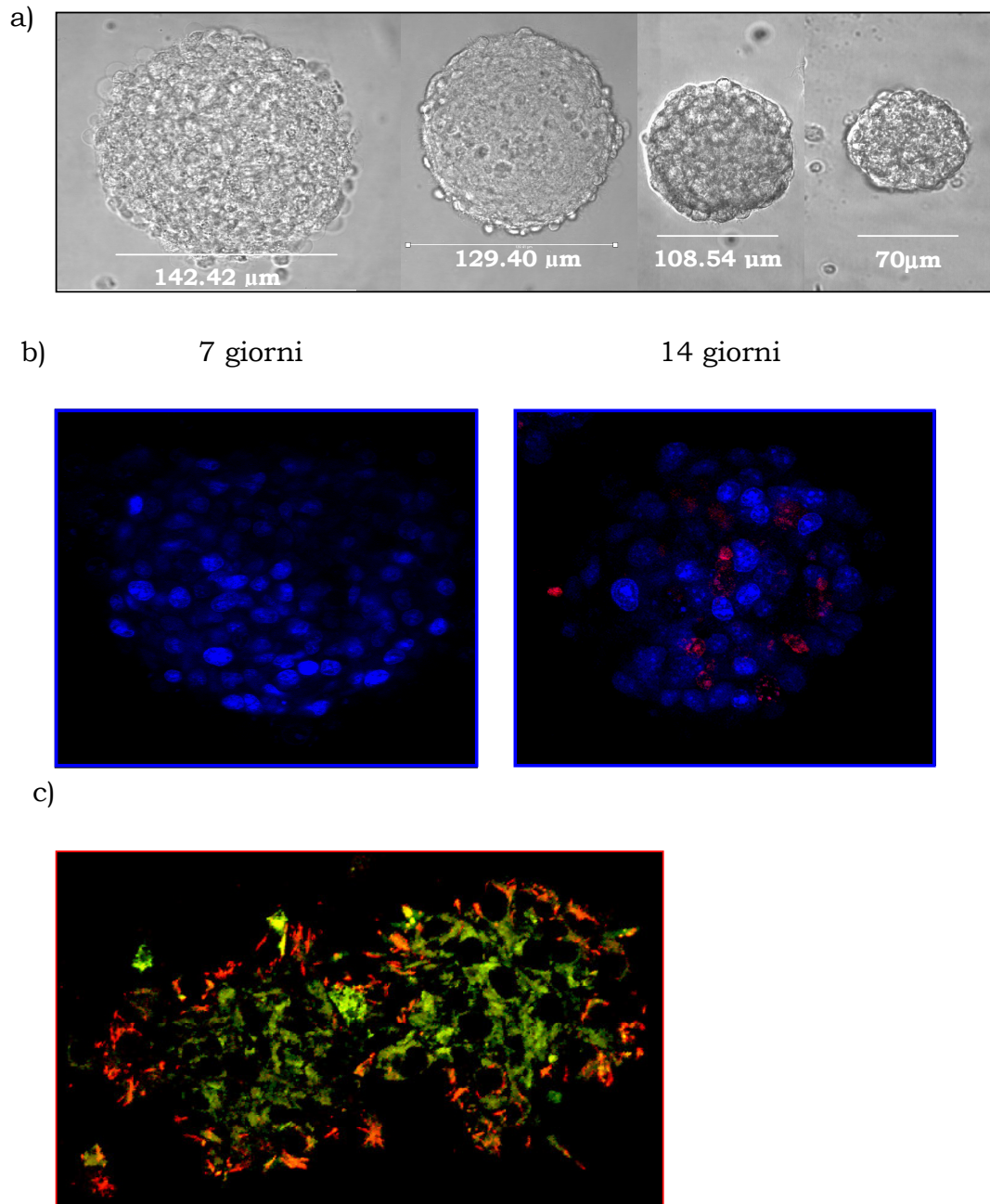


### **Caratterizzazione di neurosfere Ctr e Wr**

ANSCs/ANPCs Ctr e Wr mantenute in terreno basale formano, dopo 7 giorni in coltura, neurosfere flottanti ed eterogenee con diametro variabile tra 70-140  $\mu\text{m}$  (Figura 1a).

La doppia marcatura con le sonde fluorescenti SYTO 59 e Propidio ha permesso di valutare la vitalità cellulare delle neurosfere dopo 7 e 14 giorni di coltura. Il SYTO 59, infatti, è un colorante vitale lipofilo, in grado di permeare la membrana cellulare e di legarsi agli acidi nucleici. Il Propidio, invece, essendo idrofilico, viene escluso dalle cellule vive e si lega agli acidi nucleici delle cellule permeabilizzate. La presenza di cellule colorate con Propidio è stata riscontrata nelle sfere Ctr e Wr mantenute in coltura per 14 giorni, ma non in quelle coltivate per 7 giorni (Figura 1b). Al fine di permettere la migliore espansione cellulare, ho perciò deciso di dissociare le neurosfere settimanalmente. Mantenendo le sfere in coltura, per 14 giorni o tempi superiori, è possibile osservare, anche al microscopio ottico, la formazione di un core scuro costituito da cellule necrotiche o apoptotiche (Svendsen et al., 1997; Bez et al., 2003), che vengono colorate dal Propidio. Infatti, al raggiungimento di una dimensione critica le cellule nel core della neurosfera risentono di una riduzione degli scambi con l'ambiente circostante, come nutrimento, ossigeno e rimozione dei cataboliti.

Queste osservazioni sono in accordo con i risultati della valutazione dello stato di energizzazione mitocondriale delle cellule che formano le sfere Ctr e Wr. La sonda fluorescente JC-1, ha messo in luce una distribuzione non omogenea delle cellule con mitocondri energizzati; infatti, sia nelle sfere Ctr sia nelle sfere Wr le cellule degli strati più esterni sono più ricche in mitocondri metabolicamente attivi, probabilmente poiché la loro posizione è favorevole allo scambio di ossigeno e nutrienti con il terreno (Figura 1c).



**Figura 1.** **a)** Immagini di neurosfere Ctr e Wr acquisite in trasmissione al microscopio confocale. **b)** Neurosfere a 7 e 14 giorni di coltura marcate con le sonde SYTO 59 (blue) e Propidio (rosso): mentre a 7 giorni tutte le cellule della sfera sono vitali, a 14 giorni si osservano cellule colorate con Propidio. **c)** Sezione di neurosfere ottenuta al microscopio confocale dopo marcatura con il colorante JC-1: le cellule dello strato più esterno delle sfere sono metabolicamente più attive rispetto a quelle del core.

### **Capacità autorigenativa e tasso di crescita di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr**

La capacità autorigenativa, in presenza di fattori di crescita come EGF e FGF-2, è una delle proprietà fondamentali delle ANSCs e deve essere dimostrata attraverso un'analisi di popolazione a lungo termine al fine di evitare che progenitori transientemente proliferanti vengano considerati ANSCs.

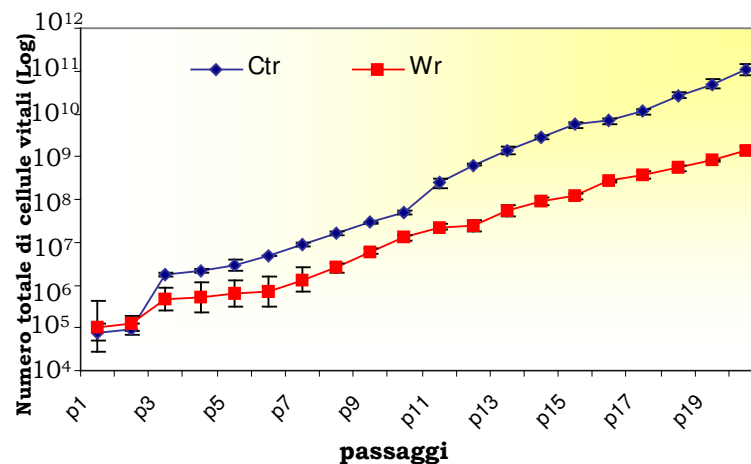
Quantificando il numero di cellule vitali Ctr e Wr ottenute dopo dissociazione cellulare delle neurosfere fino al ventesimo passaggio è stato possibile ricostruire le curve di crescita della popolazione cellulare isolata da SVZ di topi Ctr e Wr. Si è osservato che entrambe le popolazioni mostrano un'estesa capacità autorigenativa. L'espansione a lungo termine avviene per entrambe le popolazioni, ma con velocità diversa (Figura 2). A partire da P3, infatti, il numero totale di cellule vitali ottenuto dopo dissociazione delle sfere Wr è significativamente inferiore (ANOVA,  $p < 0.0001$ ,  $n=3$ ) a quello delle sfere Ctr. Ad ogni passaggio, il tasso di crescita medio, espresso come il rapporto tra il numero di cellule vitali ad un determinato passaggio e il numero di cellule vitali ottenute al passaggio precedente, è di  $2.92 \pm 0.95$  e di  $1.79 \pm 0.14$  rispettivamente per le ANSCs Ctr e Wr.

Per verificare se tale differenza fosse dovuta ad una inferiore capacità proliferativa delle ANSCs Wr, è stata valutata la capacità delle cellule Ctr e Wr di incorporare BrdU durante la fase di sintesi del ciclo cellulare. L'incorporazione di BrdU è significativamente inferiore ( $p < 8.05 \times 10^{-6}$ ) nelle ANSCs Wr rispetto a quelle di Ctr (Figura 3a); perciò, ANSCs isolate dalla SVZ di topi Wr proliferano più lentamente rispetto ad ANSCs isolate da topi sani.

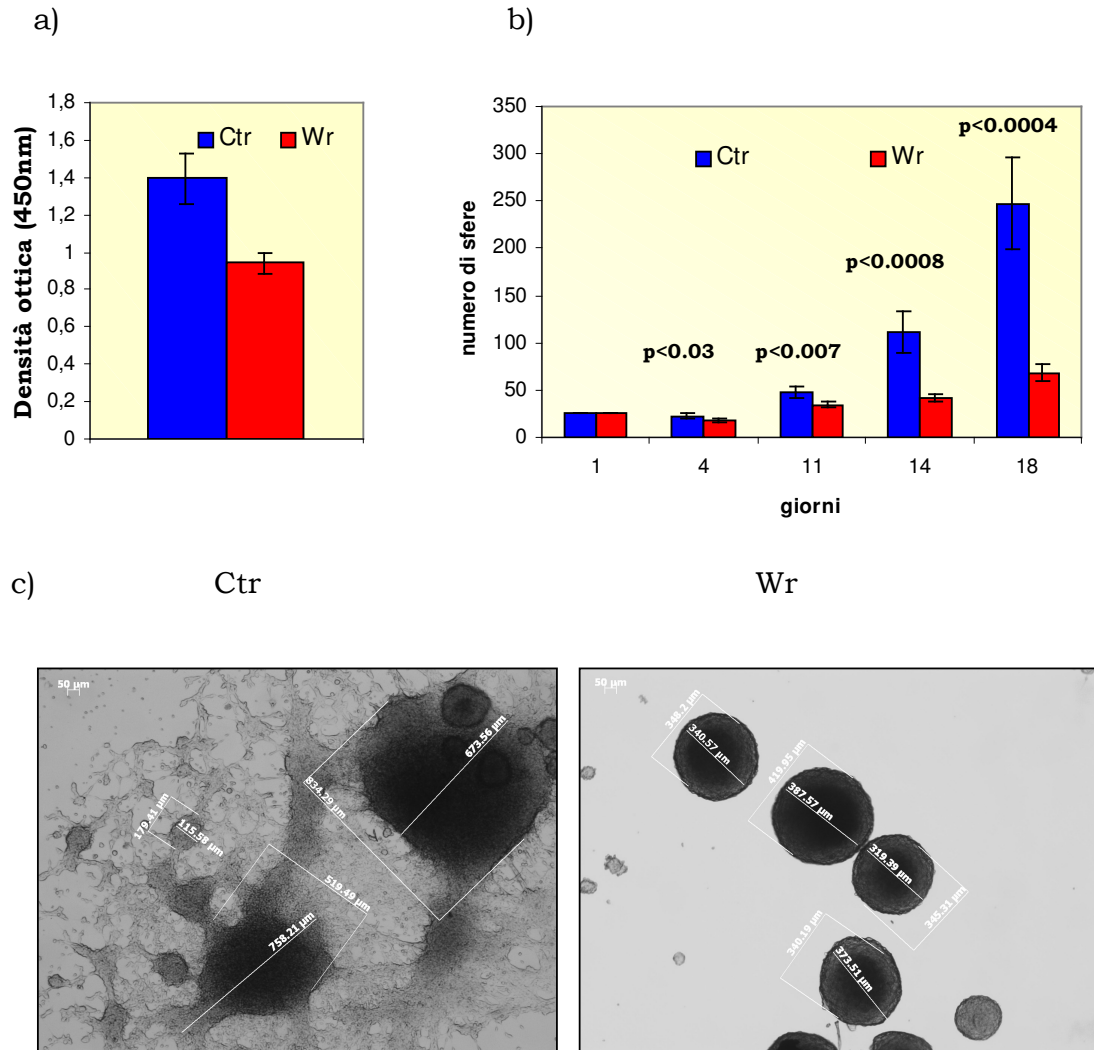
Risultati simili si ottengono seminando, a bassa densità (25 cellule/pozzetto), ANSCs Ctr e Wr e valutando la capacità delle cellule di generare neurosfere secondarie dopo 4, 11, 14, 18 giorni in

coltura. Il numero di sfere generato da ANSCs Wr è significativamente inferiore rispetto a quello generato da ANSCs Ctr (Figura 3b) e dalle sfere Ctr, si può osservare un'estesa migrazione di cellule (Figura 3c). Non sono state riscontrate differenze tra colture Ctr e Wr nella percentuale di cellule morte/danneggiate, misurata come il rapporto tra l'attività dell'enzima LDH rilevabile nel mezzo di coltura e l'attività totale dell'enzima calcolata sull'omogenato di neurosfere (in presenza di detergente). Nelle colture di Ctr è stata riscontrata una percentuale di permeabilizzazione di  $6.19 \pm 0.69\%$  (n=9 colture), mentre nelle colture Wr di  $5.02 \pm 0.71\%$  (n=5 colture). Il differente tasso di crescita tra ANSCs Wr e Ctr non è, quindi, dovuto ad un aumento della morte cellulare.

La ridotta capacità proliferativa della popolazione di ANSCs/ANPCs Wr rispetto a quella di Ctr potrebbe dipendere sia da un'alterazione nella risposta ai mitogeni dovuta alla mutazione nel gene che codifica per la proteina Vps54 sia da un'alterazione del rapporto ANSCs/ANPCs nella nicchia subventricolare.



**Figura 2.** Curve di crescita di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr. I risultati sono la media  $\pm$  DS di n=3 differenti colture per condizione.



**Figura 3.** a) Incorporazione di BrdU da parte di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr dopo 10 ore di incubazione. Gli istogrammi rappresentano la media $\pm$ DS dei valori di assorbanza ottenuti analizzando n=3 coltute Ctr e Wr. b) Gli istogrammi rappresentano la media $\pm$ DS del numero di neurosfere ottenuto 4, 11, 14 e 18 giorni dopo la semina di 25 ANSCs/ANPCs/pozzetto. c) Immagini di neurosfere ottenute dopo 14 giorni in coltura.

### **Espressione di mRNA di recettori di EGF e FGF-2 in neurosfere Ctr e Wr**

Per valutare se un'alterazione nella risposta delle ANSCs/APNCs Wr ai mitogeni potesse contribuire alla ridotta capacità di proliferazione, sono stati condotti esperimenti di RT-PCR ed è stata misurata l'espressione di mRNA di EGFR e delle isoforme 1,2,3,4 di FGFR, in colture di neurosfere Ctr e Wr a P5, P12 e P20. I recettori con mRNA maggiormente espresso sono EGFR e FGFR3. Inoltre, le colture Wr esprimono, in media, una quantità doppia di mRNA per EGFR ed una quantità 2.5 volte superiore di FGFR3 rispetto alle colture Ctr. Non sono osservabili differenze significative nell'espressione di mRNA per i recettori FGFR1 e 2. Il recettore FGFR4 non è espresso né in neurosfere Ctr né in neurosfere Wr. Il risultato sembrerebbe in contrasto con una ridotta proliferazione delle cellule Wr. Tuttavia, recenti studi dimostrano che i recettori tirosin chinasi EGFR e FGFR possono indurre proliferazione cellulare non solo attivando la cascata di fosforilazioni, ma anche traslocando al nucleo e fungendo da co-fattori trascrizionali nel processo di attivazione genica. Lo e collaboratori (2006) hanno ipotizzato un coinvolgimento del trasporto endosomiale nella traslocazione nucleare di EGFR. Un'alterazione del trasporto endosomiale e/o una maggiore degradazione lisosomiale di EGFR e FGFR3, dovuta alla presenza della proteina Vps54 mutata nelle cellule Wr, potrebbero determinare, come conseguenza adattativa, l'incremento nell'espressione di mRNA osservato. L'analisi della relazione tra la mutazione di vps54 ed il pathway endocellulare dei recettori per EGF e FGF2 costituirà uno dei temi da approfondire nel proseguimento di questa ricerca.

### **Espressione di markers di staminalità e di progenitori cellulari in sezioni di neurosfere Ctr e Wr**

Per verificare se il rapporto tra ANSCs ed ANPCs fosse diverso nella popolazione cellulare isolata da SVZ di Wr e/o se cambiamenti si verificassero durante l'espansione in vitro, è stata valutata l'espressione di markers di staminalità e di progenitori cellulari in sezioni di neurosfere Ctr e Wr. L'esperimento era stato progettato in modo che sezioni consecutive di neurosfere Ctr e Wr, ottenute al criostato tagliando fettine ogni 10 $\mu$ m, a bassi (P2, P4) ed ad alti passaggi (P20), venissero marcate con due sequenze diverse di anticorpi (vd Materiali e Metodi) per alcuni markers di staminalità e di progenitori cellulari gliali e neuronali. Entrambe le sezioni consecutive venivano però marcate per il filamento intermedio nestina. In questo modo si pensava di poter ricostruire tridimensionalmente le neurosfere e di poter quantificare le percentuali sia di cellule che esprimevano un solo marker sia di cellule che co-esprimevano più markers. Difficoltà sperimentali non hanno reso possibile un'analisi quantitativa dei fenotipi cellulari nelle popolazioni Ctr e Wr; tuttavia, è stato possibile fare alcune osservazioni qualitative:

- 1) la presenza di cellule con fenotipo astrocitario (GFAP<sup>+</sup>), neuronale ( $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup>) ed oligodendrogliale (NG2<sup>+</sup>) nell'ambito della stessa neurosfera sia nel Ctr che nel Wr è indice, della multipotenzialità della cellula generante la sfera;
- 2) a P2 sia nelle sezioni di sfere Ctr sia nelle sezioni di sfere Wr si è osservata un'intensa colorazione per la nestina (marker di staminalità), per GFAP e per vimentina (marker di precursori gliali); è stato, invece, osservato un numero esiguo di cellule positive per NG2 e per  $\beta$ -tubulina III. Sia in sfere Ctr sia in sfere Wr sono presenti aree di co-localizzazione nestina-GFAP, nestina-vimentina, GFAP-

vimentina. Particolarmente evidente è la presenza in sezioni di sfere Wr di cellule caratterizzate dalla co-espressione di nestina-vimentina-GFAP (Figura 4a);

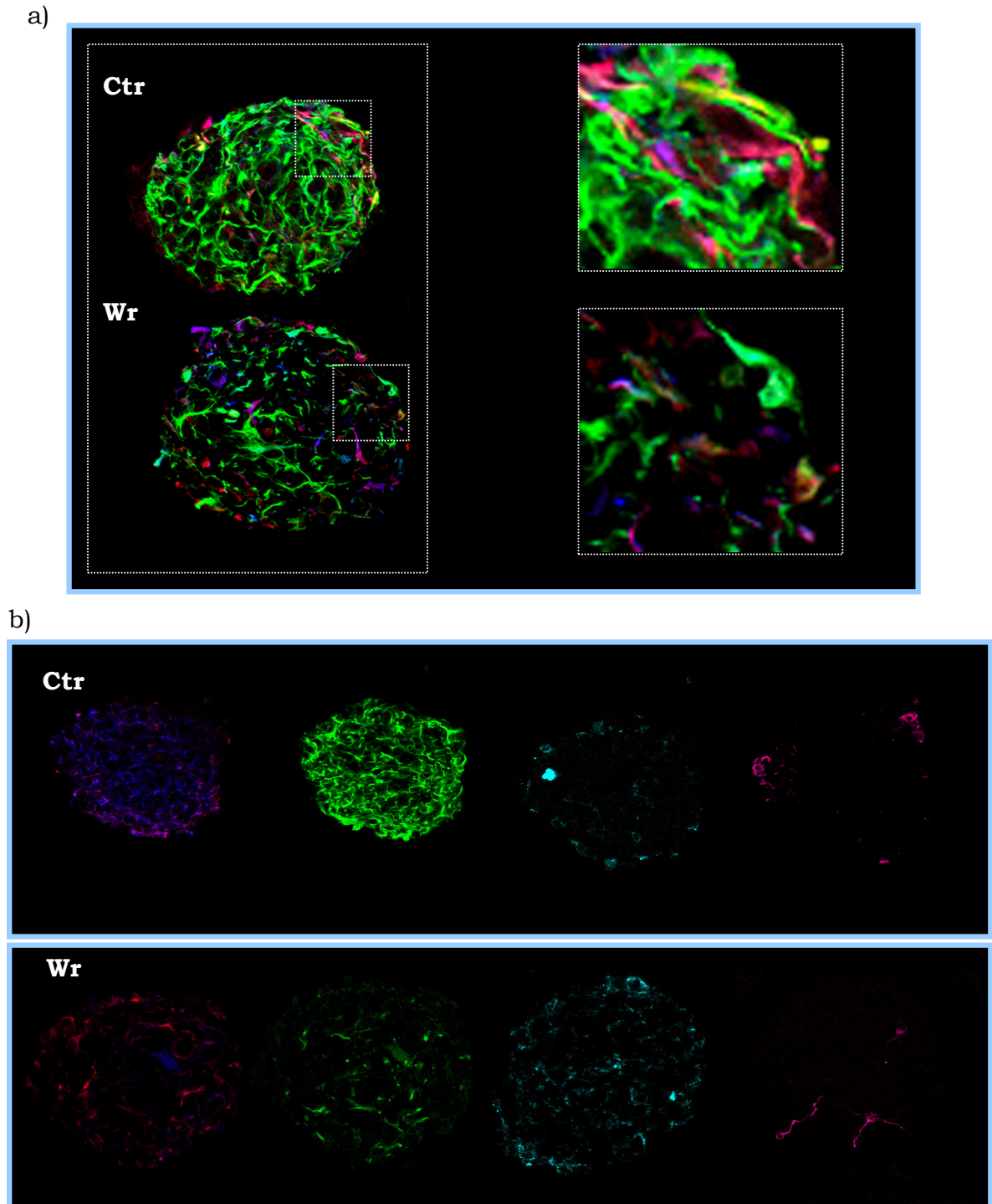
3) a P4 si osserva una riduzione nell'espressione di GFAP nelle sfere Wr rispetto sia a sfere Wr a P2 sia a sfere Ctr a P2 e a P4. Le cellule nestina<sup>+</sup> sono molto più abbondanti nelle sezioni di sfere Wr rispetto alle sfere Ctr, mentre il numero sia di cellule NG2<sup>+</sup> sia di cellule  $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup> rimane esiguo in entrambe i tipi di coltura.

Nelle sfere Ctr sono particolarmente presenti aree di co-localizzazione GFAP-vimentina, mentre nelle sfere Wr sono particolarmente evidenti aree di co-espressione nestina-vimentina. In entrambe le colture sono presenti piccole aree di co-localizzazione GFAP-nestina.

4) a P20, come a P4, l'espressione della GFAP è più abbondante nelle sfere Ctr rispetto alle sfere Wr, le quali, invece, mostrano una più intensa colorazione per il marker nestina (Figura 4b). Si può, inoltre, osservare un chiaro aumento del numero di cellule NG2<sup>+</sup> nelle sezioni di sfere Wr rispetto sia alle sfere Wr a passaggi inferiori sia alle sfere Ctr a tutti i passaggi osservati (Figura 4b). Mentre nelle sfere Ctr si osservano parecchie zone di co-localizzazione GFAP-vimentina, in quelle Wr prevale la co-espressione nestina-vimentina.

Nelle neurosfere sia Ctr che Wr predominano gli immunofenotipi astrocitari. Infatti, la co-espressione delle proteine nestina-vimentina, indica la presenza di precursori astrocitari; invece, la co-espressione di vimentina-GFAP indica la presenza di astrociti in fase di maturazione o di astrociti adulti (Eliasson et al., 1999). Le cellule caratterizzate da co-localizzazione di nestina-GFAP e nestina-GFAP-vimentina, potrebbero essere le ANSCs in quanto la co-espressione di queste proteine è tipica degli astrociti B della nicchia sottoventricolare (Garcia et al., 2004).

Durante l'espansione in vitro delle ANSCs/ANPCs è possibile osservare una variazione dei fenotipi presenti nelle neurosfere sia nelle colture Wr che Ctr. Tuttavia, sarà necessario effettuare esperimenti di citofluorimetria per avere una stima quantitativa dei vari fenotipi cellulari nelle popolazioni di ANSCs/ANPCs e della loro variazione relativamente ai passaggi in coltura.



**Figura 4. a)** Neurosfere Ctr e Wr a P2 marcate con nestina (rosso), vimentina (blue) e GFAP (verde). Nell'inserto è possibile notare zone di co-localizzazione nestina-GFAP (giallo), nestina-vimentina (magenta), GFAP-vimentina (ciano). **b)** Sezioni di neurosfere Ctr e Wr marcate con: nestina (rosso) e vimentina (blue)(Merging), GFAP (verde), NG2(ciano),  $\beta$ -tubulina III (magenta).

### **Multipotenzialità di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr in terreno differenziativo**

La rimozione dei fattori di crescita e l'aggiunta di un substrato di adesione (Matrigel 1X) blocca la proliferazione ed induce il differenziamento delle ANSCs nei tre fenotipi neurali: neuroni, astrociti ed oligodendrociti. Mediante l'uso di anticorpi in grado di legarsi in modo specifico ad antigeni caratteristici dei tre tipi cellulari, è stato osservato che in tutte le condizioni differenziate analizzate e a tutti i passaggi considerati, le ANSCs Wr sono multipotenti (Figura 5) e la maggior parte delle cellule differenziate è rappresentata da astrociti. Mentre le ANSCs Ctr generano solo pochi neuroni, ad eccezione della condizione TCA, una quantità variabile di cellule  $\beta$ -tubulinaIII<sup>+</sup> è stata ottenuta dal differenziamento di ANSCs Wr in dipendenza dalle condizioni colturali utilizzate.

In terreno controllo, a P4, la percentuale di cellule con fenotipo neuronale è inferiore all'1% sia nelle colture Ctr sia nelle colture Wr. A P20, nelle colture Wr, non si osservano differenze significative delle cellule con fenotipo neuronale mentre un significativo aumento delle cellule O4<sup>+</sup> (marker di oligodendrociti), rispetto sia alle colture Wr e Ctr a P4 ( $p < 2 \times 10^{-6}$ ) sia alle colture Ctr a P20 ( $p < 0.007$ ).

In presenza di terreno Neurobasal, a P4, si è osservato un aumento del numero di cellule  $\beta$ -tubulinaIII<sup>+</sup> e una riduzione delle cellule GFAP<sup>+</sup> nelle colture Wr rispetto sia alle colture Ctr ( $p < 8 \times 10^{-8}$ ;  $p < 2 \times 10^{-6}$ ) sia alle colture Wr differenziate in terreno di controllo ( $p < 0.0005$ ;  $p < 0.05$ ). Il terreno Neurobasal, è, infatti, considerato ottimale per la crescita e la sopravvivenza dei neuroni. L'aumento di cellule  $\beta$ -tubulinaIII<sup>+</sup> e la riduzione di astrociti nelle colture Wr è ancora più evidente in presenza di terreno Neurobasal condizionato da motoneuroni purificati (Figura 6).

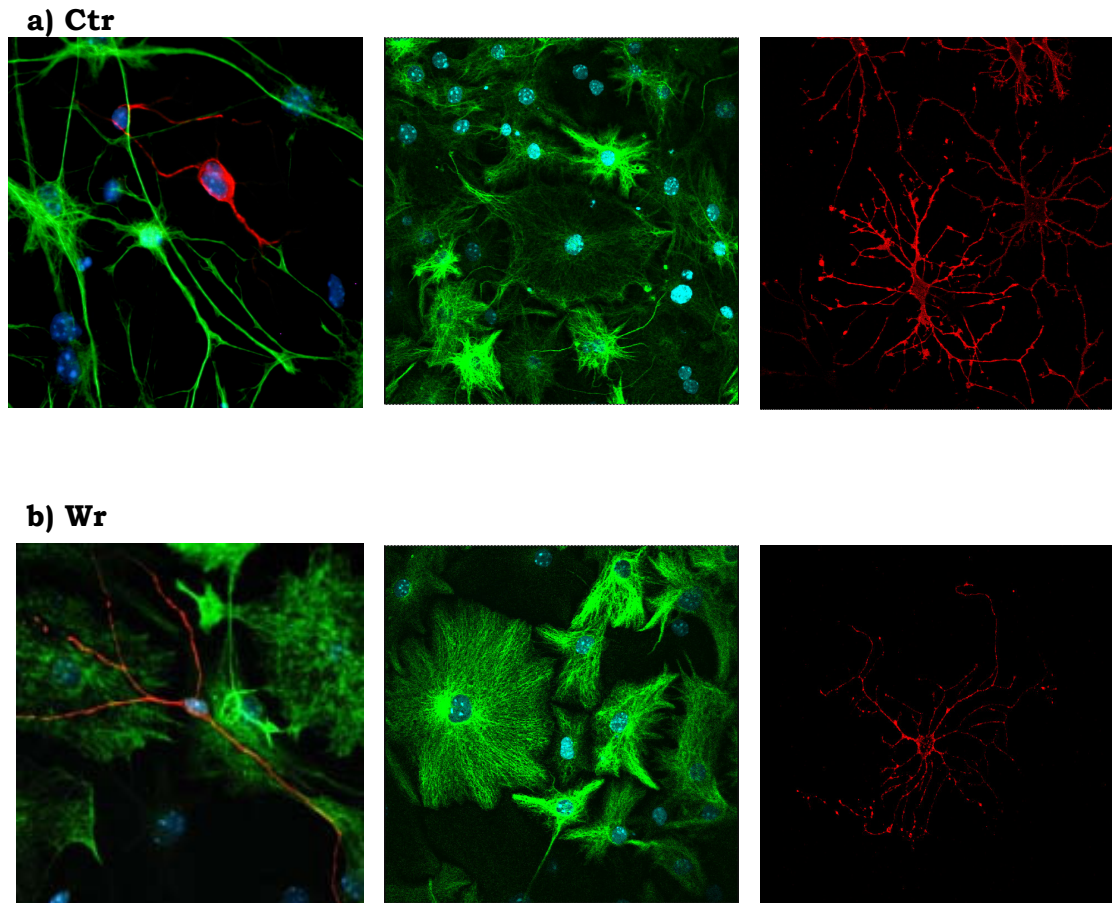
Le cellule con fenotipo neuronale, ottenute in presenza di terreno Neurobasal e di terreno Neurobasal condizionato da motoneuroni, non sono distribuite in modo omogeneo sul tappeto di astrociti, ma sono raggruppate in aree discrete. I gruppi di cellule, osservati in presenza di terreno Neurobasal condizionato da motoneuroni, sono di dimensioni maggiori rispetto a quelli osservati in presenza di Neurobasal e le cellule presentano processi più lunghi e un numero maggiore di connessioni (Figura 7).

Il differenziamento di ANSCs/ANPCs in terreno TCA è stato l'unica condizione che mi ha permesso di ottenere una marcata neurogenesi sia nelle colture Ctr sia nelle colture Wr. Anche in tale condizione colturale la percentuale di cellule con fenotipo neuronale è significativamente maggiore ( $p < 0.002$ ) nelle colture Wr rispetto alle colture Ctr. In entrambe le colture tutte le cellule  $\beta$ -tubulinaIII<sup>+</sup> co-esprimono GAD 67, ed hanno quindi fenotipo GABA-ergico (Figura 8). In Tabella 1 vengono riportate le percentuali dei fenotipi neurali ottenute in tutte le condizioni colturali.

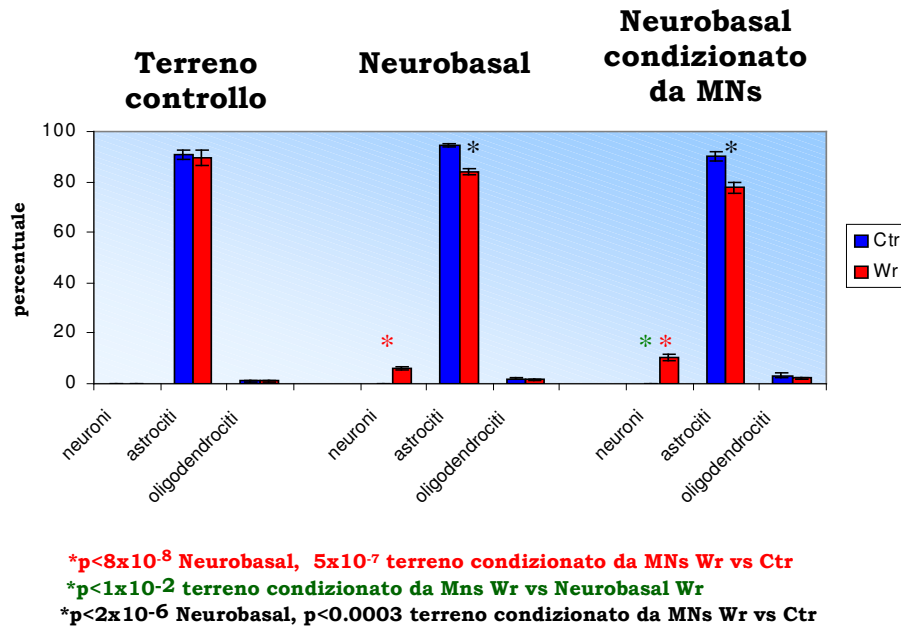
Un aumento della neurogenesi nella SVZ è stato osservato in vari modelli animali di patologie neurodegenerative (Tattersfield et al., 2004; Jin et al., 2004; Liu et al., 2006). Le modificazioni del microambiente della nicchia sottoventricolare in queste patologie sarebbero responsabili della modulazione dei normali pathways proliferativo e differenziativo delle ANSCs verso una produzione maggiore di precursori neuronali. Molti sono i fattori che possono contribuire a determinare il “commitment” verso il fenotipo neuronale (Ninkovic e Gotz., 2007). Tuttavia, la presenza nel parenchima circostante la nicchia neurale di cellule con fenotipo attivato, come astrociti e cellule microgliali, sembra essere particolarmente importante. Le molecole secrete da queste cellule attivate (come Interleuchina-1 $\beta$ , citochine neurotrofiche della famiglia della

Interleuchina 6, “Brain-derived Neurotrophic Factor”, “Ciliary Neurotrophic Factor”, “Glial-derived Neurotrophic Factor”, “Transforming Growth Factor  $\beta$ ”) ed eventualmente da linfociti infiltrati, legandosi a recettori espressi sulla superficie delle ANSCs (come recettori MHC di classe 1 e recettori “Toll-like”, TLR2 e 4), attivano “un programma di difesa del cervello” che prevede lo spostamento dell’equilibrio ANSCs-progenitori C transientemente proliferanti, verso la produzione di ANPCs e la formazione di nuovi neuroni (Rolls et al., 2007; Martino e Pluchino, 2006; Martino e Pluchino; 2007). Si può ipotizzare un meccanismo simile per spiegare l’aumentata neurogenesi delle ANSCs/ANPCs di Wr “in vitro”. Infatti, nel cervello di Wr è stata descritta una marcata astrogliosi e microgliosi (Hantaz-Ambroise et al., 1994; Boilée et al., 2001) e la produzione da parte di astrociti reattivi e cellule microgliali attivate, di molecole di tipo infiammatorio come il TNF $\alpha$  (Schlomann U et al., 2000).

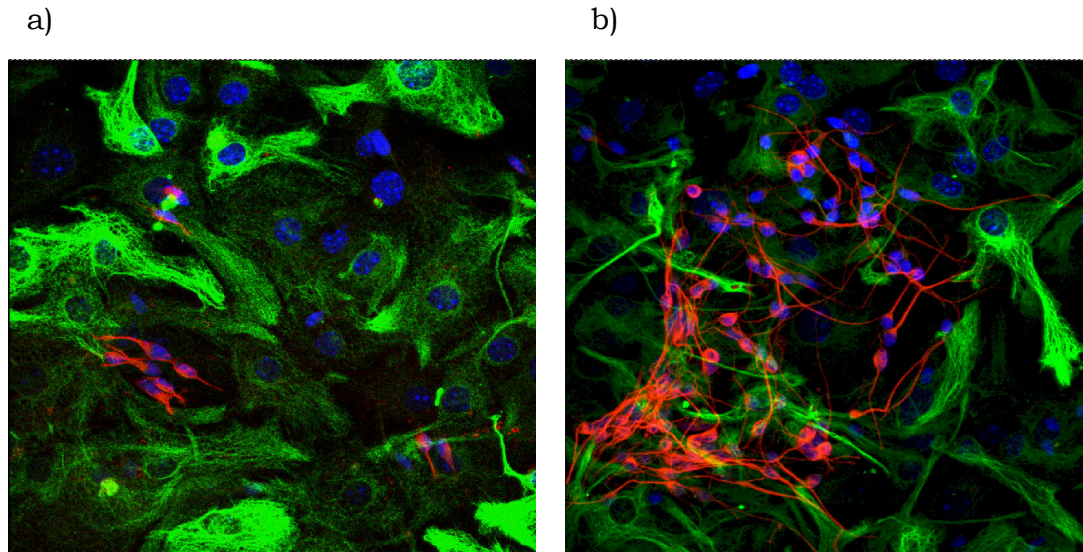
Il terreno differenziativo che ha consentito una marcata formazione di neuroni sia delle cellule Wr (33%) che Ctr (25%) è arricchito con apotransferrina (terreno TCA). Farinelli e collaboratori (1998) hanno dimostrato un ruolo neuroprotettivo dell’apotransferrina su neuroni embrionali cerebrali nei confronti dello stress ossidativo. L’aumentato numero di neuroni osservato nelle colture Ctr e Wr in presenza di terreno TCA potrebbe essere dovuto ad un effetto neuroprotettivo dell’apotransferrina sui precursori neuronali. Tuttavia, non è possibile escludere una stimolazione diretta della neurogenesi. Un approfondimento di queste osservazioni è oggetto di studio come prosecuzione del mio lavoro di tesi.



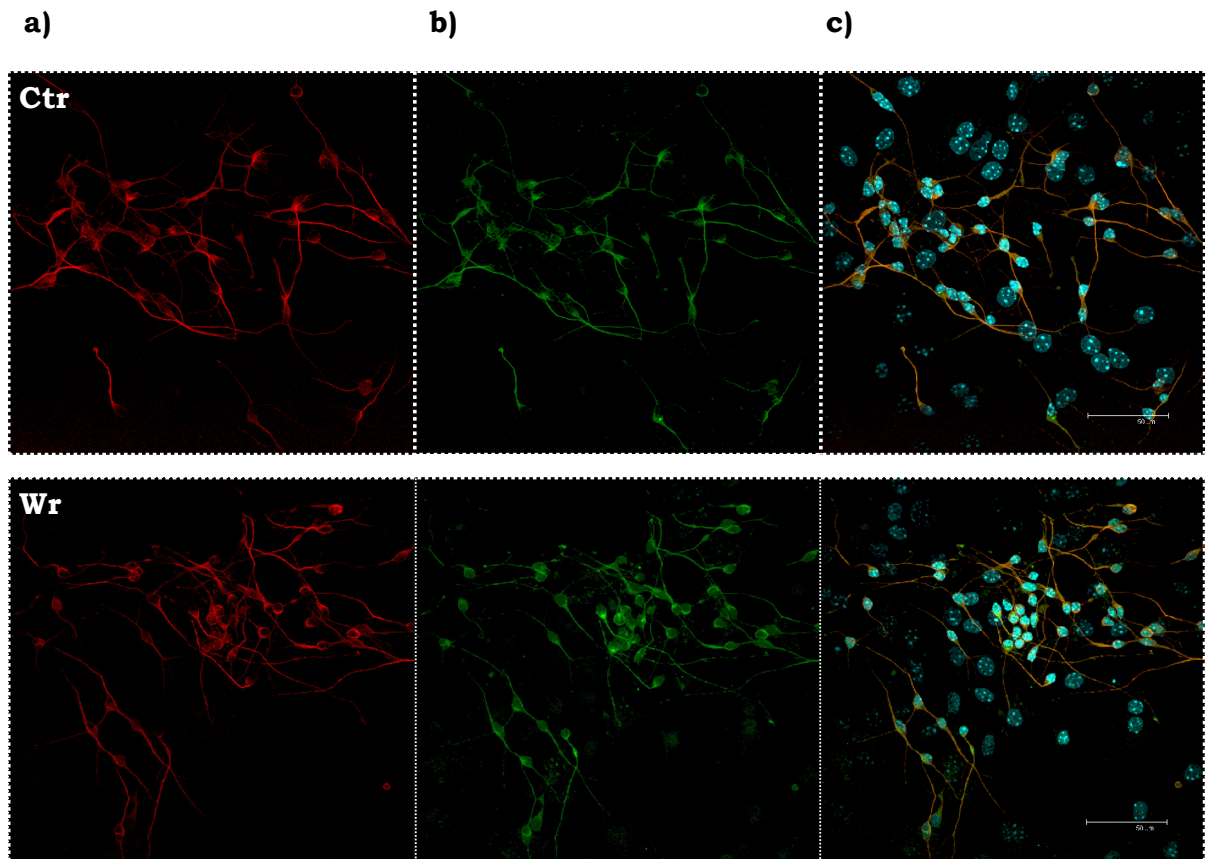
**Figura 5.** Immagini ottenute al microscopio confocale dei tre fenotipi neurali derivanti dal differenziamento di ANSCs/ANPCs Ctr **(a)** e Wr **(b)**. I neuroni sono marcati con un anticorpo anti- $\beta$ -tubulinaIII (rosso); gli astrociti sono marcati con un anticorpo anti-GFAP (verde); gli oligodendrociti sono marcati con un anticorpo anti-O4 (rosso). I nuclei sono colorati con Hoechst 33258 (blue).



**Figura 6.** Percentuali dei tre fenotipi neurali ottenuti dal differenziamento di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr a P4 in presenza di terreno controllo, terreno Neurobasal e terreno Neurobasal condizionato da MNs.



**Figura 7.** Immagini rappresentative ottenute al microscopio confocale di neuroni ( $\beta$ -tubulinaIII, rosso) e astrociti (GFAP, verde) differenziati da ANSCs/ANPCs Wr in presenza di terreno Neurobasal **(a)** e di terreno Neurobasal condizionato da MNs **(b)**. I nuclei sono colorati con Hoechst 33258 (blue).



**Figura 8.** Immagini acquisite al microscopio confocale di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr in terreno controllo contenente apotransferrina (TCA). I nuclei sono colorati con Hoechst 33528 (ciano). **a)**  $\beta$ -tubulinIII+ (rosso); **b)** GAD67+ (verde) ;c) sovrapposizione rosso+verde (merging).

a)

<b>Terreno Controllo P4</b>	<b>Neuroni</b>	<b>Astroцити</b>	<b>Oligodendrociti</b>
Ctr	<1%	90.77±1.96	0.98±0.3
Wr	<1%	89.42±2.98	1.05±0.33

b)

<b>Terreno Controllo P20</b>	<b>Neuroni</b>	<b>Astroцити</b>	<b>Oligodendrociti</b>
Ctr	<1%	89.56±0.23	5.25±2.76
Wr	1.48±0.82	81.85±2.07	16.88±0.3

c)

<b>Terreno Neurobasal P4</b>	<b>Neuroni</b>	<b>Astroцити</b>	<b>Oligodendrociti</b>
Ctr	<1%	94.44±0.72	2.01±0.36
Wr	6.24±0.72	84.06±1.37	1.63±0.22

d)

<b>Terreno condizionato da MNs</b>	<b>Neuroni</b>	<b>Astroцити</b>	<b>Oligodendrociti</b>
Ctr	<1%	90.32±1.97	3.14±0.85
Wr	10.31±1.41	77.8±2.25	2.38±0.3

e)

<b>Terreno TCA</b>	<b>Neuroni</b>	<b>Astroцити</b>	<b>Oligodendrociti</b>
Ctr	25.27±5.26	68.04±7.45	% non valutata
Wr	32.85±5.45	62.89±3.86	% non valutata

**Tabella 1.** Percentuali dei fenotipi neurali ottenuti dal differenziamento di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr in presenza di terreno controllo (a,b), di terreno Neurobasal (c), di terreno Neurobasal condizionato da MNs (d) e di terreno TCA (e).

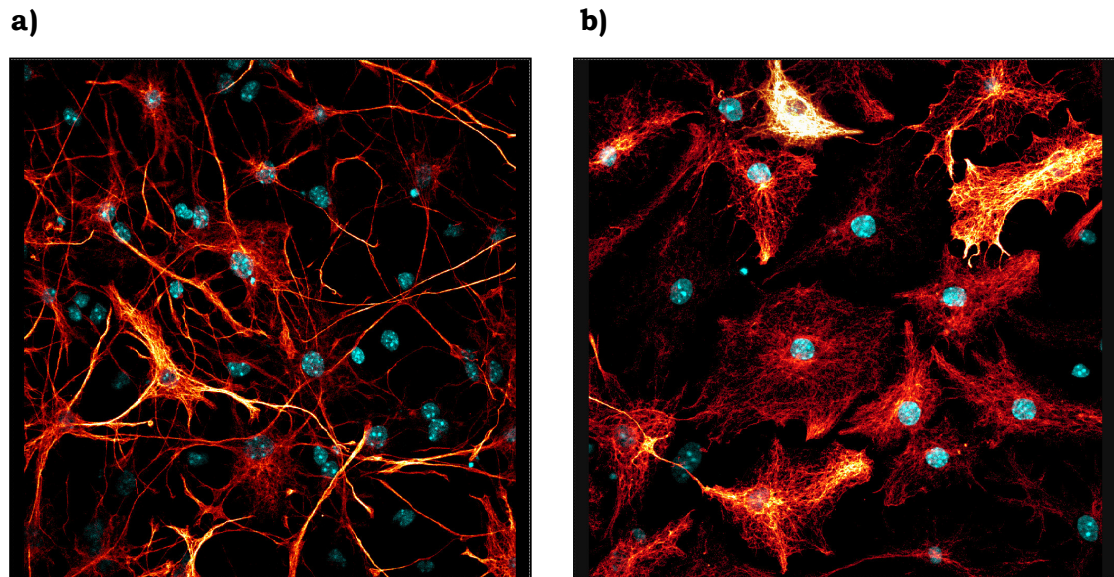
## **Astroцитi ottenuti dal differenziamento di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr**

**1. Astroцитi intensamente reattivi alla GFAP.** In tutte le condizioni culturali differenziative considerate si è osservata, sia nelle colture Ctr sia in quelle Wr, la presenza di una popolazione di astroцитi intensamente reattivi alla GFAP (GFAP<sup>++</sup>). Questa popolazione è, però, più rappresentata nelle colture Wr. Di seguito vengono riportate le percentuali ottenute dal conteggio degli astroцитi fortemente reattivi alla GFAP in colture Ctr e Wr: a) terreno controllo: 13.03±2.73% in colture Ctr e 28.51±8.05% in colture Wr (p<0.05); b) terreno Neurobasal: 4.31±0.97% in colture Ctr e 16.11±2.58% in colture Wr (p<0.0003); c) terreno Neurobasal condizionato da motoneuroni: 4.88±0.78% in colture Ctr e 16.15±1.65% in colture Wr (p<4x10<sup>-6</sup>).

Nelle colture Ctr il fenotipo astroцитario predominante è costituito da astroцитi caratterizzati da sottili processi cellulari. Nelle colture Wr, la maggior parte degli astroцитi, in particolare quelli GFAP<sup>++</sup>, mostra processi cellulari corti e spessi e soma ipertrofico (Figura 9).

In vivo, l'aumento dell'immunoreattività nei confronti del marker GFAP è una caratteristica tipica degli astroцитi reattivi. In tali astroцитi, inoltre, viene generalmente indotta anche l'espressione delle proteine nestina, vimentina e dell'enzima ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS). Ho, quindi, valutato immunocitochimicamente l'espressione di tali proteine in astroцитi ottenuti dopo 5 giorni di differenziamento da ANSCs/ANPCs Ctr e Wr, sia in condizioni basali sia dopo stimolazione per 24h con l'endotossina LPS. In entrambe le condizioni, sia nelle colture Ctr sia nelle colture Wr, non ho osservata l'espressione di nestina e di iNOS, mentre ho osservato una debole immunoreattività alla vimentina. Analisi mediante Western blot hanno dimostrato che anche in astroцитi Ctr e Wr ottenuti dopo 10 giorni di differenziamento non si osserva induzione dell'espressione di

iNOS. Sarà importante valutare se le colture astrocitarie ad uno stadio più maturo (1 mese) avranno un comportamento più simile alla cellule gliali "in vivo".



**Figura 9.** Immagini ottenute al microscopio confocale di astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Ctr (a) e Wr (b). Gli astrociti sono stati marcati con un anticorpo primario anti-GFAP e un anticorpo secondario Alexa-488; il normale colore verde è stato sostituito con lo pseudocolore glowover. I nuclei sono colorati con Hoechst 33258 (blue). Le immagini mettono in luce una chiara differenza morfologica tra astrociti Ctr e Wr.

**2. Capacità degli astrociti di supportare la sopravvivenza motoneuronale.** La sopravvivenza di motoneuroni embrionali coltivati su un tappeto di astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Wr, è ridotta ( $p < 0.01$ ) rispetto a quando i motoneuroni vengono coltivati su astrociti ottenuti da ANSCs/ANPCs Ctr. Inoltre, nelle stesse condizioni, gli assoni dei motoneuroni coltivati su astrociti ottenuti da ANSCs/ANPCs Wr sono più corti ( $p < 0.001$ ).

Questi risultati, dimostrano che gli astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Wr oltre a presentare intensa immunoreattività alla GFAP ed alterazioni morfologiche simili a quelle descritte per gli astrociti Wr in situ ed in coltura primaria (vedi introduzione pag.30), analogamente a questi ultimi inducono una sofferenza motoneuronale.

DiGiorgio e collaboratori (2007) e Nagai e collaboratori (2007) hanno dimostrato indipendentemente che cellule gliali portatrici della mutazione SOD1<sup>G93A</sup> giocano un ruolo fondamentale nella degenerazione specifica dei motoneuroni spinali in un altro modello murino di SLA, il topo SOD1<sup>G93A</sup>. La sola espressione della SOD1<sup>G93A</sup> mutata in motoneuroni primari non provoca degenerazione; tuttavia, sia motoneuroni primari sia motoneuroni differenziati da Cellule Staminali Embrionali (ESCs), derivate sia da topi sani sia da topi transgenici per SOD1 mutata, co-coltivati su colture primarie di cellule gliali ottenute da topi SOD1<sup>G93A</sup>, mostrano segni di neurodegenerazione. Gli autori attribuiscono l'effetto tossico al rilascio astrocitario di fattori che agiscono attraverso un meccanismo Bax-dipendente.

**3. Potenziale transmembrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) in astrociti Ctr e Wr a 5 giorni di differenziamento.** Gli astrociti reattivi sono caratterizzati non solo da alterazioni morfologiche e da un'aumentata

immunoreattività per la GFAP, ma anche da alterazioni metaboliche come un aumento delle attività enzimatiche e della sintesi di vari polipeptidi tra cui parecchi fattori di crescita.

Al fine di evidenziare eventuali alterazioni metaboliche di astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Wr, ho valutato il potenziale transmembrana mitocondriale mediante colorazione con la sonda fluorescente JC-1.

Le immagini ottenute al microscopio confocale sono state quantificate con il programma “Adobe Photoshop” tramite una modalità che permette di calcolare, in un intervallo di soglia (metodo delle somme), per ogni cellula analizzata, la sommatoria dei pixels verdi, indice di mitocondri poco attivi metabolicamente, e dei pixels rossi, indice di mitocondri con un potenziale fortemente negativo. E’ stato così possibile calcolare la frazione di pixels rossi sul totale di pixels ( $\Sigma_r/(\Sigma_r+\Sigma_v)$ ) come rappresentativa dello stato di polarizzazione della membrana mitocondriale interna.

In Tabella 2 vengono riportati i valori del potenziale di membrana mitocondriale di astrociti Ctr e Wr espressi come  $\Sigma_r/(\Sigma_r+\Sigma_v)$ .

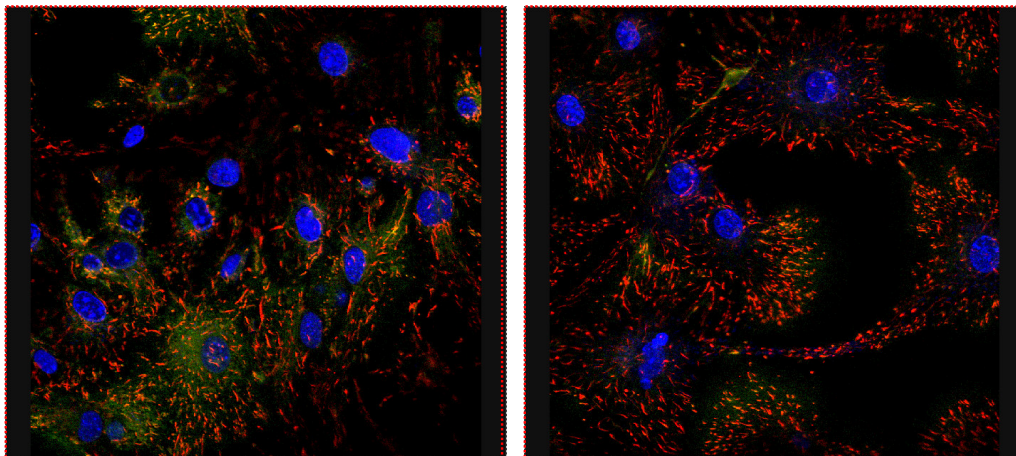
Gli astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Wr mostrano uno stato di energizzazione mitocondriale medio significativamente maggiore ( $p<0.3 \times 10^{-5}$ ) rispetto ad astrociti ottenuti da ANSCs/ANPCs Ctr (Figura 10).

Sia nelle colture Ctr sia nelle colture Wr la popolazione di astrociti è eterogenea per quanto riguarda lo stato di polarizzazione mitocondriale. In Figura 11 è rappresentata la percentuale di cellule Ctr e Wr con  $\Sigma_r/(\Sigma_r+\Sigma_v)$  compreso tra 0.2-0.5, 0.5-0.7 e 0.7-0.9; mentre nelle colture Ctr una significativa percentuale di astrociti presenta stato di energizzazione mitocondriale compreso tra 0.2-0.5 e 0.5-0.7, nelle colture Wr prevalgono gli astrociti con stato di energizzazione mitocondriale compreso tra 0.5 e 0.9.

I risultati ottenuti sembrerebbero indicare che gli astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Wr differiscono da quelli di Ctr non solo per caratteristiche morfologiche e immunocitochimiche, ma anche metaboliche. Hantaz-Ambroise e collaboratori (1995) in colture primarie di astrociti di Wr hanno osservato un aumento della concentrazione di glutammato e glutamina nel terreno di coltura e una riduzione dei livelli intracellulari di glutammato. Un'alterazione simile del metabolismo del glutammato potrebbe giustificare l'aumento del potenziale transmembrana mitocondriale osservato nelle colture di astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Wr.

a)

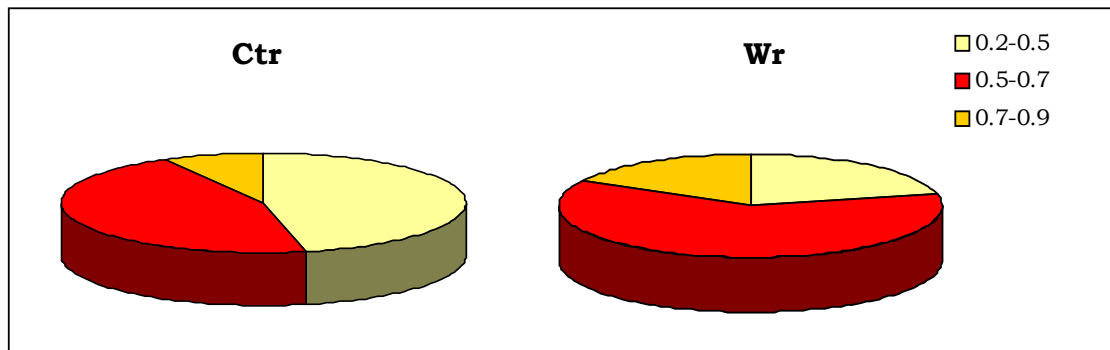
b)



**Figura 10.** Immagini acquisite al microscopio confocale di astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Ctr (a) e Wr (b) marcati con la sonda fluorescente JC-1.

<b>Astroci Ctr 5giorni</b>				<b>Astroci Wr 5giorni</b>			
0,524	0,603	0,511	0,554	0,561	0,554	0,766	0,417
0,480	0,483	0,461	0,567	0,521	0,549	0,762	0,667
0,478	0,429	0,380	0,549	0,551	0,703	0,846	0,647
0,538	0,386	0,537	0,562	0,556	0,567	0,652	0,554
0,518	0,377	0,514	0,700	0,593	0,581	0,692	0,613
0,512	0,536	0,611	0,751	0,559	0,622	0,736	0,801
0,480	0,403	0,545	0,691	0,585	0,590	0,626	0,648
0,489	0,406	0,616	0,734	0,584	0,531	0,689	0,548
0,509	0,371	0,509	0,763	0,591	0,593	0,729	0,599
0,489	0,412	0,477	0,778	0,578	0,838	0,560	0,464
0,491	0,402	0,494	0,418	0,574	0,518	0,749	0,606
0,489	0,372	0,528	0,412	0,549	0,552	0,734	0,685
0,508	0,339	0,482	0,800	0,527	0,559	0,582	0,628
0,522	0,320	0,572	0,731	0,563	0,270	0,657	0,477
0,492	0,460	0,637	0,633	0,588	0,214	0,531	0,892
0,494	0,438	0,774	0,496	0,539	0,329	0,501	0,459
0,496	0,430	0,612	0,605	0,648	0,206	0,669	0,533
0,481	0,430	0,411	0,572	0,561	0,449	0,525	0,635
0,496	0,428	0,424	0,937	0,659	0,430	0,560	0,628
0,490	0,423	0,468	0,625	0,642	0,443	0,669	0,483
0,471	0,394	0,459	0,772	0,818	0,579	0,498	0,578
0,481	0,377	0,443	0,691	0,659	0,572	0,671	0,674
0,474	0,421	0,463	0,687	0,642	0,502	0,746	0,691
0,474	0,300	0,492	0,673	0,602	0,455	0,627	0,723
0,497	0,348	0,548	0,582	0,579	0,334	0,488	0,650
0,535	0,479	0,551	0,642	0,557	0,297	0,627	0,677
0,497	0,556	0,475	0,496	0,572	0,771	0,502	0,670
0,484	0,528	0,525	0,692	0,728	0,734	0,626	0,527
0,513	0,485	0,444	0,642	0,722	0,489	0,530	0,550
0,507	0,503	0,498	0,749	0,861	0,544	0,595	0,617
0,502	0,561	0,548	0,825	0,656	0,313	0,466	
0,491	0,488	0,476	0,749	0,600	0,446	0,438	
0,510	0,488	0,456	0,829	0,602	0,489	0,369	
0,504	0,514	0,531	0,444	0,605	0,592	0,375	
0,493	0,538	0,574	0,652	0,718	0,551	0,417	
0,483	0,556	0,563	0,626	0,630	0,452	0,508	
0,490	0,609	0,593	0,527	0,728	0,457	0,461	
0,514	0,529	0,680	0,664	0,911	0,700	0,429	
0,537	0,561	0,563	0,560	0,522	0,794	0,568	
0,485	0,663	0,540	0,521	0,919	0,538	0,396	
0,520	0,597	0,499	0,482	0,823	0,565	0,427	
0,480	0,565	0,547	0,661	0,625	0,792	0,436	
0,508	0,550	0,535		0,584	0,774	0,441	
<b>MEDIA</b> <b>0.533±0.04</b>				<b>MEDIA</b> <b>0.586±0.05</b>			

**Tabella 2.** Stato di energizzazione mitocondriale, espresso come  $\Sigma r / (\Sigma r + \Sigma v)$ , di astrociti ottenuti dopo 5 giorni di differenziamento di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr.



**Figura 11.** Grafico a torta rappresentativo delle percentuali di astrociti, differenziati da ANSCs/ANPCs Ctr e Wr, in cui i mitocondri hanno stato di energizzazione ( $\Sigma r / (\Sigma r + \Sigma v)$ ) compreso tra 0.2-0.5, 0.5-0.7 o 0.7-0.9.