

## **Colture primarie di ANSCs/ANPCs**

La popolazione di ANSCs/ANPCs è stata isolata da topi wobbler (wr/wr) e da topi omozigoti sani di 5 settimane. Gli animali sono stati trattati in conformità alle indicazioni istituzionali in accordo con le leggi nazionali (EEC Council Directive 86/609, OJL 358, 1, December 12, 1987; NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, US National Research Council, 1996).

I topi sono stati anestetizzati con fluotano (0,5%) e sacrificati mediante decapitazione. Il cervello è stato rimosso e posto in capsule Petri con PBS e penicillina/streptomina all'1%. Si è, quindi, proceduto al prelievo della SVZ. Osservando il cervello con un microscopio per dissezione sono stati asportati i bulbi olfattori e, con la lama di un bisturi, sono state tagliate fettine dello spessore di circa 1 mm a partire dalla parte anteriore del cervello. Dalle fettine in cui risultavano visibili i ventricoli laterali, sono state dissezionate le pareti laterali dei ventricoli laterali. Il tessuto prelevato è stato posto in una capsula Petri con penicillina/streptomina, sminuzzato con le forbici in piccoli pezzi e lavato in PBS. Dopo centrifugazione a 159 x g (Centrifuga Hermle Z300K) per 7 minuti, il tessuto è stato incubato in agitazione con collagenasi I allo 0,05% per 15 minuti a 37°C. Dopo diluizione della collagenasi con PBS, il tessuto è stato centrifugato a 159 x g per 7 minuti e triturato delicatamente con una pipetta Gilson P1000 in 500 µL di terreno DMEM/F12 (1:1; Gibco) contenente 2 mM L-glutamina, 0.6% glucosio, sodio bicarbonato 0,1%, Hepes 5mM, 9.6 ng/ml putrescina, 6.3 ng/ml progesterone, 5.2 ng/ml sodio selenite, 0.025 mg/ml insulina, 2 µg/ml eparina, 4mg/ml albumina bovina (BSA) e i fattori di crescita FGF-2 (10 ng/ml; Peprotech,) e EGF (20 ng/ml; Peprotech) (**terreno basale**). Le cellule sono state, quindi, risospese in terreno basale ad una densità di  $1 \times 10^5$  cellule/mL e

piastrate in flasks da 25cm<sup>2</sup>. Dopo dieci giorni si sono ottenute le neurosfere primarie.

### **Colture Cellulari e valutazione della vitalità cellulare**

Le neurosfere primarie ottenute dalle cellule isolate dalla SVZ sono state centrifugate a 159 x g per 7 minuti e sono state dissociate enzimaticamente con collagenasi allo 0,1% per 30 minuti a 37 °C. Dopo aver lavato con PBS e dopo aver centrifugato a 159 x g per 7 minuti, le neurosfere sono state dissociate meccanicamente (delicatamente, evitando la formazione di bolle) con una pipetta Gilson P-200. Tale processo enzimatico e meccanico di dissociazione cellulare viene comunemente detto “passaggio”. Le cellule sono state, quindi, risospese in terreno basale e piastrate in flasks ad una densità di circa 10<sup>5</sup> cellule/mL. Tale processo è stato ripetuto ogni 7 giorni per un totale di massimo 20 passaggi per coltura.

L'integrità di membrana delle ANSCs che costituiscono le neurosfere è stata valutata misurando l'attività dell'enzima citosolico Lattato Deidrogenasi (LDH) nel terreno di coltura a 30°C. In breve, 1mL di mix di reazione contiene: 120mM tampone fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7.5; piruvato 3.4 mM, KCN 540 nM, NADH 4 mM, starter della reazione (Bergmeyer e Bent, 1974). L'attività è stata valutata spettrofotometricamente a 340 nm (Perkin Elmer 551S). L'attività totale della LDH è stata misurata in presenza di Triton X-100 0,1% (v/v) dopo omogeneizzazione delle neurosfere, effettuata in tampone Tris 50 mM/ HCl 1N a pH 7.5 in un omogeneizzatore Braun in vetro con 10 passaggi di un pestello in teflon. La percentuale di cellule con perdita di integrità di membrana è stata calcolata mediante il rapporto tra l'attività della LDH nel terreno di coltura delle neurosfere e l'attività della LDH nell'omogenato di neurosfere.

La vitalità della popolazione di ANSCs/ANPCs che formano le neurosfere è stata anche valutata sulle neurosfere intatte mediante doppia colorazione con coloranti fluorescenti come descritto nella sezione di microscopia confocale.

### **Valutazione della proliferazione cellulare**

Al fine di ottenere una curva di crescita della popolazione di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr, le neurosfere sono state dissociate a singola cellula e le cellule ottenute sono state seminate (dal primo al ventesimo passaggio), in terreno basale ad una concentrazione di  $1 \times 10^5$  cellule/mL. Il numero delle cellule vitali ad ogni passaggio è stato valutato mediante esclusione del colorante Trypan Blue (0,4%). Tale colorante, infatti, colora solo le cellule danneggiate in quanto quelle vitali possiedono una membrana plasmatica integra che ne impedisce l'ingresso. La conta cellulare è stata effettuata con una camera di Burker. Il numero totale di cellule è stato calcolato moltiplicando il tasso di amplificazione (numero totale di cellule ottenute ad un dato passaggio/numero di cellule seminate) per il numero totale di cellule ottenute al passaggio precedente.

La proliferazione cellulare è stata valutata mediante un saggio colorimetrico (Cell proliferation ELISA kit, Roche) che si basa sull'incorporazione di bromodeossiuridina (BrdU). Neurosfere a P11 sono state dissociate (P12) e le ANSCs/ANPCs sono state seminate in terreno basale ad una densità di  $4 \times 10^3$  cellule/pozzetto in pozzetti precedentemente trattati con Matrigel 1X per 2 ore a  $37^\circ\text{C}$ . Dopo tre giorni di incubazione, è stata aggiunta BrdU  $10 \mu\text{M}$  per 10 h. Successivamente la popolazione di ANSCs/ANPCs è stata fissata ed incubata, per 90 minuti, con un anticorpo anti-BrdU coniugato con l'enzima perossidasi. Dopo tre lavaggi, le cellule sono state incubate a

temperatura ambiente per 10 min con una soluzione di tetrametilbenzidina, TMB, substrato dell'enzima perossidasi. La reazione è stata bloccata con 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed i valori di assorbanza sono stati letti a 450 nm con un lettore di piastre (GDV, modello DV990/BV6).

Per valutare la capacità delle ANSCs Ctr e Wr di generare neurosfere sono state piastrate 25 cellule/pozzetto in pozzetti da 24 mm e, dopo 4, 11, 14, 18 giorni, è stato contato il numero di neurosfere generate in ogni pozzetto. Immagini di neurosfere Ctr e Wr sono state acquisite in campo chiaro con un microscopio Nikon (Eclipse TE300).

### **Esperimenti di biologia molecolare (svolti nel laboratorio della dr. M. Paolillo, Università di Pavia)**

La “real time PCR” è stata utilizzata per misurare l'espressione assoluta di mRNA per il recettore di EGF (EGFR) e per le isoforme 1/2/3/4 del recettore di FGF2 (FGFR), su neurosfere Ctr e Wr a P5, 12, 20.

### **Estrazione di RNA e retro-trascrizione (RT)**

Il RNA totale è stato estratto con il reagente Trizol (Invitrogen) e quantificato a 260 nm mediante uno spettrofotometro a UV. Solo il RNA avente un rapporto 260/280nm maggiore di 2.0 è stato usato per la reazione RT. Per evitare la contaminazione di DNA genomico, 10 µg di RNA totale sono stati trattati con 10 unità di “RQ1 RNase-free DNase” (Promega) a 37°C per 30 minuti e la reazione è stata bloccata riscaldando il campione a 65°C per 10 minuti. Il cDNA stampo è stato ottenuto da il RNA totale, trattato con Dnasi, mediante il kit “Thermoscript RT-PCR system kit” (Invitrogen). In breve, il RNA è stato denaturato a 65°C per 5 minuti e incubato con i primers oligo(dT)<sub>15</sub> 1µM e raffreddato a 4°C. Dopo aver aggiunto la

trascrittasi inversa AMV (30 unità) il mix di reazione è stato incubato a 52°C per 90 minuti, a 85°C per 5 minuti e il RNA è stato digerito a 37°C per 20 minuti in presenza di 1 unità di Rnasi. Infine, il volume totale di reazione è stato portato a 40 µL aggiungendo 20 µL di acqua.

### **PCR qualitativa**

Sono state costruite delle curve standard: lo standard per ogni mRNA è stato preparato mediante PCR qualitativa usando i prodotti della “real time PCR” come stampi e ri-amplificando i prodotti con gli stessi primers. I prodotti riamplicati sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3%, purificati usando colonne “spin QIAquick” (Qiagen) e quantificati a 260 nm. Dopo la quantificazione spettrofotometrica, sono state preparate diluizioni seriali del campione. I primers sono stati disegnati usando il software “Primer3 input” al sito” <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi/primer3www.cgi>” e la specificità di ogni primer è stata controllata mediante il software BLAST. Il mix di reazione per la PCR (volume finale: 50 µL) contiene: 1 µg di cDNA stampo, dNTPs 500µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.5µM di ogni primer, 2.5 unità di Taq polymerasi. L’amplificazione con la PCR è stata effettuata per 40 cicli. Uno step finale a 72°C per 10 minuti è stato effettuato in tutte le reazioni.

### **“Real time PCR” quantitativa**

Le reazioni quantitative della PCR sono state effettuate in un “Light Cycler instrument” (Roche) seguendo le linee guida riportate nel kit “Fast Start DNA Master SYBR Green I kit” (Roche). In breve, un decimo del mix di RT (4 µl) è stato usato come stampo per il mix di real-time PCR contenente 0.4 µM “forward and reverse nested primers”, 200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 unità di “hot start” Taq DNA polymerasi, SYBR Green I dye e buffer di reazione. Le condizioni di amplificazione sono: 10 sec a 95°C, 5 sec a 55°C, 10 sec a 72°C per 45 cicli. Alla fine della reazione, è stata effettuata una “melting curve

analysis” per verificare la presenza dei dimeri di primers. Per la quantificazione assoluta del cDNA, sono state costruite curve standard usando differenti concentrazioni di standard preparati reamplificando i prodotti ottenuti dalla PCR qualitativa come descritto sopra.

### **Sezioni di neurosfere ottenute al criostato**

Le neurosfere, a P2, P4 e P20 sono state trasferite in una provetta Falcon da 15 mL, e lasciate sedimentare in incubatore. Il pellet è stato fissato con paraformaldeide (PFA) al 4%, lavato tre volte in PBS e lasciato per una notte a 4°C in saccarosio al 30%. Quindi, il saccarosio è stato sostituito con il mezzo di inclusione O.C.T (Satura Tissue-Tek) per 1 ora e il pellet di neurosfere è stato tagliato al criostato (Leica CM 1850). Per ogni coltura sono state tagliate 20 sezioni dello spessore di 10 µm; tali sezioni sono state poste su vetrini portaoggetto di vetro trattati con 3-aminopropil trietossi-silano e successivamente processate per l'immunocitochimica.

### **Analisi immunocitochimica su sezioni di neurosfere**

Dopo incubazione di 1h a temperatura ambiente con una soluzione bloccante e permeabilizzante costituita da PBS, siero normale di capra (NGS) al 10% e Triton X-100 allo 0,1%, le sezioni di neurosfere sono state incubate a 37°C, per 90 minuti, con anticorpi primari specifici, diluiti in soluzione permeabilizzante. Gli anticorpi primari utilizzati sono: 1) nestina, marker di cellule staminali embrionali neuroepiteliali ; 2) vimentina, marker di progenitori gliali 3) GFAP, marker di astrociti,; 4)  $\beta$ -tubulina III, marker di neuroni; 5) NG2, marker di precursori oligodendrogliali.

Sezioni consecutive sono state marcate rispettivamente con gli anticorpi primari anti: 1) nestina + vimentina + GFAP, 2) nestina +  $\beta$ -tubulina III+ NG2. Per la prima sequenza sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anticorpo anti-nestina ottenuto nel topo (1:100, Immunological Sciences, Rome, Italy), anticorpo anti-vimentina ottenuto nel pollo (1:1000; Novus Biologicals, Littleton, CO); anticorpo anti-GFAP ottenuto nel coniglio (1:300; DakoCytomation, Denmark). Per la seconda sequenza sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anticorpo anti-nestina ottenuto nel pollo (1:1000; Novus Biologicals, Littleton, CO); anticorpo anti  $\beta$ -tubulina III ottenuto nel topo (1:100; Chemicon, CA); anticorpo anti-NG2 ottenuto nel coniglio (1:200; Sigma, Missouri).

Dopo aver effettuato tre lavaggi di 5 minuti con PBS, i campioni sono stati incubati per 45 minuti a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi secondari diluiti in PBS: anticorpo IgG di capra anti-coniglio coniugato con Alexa 488 (1:500; Molecular Probes); anticorpo IgG di capra anti-topo coniugato con Alexa 633 (1:500; Molecular Probes); anticorpo IgG di capra anti-pollo coniugato con AMCA (1:100; Jackson Immuno Research, PA).

Dopo l'incubazione con gli anticorpi secondari sono stati effettuati due lavaggi di 5 minuti con PBS e un lavaggio in acqua distillata.

I vetrini portaoggetto su cui sono state poste le sezioni di neurosfere sono stati montati con Moviol (Molecular Probes) e sono stati coperti con vetrini coprioggetto.

## **Esperimenti di microscopia confocale su neurosfere Ctr e Wr non fissate**

### **Valutazione della vitalità cellulare**

La vitalità della popolazione di ANSCs/ANPCs che costituisce le neurosfere è stata valutata su neurosfere non fissate, ottenute dopo 7 e 14 giorni in vitro, mediante doppia colorazione con il colorante vitale lipofilo SYTO 59 (0.5  $\mu$ M) e con il colorante idrofilico Propidio (PI, 10  $\mu$ M).

Dopo incubazione delle neurosfere con le sonde fluorescenti in terreno basale per 20 minuti a 37°C, i campioni sono stati lavati due volte con terreno basale ed incubati per 10 minuti su vetrini coprioggetto da 19 mm, precedentemente trattati con poli-L-lisina allo 0,01%. Al termine dell'incubazione, i vetrini sono stati posti alla base di una camera in plexiglass, (fornita dal laboratorio di "Biofisica delle membrane cellulari" dell'Istituto di Cibernetica e Biofisica dell'Università di Genova, Responsabile: Dr. Cesare Usai) e sono stati aggiunti 300  $\mu$ L di un tampone extracellulare con la seguente composizione: NaCl 142 mM, KCl 2.4 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM, glutamina 1%, glucosio 5 mM; pH 7.4.

I campioni sono stati osservati mediante un sistema di microscopia confocale descritto nella sezione "Sistema di microscopia confocale e di microscopia ad epifluorescenza per l'osservazione dei campioni".

La sonda fluorescente SYTO 59 è stata eccitata con la linea 633 di un laser He/Neon e il PI è stato eccitato a 488 nm con un laser ad Argon. E' stato scelto lo pseudo-colore blue per il SYTO 59 in modo da distinguere tra l'emissione di fluorescenza di questo colorante e quella del PI (rossa).

### **Valutazione del potenziale transmembrana mitocondriale**

Il potenziale transmembrana mitocondriale nelle cellule componenti le neurosfere è stato valutato mediante l'utilizzo del colorante cationico lipofilico 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1). Questa sonda fluorescente si accumula selettivamente nei mitocondri in modo potenziale-dipendente e forma, a potenziali molto negativi ( $<-80$ ), j-aggregati che, eccitati a 488 nm, emettono a 590 nm (rosso). In mitocondri deenergizzati, invece, il colorante si trova in forma monomericamente e, se eccitato a 488 nm, ha un massimo di emissione a 527 nm (verde).

Il JC-1 è stato utilizzato ad una concentrazione di  $3\mu\text{M}$  in terreno basale. Prima dell'utilizzo, la soluzione è stata centrifugata a  $13000 \times g$  per 1 minuto in modo da eliminare gli aggregati di colorante. Per la preparazione dei campioni e per l'osservazione al microscopio confocale è stato seguito il protocollo descritto per il SYTO 59 e il Propidio.

L'analisi dei dati è stata effettuata con i software "Leica" e "Adobe Photoshop".

### **Differenziamento di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr**

Le neurosfere Ctr e Wr (P4 e P20) sono state dissociate a singole cellule, risospese in terreno basale e piastrate ad una densità di  $6 \times 10^4$  cellule/mL su vetrini coprioggetto da 19 mm precedentemente trattati con Matrigel. Dopo due giorni il terreno basale è stato sostituito con terreno differenziativo di composizione uguale a quello basale, ma senza fattori di crescita e con il 2% di siero fetale bovino (FBS) (**Terreno controllo**).

Le cellule ottenute dalla dissociazione delle neurosfere a P4, risospese in terreno basale e piastrate su vetrini da 19mm per due giorni, sono state anche differenziate con i seguenti tipi di terreno:

- 1) 50% di terreno controllo e 50% di terreno **Neurobasal**, con la seguente composizione: terreno Neurobasal (Invitrogen) con B27 (Invitrogen) al 2%, siero di cavallo (Invitrogen) al 2%, L-glutammina 0.5mM,  $\beta$ -mercaptoetanololo 25  $\mu$ M, glutammato 25  $\mu$ M, 10ng/mL di BDNF.
- 2) 50% di terreno controllo e 50% di terreno Neurobasal condizionato per tre giorni da colture primarie di motoneuroni purificati (MNs). Questo terreno, prima di essere utilizzato, è stato filtrato.
- 3) Terreno controllo con l'aggiunta di apotransferrina 100 $\mu$ g/mL (TCA)

Dopo 5 giorni di differenziamento le cellule sono state fissate in PFA al 4%, lavate tre volte con PBS e processate per l'immunocitochimica.

### **Esperimenti di co-coltura di astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Ctr e Wr e motoneuroni embrionali murini (svolti nel laboratorio della dr. T. Mennini, Istituto M.Negri, Milano)**

Dopo dissociazione delle sfere la popolazione di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr è stata risospesa in terreno basale con FBS al 10% (questo medium è stato utilizzato per promuovere il differenziamento delle cellule in astrociti) e piastrata su vetrini da 19 mm precedentemente trattati con Matrigel 1X. Al raggiungimento della confluenza (4-5 giorni in coltura), gli astrociti sono stati trattati con AraC 400nM; dopo 72h il terreno è stato sostituito con terreno fresco per 24h.

La coltura di motoneuroni primari è stata ottenuta come precedentemente descritto da Comoletti e collaboratori (2001) con alcune modifiche. In breve, i midolli spinali di embrioni di topo C57BL/6N di 13 giorni (E13) sono stati dissezionati, tripsinizzati e centrifugati per 10 min a 300xg su uno strato di albumina bovina (BSA) al 4%. Il pellet è stato successivamente risospeso e purificato mediante centrifugazione di 15 min a 800xg su uno strato al 6% di iodixanolo (OptiPrep). I motoneuroni purificati sono stati risospesi in un terreno di coltura completo con la seguente composizione: terreno Neurobasal, B27 al 2%, L-glutamina 0.5mM, siero di cavallo al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanololo 25  $\mu$ M, glutammato 25  $\mu$ M, 10ng/ml BDNF, penicillina/streptomicina 1%. Le cellule sono state centrifugate per 5 min a 500xg su uno strato di BSA al 4% e, successivamente, sono state piastrate sul monostrato di astrociti ad una densità di  $4 \times 10^4$  cellule/pozzetto. Dopo tre giorni il terreno è stato sostituito con un terreno con la medesima composizione, ma senza glutammato. Le co-culture, dopo 6 giorni, sono state fissate per 40 minuti in PFA al 4% a temperatura ambiente e successivamente processate per l'immunocitochimica.

### **Trattamento con lipopolisaccaride (LPS) di astrociti ottenuti dal differenziamento di ANSCs/ANPCs Ctr e Wr**

ANSCs/ANPCs Ctr e Wr differenziate per 5 giorni in terreno controllo sono state trattate per 24, 48 e 72 ore con LPS 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M al fine di valutare immunocitochimicamente l'espressione di nestina, vimentina e ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS). L'espressione della iNOS è stata anche valutata mediante Western blot su astrociti ottenuti da ANSCs/ANPCs Ctr e Wr dopo 10 giorni di differenziamento. Per l'analisi mediante Western blot, sono state piastrate  $1.8 \times 10^5$

cellule/mL in flasks da 75 cm<sup>2</sup> precedentemente trattate con Matrigel 1X. Dopo 10 giorni gli astrociti sono stati stimolati con LPS 1µM per 24h.

### **Western blot (svolto nel laboratorio della dr. M. Paolillo, Università di Pavia)**

Dopo aver prelevato il terreno, gli astrociti sono stati trattati in ghiaccio con 250 µl di tampone di lisi contenente gli inibitori delle proteasi (composizione: 50mM Tris-HCl pH 7.4, 1% v/v NP<sub>40</sub>, 0.25% w/v sodio desossicolato, 1 mM fenimetilsulfonilfluoride (PMSF), 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 30 mM sodio pirofosfato, 1 mM NaF, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina A, 1 µg/ml aprotinina and 1 µg/ml microcistina). Le cellule sono state sonicate per 10 sec, centrifugate a 12000g per 5 min a 4°C e la quantità di proteine nel surnatante è stata misurata con il BCA protein Assay Kit (Pierce). Per l'analisi mediante western blot della iNOS, 60 µg di proteine sono stati separati per mezzo di SDS-PAGE al 7,5% a 150V per 2h. Le proteine separate sono state poi trasferite su membrana in nitrocellulosa di 0.22 µm a 50 mA per 16h. La membrana è stata trattata con Ponceau per 2h e bloccata per 2h in soluzione salina TBST (composizione: Tris 10mM, NaCl 150mM, 0.1% v/v Tween 20) e il 4% di latte in polvere (TBSTM). La membrana è stata, quindi, incubata in agitazione, a 4°C, per 16h, con il seguente anticorpo primario diluito in una soluzione di TBST con il 2% di albumina bovina (BSA) e il 2% di latte in polvere: un anticorpo primario monoclonale, ottenuto nel topo, anti-iNOS (1:7000; BD Transduction Laboratories). La membrana è stata lavata tre volte in TBST per 15 minuti e poi incubata per 1h a 4°C con un anticorpo secondario IgG contro antigeni di topo, coniugato con

horseradish-perossidasi (Upstate Biotechnology) e diluito 1:10000 in TBSTM al 4%. Le membrane sono state lavate tre volte per 15 minuti in TBST e il segnale luminescente è stato rilevato mediante “ECL plus Western Blotting Detection System” (Amersham).

### **Analisi immunocitochimica sui fenotipi neurali differenziati da ANSCs di Ctr e Wr.**

I tre fenotipi neurali ottenuti dal differenziamento delle ANSCs in tutte le condizioni colturali utilizzate è stato eseguito con lo stesso protocollo utilizzato per le sezioni di neurosfere.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: un anticorpo policlonale per gli astrociti anti-GFAP ottenuto nel coniglio (1:300; DakoCytomation, Denmark); un anticorpo monoclonale IgM per gli oligodendrociti anti-O4 ottenuto nel topo (1:100; Chemicon, CA); un anticorpo monoclonale IgG per i neuroni anti  $\beta$ -tubulina III ottenuto nel topo (1:100; Chemicon, CA); un anticorpo per i neuroni GABA-ergici anti-GAD65/67 ottenuto nel coniglio (1:1000; Chemicon, CA).

Nelle colture Ctr e Wr differenziate in terreno controllo è stata anche valutata l'espressione di vimentina, nestina e iNOS mediante i seguenti anticorpi primari: un anticorpo anti-nestina ottenuto nel topo (1:100, Immunological Sciences, Rome, Italy), un anticorpo anti-vimentina ottenuto nel pollo (1:1000; Novus Biologicals, Littleton, CO) e un anticorpo anti-iNOS ottenuto nel topo (1:100, BD Transduction Laboratories)

Gli anticorpi primari sono stati marcati con i seguenti anticorpi secondari fluorescenti: un anticorpo IgG capra anti-coniglio coniugato con Alexa 488 (1:500; Molecular Probes); un anticorpo IgG capra anti-topo coniugato con Rhodamina TRITC (1:100; Jackson Immuno Research, PA), un anticorpo IgM capra anti-topo coniugato con

Rhodamina TRITC (1:100; Jackson Immuno Research, PA) e un anticorpo IgG capra anti-pollo coniugato con AMCA (1:100; Jackson Immuno Research, PA).

Per permettere il riconoscimento e la conta delle cellule differenziate, dopo i tre lavaggi degli anticorpi secondari, è stata effettuata una contro-colorazione con il colorante nucleare Hoechst 33258 (Molecular Probes) 1 $\mu$ M per 20 minuti a temperatura ambiente. Alla colorazione sono seguiti due lavaggi in PBS e un lavaggio in acqua distillata.

I vetrini coprioggetto su cui sono state coltivate le ANSCs differenziate sono stati montati con Moviol su vetrini portaoggetto rettangolari.

### **Analisi immunocitochimica su co-culture di astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs e motoneuroni**

Le co-culture sono state fissate, permeabilizzate a temperatura ambiente per 45 min in PBS 0.1 M contenete Triton X-100 allo 0.1% e FBS al 10% ed incubate a 4°C per una notte con un anticorpo primario specifico per i motoneuroni anti-SMI32 (1:6000) ottenuto nel topo. Le cellule sono state successivamente lavate ed incubate a temperatura ambiente per 1h con un anticorpo secondario biotinilato anti-topo (1:200) diluito in PBS con 1% FBS. Il segnale è stato amplificato con avidina e perossidasi di rafano biotinilata (ABC Kit), e rivelato da diaminobenzidina (DAB 0.5mg/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 $\mu$ l/10ml) in TBS.

## **Esperimenti di microscopia confocale su astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Ctr e Wr**

### **Valutazione del potenziale transmembrana mitocondriale**

Il potenziale transmembrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) negli astrociti differenziati da ANSCs/ANPCs Ctr e Wr è stato valutato con JC-1 (1.5 $\mu$ M) seguendo il protocollo sopra descritto per le neurosfere.

Dopo incubazione con il colorante, i vetrini su cui sono state coltivate le ANSCs sono stati posti come base di una cameretta (Warner Instruments) termostata (28°C). La cameretta è stata collegata ad un sistema di perfusione che permette la continua sostituzione del tampone extracellulare, anch'esso termostato a 28°C, ad una velocità di 0,3 mL/minuto.

I campioni sono stati analizzati mediante un sistema di microscopia confocale e l'analisi dei dati è stata effettuata mediante i software "Leica" e "Adobe Photoshop".

### **Sistema di microscopia confocale e di microscopia ad epifluorescenza per l'osservazione dei campioni**

I campioni marcati con anticorpi secondari fluorescenti sono stati, in prima analisi, osservati in microscopia ad epifluorescenza mediante un microscopio Olympus CX41, dotato di sistema a led (FRAEN).

Le immagini sono state poi acquisite con un sistema confocale TCS SP2 (Leica), dotato di un microscopio invertito e di obiettivi 63X (NA 1.3) e 40X (NA 1.3) a olio. Tale sistema è situato presso il Centro Grandi Strumenti dell'Università di Pavia.

### **Analisi statistica dei dati**

Per l'analisi statistica dei dati sono stati utilizzati l'analisi della varianza (ANOVA) e test per comparazioni multiple (Fischer) o il test "t di Student".