante lo sviluppo degli OL si assiste inoltre a una modificazione nell'espressione di TrkC e di TrkB che, durante gli stadi finali di maturazione, non sono più espressi nella versione "completa" (definita *full-length*), ma mostrano una loro forma troncata, data da modificazioni post-traduzionali di questi recettori, che varia anche il tipo segnali intracellulari attivati rispetto alla loro forma nativa (Kumar et al., 1993).

Durante il processo di mielinizzazione le NT agirebbero sia in modo diretto sugli OL, sia attraverso l'attivazione di specifici segnali assonali, determinando sugli assoni la produzione di molecole coinvolte nell'interazione con gli OL per la regolazione del processo di formazione della mielina (Voyvodic, 1989). Ad esempio NGF, agendo sul suo recettore TrKA, da un lato agisce a livello neuronale promuovendo l'aumento del diametro assonale, dall'altro inibisce la formazione della mielina da parte degli OL. Questo sta ad

indicare che i livelli di NGF sono in grado di regolare sia i processi di sviluppo degli OL durante le loro fasi di maturazione, che quelli di mielinizzazione, agendo su due meccanismi regolatori differenti (Bisaz et al., 2009). Anche il BDNF e il suo recettore TrKB sono coinvolti nei processi di mielinizzazione. E' stato infatti visto che a livello del nervo ottico di topi transgenici BDNF^{-/-} il diametro assonale e i livelli di espressione delle proteine mieliniche risultavano più bassi rispetto a topi controllo (Ikeda et al., 2002, Tolwani et al., 2004). Questa ridotta mielinizzazione è stata riscontrata anche in altre aree del SNC, come l'ippocampo e la corteccia, nelle quali sia i livelli di mRNA che quelli proteici di MBP e PLP, comunemente utilizzati per caratterizzare i livelli di mielinizzazione, risultavano ridotti nei topi BDNF^{-/-} (Cellerino et al., 1997). D'altro canto, un'over-espressione di BDNF, in seguito ad iniezione intraventricolare, si traduce in un'accelerazione della mielinizzazione e in un aumento del diametro assonale. Questo indica che il BDNF è implicato nella regolazione sia della mielinizzazione che del diametro assonale (Cellerino et al., 1997).

3.5.2 La rimielinizzazione degli assoni dopo un danno neuronale

A seguito di traumi, danni ipossici o processi infiammatori nel SNC si assiste ad una demielinizzazione dovuta alla morte degli OL con conseguente perdita della loro funzionalità: questo fenomeno prende il nome di demielinizzazione.

La demielinizzazione può essere suddivisa in:

(i) primaria

si verifica quando il danno interessa direttamente gli OL provocandone la conseguente perdita funzionale.

(ii) secondaria

questo tipo di perdita funzionale della guaina mielinica è un processo che si verifica in seguito a risposte infiammatorie o a patologie che non coinvolgono direttamente gli OL, ma più spesso i neuroni, e che causano una riduzione del diametro assonale e una conseguente diminuzione nei livelli di mielinizzazione.

Gli OL mielinizzanti hanno la capacità di stabilizzare il citoscheletro degli assoni attraverso la produzione o la regolazione di proteine specifiche, come un'inadeguata espressione delle proteine canale voltaggio dipendente per il sodio (Nav), proteggendo il SNC da processi di demielinizzazione secondaria che spesso sono causati da un ridotto diametro assonale o da una sofferenza cellulare a carico dei neuroni. Sembrerebbe infatti che una

down-regolazione delle proteine coinvolte nei processi di sostegno nei confronti dell'assone garantiti dalla presenza degli OL di origine a una più rapida degradazione della mielina nei neuroni danneggiati (Piaton et al., 2010).

È stato visto, ad esempio, che la delezione del gene codificante per la proteina mielinica PLP, in topi transgenici, causa una riduzione della guaina mielinica ed è correlata in modo diretto a una successiva degenerazione assonale, indice della relazione bidirezionale che esiste tra lo stato di salute degli OL e degli assoni con i quali prendono contatto. Lo stesso vale per CNP, una proteina espressa negli OL a livello del soma e delle regioni non compatte della mielina: topi transgenici *Cnp1^{-/-}* sviluppano una patologia che determina degenerazione assonale. Anche MAG, una glicoproteina associata alla mielina, è coinvolta nei processi di regolazione del diametro e della struttura assonale e la sua mancanza porta ad una disorganizzazione della zona periassonale. Si può quindi concludere che una vasta serie di proteine, localizzate sugli OL o rilasciate dagli stessi abbiano un ruolo primario nella stabilizzazione della struttura degli assoni (Edgar et al., 2009).

Accanto ai processi di demielinizzazione appena descritti, il SNC ha sviluppato delle capacità per rigenerare la mielina persa in seguito a traumi, danni ischemici o infiammatori. Esistono infatti dei processi di rigenerazione della mielina che hanno lo scopo di ripristinare le funzioni di protezione assonale e corretta trasmissione degli impulsi nervosi garantite dagli OL attraverso la ricostruzione dell'intera guaina mielinica a livello degli assoni demielinizzati.

In seguito alla demielinizzazione si verifica il reclutamento di una popolazione di OPC adulti solitamente localizzati in specifiche aree del SNC in uno stato inattivo. Questi OPC vengono attivati da molecole e segnali trofici rilasciati dalle cellule presenti nella zona lesionata durante i processi di demielinizzazione dando origine a una rimielinizzazione spontanea.

Questi segnali portano a un cambiamento morfologico e una *up*-regolazione dell'espressione di specifici geni in questi OPC come, per esempio, il fattore trascrizionale Olig, proteine morfogeniche del midollo osseo, la chinasi Fyn, Nkx2.2 e altri geni coinvolti nei normali processi di oligodrogenesi (Zhao et al., 2009, Piaton et al., 2010). Queste modifiche permettono agli OPC in stato quiescente di acquisire la capacità di rispondere ai segnali indotti dal processo di demielinizzazione promuovendo la loro migrazione nelle zone demielinizzate e permettendo l'interazione con gli assoni danneggiati. L'attivazione di questi OPC, la loro migrazione e il ripristino della guaina mielinica prevede anche il coinvolgimento delle cellule della microglia, ma anche degli astroцитi che ad esempio

regolano i livelli di infiammazione (Olah et al., 2012) ma che possono anche aumentare la permeabilità della barriera ematoencefalica, causando effetti negativi sui processi di rimielinizzazione (Waubant, 2006).

La maggior parte dei fattori necessari agli OPC per la migrazione e la formazione dei contatti con gli assoni durante la rimielinizzazione vengono poi *down*-regolati al completamento di tale processo.

Se non si verificano tutte le condizioni favorevoli alla migrazione e maturazione degli OPC inattivi, il processo di rimielinizzazione, che viene definita spontanea, può non andare a buon fine, causando la perdita della corretta conduzione del potenziale d'azione lungo gli assoni e la conseguente comparsa di patologie neurodegenerative gravi.

Sono stati individuati tre meccanismi che sembrano regolare la corretta attivazione degli OPC inattivi: il *pathway* di Notch, il *pathway* di Wnt e il *pathway* attivato dagli inibitori della formazione della guaina mielinica, caratterizzando dei complessi funzionali sui quali si potrebbe agire per modulare tali processi (Fancy et al., 2010).

Altre cause di una mancata rimielinizzazione possono essere individuate nell'esaurimento della fonte degli OPC inattivi, necessari per il ripristino della mielina danneggiata o nel blocco della loro migrazione verso le zone lesionate.

Dopo il reclutamento degli OPC verso le zone lesionate, avviene infatti anche un'attivazione degli astrociti che formano una "cicatrice gliale" che blocca l'accesso alla zona demielinizzata in modo da proteggerla da eventuali infezioni o da infiltrazioni da parte di altri tipi cellulari. In caso di una richiesta continua e prolungata di OPC, la cicatrizzazione dell'area danneggiata messa in atto dagli astrociti potrebbe contribuire a una ridotta migrazione degli OPC e quindi bloccando i corretti processi di rimielinizzazione (Miller and Mi, 2007).

SCOPO

Le cellule staminali mesenchimali (MSC), staminali adulte dotate di caratteristiche multipotenti, libere da problematiche di natura etica, sono diventate oggetto di un numero sempre maggiore di studi volti a trovarne un potenziale utilizzo in terapia. Inoltre, sia in modelli animali che in alcuni studi clinici e preclinici, le MSC hanno mostrato un ruolo neurotrofico e neuroprotettivo a livello del SNC.

Per quanto si stiano portando avanti tuttora studi sul possibile trans-differenziamento di queste cellule, numerosi gruppi di ricerca affermano, con dati sempre più consistenti, che il potenziale effetto riparativo e neuroprotettivo indotto dalle MSC, non sia tanto da attribuire ad un loro differenziamento in neuroni o cellule gliali, quanto piuttosto al rilascio di una serie di fattori neurotrofici e proteine neuroregolatorie solubili. Queste cellule sembrerebbero infatti in grado di sostenere la sopravvivenza delle cellule neuronali e la rigenerazione del tessuto lesa attivando o amplificando i meccanismi classici che regolano questi processi nel SNC.

Partendo da queste ultime evidenze, il nostro lavoro si pone come scopo quello di studiare e caratterizzare gli effetti indotti dalle MSC su cellule del SNC, utilizzando un opportuno sistema *in vitro*. Il modello sperimentale da noi utilizzato prevede che le MSC neuroni ippocampali o oligodendrociti corticali, possano comunicare fra loro esclusivamente attraverso il rilascio di fattori solubili.

Innanzitutto è stata eseguita una caratterizzazione delle colture primarie di MSC isolate nel nostro laboratorio, passaggio indispensabile considerata l'eterogeneità fenotipica di tali cellule.

Successivamente il nostro studio si è concentrato sull'osservazione e l'analisi degli effetti indotti dalle MSC sulla sopravvivenza, lo sviluppo e la funzionalità dei neuroni, nonché sulla sopravvivenza, lo sviluppo e la proliferazione degli oligodendrociti.

Di fatto, la ricerca da noi condotta ha consentito di acquisire interessanti informazioni sulla capacità delle MSC di fornire un supporto trofico nei confronti di cellule di derivazione embrionale differente dalla loro e di avviare l'individuazione dei meccanismi alla base degli effetti indotti sulle cellule del SNC, anche attraverso l'identificazione di alcuni fattori coinvolti.

Le informazioni ottenute in questo progetto rappresentano un buon punto di partenza per chiarire le modalità attraverso cui le MSC sono in grado di sostenere le cellule del SNC e di modulare alcuni dei processi essenziali al loro funzionamento. La comprensione di tali meccanismi permetterebbe di caratterizzare al meglio gli effetti fino ad oggi descritti a

carico delle MSC per meglio chiarire il loro ruolo in un possibile impiego nella cura di patologie neurodegenerative.

MATERIALI E METODI

1. Colture cellulari

1.1 Estrazione e messa in coltura delle cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) vengono prelevate dal midollo osseo dei femori e delle tibie di una ratto adulta Sprague-Dowley.

Dopo aver ripulito le ossa dagli strati muscolari, si recidono entrambe le estremità di femore e tibia per esporre il canale midollare. In seguito, si estrae e raccoglie il midollo in una piastra Petri iniettando, nel canale midollare, del medium da coltura α -MEM (Lonza, si veda par. 3 dei Materiali e metodi) privo di siero tramite l'utilizzo di una siringa da insulina con ago 21G ripetendo questa operazione per due o tre volte. Le cellule del midollo estratte vengono ulteriormente dissociate meccanicamente e la risospensione cellulare così ottenuta viene centrifugata a 150 x g per 10 minuti. Dopo aver scartato il surnatante, il pellet viene risospeso e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente in cloruro d'ammonio (0.84% p/v, NH₄Cl) per lisare i globuli rossi rimasti e visibili come anello rosso sopra il pellet. La lisi degli eritrociti viene bloccata aggiungendo α -MEM contenente il 20% di ES-FBS, (20% v/v di siero fetale bovino certificato per cellule staminali embrionali, Hyclone). Si ripete la centrifugazione a 150 x g per 10 minuti e si risospende il pellet in α -MEM completo (si veda par. 3 dei Materiali e metodi). Tutte le cellule così ottenute vengono piastrate in una fiasca da coltura mantenendole in incubatore a 37°C e in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. Dopo 48 ore dalla piastratura, si cambia il medium di crescita e le cellule vengono fatte crescere in questo modo per 15 giorni sostituendo il terreno ogni 3-5 giorni in modo da fargli raggiungere una confluenza tale da poter essere raccolte e divise tramite trattamento con tripsina/EDTA 0.5 gr/L (Sigma).

Le cellule vengono poi divise una volta alla settimana per tre passaggi in modo da poter purificare la coltura; raggiunto il terzo passaggio di divisione (P3), le MSC hanno raggiunto una purezza di circa il 95% e sono pronte per essere utilizzate come coltura cellulare pura. In seguito queste cellule vengono utilizzate fino al passaggio cellulare P6 al fine di evitare che queste vadano incontro a modificazioni cellulari, come differenziamento spontaneo, alterazioni cromosomiche e morfologiche.

1.2 Estrazione e messa in coltura dei neuroni ippocampali

I neuroni utilizzati per gli esperimenti sono ottenuti dalla dissezione di ippocampi di embrioni di ratto Sprague-Dowley (Charles River) prelevati al 18° giorno di gestazione (E18). Dopo il sacrificio dell'animale il cervello viene estratto e mantenuto in un tampone di soluzione salina Hanks, formato da EBSS, MgCl₂ e HEPES (HBSS) per i successivi passaggi.

Gli ippocampi, una volta separati dalle cortecce e puliti dalle meningi, vengono incubati a 37°C per 15 minuti in HBSS contenente tripsina (2.5% gr/L) in modo da cominciare a disgregare il tessuto digerendo i contatti cellula-cellula presenti negli ippocampi isolati. Successivamente si lava la tripsina con dei tre lavaggi in HBSS. Al termine di questa prima dissociazione enzimatica, si procede a una dissociazione meccanica in modo da ottenere una sospensione cellulare omogenea priva di aggregati.

Le cellule così ottenute vengono piastrate ad una densità di 2,2-2,5 x 10³ cell/cm² su vetrini copri-oggetto pre-trattati con poli-L-lisina (1mg/mL, Sigma, St Louis, MO) e mantenute in neurobasal addizionato con B27 e glutamato (si veda par. 3 dei Materiali e metodi) per 4 ore in modo da favorirne l'adesione.

Al termine delle 4 ore viene eseguito un cambio medium completo per rimuovere il glutamato dal terreno di coltura per evitare degli effetti tossici sulle colture.

1.3 Estrazione e messa in coltura degli astrociti corticali

Le colture primarie di astrociti sono ottenute dalle cortecce cerebrali prelevate da ratti Sprague-Dowley (Charles River) di due giorni post-natali (P2). Dopo il sacrificio dell'animale, il cervello viene estratto e mantenuto in HBSS per i successivi passaggi nei quali viene eliminato il cervelletto e separati i due emisferi. Successivamente, dalle cortecce isolate vengono asportate le meningi e gli ippocampi. Le cortecce vengono poi dissociate meccanicamente e sottoposte a due incubazioni sequenziali in una soluzione contenente HBSS, tripsina (2.5 gr/L) e DNAsi (0.001% p/v) a 37°C per una durata complessiva di 30 minuti. Dopo inattivazione della tripsina e della DNAsi tramite l'aggiunta di terreno gliale (si veda par. 3 dei Materiali e metodi), la risospensione cellulare viene filtrata attraverso una membrana di nylon con pori di 80 µm di diametro, in modo da rimuovere il tessuto non dissociato, e sottoposta a 10 minuti di centrifuga a 150 x g a temperatura ambiente. Il pellet ottenuto viene quindi risospeso in terreno gliale, sottoposto

a dissociazione meccanica piastrato sia in fiasche sterili, ad una densità di 2.5×10^6 cellule per fiasca, sia in piastre Petri per colture tissutali (BD, Franklin Lakes, NJ), con una densità di 0.5×10^6 cell/mL. Il terreno di crescita viene cambiato il giorno seguente alla piastratura e successivamente una volta alla settimana.

1.4 Isolamento degli oligodendrociti a partire dagli astrociti corticali

Gli oligodendrociti (OL) si preparano secondo le modalità seguite per gli astrociti corticali da ratti P2, piastrate a una densità maggiore (1×10^7 cellule per fiasca). Queste co-culture miste di cellule gliali comprendono precursori bipolari di OL e astrociti di tipo II, che crescono al di sopra di un monostrato confluyente di astrociti di tipo I. Dopo circa 15 giorni dalla dissezione, quando gli astrociti hanno raggiunto una confluenza pari a circa l'80-90% e gli OPC un'adeguata densità al di sopra del monostrato, si procede al distacco selettivo degli OPC dal monostrato mediante agitazione meccanica per 16 ore a 320 rpm e alla temperatura di 37°C. Le cellule che si sono staccate dal monostrato di astrociti vengono raccolte e centrifugate a $200 \times g$ per 10 minuti. Dopo una risospensione meccanica del pellet ottenuto in terreno gliale (si veda par. 3 dei Materiali e metodi), le cellule vengono piastrate ad una densità di 2×10^4 cellule/cm² su vetrini copri-oggetto pre-trattati con poli-D-lisina (1mg/ml, Sigma) e mantenute in terreno gliale, per favorirne l'adesione. Dopo 4 ore dalla piastratura viene eseguito un cambio medium completo con il terreno di crescita specifico per gli OL (si veda par. 3 dei Materiali e metodi) che in seguito viene sostituito a giorni alterni.

Tutte le procedure sugli animali sono eseguite in accordo con la direttiva 86/609/EEC della Comunità Europea.

2 Allestimento delle co-culture cellulari

La maggior parte degli esperimenti svolti prevede la presenza di due linee cellulari differenti, fisicamente separate tra loro, ma in comunicazione tramite fattori solubili rilasciati dalle cellule nel comune medium di coltura. Tale co-cultura viene definita "a sandwich" e segue il protocollo descritto da Banker e colleghi (Kaech and Banker 2006). In questo caso, infatti, una linea cellulare è presente come monostrato sulla Petri da coltura,

necessaria come supporto trofico per la linea cellulare piastrata sui vetrini appositamente sterilizzati e dotati di spaziatori in paraffina in modo da garantire la separazione fisica tra le due popolazioni cellulari. Come colture di supporto trofico si utilizzano dei monostrati di astrociti o MSC a una confluenza di circa l'80% sulle quali vengono posti dei vetrini con adesivi neuronali o di oligodendrociti corticali (Fig.18).

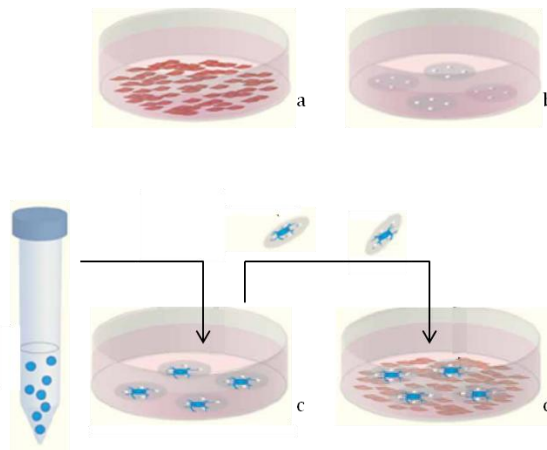


Fig.18 Rappresentazione schematica della preparazione di una co-cultura . a. Preparazione del monostrato di astrociti o di MSC; b. Preparazione dei vetrini con gli spaziatori di paraffina; c. Piastratura dei neuroni ippocampali o degli oligodendrociti sui vetrini ; d. Capovolgimento dei vetrini con i neuroni sul monostrato preparato precedentemente [immagine modificata da Kaech e Banker, (Kaech and Banker, 2006)].

Nel nostro caso le co-culture che utilizzano un monostrato di astrociti corticali sono state considerate come co-culture di controllo, mentre quelle che utilizzano un monostrato di MSC rappresentano la condizione sperimentale da analizzare.

2.1 Preparazione e utilizzo del medium condizionato

In alcuni esperimenti per valutare gli effetti svolti dalle molecole rilasciate dalle co-culture nel medium di crescita, si è reso necessario l'utilizzo di medium derivante da co-culture parallele.

Per medium condizionato (CM) si intende, infatti, il terreno in cui sono state mantenute le co-culture che hanno quindi "condizionato" tale terreno con i fattori trofici rilasciati.

Le colture di neuroni o oligodendrociti, in assenza di monostrato cellulare di supporto, sono successivamente poste in tale medium.

In alcuni esperimenti, il medium condizionato è anche sottoposto a specifici trattamenti in modo da bloccare in modo selettivo l'azione di specifici fattori solubili (par. 7)

3 Terreni utilizzati

(i) TERRENO PER I NEURONI IPPOCAMPALI

I neuroni ippocampali vengono mantenuti in coltura con Neurobasal (Invitrogen) addizionato con B27 50X, streptomicina 100 µg/ml, penicillina 100 U/ml e glutammina 2 mM.

Nelle prime 4 ore dopo la piastratura, questo terreno viene addizionato con glutammato 25 µM.

(ii) TERRENO PER GLI ASTROCITI

Gli astrociti corticali vengono mantenuti in coltura con il terreno gliale, costituito da Minimum Essential Medium (MEM, Invitrogen), 10% v/v di siero di cavallo (Invitrogen), glucosio 0.6% p/v, streptomicina 100 µg/ml e penicillina 100 U/ml.

(iii) TERRENO PER LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Le MSC vengono mantenute in coltura con α- Minimum Essential Medium (α-MEM, Cambrex) addizionato con il 20% v/v di siero fetale bovino certificato per cellule staminali embrionali (ES-FBS, Hyclone), L-glutammina 2 mM (Sigma), streptomicina 100 µg/ml, penicillina 100 U/ml e fungizone 250 µg/ml (Invitrogen).

(iv) TERRENO PER GLI OLIGODENDROCITI

Gli OL vengono mantenuti in coltura in un terreno che ne garantisce la sopravvivenza e la proliferazione costituito da DMEM- F12 (Sigma) addizionato con una soluzione contenente Insulina (0.01 g/L), Transferrina (0,055 g/L) e Selenio (0.00067 g/L) (ITS Gibco, 1:100), progesterone (10 µg/ml), putrescina (16 µg/ml) e l'ormone tiroideo T3 (40 ng/ml).

4 Sterilizzazione dei vetrini e preparazione degli spaziatori di paraffina

La preparazione dei vetrini (24 mm di diametro, VWR) sui quali sono piastrate le colture di neuroni ippocampali o oligodendrociti che andranno a costituire le co-colture richiede due procedure differenti:

- (i) Sgrassatura e sterilizzazione dei vetrini per i neuroni:

Prima della piastratura dei neuroni ippocampali, si procede con la rimozione di ogni possibile residuo di grasso presente sul vetrino attraverso un trattamento di 48 ore in acido nitrico e una sterilizzazione e disidratazione da 5 ore a 180°C.

- (ii) Sterilizzazione dei vetrini per gli oligodendrociti:

Il giorno prima della piastratura i vetrini vengono immersi in etanolo al 100% per circa 10 minuti e poi passati su fiamma di bunsen in modo da togliere tutti i residui di etanolo e completare la loro sterilizzazione

Terminato il processo di sgrassatura e sterilizzazione per entrambe i tipi di vetrini preparati si procede con l'applicazione degli spaziatori posizionando 4 piccole gocce di paraffina su ogni vetrino, in modo da garantire la separazione della coltura cellulare piastrata sul vetrino di almeno 1-2mm rispetto al monostrato cellulare utilizzato per la co-coltura. In seguito i vetrini vengono irradiati con gli UV per almeno 30 minuti in modo da garantire una completa sterilità.

I vetrini sui quali verranno piastrati i neuroni vengono ulteriormente trattati con l'aggiunta per circa 16 ore di poli-L-lisina per agevolare l'adesione delle cellule neuronali (1mg/ml, Sigma, St Louis, MO) disciolta in Buffer Borato 0.1 M, pH 8.5.

Al contrario, per agevolare l'adesione degli oligodendrociti i vetrini vengono pretrattati con un'incubazione da 10 minuti in poli-D-lisina (1mg/ml, Sigma, St Louis, MO) sciolta in acqua sterile bi-distillata.

5. Metodiche di analisi utilizzate

5.1 Citofluorimetria a flusso

Per l'identificazione di specifici marcatori di staminalità sono state eseguite delle analisi di citofluorimetria a flusso come precedentemente riportato in letteratura (Foudah et al., 2009).

Per queste analisi sono state utilizzate delle MSC a P4.

Le cellule sono state sottoposte a trattamento con tripsina, centrifugate a 250 x g per 10 minuti e risospese in PBS contenente il 3% di FCS e lo 0.01% (p/v) di sodio azide.

Successivamente è stata fatta un'incubazione di 30 minuti a 4°C con gli anticorpi primari diretti contro i marcatori scelti e successivamente sono stati aggiunti gli anticorpi secondari fluorescenti.

Per l'analisi sono stati preparati anche dei campioni controllo trattati solo con gli anticorpi secondari, in modo da identificare eventuali segnali aspecifici.

I campioni sono stati letti attraverso il FACScanto™ FlowCytometer (BD Biosciences) dopo aver individuato la corretta finestra di acquisizione in base alle proprietà morfologiche e di fluorescenza delle cellule. I dati ottenuti sono stati poi analizzati attraverso un software dedicato (FACS Diva software, BD Biosciences).

5.2 Immunofluorescenza

Le cellule vengono fissate mediante incubazione per 20 minuti a temperatura ambiente con paraformaldeide 40 g/L e saccarosio 40 g/L sciolti in tampone fosfato 0.12 M, pH 7.4 e successivamente lavate con PBS.

Le cellule fissate vengono in seguito lavate prima con PBS a bassa concentrazione salina (LS-PBS: NaCl 150 mM, tampone fosfato 10 mM, pH 7.2) e poi con PBS ad alta concentrazione salina (HS-PBS: NaCl 500 mM, tampone fosfato 20 mM, pH 7.2). Successivamente vengono permeabilizzate attraverso un'incubazione da 20 minuti in *Gelatin Dilution Buffer* (GDB: tampone fosfato KH₂PO₄ 20 mM, gelatina 0.2% p/v, Triton X-100 0.3% p/v, NaCl 0.45 M) che garantisce anche la saturazione dei siti aspecifici. A questo punto, viene eseguita un'incubazione di 2 ore a temperatura ambiente con gli anticorpi primari diluiti nel tampone GDB e, dopo dei lavaggi con HS-PBS, si procede con l'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari coniugati con specifici fluorocromi diluiti sempre in tampone GDB. Terminata l'incubazione, i campioni vengono lavati prima con HS-PBS, incubate per 5 minuti con DAPI (4,6-diaminidino, 2-fenilindolo) 1 μM, diluito in PBS e poi con LS-PBS. Al termine della marcatura delle cellule con gli anticorpi desiderati, si procede con il montaggio dei vetrini sui vetri porta-oggetto con una soluzione di glicerolo e PBS in rapporto 9:1. Le immagini ottenute dai campioni sono state ottenute utilizzando un microscopio confocale Zeiss (LSM-710) collegato ad un computer dotato del software per l'analisi delle immagini (Zeiss, Zen 2009).

5.3 Analisi SDS-PAGE e Western immunoblotting

Questa tecnica consente di separare le proteine, estratte dai campioni di interesse, in base al loro peso molecolare, attraverso una corsa elettroforetica su un gel denaturante di poliacrilammide arricchito dal sodio dodecil solfato che denatura le proteine stesse. Queste, vengono visualizzate attraverso anticorpi primari specifici, i quali sono riconosciuti da anticorpi secondari che, nel nostro caso, sono coniugati con la perossidasi che ne permette la rivelazione tramite la reazione con specifici substrati.

Le cellule sono raccolte in PBS, centrifugate, risospese in una soluzione di Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, sottoposte a dosaggio proteico con il metodo di lettura BCA (Pierce) seguendo le indicazioni della ditta produttrice e preparate per il caricamento su gel con l'aggiunta di Laemmli Buffer (LB: Tris-HCl 300mM, pH 6.8, 5% SDS, 0.05% p/v di blu di bromofenolo) e il ditiotreitolo 100mM (DTT). I gel di poliacrilammide utilizzati sono composti dal 10% di acrilamide e addizionati con Temed (0,0005% v/v, BioRad) e ammonio persolfato (10% p/v, BioRad). La corsa elettroforetica viene eseguita alla corrente costante di 20 mA/gel, a 80V. Dopo la corsa elettroforetica, le proteine sono trasferite su membrane di nitrocellulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia) utilizzando una cella semy-dry (Biometra Fast-Blot) utilizzando un tampone di trasferimento composta da Tris base 25 mM, metanolo 10% v/v, pH 8.3. e applicando una corrente costante di 1.5 mA per ogni cm² di superficie di gel da trasferire per due ore.

Al termine del trasferimento la nitrocellulosa viene incubata in una soluzione di bloccaggio dei siti aspecifici (soluzione di blocking:5% latte in polvere magro, Marvel®, sciolto in tampone Tris-HCl 20 mM, pH 7.5/NaCl 150 mM contenente 0.1% Tween 20, BioRad).

La nitrocellulosa viene poi lavata in TBS-T (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5/NaCl 150 mM contenente 0.1% Tween 20), a temperatura ambiente e incubata per 2 ore in soluzione di bloccaggio contenente l'anticorpo primario di interesse. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, la nitrocellulosa viene lavata in TBS-T e incubata per 1,5 ore con un anticorpo secondario coniugato a perossidasi (Pierce). La rilevazione del segnale viene effettuata mediante chemiluminescenza con il Kit SuperSignal® West Pico (Pierce).

5.4 Test ELISA

Per quantificare i livelli di BDNF presenti nel medium delle co-culture, è stato usato il BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega) seguendo le indicazioni della ditta

produttrice. In breve questo sistema prevede la presenza di anticorpi monoclonali specifici per il BDNF in grado di rilevare la presenza di questa neurotrofina attraverso un successivo riconoscimento da parte di anticorpi secondari coniugati con la perossidasi, grazie alla quale, dopo la reazione con il substrato cromogenico, viene quantificato il BDNF presente nei campioni (Fig.19).

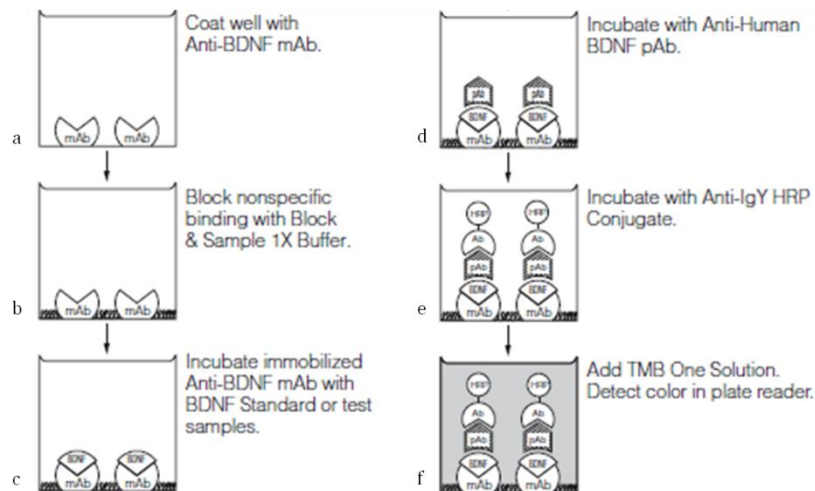


Fig.19 Rappresentazione schematica dei passaggi del test ELISA per quantificare il BDNF (Promega).

Prima di effettuare il test ELISA è necessario concentrare il medium per poter rilevare anche piccole quantità di BDNF. Per fare questo, si utilizzano delle colonne specifiche (Amicon Ultra0.5 ml, 3KDa, Millipor) in grado di concentrare la componente proteica presente nel medium di almeno 10 volte.

I valori ottenuti dai pozzetti contenenti i campioni analizzati vengono poi rapportati ai valori ottenuti da una curva standard letta in parallelo in modo da determinare le concentrazioni di BDNF presente nel medium di coltura.

6 Anticorpi utilizzati

Per gli esperimenti condotti sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- anticorpo monoclonale di topo diretto contro il trasportatore vescicolare dell'acido γ -ammino-butirrico (GABA), vGat, 1:100 per IF e 1:1000 per WB.(Synaptic Systems).

- anticorpo policlonale di coniglio diretto contro trasportatore vescicolare dell'acido glutammico, vGlut-1, diluito 1:100 per IF e 1:1000 per WB (Synaptic Systems).
- anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la proteina fibrillare acida (GFAP) diluito 1:200 per IF e 1:2000 per WB, (Dako)
- anticorpo policlonale di coniglio diretto contro il co-trasportatore del cloro (KCC2) diluito 1:100 per IF e 1:1000 per WB (Abcam)
- anticorpo monoclonale di topo diretto contro β III-tubulina, diluito 1:150 per IF e 1:1000 per WB (Sigma).
- anticorpo monoclonale di topo diretto contro NG2, diluito 1:100 (Abcam)
- anticorpo monoclonale di topo diretto contro O4, diluito 1:100 (Millipore)
- anticorpo monoclonale di topo diretto contro MBP, diluito 1:200 per IF e 1:1000 per WB (Chemicon)
- anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD29 coniugato a PE-CY7 (clone HMb1-1; Biolegend) diluito 1:100 per esperimenti di FACS
- anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD90 coniugato fluorescina (FITC) (clone OX-7; Biolegend) diluito 1:100 per esperimenti di FACS
- anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD34 coniugato a PE (clone ICO115; Santa Cruz) diluito 1:100 per esperimenti di FACS
- anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD45 biotinilato (clone OX-1; Biolegend) diluito 1:100 per esperimenti di FACS

Per la rilevazione degli anticorpi primari utilizzati sono invece stati utilizzati i seguenti anticorpi secondari:

- anticorpo di capra contro IgG di topo coniugato ai fluorocromi Alexa Fluor 488 o Alexa fluor 594 (Molecular Probes)
- anticorpo di capra contro IgG di ratto coniugato al fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)
- anticorpo di capra contro IgG di coniglio coniugato con Alexa Fluor 594 (Molecular Probes)
- anticorpo di capra diretto contro IgG di topo, coniugato con perossidasi (Pierce), diluito 1:10000
- anticorpo di capra diretto contro IgG di coniglio, coniugato con perossidasi (Pierce), diluito 1:5000

- streptavidina coniugata a PerCP (BD Pharmigen, Germany) diluito 1:100 per esperimenti di FACS

7 Trattamenti sul medium delle co-culture

7.1 Trattamento con ArabinosideC (AraC)

L'ArabinosideC (AraC, Sigma-Aldrich) è stato aggiunto, alla concentrazione di 5 μ M, sia ai neuroni mantenuti in coltura con medium condizionato dalle co-culture di neuroni/astrociti e neuroni/MSC, sia ai neuroni mantenuti nelle due condizioni di co-cultura dopo 3 e 7 giorni. Dopo 10 giorni sono state fissate le cellule e analizzate tramite immunofluorescenza per determinare la percentuale delle cellule GFAP positive nelle varie condizioni di coltura e co-cultura (vedi Risultati). Per ogni esperimento sono stati analizzati 10 campi.

Inoltre, l'AraC (Sigma-Aldrich) è stato aggiunto, alla concentrazione di 5 μ M, ai neuroni mantenuti in coltura con medium condizionato dalle co-culture di neuroni/astrociti e neuroni/MSC dopo 3 e 7 giorni di coltura. Le cellule sono state fissate a 10 giorni di coltura e sottoposte ad analisi di immunofluorescenza per determinare il numero dei neuroni vGat positivi rispetto al totale delle sinapsi (vedi Risultati). Per ogni esperimento sono stati analizzati 20 campi.

7.2 Trattamento con tripsina

Il medium condizionato da co-culture di neuroni/astrociti e neuroni/MSC è stato trattato con tripsina (Sigma) 100 ng/ml per 1 ora e successivamente con l'inibitore della **tripsina** della soia (trypsin soybean inhibitor, Sigma) alla medesima concentrazione per un'ora in modo da inattivare l'azione dell'enzima.

Il terreno così trattato è stato aggiunto a colture di neuroni a 3 e 7 giorni di coltura e le cellule sono state poi fissate a 10 DIV.

7.3 Trattamento con K252a

Le colture di neuroni sono state mantenute in presenza di K252a (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 200 nM, a partire da 3 DIV e rinnovando il trattamento a 7 e 10 DIV.

Dopo il trattamento le cellule sono state fissate a 7, 10 e 14 DIV e analizzate tramite immunofluorescenza.

Per le colture di OL, il K252a è stato aggiunto sia a diverse concentrazioni (somministrato in diversi esperimenti con dosi decrescenti da 200 nM fino a 0,1 nM), sia con differenti tempistiche (somministrato sia dal giorno della piastratura che dopo 3 DIV).

7.4 Trattamento con TrkB-Fc

Il TrkB-Fc (R&D System) è costituito da una proteina ricombinante costituita dalla sequenza amminoacidica corrispondente al dominio extracellulare del recettore Trk B fusa con la regione Fc dell'immunoglobulina, in grado di bloccare selettivamente l'effetto del BDNF.

Questo *scavenger* è stato aggiunto al medium condizionato prelevato dalle co-colture di neuroni/astrociti e neuroni/MSC, alla concentrazione di 10 nM, a partire da 3 DIV e rinnovando il trattamento a 7 e 10 DIV. Le cellule sono state fissate dopo 10 e 14 giorni di coltura e analizzate tramite immunofluorescenza.

8 Metodi utilizzati per l'analisi dei dati ottenuti

Per quantificare le presinapsi positive per vGlut-1 e vGat, rispettivamente marcatori delle presinapsi eccitatorie e inibitorie, sono state acquisite immagini confocali analizzando le intensità di fluorescenza emesse sia da vGlut-1 (in rosso), che da vGat (in verde), prestando attenzione a mantenere costanti i settaggi di acquisizione tra i diversi esperimenti. I valori di densità ottica totale ottenuti tramite il software Metamorph® nei canali in rosso e in verde rappresentano, rispettivamente, la densità presinaptica eccitatoria e inibitoria. I risultati sono mostrati come la percentuale delle sinapsi GABAergiche (vGat) rispetto al totale delle sinapsi (vGat + vGlut-1).

L'analisi densitometrica delle bande ottenute tramite analisi di Western immunoblotting è stata ottenuta utilizzando la *plug-in* "gel analysis" del software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

9. Analisi statistiche

Tutti i risultati ottenuti sulle colture mantenute in presenza di MSC (o del CM) sono stati normalizzati per quelli ottenuti da colture di controllo mantenute in presenza di astrociti ed espressi come media \pm SEM dei vari esperimenti. La significatività statistica degli stessi è stata calcolata applicando il t-test di Student, valutando come parametro di inclusione $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

RISULTATI

1 Valutazione degli effetti delle cellule staminali mesenchimali sui neuroni ippocampali

La prima parte dei risultati ottenuti si è focalizzata sullo studio del ruolo che le MSC svolgono nella regolazione della sinaptogenesi GABAergica su neuroni ippocampali posti in coltura.

Per questi esperimenti sono stati utilizzati due modelli *in vitro* in cui i neuroni sono stati fatti crescere in una co-coltura, definita a “sandwich”, e uno in cui sono stati mantenuti in presenza di un medium condizionato da co-culture parallele.

Le co-culture analizzate sono composte da neuroni posti su un monostrato di MSC paragonate a una condizione di controllo, nella quale i neuroni sono stati fatti crescere su un monostrato di astrociti. Gli astrociti sono usati come parametro di controllo in tutti gli esperimenti svolti, in quanto questo tipo di coltura simula una situazione più vicina a quella fisiologica in cui crescono e si sviluppano i neuroni. In entrambi i casi, i neuroni sono piastrati su vetrini dotati di spaziatori di paraffina affinché le cellule comunichino tra loro solamente tramite fattori solubili rilasciati nel terreno di coltura (si veda Materiali e Metodi, par. 2), senza essere a diretto contatto.

Nel secondo modello utilizzato i neuroni ippocampali vengono mantenuti in assenza del monostrato cellulare di supporto, ma in presenza di terreno di crescita condizionato (medium condizionato, CM) prelevato da co-culture mantenute in parallelo. Nel medium condizionato sono presenti tutti i fattori rilasciati dalle cellule in co-coltura, necessari per garantire la sopravvivenza e il supporto trofico ai neuroni cresciuti senza monostrato. I neuroni analizzati sono stati fatti crescere in coltura fino a un massimo di 14 giorni (DIV, *days in vitro*) e tipicamente le analisi sono state effettuate a 7, 10 e 14 DIV.

1.1 Controllo dei marcatori tipici delle cellule staminali espressi dalle MSC in coltura

Le MSC utilizzate sono ottenute a partire da cellule estratte dal midollo osseo di tibia e femore di ratti adulti secondo un protocollo noto e ampiamente utilizzato nella letteratura scientifica (Lennon and Caplan, 2006).

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che le MSC da noi utilizzate dopo il loro isolamento e mantenimento in coltura sono in grado di differenziare in alcune delle linee cellulari tipiche di queste staminali come gli adipociti e i condrociti (Mauri et al., 2012).

Per valutare se le MSC mantenessero il loro potenziale staminale durante la loro espansione *in vitro* con un terreno che ne consente sia la sopravvivenza che il mantenimento delle loro capacità staminali, è stata eseguita un'analisi tramite citofluorimetria a flusso (FACS) del profilo fenotipico delle MSC dopo 4 passaggi (P4).

Abbiamo quindi quantificato l'espressione di specifici marcatori, secondo quanto presente in letteratura, come CD29 e CD90, per i quali le MSC nel loro stato indifferenziato risultano generalmente positive, e CD34 e CD45, marcatori tipici della linea ematopoietica, che le MSC non dovrebbero esprimere. Come atteso, l'analisi ha rivelato un'alta percentuale di cellule positive per i marcatori CD29 e CD90 (95.2% e 94.8% rispettivamente) e la quasi totale assenza di cellule positive per i marcatori CD34 e CD45 (0.2% e 0.3% rispettivamente) (Fig.20).

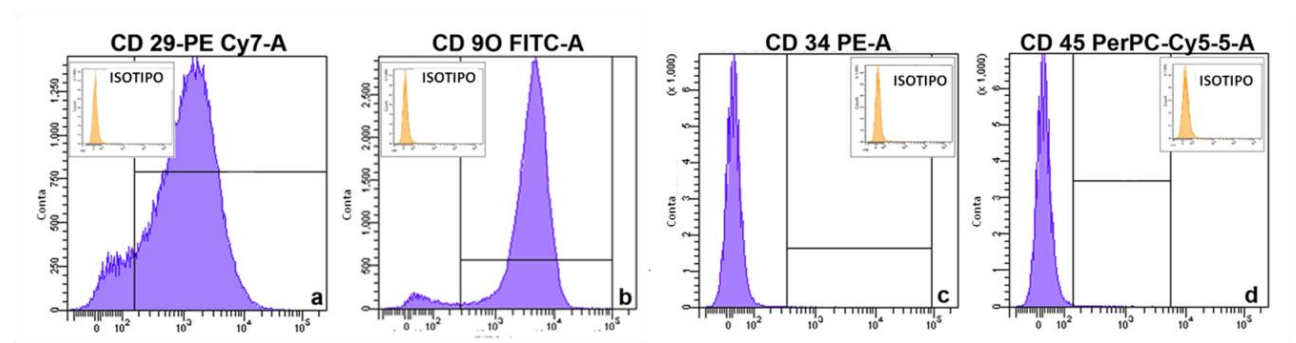


Fig. 20 Analisi al FACS effettuata su MSC estratte dal midollo osseo di tibia e femore di ratto adulto (P4). I grafici mostrano i livelli di cellule positive per CD29 e CD90 (a e b), utilizzati come marcatori di staminalità, e di CD34 e CD45 (c e d), utilizzati per identificare l'eventuale contaminazione di cellule ematopoietiche. Nei riquadri sono riportati i grafici del segnale registrato nei controlli isotipici utilizzati per settare i livelli di soglia nell'analisi.

Questi dati dimostrano che le nostre condizioni di coltura garantiscono il corretto sviluppo delle MSC, anche dopo 4 passaggi, senza alterarne il potenziale staminale.

1.1.2 Controllo dei marcatori delle cellule staminali espressi dalle MSC in co-cultura

Le MSC poste in co-cultura sono soggette a stimoli differenti rispetto a quelle cresciute nelle condizioni di espansione, a partire dal medium stesso di coltura, ma anche per i fattori trofici e i metaboliti rilasciati dai neuroni che potrebbero alterare l'identità fenotipica delle MSC. Per accertarsi che questo non si verifica nel nostro modello sperimentale, per

prima cosa è stata eseguita un'analisi del profilo fenotipico tramite FACS sulle MSC mantenute in presenza di neuroni per 3 e 10 giorni. Anche in questo caso è stata valutata la percentuale di cellule positive per i marcatori CD29, CD90, CD34 e CD45.

L'analisi ha rivelato che, ad entrambi i tempi analizzati, le MSC mostrano un'elevata positività per i marcatori CD29 e CD90 (98.6% e 95.9% a 3 DIV e 95.5% e 98.8% a 10 DIV), mentre restano negative per l'espressione dei marcatori CD34 e CD45 (0.1% e 0.4% a 3 DIV e 0.5% e 0.7% a 10 DIV) (Fig.21).

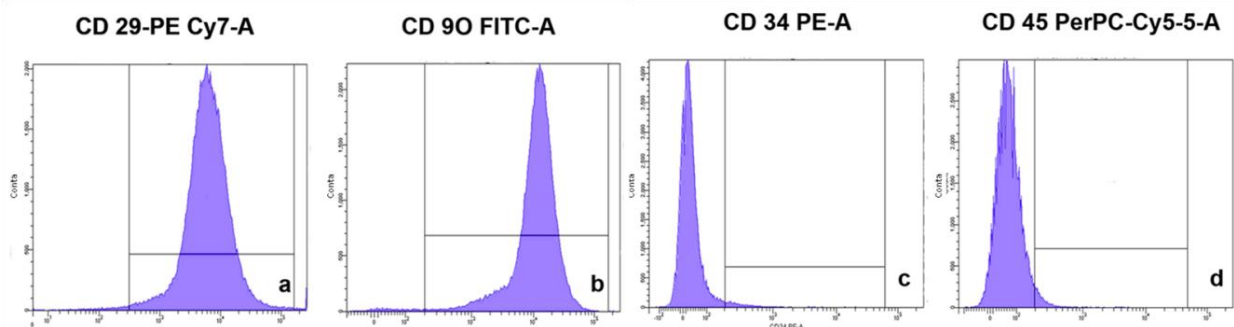


Fig. 21 Analisi al FACS effettuata su MSC mantenute in co-coltura con i neuroni per 10 giorni: i grafici relativi a CD29 e CD90 (a e b) mostrano i livelli registrati per i marcatori di staminalità, CD34 e CD45 (c e d) identificano al contrario la contaminazione da cellule ematopoietiche. I risultati ottenuti a 3 DIV sono del tutto sovrapponibili a quelli mostrati.

Questi risultati indicano che le MSC, mantengono il loro potenziale staminale anche quando poste in co-coltura con i neuroni almeno per 10 giorni, tempo in cui è stata eseguita la gran parte degli esperimenti.

Come descritto nell'introduzione (par. 1.3) le cellule staminali mesenchimali mostrano un potenziale di differenziamento multipotente e in alcuni studi si ritiene che esse, se poste nelle corrette condizioni di crescita, siano in grado di *trans-differenziare* in cellule della linea neuronale (Liu et al., 2009). Per dimostrare che le MSC, mantenute in co-coltura con i neuroni non vanno incontro a un trans-differenziamento neuronale o gliale, è stata eseguita un'analisi di Western immunoblotting su un lisato cellulare derivante da MSC mantenute in co-coltura per 10 giorni, per valutare i livelli di espressione di due proteine usate come marcatori per le cellule neurali: la proteina gliale acida fibrillare, tipicamente espressa dagli astrociti (GFAP) (Fig. 22) e la β III-tubulina, un marcatore specifico neuronale (Fig. 23). Come controllo positivo sono stati utilizzati lisati proteici di astrociti corticali provenienti dal monostrato delle co-culture di riferimento, mantenuti in presenza dei neuroni per 10 giorni, o lisati di neuroni ippocampali.

I risultati mostrano che la GFAP è rilevabile nel lisato ottenuto dagli astrociti, come atteso, mentre è assente nel campione derivato dall'estratto proteico del monostrato di MSC (Fig. 22).

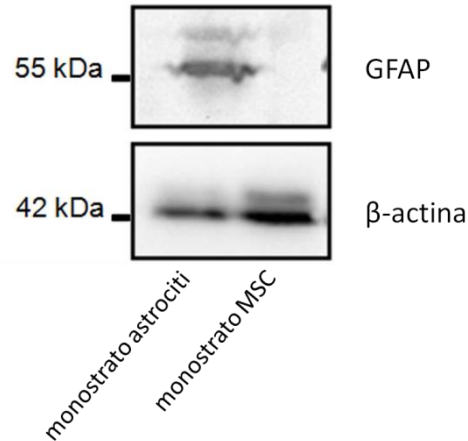


Fig. 22 Analisi mediante Western immunoblotting dei livelli di espressione di GFAP in lisati cellulari di astrociti corticali (controllo positivo) e MSC dopo 10 giorni di co-cultura con i neuroni. In basso è mostrata la banda dell'actina utilizzata come standard di riferimento per normalizzare i dati sulla quantità di proteine caricate.

Analogamente, la β III-tubulina, è espressa nei lisati cellulari di neuroni, mentre è assente nelle MSC (Fig. 23).

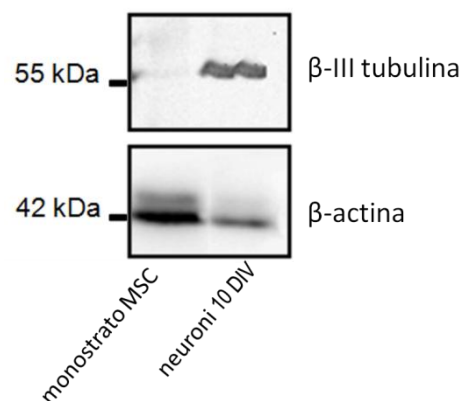


Fig. 23 Analisi mediante Western immunoblotting dei livelli di espressione di β III-tubulina su lisati cellulari di neuroni ippocampali a 10 DIV (controllo positivo) e su lisati cellulari di MSC dopo 10 giorni di co-cultura con i neuroni. In basso è mostrata la banda dell'actina utilizzata come standard di riferimento.

I dati ottenuti sono a favore di un mantenimento delle caratteristiche staminali delle MSC anche quando poste in co-cultura con i neuroni.

2 Le MSC potenziano la trasmissione GABAergica

Una prima analisi degli effetti delle MSC sui neuroni ippocampali posti in co-coltura aveva dimostrato che queste cellule sono in grado supportarne la crescita sia dal punto di vista morfologico, che funzionale in un modo del tutto paragonabile a quanto osservato nelle co-coltura di controllo utilizzate (neuroni/astrociti), suggerendo un'interazione attiva tra le MSC (Mauri et al., 2012).

Partendo da questi risultati, le indagini svolte si sono focalizzate sull'analisi della formazione di sinapsi inibitorie ed eccitatorie in neuroni posti in co-coltura rispetto a quelli posti in co-coltura con gli astrociti.

Per valutare eventuali differenze, neuroni posti in presenza di MSC o di astrociti sono stati sottoposti a immunomarcatura utilizzando due anticorpi diretti contro i trasportatori vescicolari per il glutamato (vGlut-1) e per il GABA (vGat), in modo da identificare in maniera selettiva tutte le pre-sinapsi glutamatergiche e GABAergiche, rispettivamente (Fig. 24).

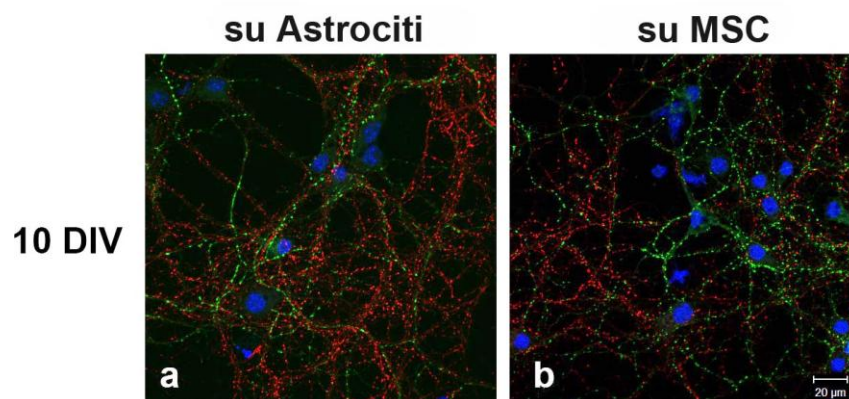


Fig. 25 Immagine rappresentativa di neuroni ippocampali a 10 DIV cresciuti in presenza di un monostrato di astrociti (a) o MSC (b) e sottoposti a immunomarcatura utilizzando anticorpi diretti contro il trasportatore vescicolare per il GABA (vGat, in verde) e contro il trasportatore vescicolare per il glutamato (vGlut-1, in rosso); in blu sono evidenziati i nuclei mediante marcatura con il DAPI; barra di calibrazione: 20 μm.

Da un'analisi semiquantitativa emerge che la percentuale delle sinapsi vGat-positive sul totale delle sinapsi (vGAT+vGlut1) è più alta nei neuroni mantenuti in co-coltura con le MSC, rispetto a quanto ottenuto su neuroni mantenuti in co-coltura di controllo (Fig. 26) (incremento delle presinapsi vGat positive in neuroni mantenuti in co-coltura con le MSC: $282\% \pm 8.14$; 15 campi analizzati per esperimento; n=3 esperimenti indipendenti; $p < 0.01$).

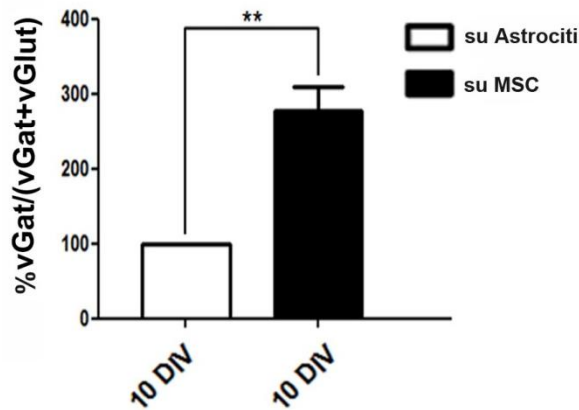


Fig. 26: Analisi semi-quantitativa della densità ottica generata dalle sinapsi vGat-positive sul totale delle sinapsi (vGat + vGlut-1), ottenuta da neuroni cresciuti sia su MSC (barra nera) che su astrociti.

Il valore delle co-culture di controllo è stato considerato come parametro di raffronto e impostato come 100% (barra bianca).

L'aumento delle pre-sinapsi GABAergiche appena descritto è stato poi valutato anche mediante la determinazione dei livelli di espressione di vGat in lisati cellulari di neuroni ippocampali mantenuti nelle due condizioni di co-cultura a 10 e 14 DIV (Fig. 27).

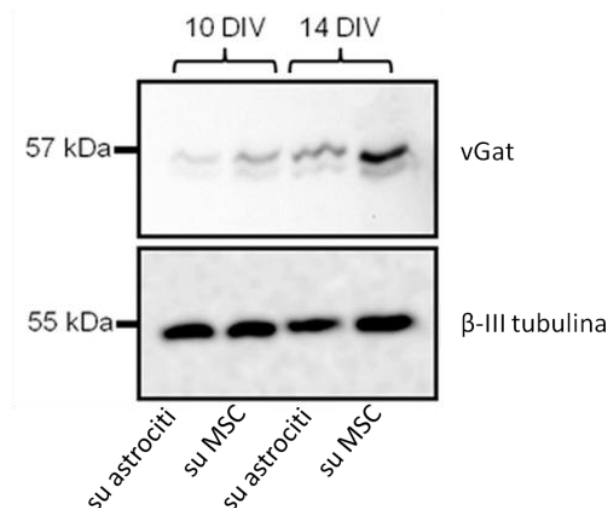


Fig. 27: Immagine rappresentativa del Western immunoblotting dei lisati cellulari di neuroni ippocampali che mostra un'aumentata espressione di vGat nelle co-culture con MSC, rispetto alle co-culture con astrociti; la banda della β -III tubulina è stata utilizzata come controllo dei livelli proteici totali caricati.

L'analisi densitometrica delle bande ottenute mediante Western immunoblotting, mostrano un incremento statisticamente significativo dei livelli di espressione di vGat nei lisati cellulari di neuroni mantenuti in co-cultura su monostrato di MSC, rispetto alla condizione

di controllo, confermando i risultati precedenti. Inoltre, a 14 DIV si può osservare un ulteriore incremento di vGAT (Fig. 28).

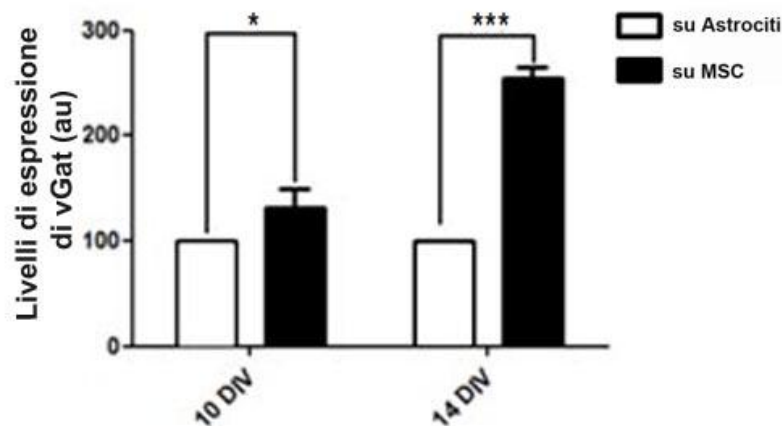


Fig. 28: Analisi densitometrica del segnale di vGat ottenuta su neuroni cresciuti sia su MSC (barra nera), che su astrociti. Il valore delle co-culture di controllo è stato considerato come parametro di raffronto e impostato come 100% (barra bianca (n=3, p<0.05: p<0.001).

2.1 Le MSC non variano la trasmissione glutamatergica nei neuroni in co-cultura

Oltre alle variazioni osservate per le sinapsi GABAergiche, è stata eseguita la stessa analisi valutando se le MSC modulano anche l'espressione delle proteine vescicolari glutamatergiche nelle co-culture o piuttosto se il loro effetto fosse specifico per le proteine vescicolari di tipo inibitorio.

L'analisi è stata fatta su co-culture valutando i livelli di espressione di vGlut-1 tramite immunofluorescenza, rapportando i livelli di segnale generati da questa proteina rispetto al segnale generato dal totale delle sinapsi (vGAT+vGlut, Fig. 29)

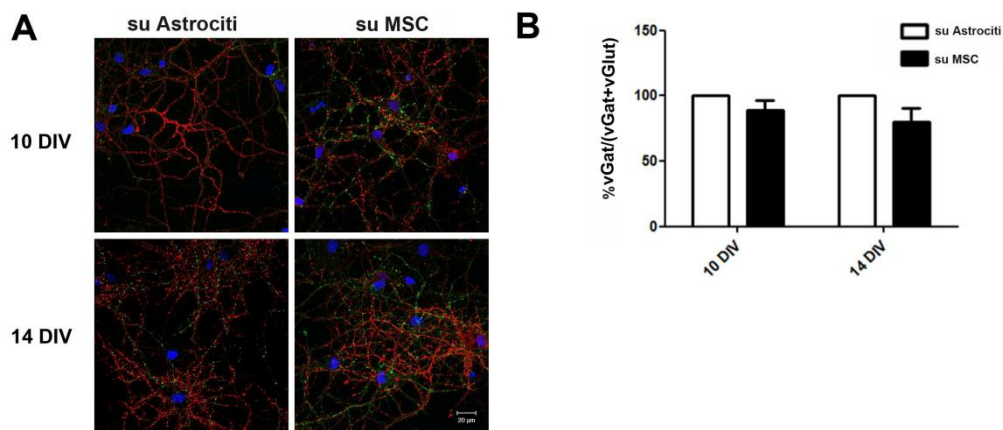


Fig 29: (A) Immagine rappresentativa di neuroni ippocampali a 10 e 14 DIV cresciuti in co-coltura con astrociti (pannelli di sinistra) o MSC (pannelli di destra) e sottoposti a immunomarcatura utilizzando anticorpi diretti contro il trasportatore vescicolare per il GABA (vGat, in verde) e contro il trasportatore vescicolare per il glutamato (vGlut-1, in rosso); in blu sono evidenziati i nuclei mediante marcatura con il DAPI; barra di calibrazione: 20 µm.

(B) Analisi semi-quantitativa della densità ottica registrata per le presinapsi positive per vGlut-1 sul totale delle sinapsi (vGat + vGlut-1) misurata su neuroni cresciuti sia su MSC (barra nera) che su astrociti. Il valore delle co-culture di controllo è stato considerato come parametro di raffronto e impostato come 100% (barra bianca, n=3).

2.2 L'aumento delle pre-sinapsi GABAergiche è un effetto diretto della comunicazione tra neuroni e MSC

Dati precedenti del nostro laboratorio hanno dimostrato che le funzioni di supporto trofico che le MSC svolgono sui neuroni sono mediate in modo indiretto dagli astrociti. Infatti è l'aumentata proliferazione delle cellule gliali sui vetrini di neuroni posti in co-coltura promossa dalle MSC a svolgere questi effetti (Mauri et al., 2012).

Per valutare se anche l'aumento delle pre-sinapsi GABAergiche fosse dovuto a una proliferazione delle cellule gliali indotta dalle MSC, le co-culture nelle diverse condizioni in esame, sono state trattate aggiungendo al medium l'arabinosideC (AraC, 5 µM), un agente antimittotico in grado di bloccare la crescita delle cellule in proliferazione.

L'AraC è stato aggiunto per 7 giorni sia alle co-culture (MSC/neuroni e astrociti/neuroni, Fig. 30, pannelli di sinistra), sia a neuroni mantenuti in assenza di monostrato cellulare di

supporto, ma in presenza di medium condizionato dalle due co-culture mantenute in parallelo (Fig. 30 pannelli di destra). Quest'ultimo trattamento è stato effettuato in modo da garantire che gli effetti osservati fossero dovuti all'azione dell'Ara-C sulle colture di neuroni e non da un suo effetto sui monostrati cellulari di supporto. Abbiamo, quindi, eseguito un saggio immunocitochimico utilizzando anticorpi diretti contro la β III-tubulina, per visualizzare i neuroni, e anticorpi diretti contro la GFAP espressa esclusivamente dagli astrociti, allo scopo di quantificare la percentuale astrociti presenti nei campioni trattati con AraC rispetto al controllo.

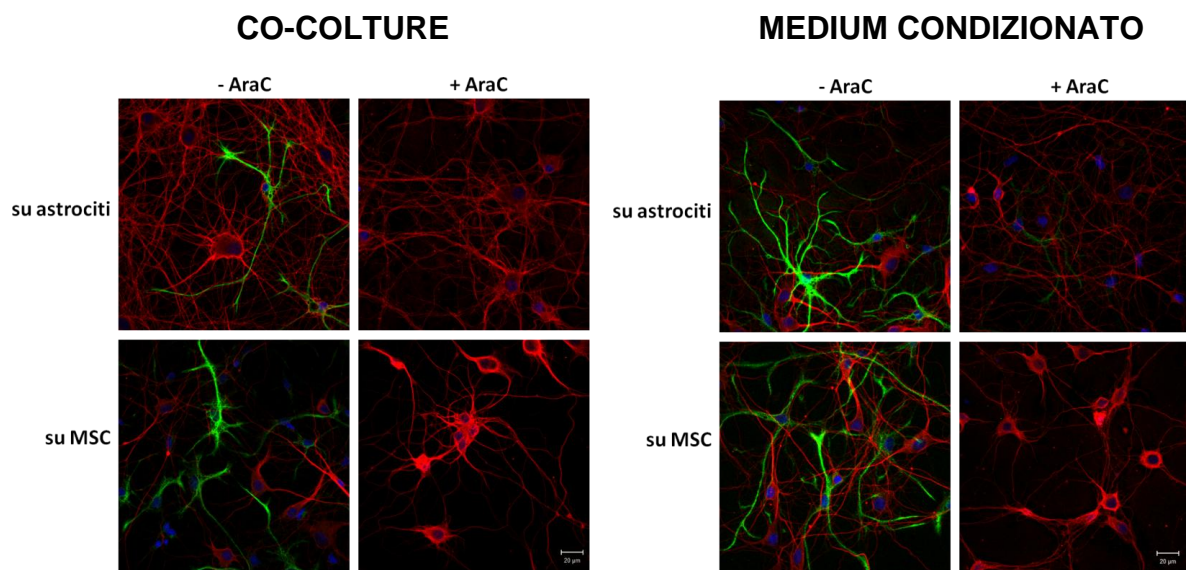


Fig. 30: Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza eseguita su neuroni controllo (-AraC) e trattati (+AraC) con AraC a 10 DIV, mantenuti in co-cultura (pannelli di sinistra) e mantenuti in coltura con medium condizionato (pannelli di destra). Gli astrociti sono stati marcati con anticorpi contro GFAP (verde), mentre i neuroni con anticorpi contro la β -III tubulina (rosso). Barra di calibrazione 20 μ m.

Il numero delle cellule gliali, GFAP positive, è stato valutato rispetto al numero totale di cellule individuate tramite la marcatura con il DAPI. L'analisi semiquantitativa (Fig. 31) mostra come, in presenza di AraC, si può osservare una ridotta presenza di cellule gliali, sia nelle co-culture (neuroni/MSK e neuroni/astrociti, pannello A), sia nelle colture mantenute con il *medium* condizionato (Fig. 31 pannello B) rispetto al controllo: percentuale delle cellule GFAP-positive normalizzate sul controllo in co-culture su astrociti 1.85 ± 0.12 e su MSK 2.10 ± 0.09 e percentuale delle cellule GFAP-positive normalizzate sul controllo in colture mantenute in *medium* condizionato da astrociti/neuroni 2.3 ± 0.11 e da MSK/neuroni 1.95 ± 0.05 .

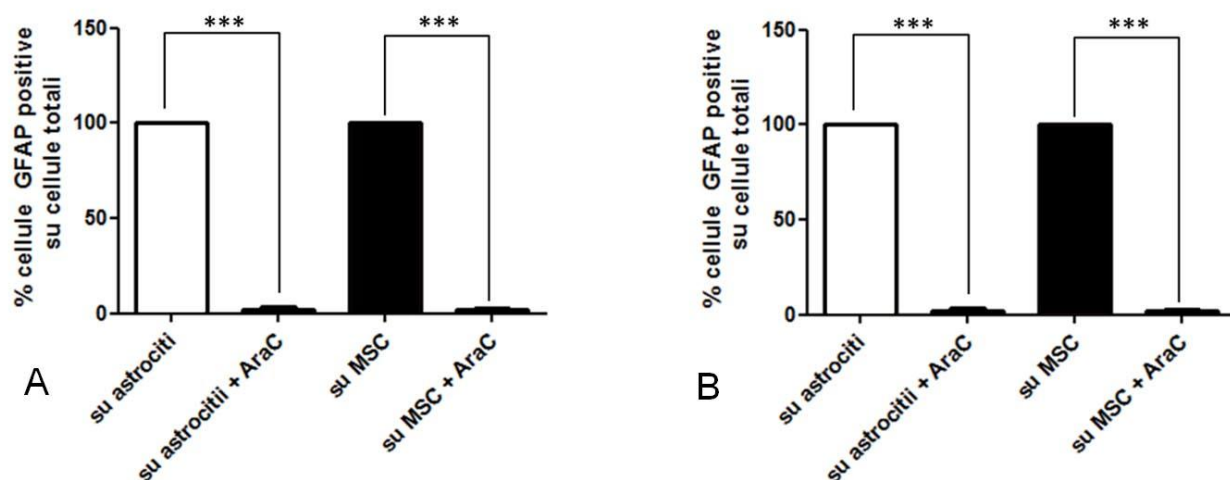


Fig. 31 Analisi del numero delle cellule gliali valutate come numero di cellule GFAP positive sul totale delle cellule nelle colture di neuroni ippocampali mantenuti per 10 giorni in co-coltura (A) o in medium condizionato (B), sia in assenza che in presenza di AraC. I dati riportati rappresentano la media di tre differenti preparazioni di neuroni ippocampali, 10 campi per preparazione; $p < 0,001$

Dopo aver verificato che il trattamento con AraC è in grado di bloccare la crescita degli astrociti dalle colture di neuroni, abbiamo valutato se l'incremento del numero dei terminali presinaptici GABAergici indotto dalle MSC si ripropone anche in neuroni fatti crescere in medium condizionato in presenza dell'agente antimittotico. I neuroni ippocampali, mantenuti in coltura per 10 giorni nel *medium* condizionato da co-culture parallele di neuroni/astrociti e neuroni/MSC, trattati con AraC 5 μ M sono quindi stati sottoposti a una doppia marcatura utilizzando anticorpi contro vGat, e vGlut-1, per visualizzare il numero delle sinapsi vGat positive sul totale (Fig. 32 A).

Dall'analisi semiquantitativa ottenuta da tre diversi esperimenti (15 campi analizzati per esperimento) si osserva che, il numero dei terminali presinaptici GABAergici è maggiore nei neuroni mantenuti in coltura con CM da co-culture di neuroni/MSC, rispetto a quelli mantenuti con CM da co-culture di neuroni/astrociti, nonostante la quasi totale assenza di cellule gliali in entrambi i campioni (percentuale delle sinapsi vGat positive su neuroni in CM da co-culture di neuroni/MSC rispetto a quelle registrate su neuroni in CM da co-culture di neuroni/astrociti: 264.4 ± 50.8 ; $p < 0.05$) (Fig. 32 B).

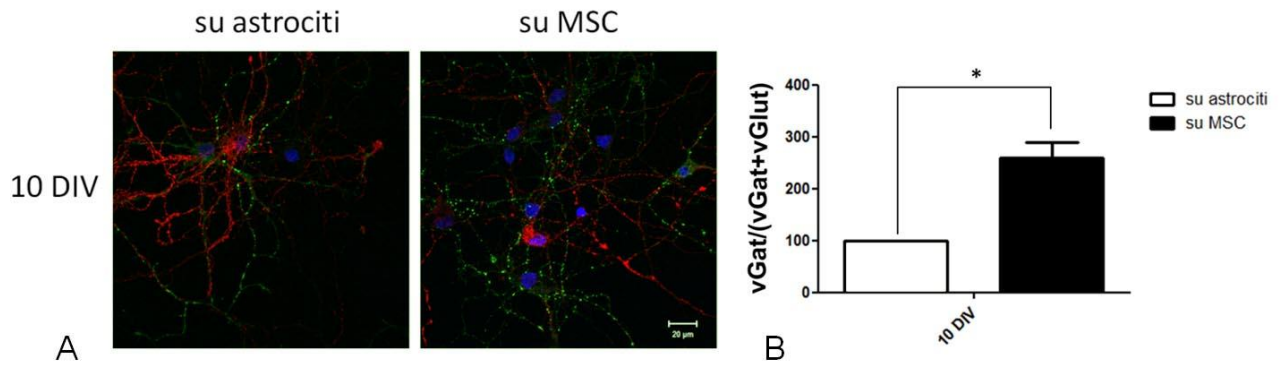


Fig. 32: A: Immagine rappresentativa di neuroni in coltura con CM da co-culture di neuroni/MSc e da co-culture di neuroni/astrociti a 10 DIV, dopo trattamento con AraC: i terminali presinaptici GABAergici sono stati visualizzati grazie a un anticorpo anti vGat (verde) mentre i terminali presinaptici glutamatergici sono stati visualizzati con anticorpo anti vGlut (rosso). Barra di calibrazione 20 µm.

B: Analisi semi-quantitativa della densità ottica registrata per le presinapsi vGlut-1 positive sul totale delle sinapsi (vGat + vGlut-1) ottenuta dall'analisi di neuroni cresciuti sia su MSC (barra nera) che su astrociti. Il valore delle co-culture di controllo è stato considerato come parametro di raffronto e impostato come 100% (barra bianca (n=3, p<0,05)).

Questi dati confermano che le MSC promuovono un incremento del numero dei terminali presinaptici GABAergici in neuroni ippocampali e che tale effetto si realizza tramite un meccanismo d'azione diretto, non mediato dalle cellule gliali.

2.3 L'aumento delle pre-sinapsi GABAergiche si correla ad un aumento della trasmissione inibitoria dei neuroni in coltura.

Per verificare se l'aumento dei terminali presinaptici GABAergici indotto dalle MSC fosse correlato a una maggiore trasmissione inibitoria, abbiamo, per prima cosa, valutato i livelli di espressione del co-trasportatore post-sinaptico neuronale per il K⁺ e il Cl⁻ (KCC2) che regola i potenziali elettrochimici del cloro a livello neuronale. Durante le fasi di maturazione dei neuroni il KCC2, è infatti coinvolto nella modificazione della loro funzionalità: la sua espressione modifica la trasmissione neuronale prodotta dalle sinapsi GABAergiche da una di tipo eccitatorio a una di tipo inibitorio tipica dei neuroni maturi (Ben-Ari et al., 1997, Rivera et al., 1999, Hübner et al., 2001a).

Attraverso un'analisi immunocitochimica abbiamo visto che l'espressione di KCC2, in neuroni ippocampali a 14 DIV cresciuti su MSC, era maggiore rispetto a quella riscontrata su neuroni mantenuti su astrociti (Fig 33 A).

I livelli di espressione del KCC2 sono stati quindi analizzati attraverso un'analisi di Western immunoblotting su lisati cellulari di neuroni a 14 DIV, mantenuti nelle due condizioni di co-coltura. I risultati ottenuti mostrano che le MSC promuovono un aumento dei livelli di KCC2 (Fig. 33 B e C; $p < 0.01$), suggerendo che le sinapsi GABAergiche formate mostrano un profilo per lo più di tipo inibitorio.

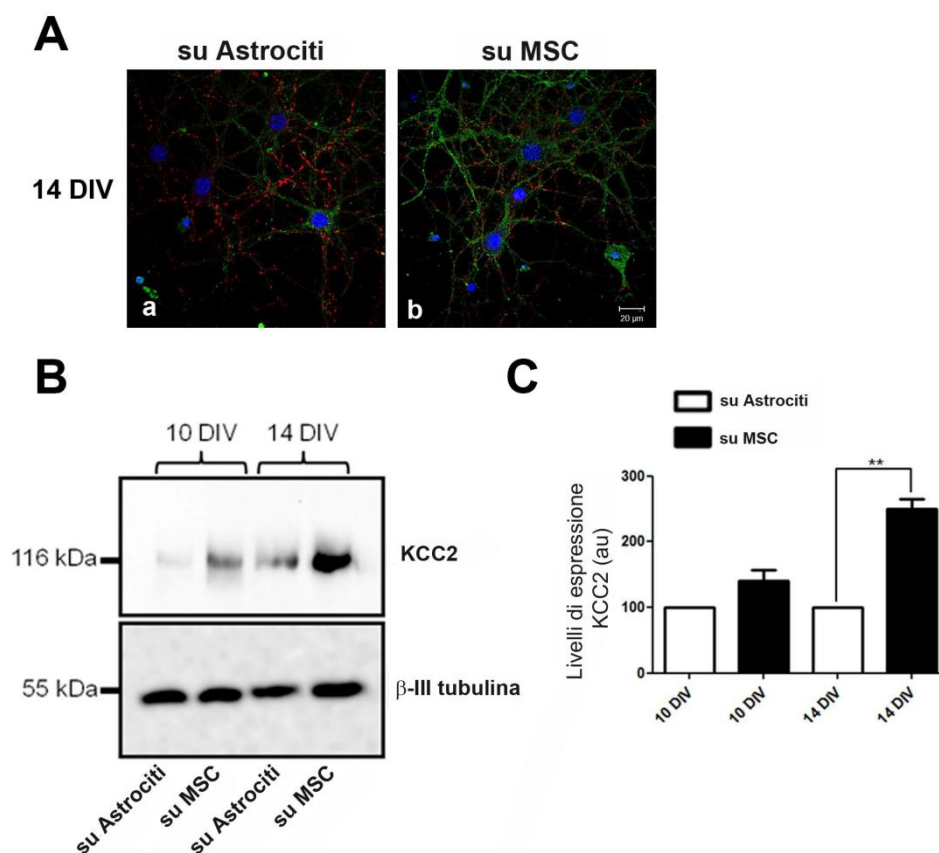


Fig 33: . (A) Immagini rappresentative del saggio immunocitochimico eseguito su neuroni ippocampali a 14 DIV mantenuti in co-coltura sia su monostrato di astrociti (a) che di MSC (b) marcati con un anticorpo contro KCC2 (verde) e con un anticorpo contro vGat (rosso) in modo da marcare le pre-sinapsi GABAergiche.

Dalle immagini è possibile apprezzare una maggiore marcatura di KCC2 sui neuroni cresciuti su MSC (b) rispetto a quelli cresciuti su astrociti (a); barra di calibrazione: 20 μ m.

(B) Western immunoblotting rappresentativo che mostra un aumentato livello di espressione di KCC2 sia nei lisati cellulari di neuroni a 10 DIV che in quelli a 14 DIV mantenuti in coltura su MSC. La banda riferita

all'espressione della β -III tubulina è stata utilizzata come controllo per normalizzare i risultati ottenuti in base al quantitativo di proteine caricate.

(C) Analisi densitometrica delle bande generate dai livelli di espressione di KCC2 normalizzate per i segnali ottenuti dalla β -III tubulina. ($n=3$; $p<0,01$).

Da ultimo sono state registrate le correnti post-sinaptiche inibitorie spontanee (sIPSCs) e in miniatura (mIPSCs) attraverso analisi di voltage-clamp.

Queste analisi sono state fatte in collaborazione con il laboratorio di elettrofisiologia del Prof. Toselli di Pavia, al quale sono state fornite le co-culture neuronali da analizzare.

Le registrazioni sia delle correnti spontanee (sIPSC, Fig. 34 A) che di quelle in miniatura (mIPSC, Fig. 34 B) hanno confermato che le MSC sono in grado di indurre un aumento della trasmissione inibitoria. Dall'analisi delle correnti eccitatorie è emerso inoltre che non ci sono modificazioni funzionali in neuroni cresciuti su MSC rispetto a quelli cresciuti su astrociti, indicando un effetto specifico delle MSC a carico della trasmissione inibitoria e non di quella eccitatoria (sEPSC, Fig.34 C).

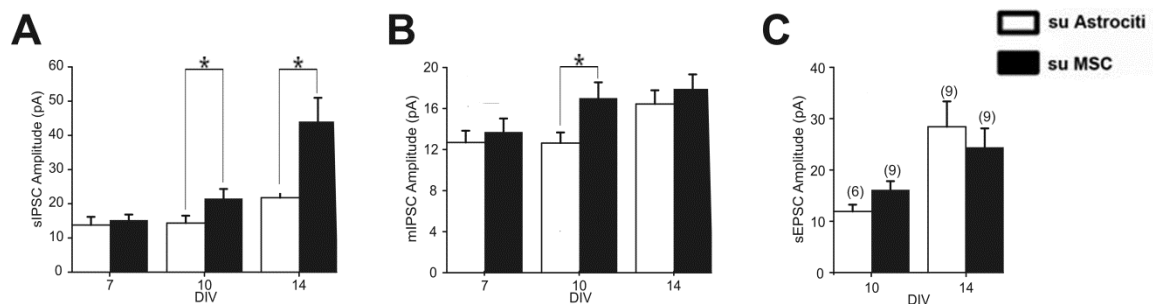


Fig. 34: (A) Media delle ampiezze delle correnti spontanee inibitorie (sIPSC) registrate in neuroni cresciuti in presenza di un monostrato di MSC (a 10 DIV, $n=15$, 21.5 ± 2.8 pA, a 14 DIV, $n=8$, 44.0 ± 6.9 pA barre nere) o di astrociti (a 10 DIV, $n=15$, 14.3 ± 2.1 pA, a 14 DIV, $n=8$, 21.7 ± 2.1 pA, barre bianche).

(B) Media delle ampiezze delle correnti inibitorie in miniatura (mIPSC) registrate in neuroni cresciuti in presenza di un monostrato di MSC (a 10 DIV, $n=18$, 17 ± 1.5 pA, barre nere) o di astrociti (a 10 DIV, $n=11$, 12.6 ± 1 pA, barre bianche).

(c) Media delle ampiezze delle correnti spontanee eccitatorie (sEPSC) registrate in neuroni cresciuti in presenza di un monostrato di MSC (barre nere) o di astrociti (barre bianche) dove non si registrano differenze statisticamente significative; i numeri ripostati tra parentesi sopra le barre dell'istogramma indicano il numero di registrazioni eseguite per ogni singolo punto.

2.4 Identificazione di alcuni fattori rilasciati nel medium responsabili dell'aumento della trasmissione inibitoria GABAergica

Gli esperimenti fatti sulle colture di neuroni in medium condizionato suggeriscono che l'incremento del numero dei terminali presinaptici GABAergici è dovuto a fattori solubili presenti nel medium di coltura, il cui rilascio è probabilmente mediato dalle MSC.

Per studiare più nel dettaglio questi fattori, il medium prelevato da co-culture di neuroni posti su un monostrato di MSC o di astrociti è stato sottoposto a trattamenti specifici prima di essere utilizzato come CM per le colture di neuroni che sono state in seguito analizzate.

2.4.1 Gli effetti delle MSC sulla sinaptogenesi GABAergica sono mediati dal rilascio di proteine nel medium

Per valutare se gli effetti delle MSC sulle colture neuronali fossero dovuti a un rilascio di proteine nel medium di coltura, il medium condizionato prelevato da entrambi i tipi di co-culture è stato trattato con la tripsina (100 ng/ml), un enzima in grado di degradare le proteine ad essa sensibili, prima del suo utilizzo nelle colture di neuroni (si veda Materiali e Metodi par.7.3).

Le cellule neuronali sono quindi state fatte crescere per 10 DIV in presenza di CM trattato con la tripsina ottenuto da co-culture parallele di neuroni/MSC o neuroni/astrociti, e in seguito fissate e sottoposte a un saggio immunocitochimico per analizzate il numero di sinapsi GABAergiche e glutamatergiche (Fig.35).

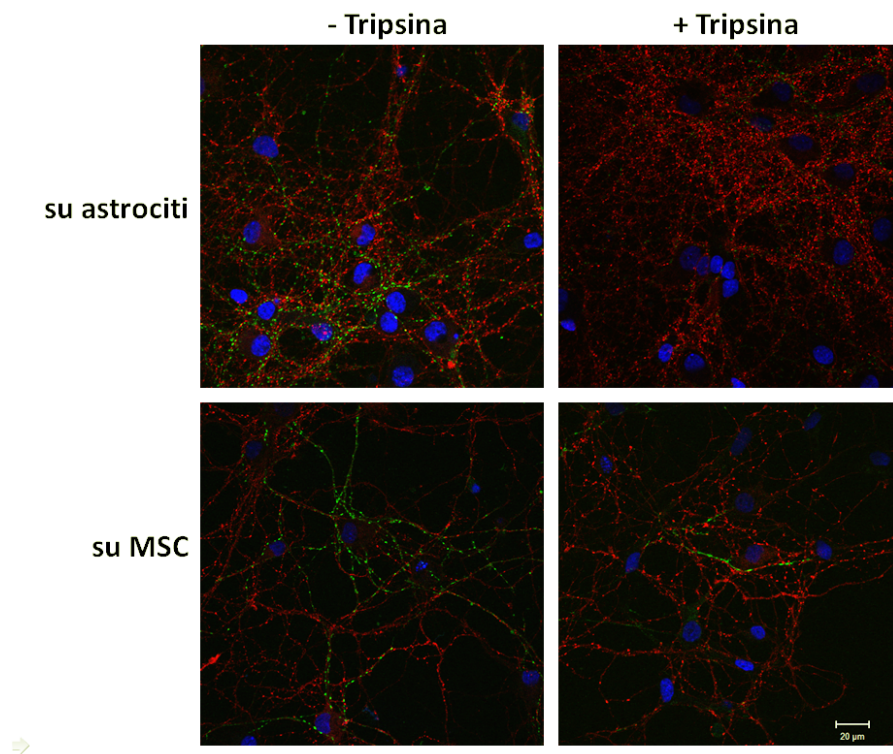


Fig. 35: Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza di neuroni di 10 DIV in coltura con CM da MSC e da astrociti, in condizioni di controllo (-tripsina) o cresciuti un CM trattato con tripsina (+tripsina). I terminali presinaptici GABAergici sono stati visualizzati grazie a un anticorpo anti vGat (verde) mentre i terminali presinaptici glutamatergici sono stati visualizzati con anticorpo anti vGlut (rosso). Barra di calibrazione 20 µm.

L'effetto del trattamento è stato in seguito quantificato attraverso un'analisi della densità ottica generata dai due canali (vGat, in verde + vGlut-1, in rosso) e i dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti hanno confermato che in presenza di CM sottoposto a trattamento con tripsina si verifica una diminuzione dei terminali presinaptici GABAergici in entrambi i tipi di cocoltura (Fig 36; percentuale delle presinapsi GABAergiche sul totale: neuroni su astrociti: 31.6 ± 2.3 ; neuroni su MSC: 28.7 ± 3.8 ; $p < 0,001$).

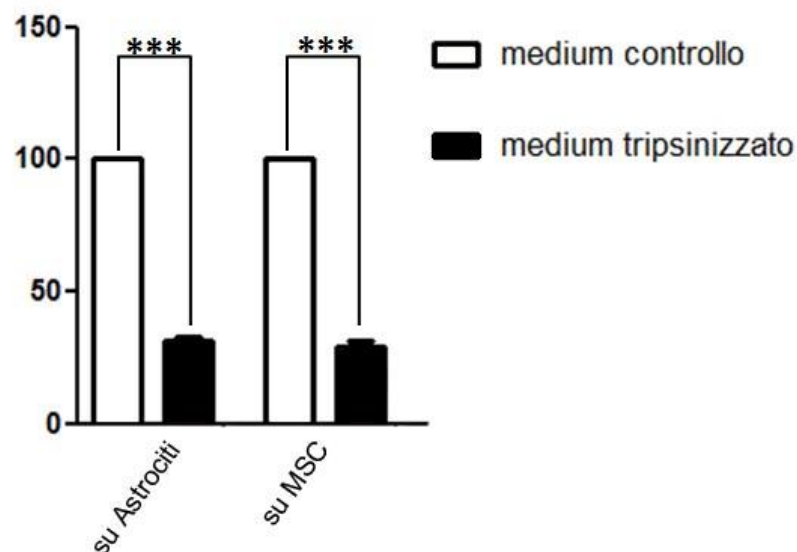


Fig. 36: Analisi semiquantitativa del numero dei terminali presinaptici GABAergici positivi per vGat sul totale (vGat + vGlut-1) in neuroni mantenuti per 10 giorni in coltura con medium condizionato con e senza trattamento con tripsina. (n=3; 15 campi per esperimento; p<0,001)

A seguito del trattamento con tripsina si può concludere che i neuroni in coltura in presenza di CM mostrano una drastica riduzione del numero dei terminali presinaptici GABAergici, suggerendo, pertanto, che alcuni fattori essenziali coinvolti nella formazione e regolazione delle sinapsi inibitorie presenti nel terreno di coltura sono di origine proteica.

2.4.2 Le neurotrofine sono tra le proteine coinvolte in questi meccanismi.

Come menzionato nell'introduzione (par. 2.6) è noto che le neurotrofine (NT) sono coinvolte nella regolazione della trasmissione inibitoria (Elmariah et al., 2005b). Poiché in letteratura è descritto che le MSC sono in grado di rilasciare NT e risultati precedenti ottenuti nel nostro laboratorio hanno confermato che le MSC, mantenute nelle nostre condizioni di coltura, esprimono gli mRNA di alcune NT, quali BDNF e NGF. Per investigare i meccanismi molecolari coinvolti nell'azione esercitata dalle MSC, abbiamo deciso di concentrarci proprio su queste molecole. A tale scopo, al CM in cui crescevano i neuroni è stato aggiunto un bloccante aspecifico dei recettori TrK per le neurotrofine, il K252a (200nM). I neuroni ippocampali mantenuti in coltura con questo terreno sono stati poi analizzati a 10 e 14 DIV, a seguito di una doppia marcatura con anticorpi diretti contro vGat e vGlut-1 (Fig. 37).

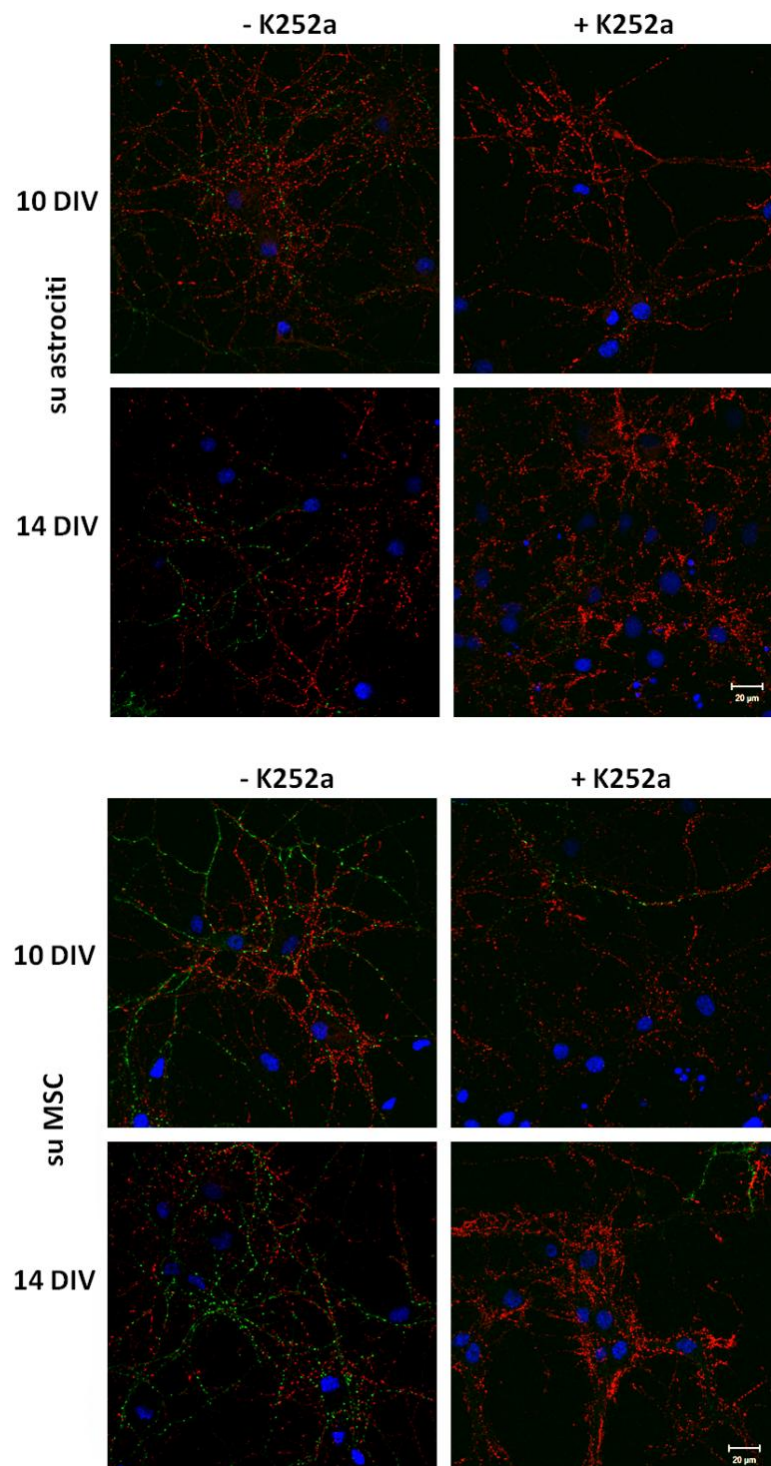


Fig. 37: Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza sui neuroni di 10 e 14 DIV in coltura con CM da co-culture parallele di neuroni/MSK o neuroni/astrociti, in condizioni di controllo (-K252a) o cresciuti in un CM trattato con il bloccante per i recettori Trk (K252a). I terminali presinaptici GABAergici sono stati visualizzati grazie a un anticorpo anti vGat (verde) mentre i terminali presinaptici glutamatergici sono stati visualizzati con anticorpo anti vGlut (rosso). Barra di calibrazione 20 μm.

Come per gli esperimenti precedenti l'effetto del trattamento è stato quantificato attraverso un'analisi della densità ottica generata dai due canali (verde, vGat + rosso, vGlut-1) e i dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti hanno confermato che, in presenza di CM sottoposto a trattamento con K252a, si verifica una diminuzione dei terminali presinaptici GABAergici (Fig 38; percentuale delle presinapsi GABAergiche sul totale: neuroni in CM da co-culture di neuroni/astrociti con K252a: 10DIV 32 ± 10 ; 14DIV 23.4 ± 8.9 , neuroni in CM da co-culture di neuroni/MSK con K252a: 10DIV 20.2 ± 2.9 ; 14DIV 43.6 ± 7.2).

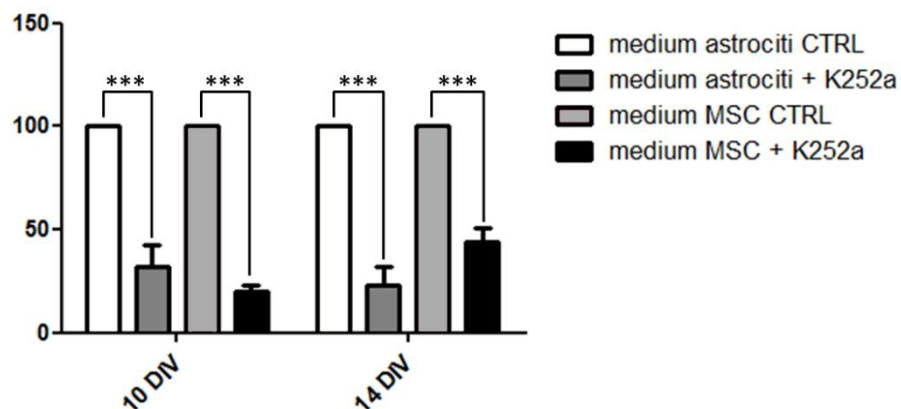


Fig. 38: Analisi semiquantitativa del numero dei terminali presinaptici GABAergici positivi per vGat sul totale (vGat + vGlut-1) in neuroni mantenuti per 10 o 14 DIV in presenza di medium condizionato con e senza trattamento con K252a. (n=3; 15 campi per esperimento; p<0,001)

I dati ottenuti da questi esperimenti indicano, quindi, che il meccanismo d'azione con cui le MSC provocano l'incremento del numero dei terminali presinaptici GABAergici nelle colture di neuroni ippocampali è fortemente influenzato dalle presenza e dall'azione delle neurotrofine.

Le nostre indagini si sono in seguito focalizzate sul fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF). E' infatti riportato in letteratura che il BDNF è fisiologicamente coinvolto nella regolazione dello sviluppo delle sinapsi GABAergiche (Gottmann et al., 2009, Greenberg et al., 2009, Yoshii and Constantine-Paton, 2010). Per capire quindi se l'effetto prodotto dalle MSC sia mediato dal BDNF, abbiamo aggiunto al CM uno *scavenger* selettivo per deprivare il medium di coltura da tale fattore neurotrofico, il TrkB-Fc (10 nM).

I neuroni ippocampali mantenuti in coltura con questo terreno sono stati poi analizzati a 10 e 14 giorni di coltura, a seguito di una doppia marcatura con anticorpi diretti contro vGat e vGlut-1 (Fig. 39).

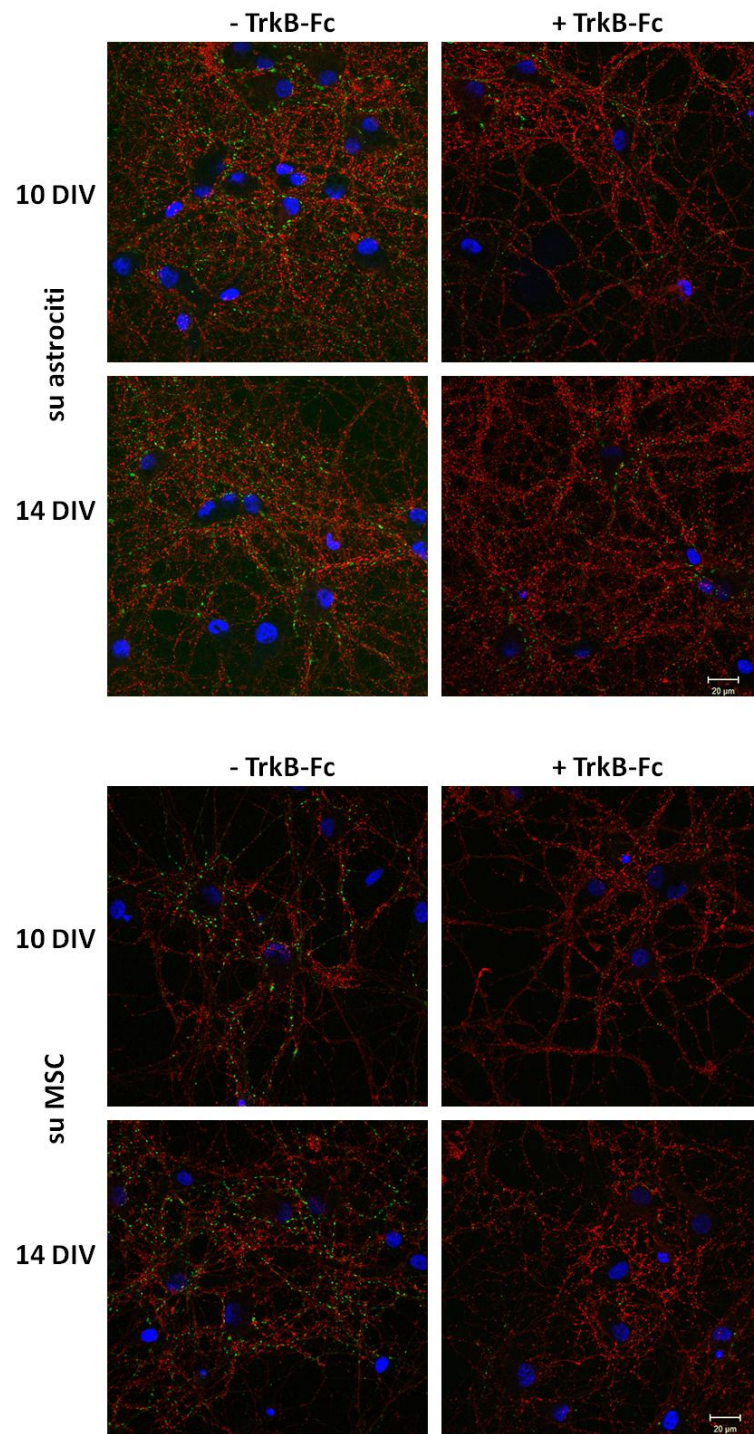


Fig. 39 Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza sui neuroni di 10 e 14 DIV in coltura con CM da co-culture parallele di neuroni/MSc o neuroni/astrociti, in condizioni di controllo (-TrkB-Fc) o cresciuti un CM trattato con lo *scavenger* specifico per il BDNF (+TrkB-Fc). I terminali presinaptici GABAergici sono stati visualizzati grazie a un anticorpo anti vGat (verde) mentre i terminali presinaptici glutamatergici sono stati

visualizzati con anticorpo anti vGlut (rosso). Dall'immagine si può apprezzare come anche in questo caso sia nei neuroni cresciuti da co-culture parallele di neuroni/MSC o neuroni/astrociti, sottoposti a trattamento con TrkB-Fc, ci sia una drastica riduzione del segnale prodotto dalle pre-sinapsi vGat positive. Barra di calibrazione 20 μ m.

Anche per questi esperimenti l'effetto del trattamento è stato quantificato attraverso un'analisi della densità ottica generata dai due canali (verde, vGat + rosso, vGlut-1) e i dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti hanno confermato che in presenza di CM sottoposto a trattamento con TrkB-Fc si verifica una diminuzione dei terminali presinaptici GABAergici (Fig 40; percentuale delle presinapsi GABAergiche sul totale: neuroni in CM da co-culture di neuroni/astrociti con TrkB-Fc: 10DIV 33.8 \pm 4; 14DIV 26.5 \pm 3.9, neuroni in CM da co-culture di neuroni/MSC con TrkB-Fc: 10DIV 30.5 \pm 5.1; 14DIV 22.2 \pm 4.5.

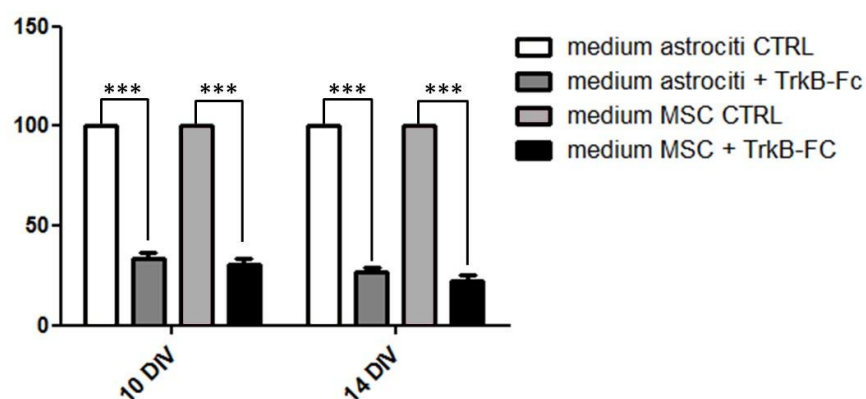


Fig. 40: Analisi semiquantitativa del numero dei terminali presinaptici GABAergici positivi per vGat sul totale (vGat + vGlut-1) in neuroni mantenuti per 10 o 14 DIV in presenza di medium condizionato con e senza trattamento con TrkB-Fc. (n=3; 15 campi per esperimento; p<0,001)

Questi risultati indicano che il BDNF è un fattore importante nella regolazione dell'incremento del numero dei terminali presinaptici GABAergici nelle colture di neuroni ippocampali.

Per quantificare i livelli di BDNF rilasciati, abbiamo effettuato un'analisi mediante test ELISA del medium prelevato dalle co-culture analizzate (in collaborazione con il laboratorio della Dott.ssa Barbara Costa, UNIMIB). In particolare sono state effettuate

misurazioni della concentrazione di BDNF nel terreno da co-culture a 3 e 10 DIV. I dati ottenuti sono sempre stati paragonati con i livelli registrati su colture singole di astrociti o MSC per valutare i livelli basali di rilascio di BDNF da parte di queste due popolazioni cellulari.

I risultati ottenuti mostrano una maggiore concentrazione di BDNF nel medium prelevato dalle co-culture di neuroni su MSC rispetto a quello prelevato dalle co-culture di neuroni su astrociti sia a 3DIV che a 10 DIV . (Fig. 41; pg di BDNF normalizzati sui mg di proteine totali: 3DIV = 1.3 ± 0.17 pg/mg in terreno da co-culture di neuroni su astrociti e 3.9 ± 1.85 pg/mg in terreno da co-culture di neuroni su MSC, $p < 0.01$; 10DIV = 1.3 ± 0.25 pg/mg in terreno da co-culture di neuroni su astrociti e 5.21 ± 0.86 pg/mg in terreno da co-culture di neuroni su MSC).

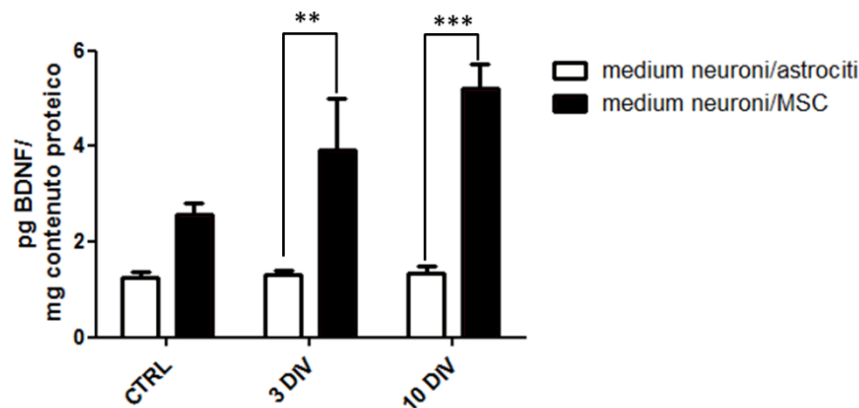


Fig. 41: Analisi quantitativa, tramite test ELISA, del BDNF rilasciato nel medium di coltura di neuroni posti in co-cultura per 3 e 10 DIV su monostrati di astrociti o MSC.

Dal grafico si può apprezzare l'aumento dei livelli di BDNF presenti nelle co-culture con MSC in entrambi i tempi sperimentali presi in analisi. I dati riportati rappresentano la media di tre differenti esperimenti; $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

I dati ottenuti, nel loro insieme, confermano il ruolo del BDNF negli effetti indotti dalle MSC sulle sinapsi GABAergiche (Mauri et al., 2012).

3 Valutazione degli effetti delle MSC sugli oligodendrociti

Oltre alla caratterizzazione degli effetti che le MSC svolgono sulla crescita e la funzionalità dei neuroni, è stata fatta anche una valutazione sugli effetti che queste cellule possono avere sulla proliferazione e il differenziamento degli oligodendrociti (OL).

Come per i neuroni, anche per questi esperimenti è stato utilizzato il modello di co-cultura in vitro definito a “sandwich”, in cui i vetrini con gli OL sono stati crescere in presenza di un monostrato cellulare, senza che le due popolazioni fossero a diretto contatto tra di loro.

Le co-culture di OL su MSC sono state sempre paragonate a co-culture di OL in presenza di astrociti, utilizzati come controllo. Gli OL sono stati mantenuti in coltura fino a un massimo di 9 DIV e tipicamente le analisi sono state fatte a 3, 6 e 9 DIV.

3.1 Valutazione degli effetti delle MSC sulle fasi di proliferazione dei precursori degli OL.

In una prima analisi abbiamo valutato se gli OPC posti in co-cultura con le MSC modificano le loro capacità di proliferazione, utilizzando come parametro d'indagine il numero di cellule positive per i due marcatori proteici NG2 e O4 che identificano specifici stadi di sviluppo di queste cellule (si veda par. 3.4.1 dell'introduzione).

3.1.1 Le MSC aumentano il numero di OPC NG2-positivi

L'analisi dell'espressione di NG2 è stata effettuata considerando tre finestre temporali scelte in base alle informazioni derivanti dalla letteratura e da precedenti studi morfologici svolti nel nostro laboratorio sul modello sperimentale utilizzato per poter monitorare le diverse fasi in cui si articola lo sviluppo della linea oligodendrocitica *in vitro*. Per valutare l'espressione di questa proteina durante lo stadio proliferativo, gli OPC sono stati posti in tre diverse condizioni di crescita. Nella prima condizione gli OPC sono stati mantenuti in coltura con un terreno di crescita che ne garantisce la sopravvivenza e il differenziamento (vedi Materiali e Metodi par. 3) (Fig. 42 riquadri di sinistra); nella seconda condizione di crescita gli OPC sono stati posti in co-cultura in presenza di un monostrato di astrociti (FIG. 42 riquadri centrali), e infine nella terza condizione sperimentale, gli OPC sono stati posti in co-cultura con le MSC (Fig. 42 riquadri di destra). L'espressione di NG2 è stata valutata, mediante microscopia confocale, considerando il numero di cellule NG2-positive

(NG2⁺, Fig.42 in verde) sul numero totale di cellule individuate tramite la marcatura con il DAPI (Fig. 42 in blu) a 3, 6, 9 DIV. La morfologia degli OL passa da una struttura semplice e poco articolata (3 DIV), ad una caratterizzata dalla presenza di un numero maggiore di processi (6 DIV) che nella fase finale si arricchisce di ramificazioni (9 DIV) soprattutto negli OL cresciuti in presenza del monostrato di MSC. Allo stesso tempo si assiste anche a un aumento del numero di cellule positive per NG2, sempre negli OL posti in co-cultura con le MSC (Fig. 42).

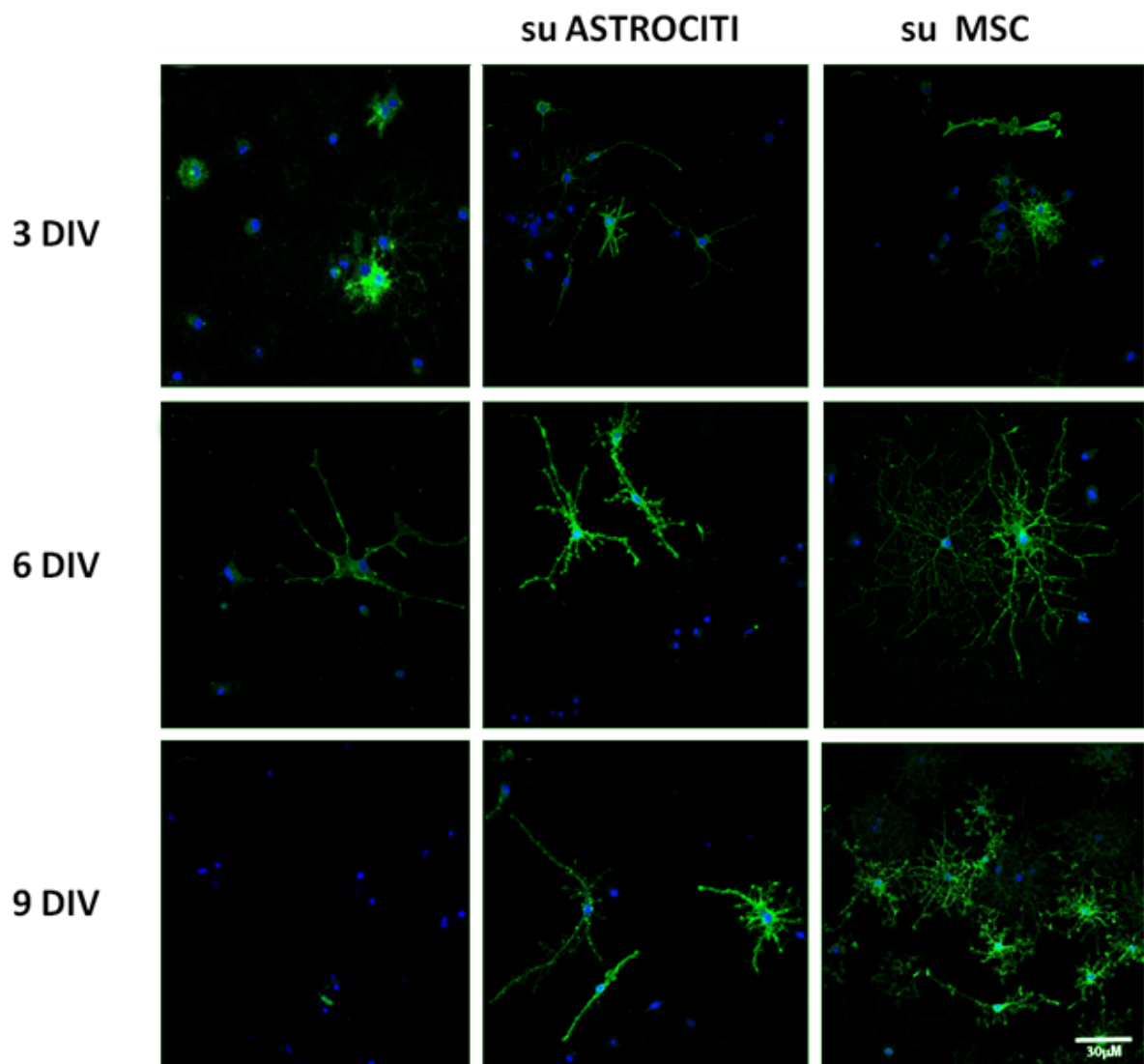


Fig. 42: Immagini rappresentative dell'immunomarcatura con anticorpi contro NG2 analizzate per valutarne l'espressione durante la maturazione *in vitro* degli OPC mantenuti in coltura in assenza di un

monostrato cellulare di supporto (riquadri a sinistra), in co-coltura con astrociti (riquadri centrali) e in co-coltura con MSC (riquadri a destra). Barra di calibrazione 30µm.

Dopo analisi immunocitochimica le immagini acquisite sono state analizzate attraverso una quantificazione del numero di cellule positive per NG2 sul totale delle cellule presenti, confermando che a 9 DIV è presente un numero maggiore di OPC positivi per NG2 nelle co-culture con MSC (Fig. 43). Già a 3 DIV, in presenza del monostrato di MSC, si possono osservare elevati livelli di cellule positive per NG2 rispetto al numero registrato negli OPC cresciuti in assenza di un monostrato cellulare di supporto; a 9 DIV questa differenza aumenta ancora di più raggiungendo dei livelli statisticamente significativi a favore degli OPC cresciuti in presenza di MSC, anche rispetto a quelli cresciuti sul monostrato di astrociti. OPC cresciuti in assenza di un monostrato di supporto: (3 DIV) 0.1223 ± 0.05270 , (6 DIV) 0.08013 ± 0.04396 , (9 DIV) 0.05003 ± 0.02355 ; OPC su astrociti: (3 DIV) 0.4209 ± 0.1081 , (6 DIV) 0.3681 ± 0.09203 , (9 DIV) 0.4261 ± 0.1367 ; OPC su MSC: (3 DIV) 0.3356 ± 0.05372 , (6 DIV) 0.5573 ± 0.05980 , (9 DIV) 0.6048 ± 0.1048 (Fig x). Questi dati indicano che le MSC hanno la capacità di incrementare la fase di proliferazione degli OPC in co-coltura.

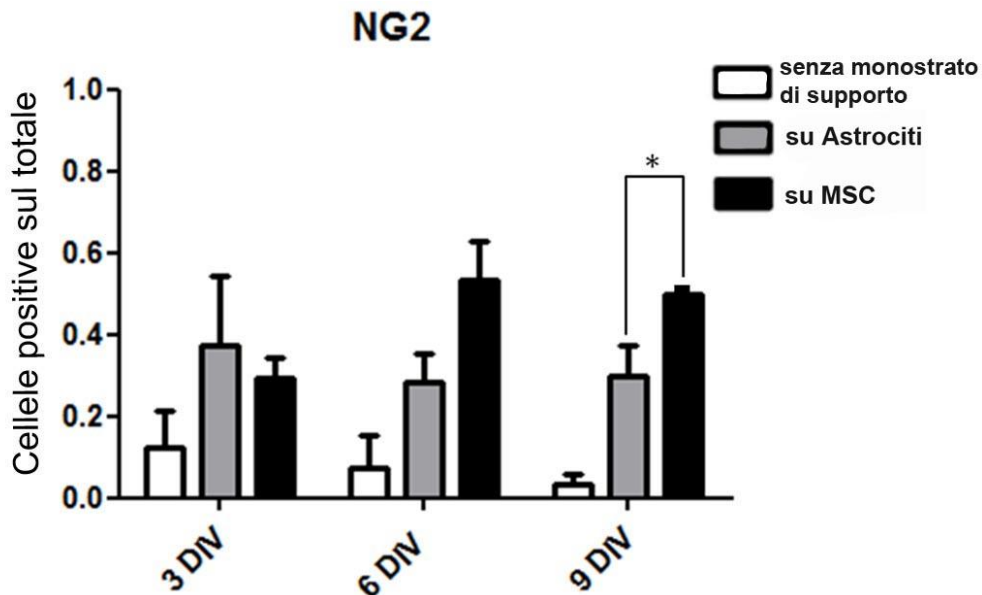


Fig. 43: Analisi del numero di cellule positive per NG2 valutato sul totale della popolazione cellulare. I dati ottenuti sono stati espressi come media \pm SD di tre differenti preparazioni di OPC (10 campi per esperimento; n=3) e analizzati tramite t-test di Student ($p < 0.05$).

3.1.2 Le MSC aumentano il numero di OPC O4 positivi

Sulla base delle caratterizzazioni temporali che in letteratura descrivono le fasi del processo di proliferazione degli OPC, abbiamo valutato anche il numero di OPC positivi per O4, una glicoproteina di membrana tipicamente espressa nelle fasi tardive della proliferazione. Le condizioni sperimentali e i tempi utilizzati per caratterizzare l'espressione di cellule positive per O4 sono le stesse utilizzate per analizzare l'andamento dell'espressione di NG2. L'espressione di O4 è stata valutata, mediante microscopia confocale, considerando il numero di cellule O4 positive (O4⁺, Fig. 44 in verde) sul numero totale di cellule individuate tramite la marcatura con il DAPI (Fig. 44 in blu). Dall'analisi delle immagini ottenute dall'immunomarcatura dei campioni con l'anticorpo diretto contro O4, si può osservare come gli OPC cresciuti in co-cultura su MSC presentano sia una morfologia più complessa che un numero di cellule positive per O4 maggiore rispetto alle cellule dei controlli (Fig. 44).

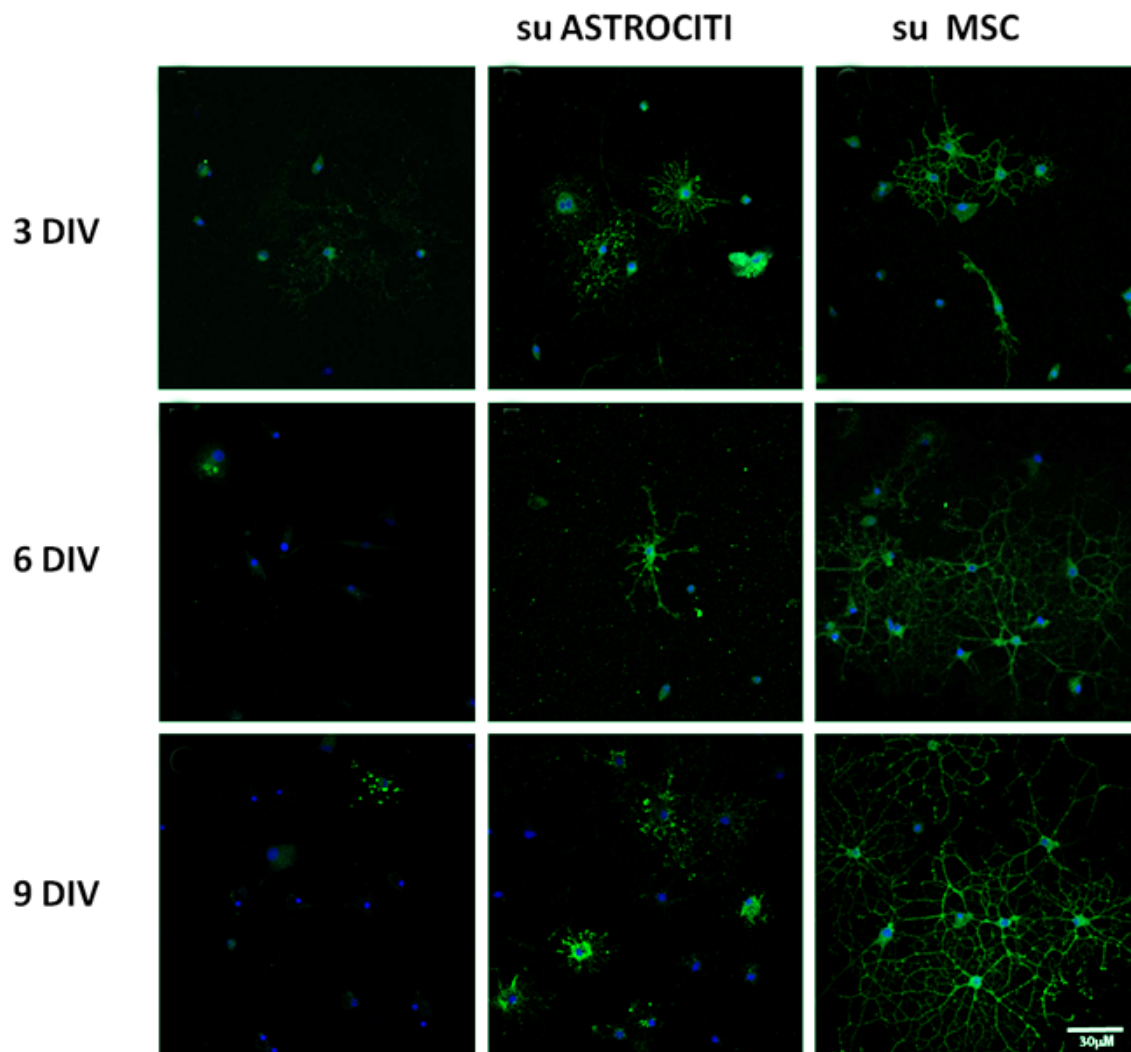


Fig. 44: Immagini rappresentative dell'immunomarcatura con anticorpi contro O4 analizzate per valutarne l'espressione durante la maturazione in vitro degli OPC mantenuti in coltura in assenza di un monostrato

cellulare di supporto (riquadri a sinistra), in co-coltura con astrociti (riquadri centrali) e in co-coltura con MSC (riquadri a destra). Barra di calibrazione 30 μ m.

Dopo il saggio immunocitochimico, le immagini acquisite sono state analizzate attraverso una quantificazione del numero di cellule positive per O4 sul totale delle cellule presenti, confermando che a 9 DIV è presente un numero maggiore di OPC positivi per O4 nelle co-culture con MSC, mostrando una loro capacità nell'incrementare anche la fase tardiva della proliferazione degli OPC in co-coltura. OPC cresciuti senza un monostrato di supporto: (3 DIV) 0.1125 ± 0.04545 , (6 DIV) 0.07108 ± 0.03190 , (9 DIV) 0.04429 ± 0.006202 ; OPC su astrociti: (3 DIV) 0.2554 ± 0.1512 , (6 DIV) 0.2569 ± 0.02395 , (9 DIV) 0.1833 ± 0.07340 ; OPC su MSC (3 DIV) 0.3380 ± 0.06478 , (6 DIV) 0.3487 ± 0.07562 , (9 DIV) 0.6168 ± 0.09185 (Fig 45)

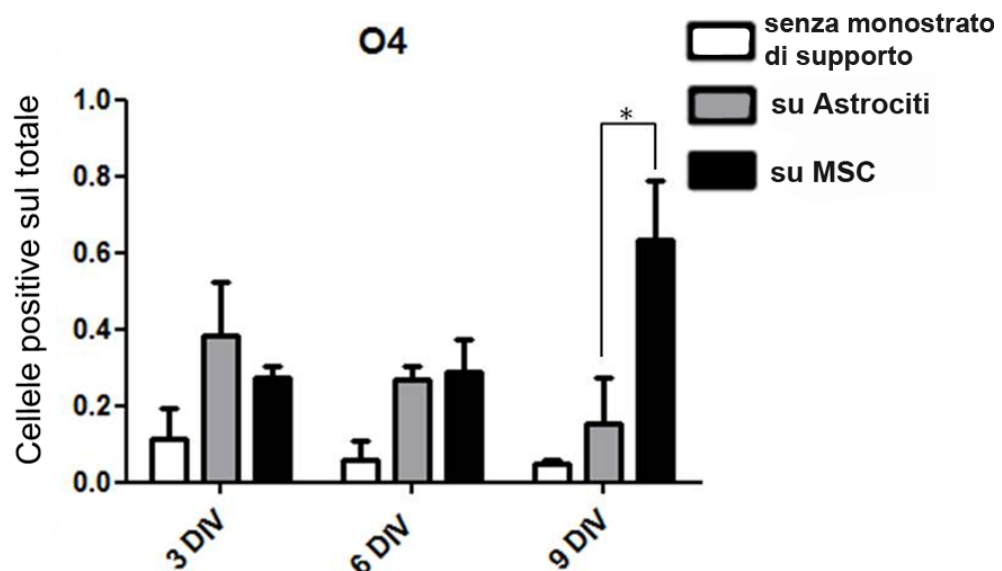


Fig. 45: Analisi del numero di cellule positive per O4 valutato sul totale della popolazione cellulare. I dati ottenuti sono stati espressi come media \pm SD di tre differenti preparazioni di OPC (10 campi per esperimento; n=3) e analizzati tramite t-test di Student ($p < 0.05$).

I dati ottenuti suggeriscono che le MSC sono in grado di agire positivamente sulle fasi di proliferazione degli OPC, prolungando sia la durata temporale che la complessità morfologica delle cellule analizzate.

3.2 Le MSC promuovono un precoce differenziamento degli OPC in OL maturi.

La caratterizzazione della fase di differenziamento è stata analizzata attraverso la valutazione dei livelli di espressione di MBP, la proteina basica della mielina:

comunemente vengono definite cellule MBP-positive (MBP⁺), gli OL che stanno differenziando in cellule in grado di produrre mielina.

Le condizioni sperimentali utilizzate per identificare il numero di cellule positive per MBP sono le stesse utilizzate per l'analisi dell'espressione delle proteine NG2 e O4. L'espressione di MBP è stata valutata, mediante microscopia confocale, considerando il numero di cellule MBP-positive (MBP⁺, Fig. 46 in verde) sul numero totale di cellule individuate tramite la marcatura con il DAPI (Fig. 46 in blu). Le immagini ottenute dopo immunomarcatura dei campioni con un anticorpo diretto contro MBP mostrano che la morfologia degli oligodendrociti passa da una struttura semplice e poco articolata (3 DIV) ad una caratterizzata dalla presenza di un numero maggiore di processi (6 DIV) che nella fase finale si arricchisce di ramificazioni (9 DIV), soprattutto negli OL cresciuti in presenza del monostrato di MSC. Allo stesso tempo si assiste anche a un aumento del numero di cellule positive per MBP negli OL posti in co-coltura con le MSC rispetto alle condizioni controllo principalmente a 3 e 6 DIV.

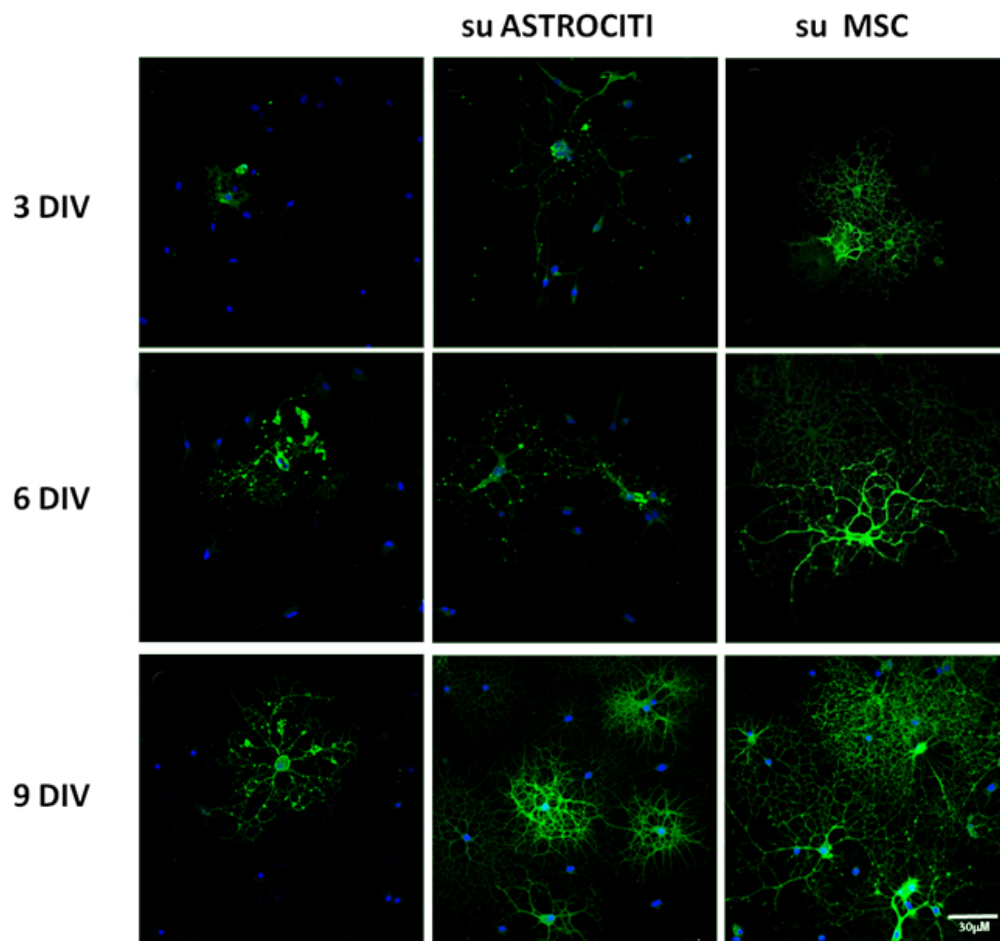


Fig. 46: Immagini rappresentative dell'immunomarcatura con anticorpi contro MBP analizzate per valutarne l'espressione durante la maturazione in vitro degli OL mantenuti in coltura in assenza di un

monostrato cellulare di supporto (riquadri a sinistra), in co-cultura con astrociti (riquadri centrali) e in co-cultura con MSC (riquadri a destra). Barra di calibrazione 30µm.

Da un'analisi delle immagini acquisite, svolta anche in questo caso attraverso una quantificazione del numero di cellule positive per MBP sul totale delle cellule presenti, si è visto che a 3 e 6 DIV, in presenza del monostrato di MSC, si possono osservare livelli di cellule positive per MBP statisticamente maggiori rispetto al numero registrato negli OL cresciuti in assenza di un monostrato cellulare di supporto; a 9 DIV questa differenza non risulta più statisticamente significativa suggerendo che anche le altre condizioni di coltura (soprattutto quella su astrociti) raggiungono un livello di differenziamento paragonabile. OL cresciuti senza un monostrato: (3 DIV) 0.1230 ± 0.03665 , (6 DIV) 0.01138 ± 0.04647 , (9 DIV) 0.1260 ± 0.09397 ; OL su astrociti: (3 DIV) 0.1464 ± 0.01306 , (6 DIV) 0.1774 ± 0.07364 , (9 DIV) 0.3522 ± 0.02021 ; OL su MSC (3 DIV) 0.2622 ± 0.04405 , (6 DIV) 0.3429 ± 0.04489 , (9 DIV) 0.4314 ± 0.09608 (Fig 47).

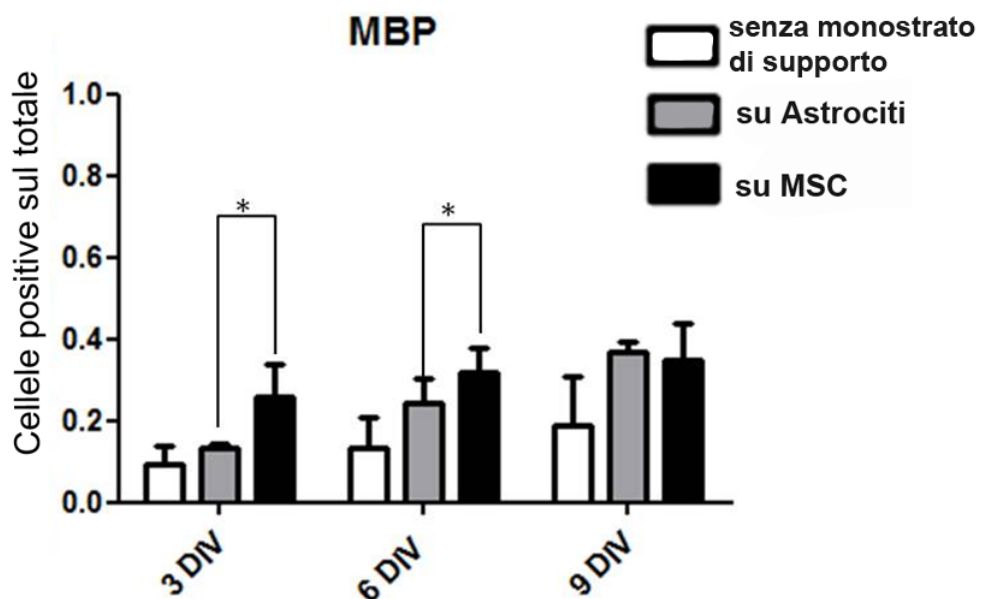


Fig. 47: Analisi del numero di cellule positive per MBP valutato sul totale della popolazione cellulare. I dati ottenuti sono stati espressi come media \pm SD di tre differenti preparazioni di OPC (10 campi per esperimento; n=3) e analizzati tramite t-test di Student ($p < 0.05$).

Sebbene ci sia un numero di OPC differenziati paragonabile tra le varie condizioni sperimentali a 9 DIV, a livello visivo si ha comunque l'impressione che i livelli di MBP

espressi nella co-coltura di OL su MSC siano maggiori rispetto alla co-coltura di controllo di OL su astrociti. Per valutare questo aspetto, abbiamo eseguito un'analisi dell'espressione di MBP mediante Western immunoblotting su lisati cellulari di OL mantenuti nelle due differenti condizioni di co-coltura a 6 e 9 DIV.

I risultati ottenuti mostrano che i livelli di espressione di MBP sono maggiori a 9 DIV in OL cresciuti in co-coltura con MSC rispetto ai controlli, mentre sono del tutto paragonabili nelle due condizioni analizzate a 6 DIV (Fig. 48). Questo dato potrebbe essere giustificato dalla maggior arborizzazione dei processi degli OL in presenza di MSC a 9 DIV rispetto a quelli cresciuti in presenza di astrociti.

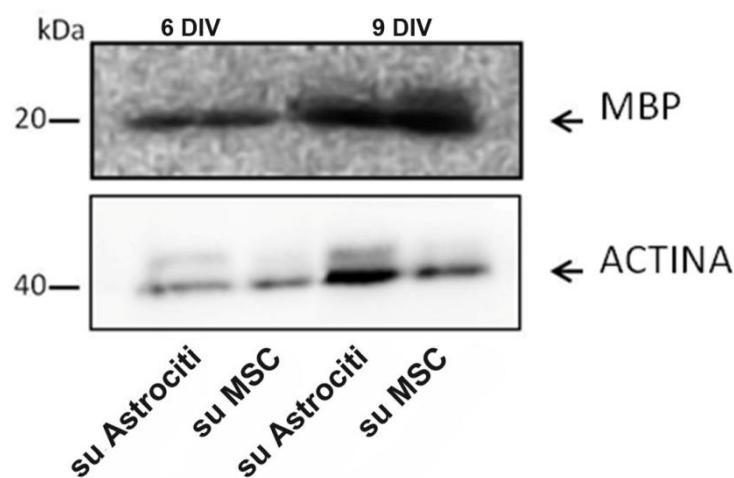


Fig 48: Western immunoblotting che mostra un aumentato livello di espressione di MBP nei lisati cellulari di OL mantenuti in presenza di MSC a 9 DIV, rispetto a quelli mantenuti in presenza di astrociti. Lactina è stata utilizzata come controllo dei quantitativi di proteine caricate.

I risultati ottenuti, attraverso gli esperimenti di caratterizzazione dell'andamento della proliferazione e del differenziamento degli OPC in co-coltura, suggeriscono che le MSC sono in grado di comunicare con gli OPC garantendogli un adeguato, se non migliore, supporto trofico rispetto agli astrociti, agendo contemporaneamente sia sulla loro attività proliferativa che sulla loro capacità differenziativa.

3.3 Analisi molecolare dei possibili fattori responsabili dell'azione delle MSC sulla proliferazione e il differenziamento degli OL: coinvolgimento del pathway di ERK

In base ai dati della letteratura che supportano l'ipotesi che le NT sono tra i fattori coinvolti nella proliferazione e maturazione degli OL, abbiamo valutato un loro coinvolgimento come possibili mediatori degli effetti indotti dalle MSC.

Per verificare se gli effetti da noi osservati fossero, almeno in parte, mediati dall'attivazione dei recettori TrK per le NT, come per i neuroni, abbiamo trattato le colture con il bloccante aspecifico per i recettori tirosin-chinasici, K252a. Dal momento che i recettori TrK sono espressi, oltre che dagli OL, anche dalle MSC e dagli astrociti, per evitare che l'inibitore K252a potesse bloccare i recettori presenti a livello di queste cellule alterando le risposte osservate, anche in questo caso si è deciso di trattare gli OL fatti crescere in assenza del monostrato di supporto, ponendoli in un terreno condizionato da co-colture parallele di OL su MSC o di OL su astrociti. In questo modo agli OL trattati con K252a venivano comunque garantiti i fattori necessari per la sopravvivenza e la maturazione, ma non si alterava la funzionalità del monostrato cellulare di supporto. Il trattamento con K252a ha indotto la morte cellulare degli OL nell'arco di 24-36 ore dalla sua aggiunta al CM sia con concentrazioni variabili (somministrato in diversi esperimenti con dosi decrescenti: 200 nM, 100nM, 10nM e 0,1 nM) che con differenti tempistiche di somministrazione del bloccante (somministrato sia il giorno della piastratura che dopo 3 DIV), suggerendo un ruolo chiave di queste molecole nella sopravvivenza e nel corretto sviluppo di queste cellule (dati non mostrati).

Per approfondire il coinvolgimento delle NT, abbiamo quindi deciso di andare ad indagare se ci fossero delle differenze nelle risposte dei segnali intracellulari attivati dai recettori TrK nelle diverse condizioni di coltura, cominciando a focalizzarci sul coinvolgimento delle vie attivate dalle MAP kinasi e in particolare sullo stato di fosforilazione di ERK.

Questa analisi, svolta in collaborazione con il laboratorio della Dott.ssa Mariarosaria Miloso (UNIMIB), è stata fatta attraverso la valutazione dei livelli di fosforilazione di ERK1 e 2 su lisati cellulari di OL mantenuti in co-coltura su MSC o astrociti, in quanto è noto che i livelli di fosforilazione di questa proteina sono legati al suo stato di attivazione da parte di una vasta gamma di recettori di membrana tra cui proprio i recettori TrK per le NT.

Dall'analisi preliminare dell'espressione delle proteine ERK fosforilate identificate mediante Western immunoblotting, si è visto un aumento dei livelli di fosforilazione sia di ERK1 che

di ERK2 in OL mantenuti un co-coltura per 9 DIV su MSC rispetto ai livelli registrati su OL in co-coltura su astrociti (Fig. 49).

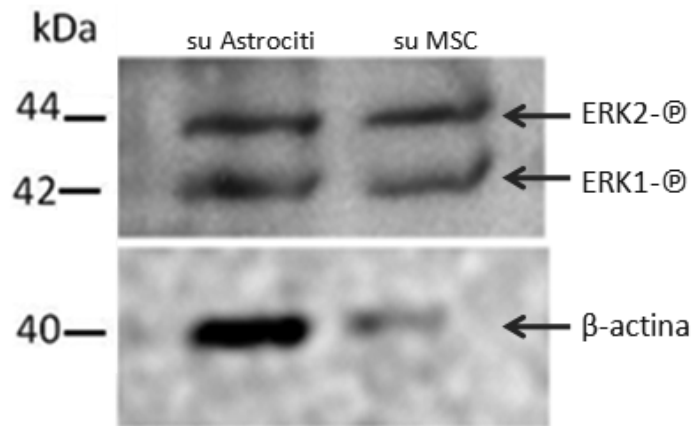


Fig 49: Western immunoblotting rappresentativo che mostra un aumentato livello di espressione di ERK 1 e 2 fosforilati nei lisati cellulari di OL su MSC a 9 DIV rispetto a quelli su astrociti. La banda di riferimento dell'espressione dell'actina è stata utilizzata come controllo dei livelli di proteina caricati.

Le bande ottenute dalla corsa di tre lisati cellulari derivanti da tre differenti preparazioni mostrano, attraverso un'analisi densitometrica, che in OL cresciuti su MSC si registra un aumento dei livelli di ERK 1 e 2 fosforilate, come mostrato nel grafico in figura 50.

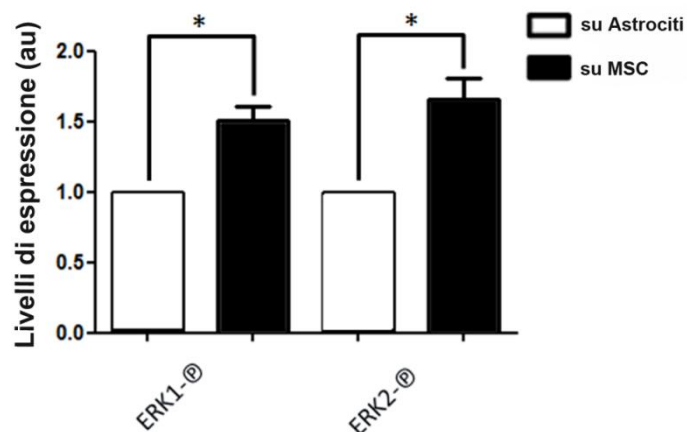


Fig. 50: Grafico dall'analisi densitometrica, normalizzata per i livelli di actina nei vari campioni, del segnale di ERK 1 e 2 fosforilate ottenuta su OL cresciuti sia su MSC (barra nera) che su astrociti, il cui valore è stato considerato come parametro di raffronto e impostato come 100% (barra bianca). ($p < 0.05$; $p < 0.001$)

Questi dati, sebbene richiedano un più approfondito studio per comprenderne il reale significato biologico, indicano che le MSC possono regolare, tramite la secrezione di fattori trofici, la proliferazione e il differenziamento degli OPC *in vitro*, modulando anche l'attività di proteine effettrici come ERK1 e 2.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel mio periodo di dottorato ho valutato gli effetti che le cellule staminali mesenchimali (MSC) hanno sulla funzionalità di neuroni ippocampali focalizzando l'attenzione soprattutto sul loro coinvolgimento nella regolazione della trasmissione inibitoria. Inoltre lo studio ha previsto l'analisi degli effetti delle MSC sull'identità morfologica, sulla sopravvivenza e sulla maturazione di oligodendrociti (OL) corticali. Gli esperimenti svolti indicano, per la prima volta, che le MSC sono in grado di aumentare la sinaptogenesi GABAergica, e quindi la trasmissione di segnali inibitori, attraverso il rilascio di fattori solubili, tra cui il BDNF. A livello degli OL, inoltre, si è visto che le MSC sono in grado sia di prolungarne la fase di proliferazione, che di anticipare e aumentare il differenziamento degli OPC.

1. L'azione delle MSC è garantita da meccanismi paracrini

I nostri dati suggeriscono che le MSC svolgono i loro effetti attraverso meccanismi d'azione di tipo paracrino. Questa affermazione è supportata da evidenze ottenute utilizzando modelli sperimentali differenti: (i) co-culture in cui le cellule sono fisicamente separate e comunicano mediante il rilascio di sostanze nel medium che condividono; (ii) l'utilizzo di medium condizionato da co-culture parallele, in cui viene fatta crescere la popolazione cellulare in esame, in modo da eliminare ogni possibile interazione diretta con le cellule del monostrato di supporto.

Gli effetti osservati ben correlano con i dati presenti in letteratura che indicano come le MSC siano in grado di rilasciare un'ampia gamma di fattori trofici tra cui citochine, chemochine e antiossidanti che, in modo paracrino, sono in grado di supportare la sopravvivenza neuronale (Crigler et al., 2006a, Lanza et al., 2009, Meirelles et al., 2009, Wilkins et al., 2009, Scuteri et al., 2011), la rigenerazione delle cellule del sistema nervoso (Rivera et al., 2006, Bai et al., 2007) e ridurre gli effetti apoptotici provocati da stati infiammatori o di sofferenza cellulare (Crigler et al., 2006a, Scuteri et al., 2011).

Focalizzandoci sugli effetti descritti sulle cellule neuronali, altri gruppi di ricerca hanno proposto dei modelli in cui dimostravano che le MSC sono in grado di secernere fattori solubili, tra cui anche il fattore trofico di derivazione neuronale (BDNF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF-2) e il fattore trofico di derivazione gliale (GDNF) e di garantire, attraverso il loro rilascio, un effetto protettivo su neuroni dopaminergici in seguito a danni cerebrali (Shintani et al., 2007). L'individuazione del BDNF come molecola coinvolta nell'aumento della sinaptogenesi GABAergica a carico delle MSC, attraverso gli esperimenti condotti con i bloccanti per le neurotrofine (K252a e TrkB-Fc), suggeriscono inoltre che le cellule in co-cultura non comunicano semplicemente tramite il rilascio e l'interazione di molecole, ma che instaurano tra di loro una comunicazione di tipo

bidirezionale in grado di regolare attivamente i livelli di espressione delle molecole interessate in questi processi. L'incremento del BDNF, misurato attraverso il test ELISA nel medium delle co-culture, rispetto a quello presente nel medium delle sole MSC poste nelle stesse condizioni di coltura, ma in assenza di neuroni, confermerebbe tale ipotesi. Resta comunque da definire se l'aumento del BDNF registrato sia da attribuirsi solo al rilascio da parte delle MSC o se queste cellule siano in grado di promuoverne la sintesi anche dalle cellule neurali presenti nella co-cultura.

2. Le MSC inducono un aumento della sinaptogenesi GABAergica e della trasmissione inibitoria in neuroni ippocampali.

Attraverso gli esperimenti svolti sulle co-culture tra MSC e neuroni ippocampali, utilizzando approcci sia di tipo immunocitochimico, biochimico che elettrofisiologico, abbiamo dimostrato che la presenza di queste cellule è in grado di aumentare la sinaptogenesi GABAergica. Le nostre indagini si basano su alcune evidenze riportate in letteratura che mostrano come l'interazione dei neuroni con gli astrociti sia in grado di regolare la sinaptogenesi inibitoria.

Studi condotti sul ruolo degli astrociti nella regolazione della trasmissione inibitoria mostrano, infatti, che il rilascio di fattori trofici da parte di queste cellule è in grado di aumentare il numero dei terminali presinaptici inibitori, delle frequenze delle correnti inibitorie in miniatura (mIPSC) (Elmariah et al., 2005a, Elmariah et al., 2005b, Hughes et al., 2010) e dell'espressione e della localizzazione sinaptica del recettore GABA_A. Sulla base di queste evidenze ci si potrebbe quindi aspettare che l'azione delle MSC avvenga modulando la funzionalità degli astrociti e non per azione diretta sui neuroni. In effetti nel nostro laboratorio è stata precedentemente dimostrata la capacità delle MSC di mediare in modo indiretto la sopravvivenza neuronale attraverso un'azione sugli astrociti (Mauri et al., 2012).

Al contrario però i dati ottenuti su colture di neuroni, nelle quali è stata bloccata la proliferazione della componente astrocitaria attraverso il trattamento con AraC, indicano che l'aumento della sinaptogenesi GABAergica promosso dalle MSC non è una conseguenza dei loro effetti sugli astrociti, ma piuttosto è basato su una comunicazione diretta con i neuroni. Anche altri gruppi di ricerca hanno recentemente dimostrato effetti diretti delle MSC su colture di neuroni in termini di supporto nello sviluppo e nella crescita assonale (Führmann et al., 2010).

Ovviamente queste osservazioni non vogliono in alcun modo escludere o ridurre l'importanza degli effetti prodotti dagli astrociti su questi fenomeni in condizioni fisiologiche, ma piuttosto suggeriscono che le MSC comunicano con i neuroni modulando presumibilmente le stesse vie di

segnalazione tipicamente utilizzate dagli astrociti. Questo giustificerebbe il mantenimento di una corretta sinaptogenesi GABAergica a carico delle MSC nelle colture neuronali trattate con AraC.

Tra le molecole responsabili degli effetti indotti da queste cellule sui neuroni, i nostri risultati suggeriscono un coinvolgimento del BDNF, come dimostrato con il blocco dei recettori per le neurotrofine, garantito dall'antagonista per tutti i recettori TrK, il K252a, e il sequestro del BDNF nel medium di coltura, attraverso il trattamento con il TrkB-Fc, che riducono drasticamente gli effetti prodotti sulle presinapsi GABAergiche.

Il coinvolgimento del BDNF osservato nella regolazione della trasmissione GABAergica a carico delle MSC è supportato da una serie di evidenze presenti in letteratura che mostrano come questa neurotrofina sia coinvolta nella regolazione in senso positivo della sinaptogenesi GABAergica sia a livello della corteccia cerebrale (Rutherford *et al.*, 1997) che dei neuroni ippocampali (Rutherford *et al.*, 1997, Yamada *et al.*, 2002b). Inoltre è descritto un coinvolgimento del BDNF nell'aumento dei livelli di espressione del KCC2, il cotrasportatore per gli ioni K^+ e Cl^- implicato nella regolazione della trasmissione inibitoria innescata dall'attivazione dei recettori GABA (Aguado *et al.*, 2003b, Yeo *et al.*, 2009). Come indicano anche i nostri risultati, la presenza delle MSC determina un aumento nell'espressione del KCC2 che ben correla con il coinvolgimento del BDNF nella regolazione della sua espressione.

E' inoltre interessante sottolineare che riduzioni dei livelli di espressione di KCC2 sono stati riscontrati in svariati disordini a livello neuronale che sono caratterizzati da un'alterata trasmissione inibitoria, come ad esempio nel caso dell'epilessia (Hübner *et al.*, 2001b, Payne *et al.*, 2003), suggerendo che i meccanismi molecolari attivati dalle MSC potrebbero contribuire a regolare positivamente l'espressione di questo co-trasportatore e in generale della funzionalità della corretta trasmissione GABAergica in questi disordini.

Nonostante diverse evidenze presenti in letteratura e i nostri dati supportino un ruolo del BDNF nella regolazione della trasmissione GABAergica, il meccanismo che regola la sua azione è tuttora poco definito e richiede ulteriori indagini. Alcuni autori hanno recentemente proposto che il BDNF possa agire su specifiche cascate di segnali intracellulari che verrebbero attivate nei neuroni ippocampali (Ludwig *et al.*, 2011) in seguito all'azione del BDNF, anche se non è da escludere il probabile coinvolgimento di altri fattori che intervengano in modo cooperativo in questi processi.

3. Le MSC modulano in modo positivo sia la proliferazione che il differenziamento degli oligodendrociti

Gli oligodendrociti sono cellule basilari per il corretto funzionamento del SNC, in quanto responsabili della formazione della guaina mielinica, fondamentale per la rapida ed efficiente conduzione degli impulsi nervosi. Esistono dei meccanismi spontanei/endogeni di riparazione di eventuali danni a carico della mielina (rimielinizzazione), che vedono coinvolti, in primo luogo, i precursori degli oligodendrociti (OPC). In caso di gravi traumi della spina dorsale e in patologie neurodegenerative, quali la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e la Sclerosi Multipla (SM), è stato dimostrato che questo processo di rimielinizzazione può risultare inefficace, soprattutto se vengono a mancare i segnali molecolari adeguati per la corretta proliferazione e maturazione degli OPC (Peterson and Fujinami, 2007).

Recenti studi hanno mostrato come il trapianto delle MSC in modelli animali di sclerosi multipla (encefalomielite acuta sperimentale, EAE) sia in grado di migliorare il decorso della patologia attraverso effetti neuroprotettivi –non ancora del tutto chiariti- e la regolazione dei meccanismi immunomodulatori responsabili della riduzione dell’infiammazione a livello delle regioni demielinizzate (Uccelli et al., 2012b).

Le analisi da noi iniziate hanno la finalità di partecipare alla caratterizzazione dell’eventuale azione delle MSC nella promozione di questi processi. L’analisi *in vitro*, attraverso la valutazione del numero di OPC positivi per i marcatori tipici della fase di proliferazione (NG2 e O4), ha evidenziato che queste cellule sembrerebbero allargare la finestra temporale durante la quale gli OPC mostrano una capacità proliferativa, suggerendo quindi che le MSC potrebbero essere realmente in grado di migliorare i meccanismi responsabili dei primi stadi della rimielinizzazione.

Dai risultati ottenuti è inoltre emerso che gli OL mantenuti nelle nostre condizioni di coltura mostrano anche un differenziamento precoce rispetto ai controlli e una maggiore produzione di proteine tipicamente deputate alla mielinizzazione, come MBP, suggerendo un loro possibile ruolo nel migliorare anche le fasi tardive dei meccanismi di rimielinizzazione.

Sebbene un parallelismo tra le evidenze riscontrate in letteratura in modelli animali e quanto è stato osservato da noi *in vitro* possa risultare in parte speculativo, l’utilizzo di un modello semplificato come il nostro potrebbe aiutare a comprendere nel dettaglio alcuni dei meccanismi molecolari potenzialmente coinvolti nei processi di rimielinizzazione e nel contempo aiutare a caratterizzare meglio gli effetti osservati a carico delle MSC.

La capacità di stimolare la proliferazione e il differenziamento degli OPC nel SNC potrebbe infatti essere uno dei meccanismi alla base della rimielinizzazione spontanea indotta da queste cellule; è stato peraltro dimostrato che MSC somministrate in topi EAE sono in grado di migrare fino alla zona di lesione nel SNC dove promuovono la proliferazione degli OPC in seguito alla produzione di BDNF, riducendo in modo significativo le aree di demielinizzazione (Zhang et al., 2005).

Sulla base dei dati della letteratura che propongono sia un coinvolgimento delle neurotrofine nei processi di regolazione della proliferazione e differenziamento degli OL (Frost et al., 2009, Yun et al., 2010), sia un rilascio attivo di neurotrofine da parte delle MSC, come peraltro mostrato anche nei nostri esperimenti, abbiamo cominciato a investigare il loro coinvolgimento negli effetti osservati sugli OL.

Il blocco dei recettori per le neurotrofine, attraverso l'aggiunta al medium di coltura del K252a, ha portato alla morte degli OL, suggerendo che nel nostro modello la presenza delle NT è essenziale per la sopravvivenza di queste cellule.

Inoltre è stato recentemente visto, in un modello *in vitro*, che le molecole rilasciate dagli astrociti sono in grado di interagire con i recettori presenti sugli OL portando all'attivazione delle cascate di segnale intracellulare che coinvolgono anche le MAP chinasi e in particolare inducono la fosforilazione di ERK modulandone gli effetti e garantendo una migliore sopravvivenza cellulare (Arai and Lo, 2010).

I nostri dati ben correlano con quanto dimostrato per gli astrociti: l'aumento dei livelli di espressione della proteina ERK fosforilata in OL in co-coltura con MSC da noi rilevato, lascia presupporre un potenziamento di questa via ad opera delle cellule staminali, individuando un possibile meccanismo che spieghi gli effetti positivi osservati nelle co-culture di OL/MS.

Alla luce di queste considerazioni, ulteriori sforzi saranno volti a cercare di far chiarezza sulla natura dei diversi fattori implicati nell'effetto trofico da noi osservato da parte delle MSC nei confronti degli OL e dei loro precursori. Sarà inoltre necessario ottenere ulteriori conferme sui meccanismi messi in atto dalle MSC, valutandone gli effetti in modelli di co-coltura che consentano l'interazione tra gli OL e i neuroni, in modo da poter verificare se queste cellule siano realmente in grado di avere un ruolo nel migliorare il potenziale mielinizzante degli OL.

4. Conclusioni

Negli ultimi anni si è assistito a un considerevole sviluppo dell'utilizzo delle MSC in clinica come terapia per varie patologie di tipo immunologico, cardiovascolare e, in alcuni casi neurologico (Kode et al., 2009, Mathiasen et al., 2009, Trivedi et al., 2010). Queste cellule sono state sfruttate per le loro capacità differenziative, per le loro capacità immunomodulatorie, di mobilitazione verso le aree tissutali danneggiate (homing) e di produzione e rilascio di diversi fattori solubili e molecole bioattive (Caplan and Correa, 2011, Klopp et al., 2011, Marigo and Dazzi, 2011, Uccelli et al., 2012b). Per quanto riguarda gli studi sul SNC, studi preclinici condotti in modelli di ischemia in ratto, hanno dimostrato un contributo delle MSC nella rigenerazione di danni cerebrali, promuovendo il ripristino delle funzioni legate all'attività dei neuroni in modelli di patologie quali ictus (Walker et al., 2010, Zacharek et al., 2010, Bao et al., 2011), danni a livello del midollo spinale (Ban et al., 2011), malattie demielinizzanti (Gordon et al., 2010, Veeravalli et al., 2011).. Inoltre, Costa-Ferro e collaboratori hanno dimostrato che il trapianto di MSC in modelli sperimentali di epilessia, immediatamente dopo la crisi epilettica, previene lo sviluppo di scariche cloniche e riduce la perdita neuronale (Costa-Ferro et al., 2010, Costa-Ferro et al., 2011).

A livello di patologie demielinizzanti sono in corso studi preclinici che ipotizzano un possibile utilizzo terapeutico a carico delle MSC in pazienti (Slavin et al., 2008, Yang et al., 2010, Baek et al., 2012, Sng and Lufkin, 2012). Inoltre sono già in corso anche studi clinici pilota per l'utilizzo di queste cellule su affetti da sclerosi multipla (Karussis et al., 2010, Connick et al., 2012) o da sclerosi laterale amiotrofica (Mazzini et al., 2010, Mazzini et al., 2012).

Nonostante, quindi, le MSC siano utilizzate nella pratica clinica, gli studi preclinici e quelli da noi condotti hanno lo scopo di approfondire il loro meccanismo d'azione utilizzando un modello *in vitro*, in modo da isolare e poter meglio analizzare alcuni degli aspetti specifici come il rilascio di fattori trofici e regolatori.

Va sottolineato che gli studi da noi condotti attualmente non hanno preso in considerazione i potenziali effetti di regolazione immunologica o il rilascio di altri fattori chiave, come i neurosteroidi, ma che in una panoramica più ampia della caratterizzazione delle potenzialità terapeutiche delle MSC saranno sicuramente da approfondire.

Una migliore comprensione dei meccanismi a carico delle MSC mostrati in questo lavoro, come il loro coinvolgimento nel rilascio di BDNF, neurotrofine in generale e altre molecole bioattive sulle cellule del SNC, potrebbe migliorare le possibilità di utilizzo di queste cellule anche in patologie neuronali.

BIBLIOGRAFIA

- (Retraction. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98:2615-2625. *Blood* 113:2370.2009).
- Abdelwahid E, Siminiak T, Guarita-Souza LC, Teixeira de Carvalho KA, Gallo P, Shim W, Condorelli G (Stem cell therapy in heart diseases: a review of selected new perspectives, practical considerations and clinical applications. *Curr Cardiol Rev* 7:201-212.2011).
- Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguilo A, Martinez-Guijarro FJ, Alcantara S, Borrell V, Yuste R, Ibanez CF, Soriano E (BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development* 130:1267-1280.2003a).
- Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguiló A, Martínez-Guijarro FJ, Alcantara S, Borrell V, Yuste R, Ibañez CF, Soriano E (BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development* 130:1267-1280.2003b).
- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J (Molecular cloning of a novel brain-type Na⁽⁺⁾-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 74:2622-2625.2000).
- Ainger K, Avossa D, Morgan F, Hill SJ, Barry C, Barbarese E, Carson JH (Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* 123:431-441.1993).
- Akoev GN, Sotnikov OS, Chalisova NI, Lukashin VG, Sergeeva SS, Vshivoeva VV (Brain neurite-stimulating protein promotes formation of mechanosensory endings in sensory neuron. *Neuroreport* 3:509-511.1992).
- Althaus HH, Kloppner S, Klopffleisch S, Schmitz M (Oligodendroglial cells and neurotrophins: a polyphonic cantata in major and minor. *J Mol Neurosci* 35:65-79.2008).
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-973.2003).
- Alves da Silva ML, Martins A, Costa-Pinto AR, Correlo VM, Sol P, Bhattacharya M, Faria S, Reis RL, Neves NM (Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in chitosan-based scaffolds using a flow-perfusion bioreactor. *J Tissue Eng Regen Med*.2010).
- Amaral MD, Pozzo-Miller L (Intracellular Ca²⁺ stores and Ca²⁺ influx are both required for BDNF to rapidly increase quantal vesicular transmitter release. *Neural Plast* 2012:203536.2012).
- Antunez JR, Couce M, Fraga M, Garcia-Caballero T, Beiras A, Perez-Becerra E, Forteza J (Immunohistochemical demonstration of neuronal and astrocytic markers and oncofoetal antigens in retinoblastomas. *Histol Histopathol* 6:241-246.1991).
- Arai K, Lo EH (Astrocytes protect oligodendrocyte precursor cells via MEK/ERK and PI3K/Akt signaling. *J Neurosci Res* 88:758-763.2010).
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4:1116-1122.2001).
- Baek W, Kim YS, Koh SH, Lim SW, Kim HY, Yi HJ, Kim H (Stem cell transplantation into the intraventricular space via an Ommaya reservoir in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosurg Sci* 56:261-263.2012).
- Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller RH (Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem Res* 32:353-362.2007).
- Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK (Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* 276:36764-36769.2001).
- Balazs R, Miller S, Romano C, de Vries A, Chun Y, Cotman CW (Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. *J Neurochem* 69:151-163.1997).
- Balsamo J, Leung T, Ernst H, Zanin MK, Hoffman S, Lilien J (Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin. *J Cell Biol* 134:801-813.1996).

Ban DX, Ning GZ, Feng SQ, Wang Y, Zhou XH, Liu Y, Chen JT (Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells: the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats. *Regen Med* 6:707-720.2011).

Banker GA, Cowan WM (Rat Hippocampal Neurons in Dispersed Cell-Culture. *Brain Research* 126:397-425.1977).

Bao X, Wei J, Feng M, Lu S, Li G, Dou W, Ma W, Ma S, An Y, Qin C, Zhao RC, Wang R (Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Brain research* 1367:103-113.2011).

Baracskey KL, Kidd GJ, Miller RH, Trapp BD (NG2-positive cells generate A2B5-positive oligodendrocyte precursor cells. *Glia* 55:1001-1010.2007).

Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46.1992).

Bartlett WP, Banker GA (An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4:1944-1953.1984a).

Bartlett WP, Banker GA (An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci* 4:1954-1965.1984b).

Bartsch U, Faissner A, Trotter J, Dorries U, Bartsch S, Mohajeri H, Schachner M (Tenascin demarcates the boundary between the myelinated and nonmyelinated part of retinal ganglion cell axons in the developing and adult mouse. *J Neurosci* 14:4756-4768.1994).

Bedet C, Isambert MF, Henry JP, Gasnier B (Constitutive phosphorylation of the vesicular inhibitory amino acid transporter in rat central nervous system. *J Neurochem* 75:1654-1663.2000).

Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends Neurosci* 20:523-529.1997).

Ben Achour S, Pascual O (Astrocyte-Neuron Communication: Functional Consequences. *Neurochem Res*.2012).

Bertani N, Malatesta P, Volpi G, Sonogo P, Perris R (Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J Cell Sci* 118:3925-3936.2005).

Bettler B, Tiao JY (Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol Ther* 110:533-543.2006).

Biagini G, Longo D, Baldelli E, Zoli M, Rogawski MA, Bertazzoni G, Avoli M (Neurosteroids and epileptogenesis in the pilocarpine model: Evidence for a relationship between P450scc induction and length of the latent period. *Epilepsia* 50:53-58.2009).

Bianco P, Robey P (Diseases of bone and the stromal cell lineage. *J Bone Miner Res* 14:336-341.1999).

Bisaz R, Conboy L, Sandi C (Learning under stress: a role for the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neurobiol Learn Mem* 91:333-342.2009).

Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL (Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283:534-537.1999).

Bolton MM, Eroglu C (Look who is weaving the neural web: glial control of synapse formation. *Current opinion in neurobiology* 19:491-497.2009).

Boregowda SV, Phinney DG (Therapeutic applications of mesenchymal stem cells: current outlook. *BioDrugs* 26:201-208.2012).

Bormann J (The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in pharmacological sciences* 21:16-19.2000).

Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Deliliers GL, Silani V, Soligo D, Polli E (Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol* 193:312-325.2005).

Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D (IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS ONE* 5:e14247.2010).

Brachvogel B, Moch H, Pausch F, Schlotzer-Schrehardt U, Hofmann C, Hallmann R, von der Mark K, Winkler T, Poschl E (Perivascular cells expressing annexin A5 define a novel mesenchymal stem cell-like population with the capacity to differentiate into multiple mesenchymal lineages. *Development* 132:2657-2668.2005).

Bradke F, Dotti CG (Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol* 10:574-581.2000).

Bradl M, Lassmann H (Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:37-53.2010).

Bray D (Branching patterns of individual sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 56:702-712.1973).

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779.2000).

Brustle O, Spiro AC, Karram K, Choudhary K, Okabe S, McKay RD (In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14809-14814.1997).

Caceres A, Banker GA, Binder L (Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 6:714-722.1986).

Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M, Qiu M (Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron* 45:41-53.2005).

Cai J, Zhu Q, Zheng K, Li H, Qi Y, Cao Q, Qiu M (Co-localization of Nkx6.2 and Nkx2.2 homeodomain proteins in differentiated myelinating oligodendrocytes. *Glia* 58:458-468.2010).

Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 20:869-882.1998).

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM (Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98:2396-2402.2001).

Campbell RE, Gaidamaka G, Han SK, Herbison AE (Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10835-10840.2009).

Caplan AI, Correa D (The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell* 9:11-15.2011).

Cellerino A, Carroll P, Thoenen H, Barde YA (Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* 9:397-408.1997).

Chao MV (Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309.2003).

Chao YX, He BP, Tay SS (Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 216:39-50.2009).

Charlton ST, Whetstone J, Fayinka ST, Read KD, Illum L, Davis SS (Evaluation of direct transport pathways of glycine receptor antagonists and an angiotensin antagonist from the nasal cavity to the central nervous system in the rat model. *Pharm Res* 25:1531-1543.2008).

Chaudhry FA, Reimer RJ, Edwards RH (The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J Cell Biol* 157:349-355.2002).

Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M (Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 189:49-57.2001a).

Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M (Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32:1005-1011.2001b).

Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam SC, Chopp M (Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology* 22:275-279.2002).

Chen YJ, Liou YJ, Chang CM, Li HY, Chen CY, Twu NF, Yen MS, Chang YL, Peng CH, Chiou SH, Chen CP, Chao KC (Reprogramming human endometrial fibroblast into induced pluripotent stem cells. *Taiwan J Obstet Gynecol* 51:35-42.2012).

Chenu C, Serre CM, Raynal C, Burt-Pichat B, Delmas PD (Glutamate receptors are expressed by bone cells and are involved in bone resorption. *Bone* 22:295-299.1998).

Choi YJ, Li WY, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Lee G, Bang OY (Enhancing trophic support of mesenchymal stem cells by ex vivo treatment with trophic factors. *J Neurol Sci* 298:28-34.2010).

Collino F, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G (MicroRNAs and mesenchymal stem cells. *Vitam Horm* 87:291-320.2011).

Colon-Ramos DA (Synapse formation in developing neural circuits. *Curr Top Dev Biol* 87:53-79.2009).

- Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, Du MQ, Luan SL, Altmann DR, Thompson AJ, Compston A, Scott MA, Miller DH, Chandran S (Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol* 11:150-156.2012).
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A (Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107:367-372.2006).
- Costa-Ferro ZS, Souza BS, Leal MM, Kaneto CM, Azevedo CM, da Silva IC, Soares MB, Ribeiro-Dos-Santos R, Dacosta JC (Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. *Neurobiology of disease*.2011).
- Costa-Ferro ZS, Vitola AS, Pedroso MF, Cunha FB, Xavier LL, Machado DC, Soares MB, Ribeiro-dos-Santos R, DaCosta JC (Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure : the journal of the British Epilepsy Association* 19:84-92.2010).
- Crews L, Masliah E (Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 19:R12-20.2010).
- Crigler L, Robey R, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney D (Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol* 198:54-64.2006a).
- Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG (Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol* 198:54-64.2006b).
- Cui QL, Almazan G (IGF-I-induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases. *J Neurochem* 100:1480-1493.2007).
- Cui XY, Hu QD, Tekaya M, Shimoda Y, Ang BT, Nie DY, Sun L, Hu WP, Karsak M, Duka T, Takeda Y, Ou LY, Dawe GS, Yu FG, Ahmed S, Jin LH, Schachner M, Watanabe K, Arsenijevic Y, Xiao ZC (NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *J Biol Chem* 279:25858-25865.2004).
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2204-2213.2006).
- Davis AA, Temple S (A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372:263-266.1994).
- Davydova DA, Vorotelyak EA, Smirnova YA, Zinovieva RD, Romanov YA, Kabaeva NV, Terskikh VV, Vasiliev AV (Cell phenotypes in human amniotic fluid. *Acta Naturae* 1:98-103.2009).
- De Camilli P, Jahn R (Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annu Rev Physiol* 52:625-645.1990).
- De Camilli P, Takei K (Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron* 16:481-486.1996).
- de Castro F, Bribian A (The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Brain Res Rev* 49:227-241.2005).
- De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A (Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 25:100-106.2007).
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K (Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608-614.2007).
- Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martinez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18126-18131.2011).
- Dinuzzo M, Mangia S, Maraviglia B, Giove F (The Role of Astrocytic Glycogen in Supporting the Energetics of Neuronal Activity. *Neurochem Res*.2012).

- Diogenes MJ, Costenla AR, Lopes LV, Jeronimo-Santos A, Sousa VC, Fontinha BM, Ribeiro JA, Sebastiao AM (Enhancement of LTP in aged rats is dependent on endogenous BDNF. *Neuropsychopharmacology* 36:1823-1836.2011).
- Domen J, Weissman IL (Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today* 5:201-208.1999).
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.2006).
- Donzelli E, Salvade A, Mimo P, Vigano M, Morrone M, Papagna R, Carini F, Zaopo A, Miloso M, Baldoni M, Tredici G (Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch Oral Biol* 52:64-73.2007).
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.1988).
- Drake-Baumann R (Rapid modulation of inhibitory synaptic currents in cerebellar Purkinje cells by BDNF. *Synapse* 57:183-190.2005).
- Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, Emery B, Zamanian JL, Foo LC, McManus MT, Barres BA (Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* 65:597-611.2010).
- Edgar JM, McLaughlin M, Werner HB, McCulloch MC, Barrie JA, Brown A, Faichney AB, Snaidero N, Nave KA, Griffiths IR (Early ultrastructural defects of axons and axon-glia junctions in mice lacking expression of Cnp1. *Glia* 57:1815-1824.2009).
- Elmariah S, Hughes E, Oh E, Balice-Gordon R (Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses. *Neuron Glia Biol* 1:1-11.2005a).
- Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG, Balice-Gordon RJ (Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors. *J Neurosci* 25:3638-3650.2005b).
- Erices A, Conget P, Minguell JJ (Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109:235-242.2000).
- Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA (Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139:380-392.2009).
- Fan CG, Tang FW, Zhang QJ, Lu SH, Liu HY, Zhao ZM, Liu B, Han ZB, Han ZC (Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 14:311-321.2005).
- Fancy SP, Kotter MR, Harrington EP, Huang JK, Zhao C, Rowitch DH, Franklin RJ (Overcoming remyelination failure in multiple sclerosis and other myelin disorders. *Exp Neurol* 225:18-23.2010).
- Fei H, Grygoruk A, Brooks ES, Chen A, Krantz DE (Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic* 9:1425-1436.2008).
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530.1998).
- Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G (The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci* 11:1617-1626.1991).
- Foudah D, Redaelli S, Donzelli E, Bentivegna A, Miloso M, Dalprà L, Tredici G (Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chromosome Res* 17:1025-1039.2009).
- Fox LE, Shen J, Ma K, Liu Q, Shi G, Pappas GD, Qu T, Cheng J (Membrane properties of neuron-like cells generated from adult human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 19:1831-1841.2010).
- Freedman MS, Uccelli A (Neurorepair with mesenchymal stem cells: hope or hype? *Lancet Neurol* 11:123-125.2012).
- Freeman MR (Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* 330:774-778.2010).
- Freneau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH (The identification of vesicular glutamate

- transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14488-14493.2002).
- Frerking M, Malenka RC, Nicoll RA (Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) modulates inhibitory, but not excitatory, transmission in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol* 80:3383-3386.1998).
- Frost EE, Zhou Z, Krasnesky K, Armstrong RC (Initiation of oligodendrocyte progenitor cell migration by a PDGF-A activated extracellular regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Neurochem Res* 34:169-181.2009).
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Bostrom H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126:457-467.1999).
- Führmann T, Montzka K, Hillen L, Hodde D, Dreier A, Bozkurt A, Wöltje M, Brook G (Axon growth-promoting properties of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Neurosci Lett* 474:37-41.2010).
- Gandarillas A, Watt FM (c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* 11:2869-2882.1997).
- Gard AL, Pfeiffer SE (Two proliferative stages of the oligodendrocyte lineage (A2B5+O4- and O4+GalC-) under different mitogenic control. *Neuron* 5:615-625.1990).
- Gordon D, Pavlovskaja G, Uney JB, Wraith DC, Scolding NJ (Human mesenchymal stem cells infiltrate the spinal cord, reduce demyelination, and localize to white matter lesions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:1087-1095.2010).
- Gottmann K, Mittmann T, Lessmann V (BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp Brain Res* 199:203-234.2009).
- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* 29:12764-12767.2009).
- Gruen L, Grabel L (Concise review: scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy. *Stem Cells* 24:2162-2169.2006).
- Guan XQ, Yu JL, Li LQ, Liu GX ([Study on mesenchymal stem cells entering the brain through the blood-brain barrier]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 42:920-923.2004).
- Hainfellner JA, Voigtlander T, Strobel T, Mazal PR, Maddalena AS, Aguzzi A, Budka H (Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:449-461.2001).
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13:54-63.2007).
- Hamilton NB, Attwell D (Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* 11:227-238.2010).
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13:81-88.1992).
- Heermann S, Schmucker J, Hinz U, Rickmann M, Unterbarnscheidt T, Schwab MH, Kriegelstein K (Neuregulin 1 type III/ErbB signaling is crucial for Schwann cell colonization of sympathetic axons. *PLoS One* 6:e28692.2011).
- Hering H, Sheng M (Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880-888.2001).
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21:RC181.2001).
- Hirschberg K, Zisling R, van Echten-Deckert G, Futerman AH (Ganglioside synthesis during the development of neuronal polarity. Major changes occur during axonogenesis and axon elongation, but not during dendrite growth or synaptogenesis. *J Biol Chem* 271:14876-14882.1996).
- Horn Z, Ringstedt T, Blaesse P, Kaila K, Herlenius E (Premature expression of KCC2 in embryonic mice perturbs neural development by an ion transport-independent mechanism. *Eur J Neurosci* 31:2142-2155.2010).
- Huang E, Bi Y, Jiang W, Luo X, Yang K, Gao JL, Gao Y, Luo Q, Shi Q, Kim SH, Liu X, Li M, Hu N, Liu H, Cui J, Zhang W, Li R, Chen X, Shen J, Kong Y, Zhang J, Wang J, Luo J, He BC, Wang H, Reid RR, Luu HH, Haydon RC, Yang L, He TC (Conditionally immortalized mouse embryonic fibroblasts retain

- proliferative activity without compromising multipotent differentiation potential. *PLoS One* 7:e32428.2012).
- Hübner CA, Lorke DE, Hermans-Borgmeyer I (Expression of the Na-K-2Cl-cotransporter NKCC1 during mouse development. *Mech Dev* 102:267-269.2001a).
- Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ (Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30:515-524.2001b).
- Hughes EG, Elmariah SB, Balice-Gordon RJ (Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Molecular and cellular neurosciences* 43:136-145.2010).
- Hung SC, Cheng H, Pan CY, Tsai MJ, Kao LS, Ma HL (In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. *Stem Cells* 20:522-529.2002).
- Hunter-Schaedle KE (Radial glial cell development and transformation are disturbed in reeler forebrain. *J Neurobiol* 33:459-472.1997).
- Ikeda O, Murakami M, Ino H, Yamazaki M, Koda M, Nakayama C, Moriya H (Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on compression-induced spinal cord injury: BDNF attenuates down-regulation of superoxide dismutase expression and promotes up-regulation of myelin basic protein expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:142-153.2002).
- In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH (Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22:1338-1345.2004).
- Irie F, Okuno M, Pasquale EB, Yamaguchi Y (EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptojanin 1. *Nat Cell Biol* 7:501-509.2005).
- Ishibashi T, Lee PR, Baba H, Fields RD (Leukemia inhibitory factor regulates the timing of oligodendrocyte development and myelination in the postnatal optic nerve. *J Neurosci Res* 87:3343-3355.2009).
- Jackman N, Ishii A, Bansal R (Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids. *Physiology (Bethesda)* 24:290-297.2009).
- Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V (Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 53:121-127.2007).
- Jacobi S, Soriano J, Segal M, Moses E (BDNF and NT-3 increase excitatory input connectivity in rat hippocampal cultures. *Eur J Neurosci* 30:998-1010.2009).
- Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Oh W, Yang YS, Yang SE (Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 85:212-225.2006).
- Jiang J, Lv Z, Gu Y, Li J, Xu L, Xu W, Lu J, Xu J (Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci Res* 66:46-52.2010).
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.2002).
- Jin X, Hu H, Mathers PH, Agmon A (Brain-derived neurotrophic factor mediates activity-dependent dendritic growth in nonpyramidal neocortical interneurons in developing organotypic cultures. *J Neurosci* 23:5662-5673.2003).
- Jo YH (Endogenous BDNF regulates inhibitory synaptic transmission in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurophysiol* 107:42-49.2012).
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-272.1998).
- Jones E, McGonagle D (Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)* 47:126-131.2008).
- Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F (The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol* 179:2824-2831.2007).
- Joshi S, Rajasekaran K, Kapur J (GABAergic transmission in temporal lobe epilepsy: The role of neurosteroids. *Exp Neurol*.2011).

- Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M (Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* 71:36-44.2002).
- Kaech S, Banker G (Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1:2406-2415.2006).
- Karaoz E, Ayhan S, Okcu A, Aksoy A, Bayazit G, Osman Gurol A, Duruksu G (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells co-cultured with pancreatic islets display beta cell plasticity. *J Tissue Eng Regen Med* 5:491-500.2011).
- Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, Bulte JW, Petrou P, Ben-Hur T, Abramsky O, Slavin S (Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 67:1187-1194.2010).
- Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF (1,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 8:1453-1458.1993).
- Kassis I, Vaknin-Dembinsky A, Karussis D (Bone marrow mesenchymal stem cells: agents of immunomodulation and neuroprotection. *Curr Stem Cell Res Ther* 6:63-68.2011).
- Kelly RB, Grote E (Protein targeting in the neuron. *Annu Rev Neurosci* 16:95-127.1993).
- Kessarlis N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9:173-179.2006).
- Kew JN, Kemp JA (Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 179:4-29.2005).
- Kiernan BW, Gotz B, Faissner A, French-Constant C (Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms. *Mol Cell Neurosci* 7:322-335.1996).
- Kim H, Walczak P, Kerr C, Galpoththawela C, Gilad AA, Muja N, Bulte JW (Immunomodulation by Transplanted Human Embryonic Stem Cell- Derived Oligodendroglial Progenitors in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Stem Cells*.2012).
- Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Scholer HR (Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454:646-650.2008).
- Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F, 3rd (Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 29:11-19.2011).
- Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA (Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 11:377-391.2009).
- Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A (Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68:235-244.2001).
- Kondo T, Raff M (Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Development* 127:2989-2998.2000).
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10711-10716.1999).
- Koshimizu H, Kiyosue K, Hara T, Hazama S, Suzuki S, Uegaki K, Nagappan G, Zaitsev E, Hirokawa T, Tatsu Y, Ogura A, Lu B, Kojima M (Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Mol Brain* 2:27.2009).
- Kubo M, Ito E (Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. *Proteins* 56:411-419.2004).
- Kucharova K, Stallcup WB (The NG2 proteoglycan promotes oligodendrocyte progenitor proliferation and developmental myelination. *Neuroscience* 166:185-194.2010).
- Kumar S, Pena LA, de Vellis J (CNS glial cells express neurotrophin receptors whose levels are regulated by NGF. *Brain Res Mol Brain Res* 17:163-168.1993).

Kuzirian MS, Paradis S (Emerging themes in GABAergic synapse development. *Progress in neurobiology* 95:68-87.2011).

Kwon M, Fernandez JR, Zegarek GF, Lo SB, Firestein BL (BDNF-promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent transcriptional regulation of cypin. *J Neurosci* 31:9735-9745.2011).

Landmesser L, Dahm L, Tang JC, Rutishauser U (Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron* 4:655-667.1990).

Lanza C, Morando S, Voci A, Canesi L, Principato M, Serpero L, Mancardi G, Uccelli A, Vergani L (Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo. *J Neurochem* 110:1674-1684.2009).

Le Blanc K, Ringden O (Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 262:509-525.2007).

Le Meur K, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Audinat E (GABA release by hippocampal astrocytes. *Front Comput Neurosci* 6:59.2012).

Lechner A, Habener JF (Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E259-266.2003).

Lee H, Chen CX, Liu YJ, Aizenman E, Kandler K (KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses. *Eur J Neurosci* 21:2593-2599.2005).

Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, Tada M, Sawada K, Iwasaki Y (Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology* 23:169-180.2003).

Lee JS, Ho WK, Lee SH (Post-tetanic increase in the fast-releasing synaptic vesicle pool at the expense of the slowly releasing pool. *Journal of General Physiology* 136:259-272.2010).

Lennon DP, Caplan AI (Isolation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 34:1606-1607.2006).

Leong WS, Wu SC, Pal M, Tay CY, Yu H, Li H, Tan LP (Cyclic tensile loading regulates human mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like phenotype. *J Tissue Eng Regen Med*.2012).

Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, Gao Q, Shen LH, Zhang J, Lu M, Chopp M (Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 49:407-417.2005).

Liour SS, Yu RK (Differentiation of radial glia-like cells from embryonic stem cells. *Glia* 42:109-117.2003).

Liras A (Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *J Transl Med* 8:131.2010).

Lise MF, El-Husseini A (The neuroligin and neuroligin families: from structure to function at the synapse. *Cell Mol Life Sci* 63:1833-1849.2006).

Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC (Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry* 106:984-991.2009).

Lu J, Moomhala S, Moore XL, Ng KC, Tan MH, Lee LK, He B, Wong MC, Ling EA (Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 398:12-17.2006).

Lu P, Blesch A, Tuszynski MH (Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* 77:174-191.2004).

Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH (Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109:75-86.2002).

Lu Y, Christian K, Lu B (BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* 89:312-323.2008).

Lucas FR, Salinas PC (WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev Biol* 192:31-44.1997).

Ludwig A, Uvarov P, Soni S, Thomas-Crusells J, Airaksinen MS, Rivera C (Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *J Neurosci* 31:644-649.2011).

Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY (Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion* 11:345-349.1971).

- Luscher B, Keller CA (Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacology & therapeutics* 102:195-221.2004).
- Lutton C, Young YW, Williams R, Meedeniya ACB, Mackay-Sim A, Goss B (Combined VEGF and PDGF Treatment Reduces Secondary Degeneration after Spinal Cord Injury. *J Neurotraum* 29:957-+.2012).
- Maestroni GJ (Neurohormones and catecholamines as functional components of the bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci* 917:29-37.2000).
- Magistretti J, Alonso A (Fine gating properties of channels responsible for persistent sodium current generation in entorhinal cortex neurons. *J Gen Physiol* 120:855-873.2002).
- Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL (Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematol Stem Cell* 9:841-848.2000).
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S (Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103:697-705.1999).
- Marigo I, Dazzi F (The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. *Seminars in immunopathology* 33:593-602.2011).
- Martin SM, Landel HB, Lansing AJ, Vijayan VK (Immunocytochemical double labeling of glial fibrillary acidic protein and transferrin permits the identification of astrocytes and oligodendrocytes in the rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:161-170.1991).
- Martin TF (Stages of regulated exocytosis. *Trends Cell Biol* 7:271-276.1997).
- Marty S, Wehrle R, Sotelo C (Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus. *J Neurosci* 20:8087-8095.2000).
- Mathiasen AB, Haack-Sorensen M, Kastrup J (Mesenchymal stromal cells for cardiovascular repair: current status and future challenges. *Future Cardiol* 5:605-617.2009).
- Matsui T, Ishikawa T, Ito H, Okamoto M, Inoue K, Lee MC, Fujikawa T, Ichitani Y, Kawanaka K, Soya H (Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise. *J Physiol* 590:607-616.2012).
- Mauri M, Lentini D, Gravati M, Foudah D, Biella G, Costa B, Toselli M, Parenti M, Coco S (Mesenchymal stem cells enhance GABAergic transmission in co-cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 49:395-405.2012).
- May R, Riehl TE, Hunt C, Sureban SM, Anant S, Houchen CW (Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker, doublecortin and CaM kinase-like-1, following radiation injury and in adenomatous polyposis coli/multiple intestinal neoplasia mice. *Stem Cells* 26:630-637.2008).
- Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, Testa L, Stecco A, Tarletti R, Miglioretti M, Fava E, Nasuelli N, Cisari C, Massara M, Vercelli R, Oggioni GD, Carriero A, Cantello R, Monaco F, Fagioli F (Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp Neurol* 223:229-237.2010).
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Miglioretti M, Stecco A, Servo S, Carriero A, Monaco F, Fagioli F (Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study. *Cytotherapy* 14:56-60.2012).
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870-876.1997).
- Mei F, Nagappan G, Ke Y, Sacktor TC, Lu B (BDNF facilitates L-LTP maintenance in the absence of protein synthesis through PKMzeta. *PLoS One* 6:e21568.2011).
- Meirelles LS, Fontes A, Covas D, Caplan A (Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:419-427.2009).
- Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, Chang J, Thill G, Levesque M, Zhang M, Hession C, Sah D, Trapp B, He Z, Jung V, McCoy JM, Pepinsky RB (LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8:745-751.2005).
- Miller RH, Mi S (Dissecting demyelination. *Nat Neurosci* 10:1351-1354.2007).

- Mirsky R, Jessen KR (Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol* 6:89-96.1996).
- Montzka K, Lassonczyk N, Tschoke B, Neuss S, Fuhrmann T, Franzen R, Smeets R, Brook GA, Woltje M (Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci* 10:16.2009).
- Morando S, Vigo T, Esposito M, Casazza S, Novi G, Principato MC, Furlan R, Uccelli A (The therapeutic effect of mesenchymal stem cell transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by peripheral and central mechanisms. *Stem Cell Res Ther* 3:3.2012).
- Mori H, Mishina M (Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34:1219-1237.1995).
- Nadkarni S, Jung P (Modeling synaptic transmission of the tripartite synapse. *Phys Biol* 4:1-9.2007).
- Nait Oumesmar B, Vignais L, Duhamel-Clerin E, Avellana-Adalid V, Rougon G, Baron-Van Evercooren A (Expression of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule during postnatal myelination and following chemically induced demyelination of the adult mouse spinal cord. *Eur J Neurosci* 7:480-491.1995).
- Nave KA (Oligodendrocytes and the "micro brake" of progenitor cell proliferation. *Neuron* 65:577-579.2010).
- Neshati Z, Matin MM, Bahrami AR, Moghimi A (Differentiation of mesenchymal stem cells to insulin-producing cells and their impact on type 1 diabetic rats. *J Physiol Biochem* 66:181-187.2010).
- Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I (Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 77:192-204.2004).
- Neukirchen D, Bradke F (Neuronal polarization and the cytoskeleton. *Semin Cell Dev Biol* 22:825-833.2011).
- Newell-Litwa K, Salazar G, Faundez V, Chintala S (Adaptor protein complex-3 (AP-3) isoforms competitively regulate synaptic vesicle membrane protein content. *Febs Journal* 275:204-204.2008).
- Ni B, Rosteck PR, Jr., Nadi NS, Paul SM (Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5607-5611.1994).
- Ninomiya Y, Sugahara-Yamashita Y, Nakachi Y, Tokuzawa Y, Okazaki Y, Nishiyama M (Development of a rapid culture method to induce adipocyte differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394:303-308.2010).
- Nowakowski RS, Rakic P (The mode of migration of neurons to the hippocampus: a Golgi and electron microscopic analysis in foetal rhesus monkey. *J Neurocytol* 8:697-718.1979).
- O'Brien R, Xu D, Mi R, Tang X, Hopf C, Worley P (Synaptically targeted narp plays an essential role in the aggregation of AMPA receptors at excitatory synapses in cultured spinal neurons. *J Neurosci* 22:4487-4498.2002).
- Oberlander JG, Henderson LP (Corticotropin-releasing factor modulation of forebrain GABAergic transmission has a pivotal role in the expression of anabolic steroid-induced anxiety in the female mouse. *Neuropsychopharmacology* 37:1483-1499.2012).
- Olah M, Amor S, Brouwer N, Vinet J, Eggen B, Biber K, Boddeke HW (Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia* 60:306-321.2012).
- Osterhout DJ, Ebner S, Xu J, Ornitz DM, Zazanis GA, McKinnon RD (Transplanted oligodendrocyte progenitor cells expressing a dominant-negative FGF receptor transgene fail to migrate in vivo. *J Neurosci* 17:9122-9132.1997).
- Oswald RE (Ionotropic glutamate receptor recognition and activation. *Adv Protein Chem* 68:313-349.2004).
- Pan FC, Wright C (Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn* 240:530-565.2011).
- Parekkadan B, Milwid JM (Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biomedical engineering* 12:87-117.2010).
- Park HE, Kim D, Koh HS, Cho S, Sung JS, Kim JY (Real-time monitoring of neural differentiation of human mesenchymal stem cells by electric cell-substrate impedance sensing. *J Biomed Biotechnol* 2011:485173.2011).

- Park KS, Kim YS, Kim JH, Choi B, Kim SH, Tan AH, Lee MS, Lee MK, Kwon CH, Joh JW, Kim SJ, Kim KW (Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. *Transplantation* 89:509-517.2010).
- Park SI, Lim JY, Jeong CH, Kim SM, Jun JA, Jeun SS, Oh WI (Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy promotes functional recovery of contused rat spinal cord through enhancement of endogenous cell proliferation and oligogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2012:362473.2012).
- Park Y, Kim KT (Short-term plasticity of small synaptic vesicle (SSV) and large dense-core vesicle (LDCV) exocytosis. *Cell Signal* 21:1465-1470.2009).
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26:199-206.2003).
- Perea G, Navarrete M, Araque A (Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences* 32:421-431.2009).
- Peterson LK, Fujinami RS (Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 184:37-44.2007).
- Petralia RS (Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. *ScientificWorldJournal* 2012:267120.2012).
- Piaton G, Gould RM, Lubetzki C (Axon-oligodendrocyte interactions during developmental myelination, demyelination and repair. *J Neurochem* 114:1243-1260.2010).
- Piek E, Sleumer LS, van Someren EP, Heuver L, de Haan JR, de Grijjs I, Gilissen C, Hendriks JM, van Ravestein-van Os RI, Bauerschmidt S, Dechering KJ, van Zoelen EJ (Osteo-transcriptomics of human mesenchymal stem cells: accelerated gene expression and osteoblast differentiation induced by vitamin D reveals c-MYC as an enhancer of BMP2-induced osteogenesis. *Bone* 46:613-627.2010).
- Pinto L, Gotz M (Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol* 83:2-23.2007).
- Preston MR, el Haj AJ, Publicover SJ (Expression of voltage-operated Ca²⁺ channels in rat bone marrow stromal cells in vitro. *Bone* 19:101-106.1996).
- Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J, Fu H, Rao M, Sussel L, Rubenstein J, Qiu M (Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* 128:2723-2733.2001).
- Qiao S, Luo JH, Jin JH ([Role of microglial activation induced by alpha-synuclein in pathogenesis of Parkinson's disease]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 41:210-214.2012).
- Reh TA (Neural stem cells: form and function. *Nat Neurosci* 5:392-394.2002).
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM (Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109:337-346.2002).
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98:2615-2625.2001).
- Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL (Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 11:312-324.1996).
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvoori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.1999).
- Rivera FJ, Couillard-Despres S, Pedre X, Ploetz S, Caioni M, Lois C, Bogdahn U, Aigner L (Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells. *Stem Cells* 24:2209-2219.2006).
- Robinson S, Tani M, Strieter RM, Ransohoff RM, Miller RH (The chemokine growth-regulated oncogene-alpha promotes spinal cord oligodendrocyte precursor proliferation. *J Neurosci* 18:10457-10463.1998).
- Rosenmund C, Stevens CF (Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16:1197-1207.1996).
- Rumsey JW, Das M, Stancescu M, Bott M, Fernandez-Valle C, Hickman JJ (Node of Ranvier formation on motoneurons in vitro. *Biomaterials* 30:3567-3572.2009).

Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM, Turrigiano GG (Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci* 17:4527-4535.1997).

Rutherford LC, Nelson SB, Turrigiano GG (BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* 21:521-530.1998).

Sagne C, El Mestikawy S, Isambert MF, Hamon M, Henry JP, Giros B, Gasnier B (Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett* 417:177-183.1997).

Saheki Y, De Camilli P (Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.2012).

Sakai D, Wakamatsu Y (Regulatory mechanisms for neural crest formation. *Cells Tissues Organs* 179:24-35.2005).

Sanchez AL, Matthews BJ, Meynard MM, Hu B, Javed S, Cohen Cory S (BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo. *Development* 133:2477-2486.2006).

Santello M, Cali C, Bezzi P (Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol* 970:307-331.2012).

Schafer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD (Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 277:50734-50748.2002).

Scheschonka A, Findlow S, Schemm R, El Far O, Caldwell JH, Crump MP, Holden-Dye K, O'Connor V, Betz H, Werner JM (Structural determinants of calmodulin binding to the intracellular C-terminal domain of the metabotropic glutamate receptor 7A. *J Biol Chem* 283:5577-5588.2008).

Schierwagen AK (Growth, structure and dynamics of real neurons: model studies and experimental results. *Biomed Biochim Acta* 49:709-722.1990).

Schuldiner S, Shirvan A, Linial M (Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol Rev* 75:369-392.1995).

Scuteri A, Ravasi M, Pasini S, Bossi M, Tredici G (Mesenchymal stem cells support dorsal root ganglion neurons survival by inhibiting the metalloproteinase pathway. *Neuroscience* 172:12-19.2011).

Seale P, Rudnicki MA (A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218:115-124.2000).

Seil FJ, Drake-Baumann R (TrkB receptor ligands promote activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *J Neurosci* 20:5367-5373.2000).

Sejersen T, Lendahl U (Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* 106 (Pt 4):1291-1300.1993).

Sell S (Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 50:3811-3815.1990).

Sershen H (Astrocyte origin of activity-dependent release of ATP and glutamate in hippocampal slices: Real-time measurement utilizing microelectrode biosensors. *Br J Pharmacol*.2012).

Shapiro L, Love J, Colman DR (Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci* 30:451-474.2007).

Shaw G, Banker GA, Weber K (An immunofluorescence study of neurofilament protein expression by developing hippocampal neurons in tissue culture. *Eur J Cell Biol* 39:205-216.1985).

Shi S, Gronthos S (Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18:696-704.2003).

Shintani A, Nakao N, Kakishita K, Itakura T (Protection of dopamine neurons by bone marrow stromal cells. *Brain Res* 1186:48-55.2007).

Sidoryk-Wegrzynowicz M, Lee E, Mingwei N, Aschner M (Disruption of astrocytic glutamine turnover by manganese is mediated by the protein kinase C pathway. *Glia* 59:1732-1743.2011).

Sieghart W (Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21:411-413.2000).

Simmons PJ, Torok-Storb B (Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78:55-62.1991).

Slavin S, Kurkalli BG, Karussis D (The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clin Neurol Neurosurg* 110:943-946.2008).

- Sloper JJ, Powell TP (Dendro-dendritic and reciprocal synapses in the primate motor cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 203:23-38.1978).
- Sng J, Lufkin T (Emerging stem cell therapies: treatment, safety, and biology. *Stem Cells Int* 2012:521343.2012).
- Sofroniew MV, Vinters HV (Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119:7-35.2010).
- Sommer I, Schachner M (Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83:311-327.1981).
- Somoza R, Conget P, Rubio FJ (Neuropotency of human mesenchymal stem cell cultures: clonal studies reveal the contribution of cell plasticity and cell contamination. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:546-555.2008).
- Spencer GE, Klumperman J, Syed NI (Neurotransmitters and neurodevelopment. Role of dopamine in neurite outgrowth, target selection and specific synapse formation. *Perspect Dev Neurobiol* 5:451-467.1998).
- Spiegel I, Peles E (A new player in CNS myelination. *Neuron* 49:777-778.2006).
- Stiess M, Bradke F (Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Dev Neurobiol* 71:430-444.2011).
- Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U, Wegner M (Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* 16:165-170.2002).
- Studer L, Spenger C, Seiler RW, Othberg A, Lindvall O, Odin P (Effects of brain-derived neurotrophic factor on neuronal structure of dopaminergic neurons in dissociated cultures of human fetal mesencephalon. *Exp Brain Res* 108:328-336.1996).
- Sudhof TC (The Synaptic Vesicle Cycle - a Cascade of Protein-Protein Interactions. *Nature* 375:645-653.1995).
- Sugimoto Y, Taniguchi M, Yagi T, Akagi Y, Nojyo Y, Tamamaki N (Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. *Development* 128:3321-3330.2001).
- Takasaki C, Yamasaki M, Uchigashima M, Konno K, Yanagawa Y, Watanabe M (Cytochemical and cytological properties of perineuronal oligodendrocytes in the mouse cortex. *Eur J Neurosci* 32:1326-1336.2010).
- Tat PA, Sumer H, Jones KL, Upton K, Verma PJ (The efficient generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mouse adipose tissue-derived and neural stem cells. *Cell Transplant* 19:525-536.2010).
- Tauber H, Waehnelndt TV, Neuhoff V (Myelination in rabbit optic nerves is accelerated by artificial eye opening. *Neurosci Lett* 16:235-238.1980).
- TC ES, Dezone RS, Rehen SK, Gomes FC (Astrocytes treated by lysophosphatidic acid induce axonal outgrowth of cortical progenitors through extracellular matrix protein and epidermal growth factor signaling pathway. *J Neurochem* 119:113-123.2011).
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545.2002).
- Terauchi A, Johnson-Venkatesh EM, Toth AB, Javed D, Sutton MA, Umemori H (Distinct FGFs promote differentiation of excitatory and inhibitory synapses. *Nature* 465:783-787.2010).
- Thibault RA, Scott Baggett L, Mikos AG, Kasper FK (Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements. *Tissue Eng Part A* 16:431-440.2010).
- Tolwani RJ, Cosgaya JM, Varma S, Jacob R, Kuo LE, Shooter EM (BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 77:662-669.2004).
- Torgner I, Kvamme E (Synthesis of transmitter glutamate and the glial-neuron interrelationship. *Mol Chem Neurobiol* 12:11-17.1990).
- Tretter V, Moss SJ (GABA(A) Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses. *Frontiers in molecular neuroscience* 1:7.2008).

- Trivedi P, Tray N, Nguyen T, Nigam N, Gallicano GI (Mesenchymal stem cell therapy for treatment of cardiovascular disease: helping people sooner or later. *Stem Cells Dev* 19:1109-1120.2010).
- Trotter J, Karram K, Nishiyama A (NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 63:72-82.2010).
- Tsai HH, Frost E, To V, Robinson S, Ffrench-Constant C, Geertman R, Ransohoff RM, Miller RH (The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell* 110:373-383.2002).
- Tsai HH, Tessier-Lavigne M, Miller RH (Netrin 1 mediates spinal cord oligodendrocyte precursor dispersal. *Development* 130:2095-2105.2003).
- Tyler WJ, Pozzo-Miller LD (BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 21:4249-4258.2001).
- Tyler WJ, Zhang XL, Hartman K, Winterer J, Muller W, Stanton PK, Pozzo-Miller L (BDNF increases release probability and the size of a rapidly recycling vesicle pool within rat hippocampal excitatory synapses. *J Physiol* 574:787-803.2006).
- Uccelli A, Milanese M, Principato MC, Morando S, Bonifacino T, Vergani L, Giunti D, Voci A, Carminati E, Giribaldi F, Caponnetto C, Bonanno G (Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Med* 18:794-804.2012a).
- Uccelli A, Milanese M, Principato MC, Morando S, Bonifacino T, Vergani L, Giunti D, Voci A, Carminati E, Giribaldi F, Caponnetto C, Bonanno G (Intravenous Mesenchymal Stem Cells Improve Survival and Motor Function in Experimental Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Med*.2012b).
- Uchida K, Urabe K, Naruse K, Ujihira M, Mabuchi K, Itoman M (Comparison of the cytokine-induced migratory response between primary and subcultured populations of rat mesenchymal bone marrow cells. *J Orthop Sci* 12:484-492.2007).
- Vaccarino FM, Fagel DM, Ganat Y, Maragnoli ME, Ment LR, Ohkubo Y, Schwartz ML, Silbereis J, Smith KM (Astroglial cells in development, regeneration, and repair. *Neuroscientist* 13:173-185.2007).
- van Velthoven CT, van de Looij Y, Kavelaars A, Zijlstra J, van Bel F, Huppi PS, Sizonenko S, Heijnen CJ (Mesenchymal stem cells restore cortical rewiring after neonatal ischemia in mice. *Ann Neurol* 71:785-796.2012).
- Varoqui H, Schafer MK, Zhu H, Weihe E, Erickson JD (Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22:142-155.2002).
- Veeravalli KK, Dasari VR, Fassett D, Dinh DH, Rao JS (Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells upregulate myelin basic protein in shiverer mice. *Stem Cells Dev* 20:881-891.2011).
- Voyvodic JT (Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons. *Nature* 342:430-433.1989).
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI (Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18:1417-1426.1995).
- Walker PA, Harting MT, Shah SK, Day MC, El Khoury R, Savitz SI, Baumgartner J, Cox CS (Progenitor cell therapy for the treatment of central nervous system injury: a review of the state of current clinical trials. *Stem cells international* 2010:369578.2010).
- Wang DD, Bordey A (The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology* 86:342-367.2008).
- Wang S, Sdrulla AD, diSibio G, Bush G, Nofziger D, Hicks C, Weinmaster G, Barres BA (Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21:63-75.1998).
- Waubant E (Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Dis Markers* 22:235-244.2006).
- Webb K, Budko E, Neuberger TJ, Chen S, Schachner M, Tresco PA (Substrate-bound human recombinant L1 selectively promotes neuronal attachment and outgrowth in the presence of astrocytes and fibroblasts. *Biomaterials* 22:1017-1028.2001).
- Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM (Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* 5:959-966.2003).
- Wilkins A, Kemp K, Ginty M, Hares K, Mallam E, Scolding N (Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res*.2009).

- Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B (Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 23:392-402.2005).
- Witte H, Bradke F (The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr Opin Neurobiol* 18:479-487.2008).
- Wojtowicz T, Lebeda K, Mozrzymas JW (17beta-estradiol affects GABAergic transmission in developing hippocampus. *Brain Res* 1241:7-17.2008).
- Wojtowicz T, Mozrzymas JW (Estradiol and GABAergic transmission in the hippocampus. *Vitam Horm* 82:279-300.2010).
- Wolswijk G, Riddle PN, Noble M (Platelet-derived growth factor is mitogenic for O-2Aadult progenitor cells. *Glia* 4:495-503.1991).
- Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A (piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766-770.2009).
- Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA, Bent SJ, Williams J, Nixon AJ (Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthopaed Res* 19:738-749.2001).
- Wright KT, El Masri W, Osman A, Chowdhury J, Johnson WE (Concise review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. *Stem Cells* 29:169-178.2011).
- Wu DM, Schneiderman T, Burgett J, Gokhale P, Barthel L, Raymond PA (Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2115-2124.2001).
- Xu X, Cai J, Fu H, Wu R, Qi Y, Modderman G, Liu R, Qiu M (Selective expression of Nkx-2.2 transcription factor in chicken oligodendrocyte progenitors and implications for the embryonic origin of oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 16:740-753.2000).
- Yamada MK, Nakanishi K, Ohba S, Nakamura T, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N (Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:7580-7585.2002a).
- Yamada MK, Nakanishi K, Ohba S, Nakamura T, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N (Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:7580-7585.2002b).
- Yanagawa M, Yamashita T, Shichida Y (Comparative fluorescence resonance energy transfer analysis of metabotropic glutamate receptors: implications about the dimeric arrangement and rearrangement upon ligand bindings. *J Biol Chem* 286:22971-22981.2011).
- Yang J, Yan Y, Ciric B, Yu S, Guan Y, Xu H, Rostami A, Zhang GX (Evaluation of bone marrow- and brain-derived neural stem cells in therapy of central nervous system autoimmunity. *Am J Pathol* 177:1989-2001.2010).
- Yeo M, Berglund K, Augustine G, Liedtke W (Novel repression of Kcc2 transcription by REST-RE-1 controls developmental switch in neuronal chloride. *J Neurosci* 29:14652-14662.2009).
- Yi T, Song SU (Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Archives of Pharmacol Research* 35:213-221.2012).
- Yoshii A, Constantine-Paton M (Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol* 70:304-322.2010).
- Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW (Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng* 2010:218142.2010).
- Zacharek A, Shehadah A, Chen J, Cui X, Roberts C, Lu M, Chopp M (Comparison of bone marrow stromal cells derived from stroke and normal rats for stroke treatment. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 41:524-530.2010).
- Zakharenko SS, Zablow L, Siegelbaum SA (Altered presynaptic vesicle release and cycling during mGluR-dependent LTD. *Neuron* 35:1099-1110.2002).

- Zhang J, Li Y, Chen J, Cui Y, Lu M, Elias SB, Mitchell JB, Hammill L, Vanguri P, Chopp M (Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol* 195:16-26.2005).
- Zhao C, Fancy SP, Franklin RJ, French-Constant C (Up-regulation of oligodendrocyte precursor cell alphaV integrin and its extracellular ligands during central nervous system remyelination. *J Neurosci Res* 87:3447-3455.2009).
- Zhu L, Polley N, Mathews GC, Delpire E (NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy Res* 79:201-212.2008).
- Ziv NE, Garner CC (Principles of glutamatergic synapse formation: seeing the forest for the trees. *Current opinion in neurobiology* 11:536-543.2001).
- Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V (Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro* 4.2012).