

Università degli Studi di Milano
Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche

Curriculum di Genomics, Proteomics e Tecnologie correlate

Ciclo XXIV

Anno Accademico 2010-2011

Dottorando: Marina CARDANO

**mSEL-1L: l'orologio molecolare del
differenziamento neurale**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Mario Clerici

Tutore: Prof. Laura SOLDATI

Correlatore: Prof. Ida BIUNNO

SOMMARIO

Il gene SEL-1L codifica per una proteina coinvolta nel processo di retrotraslocazione dei polipeptidi non correttamente conformati dal lume del reticolo endoplasmico al citoplasma, laddove vengono degradati attraverso un meccanismo ubiquitina-proteasoma dipendente all'interno del pathway ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Recentemente è emerso che la proteina murina mSEL-1L (murine SEL-1L) riveste un ruolo essenziale durante lo sviluppo embrionale, in quanto la sua delezione in omozigosi risulta letale durante la mid-gestation, alterando la corretta organogenesi. Questo modello transgenico ci ha permesso di indagare il contributo di mSEL-1L nel differenziamento e nello sviluppo cerebrale, valutando il ruolo della proteina nell'ambito delle cellule staminali neurali (Neural Stem Cells, NSCs) e vagliando la sua relazione con il signaling di Notch.

Si è dimostrato che durante l'embriogenesi, l'espressione di mSEL-1L è ubiquitaria, accentrandosi specificamente nelle regioni cerebrali ventricolari, densamente popolate da progenitori neurali. Con il procedere dello sviluppo, i livelli proteici di mSEL-1L si riducono significativamente, consentendo la rilevazione di rarissime cellule esprimenti la proteina esclusivamente nelle regioni ventricolari e nel giro dentato, le uniche "nicchie" neurogeniche dell'adulto in cui permane una popolazione di NSCs indifferenziate e quiescenti. E' stato in seguito provato che l'espressione di mSEL-1L assume una funzione imprescindibile nel dirigere e garantire un armonico differenziamento delle NSCs, in quanto la deplezione della proteina è associata a differenziamento precoce delle stesse che promuove l'impoverimento del pool dei progenitori neurali sia in vivo che in vitro. In particolare, in vivo l'assenza di mSEL-1L compromette la corticogenesi, poiché stravolge il corretto succedersi delle fasi neurogeniche ed astrogliogeniche, con conseguente alterazione sia della popolazione staminale residua che della sua progenie differenziata. La similarità di questo modello transgenico con i mutanti di Notch ci ha indotto a studiare il possibile coinvolgimento di mSEL-1L con tale pathway. Analisi di co-immunoprecipitazione hanno evidenziato un'interazione tra le due proteine, mentre studi di espressione proteica hanno mostrato un'inibizione dell'intero signaling di Notch-1 associata alla de-regolazione di mSEL-1L. L'espressione della forma nucleare attivata del recettore, così come quella dei suoi principali effettori finali HES-1 e HES-5 vengono significativamente inibite in seguito alla deplezione totale e/o parziale di mSEL-1L, promuovendo l'erronea sovra-regolazione del fattore trascrizionale Neurogenina-2 (NGN-2) e la conseguente attivazione dell'espressione del marcatore neuronale β III-Tubulina. Le principali proprietà delle NSCs essenzialmente governate dal pathway di Notch, quali il self-renewal, il differenziamento, la proliferazione ed addirittura la stessa vitalità cellulare sono drasticamente compromesse dalla mis-regolazione di mSEL-1L. Inoltre, nei modelli murini recanti la delezione in omozigosi di mSEL-1L è stato riscontrato un difetto vasculogenico e soprattutto angiogenico estremamente significativo durante lo sviluppo embrionale, anch'esso probabilmente imputabile all'alterazione dei segnali mediati da Notch.

Il controllo dell'espressione di mSEL-1L è dunque di primaria importanza per consentire il corretto sviluppo embrionale ed è quindi necessario che i suoi livelli proteici vengano monitorati da meccanismi particolarmente sofisticati durante il

differenziamento. E' emerso, infatti, che mSEL-1L è abbondantemente espressa nelle cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESCs) murine, permane durante il loro indirizzamento in vitro a progenitori neurali (Neural Progenitors, NEP) e si mantiene stabile nelle NSCs radial glia-like da esse derivate, mentre la sua espressione proteica viene inibita durante la loro maturazione finale in neuroni, astrociti ed oligodendrociti. Dunque, se da un canto la proteina non viene intaccata passando da uno stato di pluripotenza (ESCs), ad uno di multipotenza (NEPs), fino ad arrivare a quello di tripotenza (NSCs), essa deve essere silenziata per garantire il differenziamento terminale delle NSCs. E' stato possibile dimostrare che il meccanismo di regolazione dell'espressione proteica di mSEL-1L è di tipo post-trascrizionale, essendo mediato dall'azione del mmu-miR-183. Questo microRNA, la cui espressione viene indotta durante il differenziamento sia in vitro che in vivo, è in grado di regolare negativamente mSEL-1L, così come altre proteine a cui è associata un'importante funzione nell'ambito della staminalità, quali la β 1-Integrina e Bmi-1. Differentemente, la de-regolazione del mmu-miR-183 induce l'incremento dei livelli proteici di mSEL-1L nelle NSCs derivate dalla corteccia telencefalica degli embrioni con un solo allele funzionale del gene (mSEL-1L HET), garantendo un'elevata espressione proteica, sebbene in presenza di un quantitativo di messaggero inferiore.

In conclusione, questa ricerca ha evidenziato un ruolo di mSEL-1L ERAD-indipendente nell'ambito della biologia delle NSCs, un ruolo essenziale nel garantire il corretto sviluppo embrionale e l'omeostasi dell'intero organismo. La proteina emerge quindi come una sorta di "orologio molecolare", in grado di regolare il passaggio da uno stato di staminalità ad uno differenziato solo al momento opportuno. I dati qui presentati potrebbero offrire un ottimo punto di partenza per l'elaborazione di specifiche strategie terapeutiche contro patologie degenerative e per applicazioni in medicina rigenerativa.

ABSTRACT

The gene *SEL-1L* codifies for a protein involved in the retrotranslocation of misfolded peptides from the lumen on the endoplasmic reticulum to the cytoplasm, where they are degraded by the ubiquitin-proteasome mechanism in the ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) pathway.

Recently, it was found that the murine protein mSEL-1L (murine *SEL-1L*) plays an essential role during embryonic development, since its homozygous deletion is lethal during mid-gestation, altering the correct organogenesis. This transgenic model allowed us to investigate mSEL-1L contribution in differentiation and brain development *in vivo* and to study its role in neural stem cell (NSC) biology *in vitro*, focusing on its relationship with Notch signaling.

We have shown that during embryogenesis, mSEL-1L expression is ubiquitous in the developing brain with high levels detected in the ventricular regions, densely populated by neural progenitors. As development proceeds, mSEL-1L protein levels significantly decrease, allowing the detection of rare cells still expressing the protein only in the ventricular zones and in the dentate gyrus, the only adult neurogenic “niches” in which a population of undifferentiated and quiescent NSCs is retained. It has been subsequently proved that mSEL-1L expression plays as essential role in directing and ensuring a harmonious NSC differentiation, as the protein deletion is associated with an early cellular differentiation that determines the progenitor pool depletion, both *in vivo* and *in vitro*. In particular, mSEL-1L absence *in vivo* compromises the corticogenesis, because it affects the correct sequence of neurogenic and astrogliogenic phases, altering both the residual stem cell population and its differentiated progeny. The similarity of this transgenic model with Notch mutants led us to investigate the possible involvement of mSEL-1L with this pathway. Co-immunoprecipitation analysis has revealed an interaction between these two proteins, while expression studies have shown a specific inhibition of Notch-1 signaling associated to mSEL-1L down-regulation. The expression of the nuclear activated form of the receptor, as well as that of its main effectors *HES-1* and *HES-5*, are significantly inhibited when mSEL-1L is totally or partially depleted, promoting an erroneous up-regulation of the transcriptional factor Neurogenin-2 (*NGN-2*) and the following increase of the neuronal marker β III-Tubulin expression.

The main NSC properties primarily governed by Notch pathway, such as self-renewal, differentiation, proliferation and cell survival, are drastically affected by mSEL-1L misregulation. Moreover, mSEL-1L deficient mouse models show significant vasculogenic and angiogenic defects during embryonic development, probably due to an alteration of Notch signaling.

The proper control of mSEL-1L expression is therefore of paramount importance to enable the correct embryonic development, as well as its regulation during differentiation by specific and sophisticated mechanisms. In fact, it has emerged that mSEL-1L is abundantly expressed in mouse embryonic stem cells (ESCs) and is maintained stable through their *in vitro* differentiation into neural progenitors (NEPs) first, and then into radial glia-like NSCs, while its expression is inhibited during their final maturation into neurons, astrocytes and oligodendrocytes. So, the protein is not affected by passing from a state of pluripotency (ESCs), to multipotency (NEPs), up to tripotency (NSCs), but it must be silenced to ensure

NSC terminal differentiation. In fact, it has been demonstrated that mSEL-1L expression is regulated in a post-transcriptional way by mmu-miR-183. This microRNA, whose expression is induced during differentiation both in vitro and in vivo, is able to negatively regulate mSEL-1L, as well as other proteins with an important function in stemness, such as β -Integrin and Bmi-1. Differently, mmu-miR-183 down-modulation can promote an increase in the protein levels in NSCs derived from the telencephalic cortex of embryos with only one mSEL-1L functional allele (mSEL-1L HET), ensuring a high protein expression, although in presence of a reduced quantity of its messenger.

In conclusion, this research has highlighted an ERAD-independent role of mSEL-1L concerning NSC biology, a role that is essential to guarantee the proper embryonic development and the homeostasis of the whole organism. Therefore, the protein appears as a sort of “molecular clock” that can drive the transition from a stemness state to a differentiate one, only when it is appropriate. The data here presented may provide a good starting point for the development of specific therapeutic strategies for degenerative pathologies and for regenerative medicine applications.

INDICE

SOMMARIO

ABSTRACT

INDICE

LISTA SIMBOLI

INTRODUZIONE

1.	<i>Le cellule staminali.....</i>	4
1.1	Le cellule staminali neurali	5
1.2	La scoperta delle NSCs nell'adulto	6
1.3	Il differenziamento delle NSCs e la corticogenesi.....	8
1.4	La nicchia delle NSCs	11
1.4.1	La regione subventricolare.....	12
1.4.2	La regione subgranulare.....	14
1.5	Le NSCs <i>in vitro</i>	14
1.6	Il bilanciamento fra <i>self-renewal</i> e differenziamento	16
1.6.1	Il pathway di Wnt	16
1.6.2	Il pathway di Sonic hedgehog	18
1.6.3	Il pathway di Notch	19
1.7	Il controllo epigenetico	22
1.8	I miRNA e le NSCs	25
1.8.1	Il miR-9.....	25
1.8.2	Il miR let-7b	26
1.8.3	Il miR-124.....	26
1.8.4	Il miR-183.....	26
2.	<i>SEL-1L</i>	28
2.1	SEL-1L e il pathway ERAD	28
2.2	SEL-1L ed il tumore	29
2.3	SEL-1L nello sviluppo del pancreas.....	30

MATERIALI E METODI

1.	<i>Linee cellulari, condizioni colturali e differenziamento</i>	32
1.2.	Trasfezione e trattamenti delle NSCs	33
1.3.	Valutazione della crescita cellulare.....	34
2.	<i>Modelli murini</i>	34
2.1	Genotipizzazione	34
2.2	Preparazione dei campioni paraffinati o congelati	35
2.3	Saggio delle neurosfere e colture primarie di NSCs	35
3.	<i>Analisi immunofenotipiche</i>	36
3.1	Immunofluorescenza.....	36
3.2	Whole mount.....	37

4.	<i>Western blot.....</i>	38
4.1	Estrazione proteica e frazionamento subcellulare	38
4.2	Immunoprecipitazione.....	38
4.3	SDS-PAGE e <i>blotting</i>	39
5.	<i>RT-PCR e Real Time PCR quantitativa.....</i>	39

RISULTATI

1.	<i>Caratterizzazione dell'espressione di mSEL-1L nel SNC</i>	42
1.1	L'espressione di mSEL-1L durante lo sviluppo	42
1.2	Il modello murino mSEL-1L KO	44
2.	<i>Caratterizzazione della relazione fra mSEL-1L e le NSCs.....</i>	48
2.2	Relazione fra mSEL-1L ed il <i>self-renewal</i>	48
2.3	Differenziamento delle NSCs mSEL-1L HET	53
2.4	Espressione di mSEL-1L durante la neuralizzazione	55
2.5	mSEL-1L ed il differenziamento delle NSCs	58
2.6	Regolazione di mSEL1-1L da parte del mmu-miR-183.....	60
3.	<i>Caratterizzazione della relazione fra mSEL-1L e Notch.....</i>	68
3.1	La de-regolazione di mSEL-1L e il <i>signaling</i> di Notch-1	68
3.2	Interazione fra mSEL-1L e Notch.....	72
3.3	mSEL-1L, Notch e l'angiogenesi	74

DISCUSSIONE

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

LISTA SIMBOLI

- aNSC: *activated Neural Stem Cell*
- BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*
- BMP: *Bone Morphogenic Protein*
- BP: *Basal Progenitor*
- BrdU: *Bromo-desossi-uridina*
- BSA: *Bovine Serum Albumine*
- CHX: *Cicloesimide*
- CNPasi: *2', 3'-ciclico nucleotide 3'-fosfodiesterasi*
- CNX: *Calnexina*
- DG: *Dentate Gyrus*
- Disp: *Dispatched*
- Dvl: *Dishvelled*
- ECL: *Enhanced Chemiluminescence*
- ECM: *ExtraCellular Matrix*
- EDTA: *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*
- EGF: *Epidermal Growth Factor*
- ERAD: *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*
- ESC: *Embryonic Stem Cells*
- FBS: *Fetal Bovine Serum*
- FC: *Frontal Cortex*
- FGF: *Fibroblast Growth Factor*
- FZ: *FrieZzled*
- GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- h: *Ore*
- HCPs: *High CpG density Promoters*
- HER: *Hairy-Enhancer of split-Related gene*
- hES NSC: *Neural Stem Cell derived from Human Embryonic Stem Cell*
- HES: *Hairy and Enhancer of Split*
- HET: *Heterozygous*
- HEY: *Hes-related with YRPW motif*
- HGF: *Hepatocyte Growth Factor*
- HIS: *Istitidina*
- HRP: *Horseradish Peroxidase*
- KO: *Knock-Out*
- LCPs: *Low CpG density Promoters*
- LIF: *Leukemia Inhibitory Factor*
- LV: *Lateral Ventricle*
- MA: *Mantle*
- MBD: *Methyl Binding Proteins*
- miRNA: *microRNA*
- mSEL-1L: *murine mSEL-1L*
- MZ: *Marginal Zone*
- NB: *NeuroBlast*

- NE: *Neural Retina*
- NECD: *Notch Extracellular Domain*
- NEP: *NEural Progenitor*
- Ngn: *Neurogenin*
- NGN: *New Generated Neurons*
- NICD: *Notch Intracellular Domain*
- nIPC: *neurons Intermediate Progenitor Cell*
- NRCs: *Nucleated Red blood Cells*
- NSC: *Neural Stem Cell*
- oIPC: *oligodendrocytes Intermediate Progenitor Cell*
- Pb: *Paia di basi*
- PBS: *Phosphate Buffered Saline*
- PcG: *Polycomb Group*
- PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*
- PECAM-1: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*
- PEDF: *Pigment Epithelium-Derived Factor*
- PFA: *Paraformaldeide*
- PM: *PBS, Milk*
- PMT: *PBS, Milk, Tween20*
- PRC: *Polycomb Repressor Complex*
- qNSCs: *quiescent Neural Stem Cells*
- qRT-PCR: *quantitative Real Time PCR*
- RAM: *RBP-J-associated molecule*
- RBP-J: *Recombinant Signal Sequence-Binding Protein Jk*
- Rest: *Repressor Element 1-Silencing Transcription factor*
- RG: *Radial Glia*
- R-NSCs: *Rosette Neural Stem Cells*
- RPE: *Retinal Pigment Epithelium*
- RT-PCR: *Reverse Transcriptase PCR*
- SCF: *Stem Cell Factor*
- SDF-1: *Stromal Cell-derived Factor-1*
- SGZ: *SubGranular Zone*
- Shh: *Sonic HedgeHog*
- shRNA: *short hairpin RNA*
- siRNA: *short interference RNA*
- Smo: *Smoothened*
- SNC: *Sistema Nervoso Centrale*
- snoRNA: *small nucleolar RNA*
- SNP: *Single Nucleotide Polimorfism*
- SVZ: *Sub Ventricular Zone*
- TAD: *Transactivation Domain*
- TD: *Tempo di Duplicazione*
- TM-NICD: *TransMembrane Notch Intracellular Domain*
- TMT: *Trimetilina*
- TrxG: *Trithorax Group*
- UTR: *Untraslated Region*

- VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*
- VZ: *Ventricular Zone*
- WT: *Wild-Type*

INTRODUZIONE

1. Le cellule staminali

Le **cellule staminali** rappresentano un particolare sottotipo cellulare altamente indifferenziato in grado di originare sia una progenie di cellule figlie con le stesse caratteristiche della cellula madre, che una popolazione altamente differenziata. Dunque, le due proprietà imprescindibili di una cellula staminale sono il **self-renewal**, ossia la capacità di rigenerarsi e perpetuarsi verosimilmente all'infinito, e la sua **potenzialità**, la prerogativa di differenziare in un fenotipo specializzato e maturo. Tali caratteristiche vengono preservate grazie alla possibilità di effettuare sia la **divisione simmetrica**, attraverso cui la cellula staminale origina due cellule figlie indifferenziate, che la **divisione asimmetrica**, mediante la quale la cellula madre ne produce una con proprietà staminali ed una differenziata. Si tratta di meccanismi che fisiologicamente governano il processo duplicativo delle cellule staminali, ma la regolazione dell'una e dell'altra modalità replicativa costituisce ancora oggi una delle più affascinanti tematiche oggetto di studio da parte della biologia cellulare. Molti dei *pathways* necessari nel *self-renewal* sono anche coinvolti nel controllo della proliferazione, dell'apoptosi e del differenziamento. Basti pensare alla famiglia dei fattori trascrizionali p53 e p73, ben caratterizzata in passato per le importantissime funzioni rivestite nell'ambito del ciclo cellulare, del riparo del DNA, della tumorigenesi, ma oggi centrale nello studio delle cellule staminali. In particolare è stato provato che l'attivazione dell'oncosoppressore p53 possa ostacolare l'espansione delle cellule staminali, limitando il *self-renewal* ed inibendo la divisione simmetrica [1]. Ciò comporta una grave disfunzione, infatti, qualora una cellula staminale ne origini due completamente mature o perda la sua capacità duplicativa, viene meno il processo di *self-renewal*, con conseguente impoverimento ed eventuale deplezione del *pool* staminale [2]. Differentemente, la perdita della funzionalità di p53 è stata associata ad un'incrementata divisione simmetrica [3]. Inoltre, la deplezione di p73 è stata correlata alla drastica riduzione dei progenitori neurali *in vivo*, connessa ad una degenerazione pressoché totale delle "nicchie" di cellule staminali dell'adulto [4].

Le cellule staminali possono essere classificate a seconda della loro potenzialità, quindi in base alle loro specifiche proprietà differenziative (Figura 1):

- **totipotenti**, dal latino *totus* ("il tutto"), poiché virtualmente in grado di generare tutti i tipi cellulari embrionici ed extra-embryonici (zigote);
- **pluripotenti**, dal latino *plurimus* ("moltissimi"), ossia generate dalle cellule totipotenti e capaci di originare cellule appartenenti ai tre diversi foglietti germinativi (endoderma, mesoderma ed ectoderma). Si tratta delle cellule dell'*inner cell mass* della blastocisti [5];
- **multipotenti**, dal latino *multus* ("molto"), quando possono produrre fenotipi cellulari maturi differenti, ma comunque ben definiti;
- **oligopotenti**, dal greco *oligos* ("poco"), se danno vita a pochi tipi cellulari differenziati;
- **unipotenti**, dal latino *unus* ("uno solo"), nel momento in cui producono un solo tipo cellulare maturo, ma, essendo dotate di *self-renewal*, sono comunque ritenute cellule staminali [6].

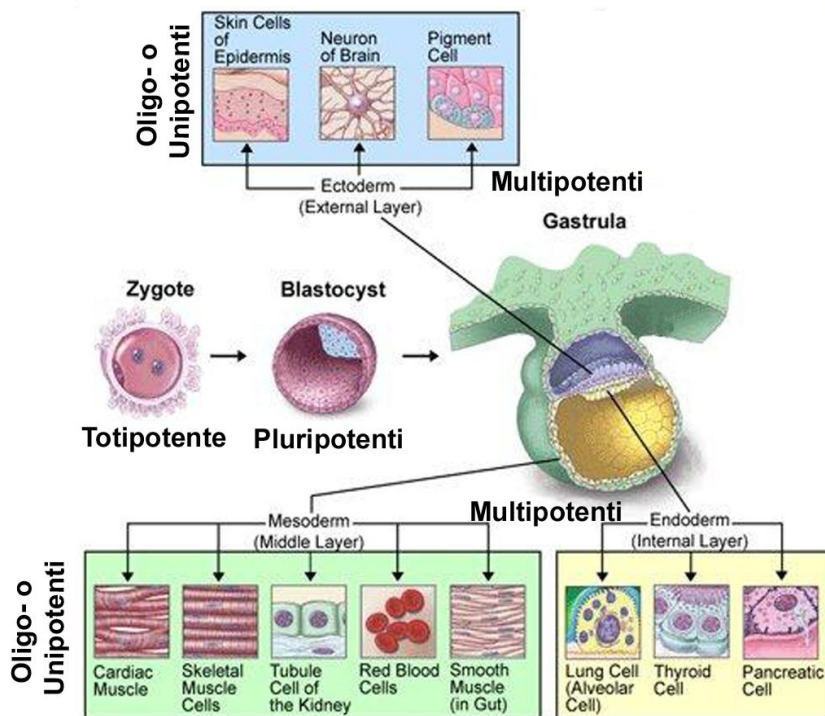


Figura 1. La potenzialità delle cellule staminali. A seconda della capacità di generare fenotipi cellulari maturi diversificati, le cellule staminali possono essere denominate totipotenti, pluripotenti, multipotenti, oligopotenti o unipotenti. Figura tratta dalla pagina web <http://www.biophylaxis.com/en/pages/stemglossary.php> e modificata

1.1 Le cellule staminali neurali

Circa 80 anni fa, Ramòn y Cajal sosteneva l'impossibilità del sistema nervoso centrale (SNC) di rigenerarsi una volta terminato il processo di sviluppo e differenziamento [7]. La neurobiologia e la medicina molecolare sono state a lungo dominate dal cosiddetto "dogma di Cajal", fino a quando le ricerche scientifiche hanno portato alla scoperta di particolari cellule staminali, le cosiddette **cellule staminali neurali** (NSCs), che si trovano non solo nel sistema nervoso durante il suo sviluppo embrionale, ma che risiedono e vengono racchiuse in numero limitato in particolari "nicchie" del cervello adulto. Si tratta di cellule in grado di rigenerarsi, auto-rinnovarsi e perpetuarsi nel tempo, grazie alla loro specifica proprietà di *self-renewal*. Un'altra prerogativa fondamentale delle NSCs è la loro **multipotenza**, ossia la capacità di originare una progenie differenziata appartenente ad uno dei tre fenotipi neurali terminalmente differenziati (Figura 2): neuronale, a cui è legata la funzionalità del sistema nervoso, astrocitario ed oligodendrogliale, il cui ruolo è quello di supportare la funzione neuronale. Tuttavia, nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, le NSCs differenziano esclusivamente in neuroni (**fase neurogenica**), acquisendo solo in un secondo tempo la multipotenzialità che consente loro di maturare anche in astrociti ed oligodendrociti (**fase gliogenica**) [8]. I meccanismi

che governano così finemente lo sviluppo neurale, bilanciando accuratamente la proliferazione ed il differenziamento verso uno specifico fenotipo neurale maturo, derivano da una ben articolata fusione di segnali sia extra- che intra-cellulari che verranno analizzati nei seguenti capitoli introduttivi.

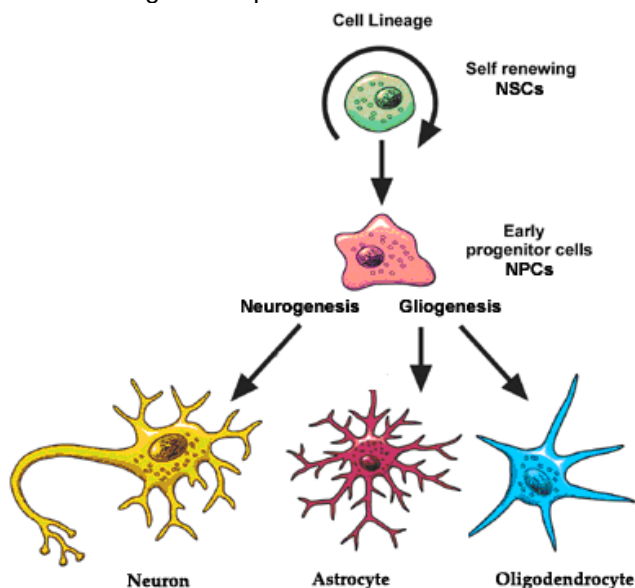


Figura 2. Self-renewal e differenziamento delle NSCs. Ogni NSC può mantenere inalterata la sua capacità di duplicarsi all'infinito, generando una progenie di cellule dotate delle sue stesse proprietà. Tuttavia, sotto specifici segnali e definiti stimoli, essa può differenziare, originando cellule progenitrici ed infine tipi cellulari maturi, quali neuroni, astrociti o oligodendrociti. Figura tratta dalla pagina web http://www.humansfuture.org/genetic_engineering_stem_cells.php.htm e modificata.

1.2 La scoperta delle NSCs nell'adulto

Le prime evidenze circa l'esistenza di cellule dotate di capacità proliferative nel SNC vennero esposte da Altman [9] e successivamente avallate da Kaplan, il quale osservò la neogenesi di neuroni nel bulbo olfattivo e nel giro dentato dell'ippocampo di ratto [10]. Una curiosa ed interessante scoperta venne effettuata negli anni '80, quando si documentò la capacità dei neuroni di rigenerarsi negli uccelli durante la stagione dell'accoppiamento [11]. Indubbiamente, il più grande contributo alla scoperta delle NSCs adulte è da attribuirsi a Reynolds [12], il quale provò l'esistenza di cellule con caratteristiche propriamente staminali nel cervello adulto, in prossimità dei sistemi ventricolari [13]. Inoltre è stato dimostrato che la neurogenesi nel SNC adulto, intesa come generazione di nuovi neuroni in grado di integrarsi nei circuiti preesistenti, tende a diminuire con l'invecchiamento [14-15], causando probabilmente la perdita di specifiche abilità cognitive associata all'età avanzata [16].

Tali interessantissime scoperte hanno modificato drasticamente l'idea che qualsiasi danno apportato al SNC fosse irreversibile, aprendo il varco all'ipotesi che l'esiguo

numero di NSCs persistenti nell'adulto potesse riparare le alterazioni subentrate, fornendo una nuova progenie di cellule funzionalmente attive. Sembra, tuttavia, che le NSCs non riescano a farsi carico del processo neurogenico in alcune patologie neurodegenerative, quali il Parkinson e l'Alzheimer, contribuendo alla patogenesi stessa di tali morbi. Differentemente, nel caso di lesioni acute del SNC, come l'ictus, i progenitori neurali intensificano la loro proliferazione attivando la neurogenesì in modo da contribuire al recupero del danno [17]. E' come se le NSCs quiescenti nel SNC si riattivassero dopo una lesione acuta, ma non durante uno stato di neurodegenerazione cronica.

La potenziale applicazione clinica delle cellule staminali neurali ha dato un grande impulso alla ricerca nel settore, come testimonia la crescita esponenziale del numero di pubblicazioni scientifiche in merito, soprattutto negli ultimi dieci anni (Figura 3 A). Gli Stati Uniti d'America, il Giappone ma anche l'Europa rappresentano le sedi in cui si sono svolte e continuano ad espletarsi le principali attività di ricerca volte a delucidare la funzione delle NSCs (Figura 3 B).

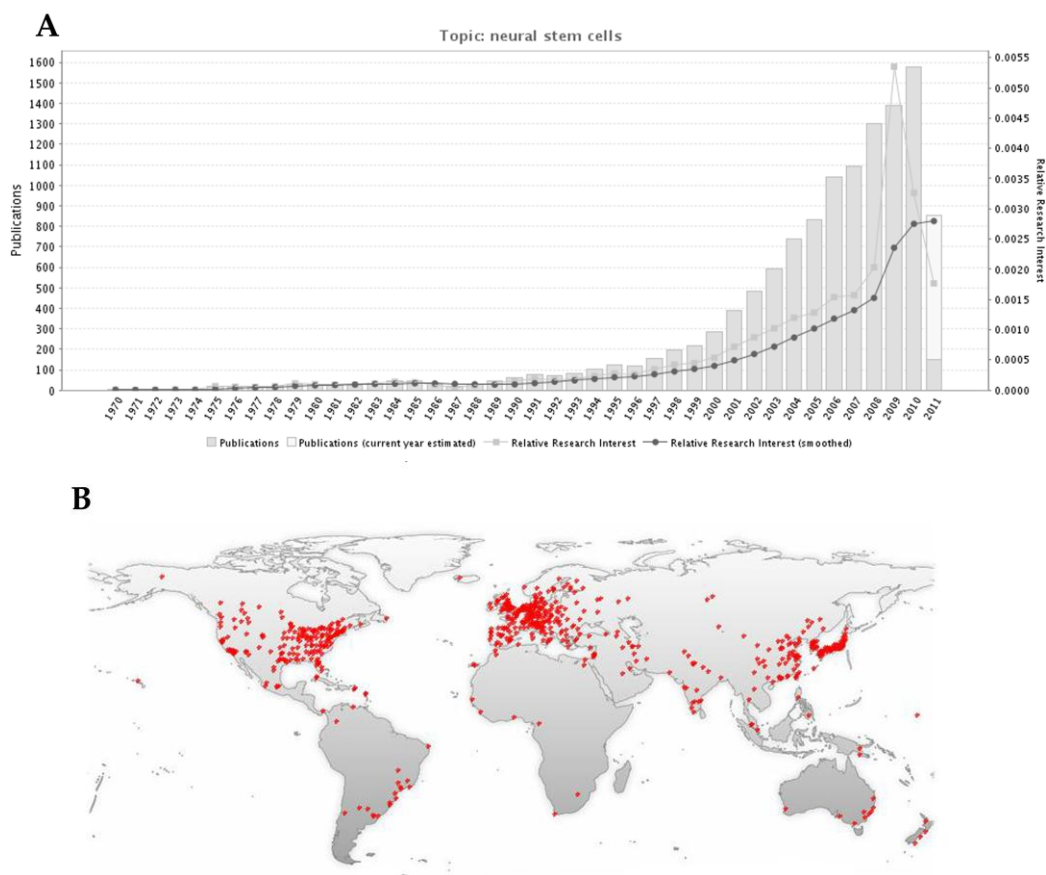


Figura 3. Pubblicazioni scientifiche nel settore delle Cellule Neurali Staminali

A) Nel corso degli ultimi 40 anni, ma particolarmente dell'ultimo decennio, le pubblicazioni scientifiche che trattano specificamente le principali tematiche

inerenti le NSCs sono cresciute esponenzialmente. B) La maggiore densità di pubblicazioni relative alle NSCs si registra negli Stati Uniti d'America, nel Giappone e nell'intera Europa. Figure tratte dalla pagina web <http://www.qopubmed.org>.

1.3 Il differenziamento delle NSCs e la corticogenesi

Durante lo sviluppo cerebrale, la neurogenesi nel mammifero prende avvio con la formazione del neuroectoderma, il quale si sviluppa nella piastra neurale che a sua volta si conforma a dare origine al tubo neurale. Tali strutture sono sostenute da una popolazione piuttosto eterogenea, costituita dai cosiddetti **progenitori neurali** (NEPs) [18]. *In vivo* tali cellule danno luogo ad una divisione simmetrica a livello della **Zona Ventricolare** (*Ventricular Zone*, VZ), in modo da costituire un cospicuo *pull* di progenitori. Successivamente, le NEPs si dividono asimmetricamente, in modo che la cellula figlia differenziata migri radialmente all'esterno della regione ventricolare. Queste cellule sono le artefici della prima fase di neurogenesi nel tubo neurale, producendo successivamente sia le cellule della **glia radiale** (*Radial Glia*, RG) che i **progenitori basali** (*Basal Progenitors*, BPs). Le cellule RG, generatesi all'inizio della neurogenesi, sono le più abbondanti nel cervello in fase di sviluppo e fungono da riserva di cellule staminali. Esse, infatti, non solo hanno un fondamentale ruolo di "impalcatura" per i nuovi neuroni, ma producono in seguito una progenie di cellule differenziate. Le cellule RG si dividono sia simmetricamente che asimmetricamente, ma il loro potenziale differenziativo risulta meno spiccato di quello delle NEPs, essendo non sempre orientato alla tripotenza, quanto piuttosto alla bipotenza o addirittura alla unipotenza. I progenitori basali sono prevalentemente concentrati nella regione **sub-ventricolare** (*Sub Ventricular Zone*, SVZ) e possono derivare sia dalle NEPs che dalle cellule RG nelle fasi tardive dello sviluppo. E' molto interessante sottolineare che queste cellule possono effettuare una sola divisione simmetrica, generando 2 neuroni e raramente alcune riescono ad effettuare una seconda mitosi originando in tutto 4 neuroni, fungendo, in definitiva, da specifica riserva neuronale. Nel cervello del mammifero adulto, le cellule progenitrici multipotenti persistono nella SVZ e nella regione **sub-granulare** (*Sub Granular Zone*, SGZ) del giro dentato, potendo garantire la gliogenesi e la neurogenesi lungo la vita dell'individuo. Esse derivano da cellule RG e nel periodo post-natale si convertono in NSCs "astrocytic-like" [19]. E' interessante notare come la dimensione e la complessità della corteccia cerebrale siano aumentate durante l'evoluzione, fino ad arrivare all'acquisizione da parte dei mammiferi della neocorteccia. Essa è caratterizzata dalla presenza di zone cito-architettoniche ben distinte che si articolano in sei diversi strati, ciascuno contraddistinto dalla sua organizzazione e composizione cellulare [20]: il sesto strato è quello più profondo, costituito dai neuroni più vecchi, mentre il primo strato è quello più esterno ed è formato dai neuroni più giovani [21] (Figura 4 A).

La neurogenesi a livello della corteccia cerebrale è un processo finemente regolato in cui i progenitori neurali differenziano in neuroni destinati a specifici strati corticali, i quali vengono divisi principalmente in due grandi sottogruppi, gli **interneuroni**, che occupano diversi strati corticali ed utilizzano solitamente il neurotrasmettitore GABA, ed i **neuroni di proiezione**, che utilizzano il glutammato come neurotrasmettitore [22]. La neurogenesi corticale è un processo che si protrae nel

tempo, infatti, se da un canto i primi neuroni si sviluppano già durante la *mid-gestation*, gli ultimi neuroni della corteccia si generano nel periodo peri-natale. Verosimilmente, durante lo sviluppo embrionale tutti i neuroni del SNC derivano dalle cellule dal lume del tubo neurale, dalla VZ, particolarmente dalle cellule RG [23]. Via via che lo sviluppo procede, i neuroni differenziatisi a partire dalle NSCs che popolano la VZ, smettono di dividersi e abbandonano tale regione, migrando verso l'area corticale esterna. Nelle prime fasi della corticogenesi, la corteccia appare molto sottile e corrisponde alla **preplate**, al di sotto della quale si distinguono la VZ ed una zona intermedia, la SVZ (Figura 4 B). In seguito, le cellule destinate a popolare il sesto strato, migrano verso la **preplate**, la quale va a costituire la **marginal zone** e la **subplate**. La successiva neogenesi neuronale comporta la loro migrazione attraverso la **subplate**, appena sotto la **marginal zone**, nella **cortical plate** [21] (Figura 4 C). All'inizio della neurogenesi i progenitori multipotenti della VZ prediligono la divisione simmetrica, ma successivamente effettuano la divisione asimmetrica, in modo da generare non solo neuroni post-mitotici, ma anche progenitori intermedi della SVZ [24]. Questi ultimi daranno origine ai neuroni degli strati superiori mediante una divisione simmetrica terminale, mentre i neuroni differenziatisi dalla VZ costituiranno gli strati più profondi della corteccia [25].

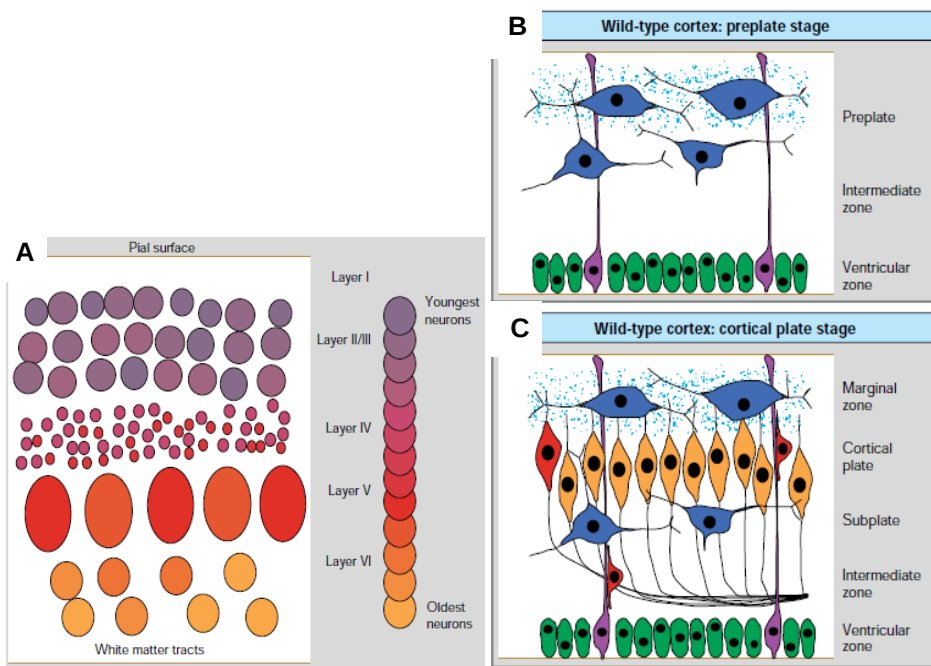


Figura 4. Struttura della neocorteccia e suo sviluppo. A) La corteccia cerebrale è formata da sei diversi strati che, andando dall'interno all'esterno, sono costituiti da neuroni più giovani. B) Nei primi stadi dello sviluppo embrionale, la corteccia cerebrale è costituita dalla cosiddetta preplate, sostenuta alla base dalla VZ e da una zona intermedia, o SVZ. C) In seguito, la migrazione dei neuroni neo-

differenziati, porta alla creazione, della subplate, della cortical plate, e della marginal zone a partire dalla preplate. Tratto da Gilmore and Herrup, 1997 [21].

Lo sviluppo del SNC è sottoposto ad un controllo molto stringente per quanto concerne il corretto susseguirsi degli eventi da un preciso punto di vista spazio-temporale. Inizialmente le NSCs sono effettivamente prive della loro multipotenza, originando esclusivamente una progenie neuronale durante la *mid-gestation*. Il differenziamento gliale è stimolato solo successivamente, durante la *late-gestation* ed il periodo perinatale [8,26] (Figure 5 A e B) ed è molto interessante notare che effettivamente sussista uno specifico *switch* fra la potenzialità neuronale e quella gliale; infatti, quando le NSCs acquisiscono la capacità gliogenica, perdono la proprietà neurogenica [27]. Il corretto sviluppo embrionale prevede dunque che la neurogenesi preceda sempre la gliogenesi e ciò viene garantito attraverso specifici determinanti sia intra- che extra-cellulari, quali per esempio citochine, fattori trascrizionali e regolatori epigenetici. Per esempio, l'espressione dei fattori pro-neurali *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) è in grado di sopprimere il potenziale gliogenico dei precursori neurali durante la neurogenesi [28]. Inoltre, bassi livelli di FGF-2 sono connessi al differenziamento neuronale, mentre la sua elevata espressione consente l'ampliamento dei progenitori gliali [29]. La gliogenesi stessa prevede la sua tempistica interna, in quanto gli oligodendrociti, generati dalla porzione ventrale del proencefalo, si differenziano nel periodo post-natale e quindi, a livello della corteccia cerebrale, la gliogenesi inizialmente corrisponde ad un differenziamento esclusivamente astrocitario. Il *pathway* di JAK-STAT, attivato dalla citochina LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), e le proteine BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), attraverso l'associazione fra STATs, SMAD-1 e P300/CBP, sono in grado di promuovere la maturazione astrogliale [30]. Tuttavia, il LIF non riesce a sostenere l'astrogliogenesi nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, poiché gli *STAT-binding element* all'interno del promotore del principale marcatore astrocitario GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) sono cospicuamente metilati e ciò ne inibisce la trascrizione [27]. Tuttavia, nelle fasi più tardive dell'embriogenesi, il promotore viene demetilato e la regolazione trascrizionale operata dal LIF può diventare effettiva [31], garantendo un'elevata espressione della GFAP. Per quanto concerne lo sviluppo oligodendrogliale, i bHLH OLIG-1 e OLIG-2, espressi durante lo sviluppo, sembrano giocare un ruolo molto importante [32], eventualmente mediato anche dall'azione di altri fattori trascrizionali differenzialmente espressi nel tempo e nello spazio.

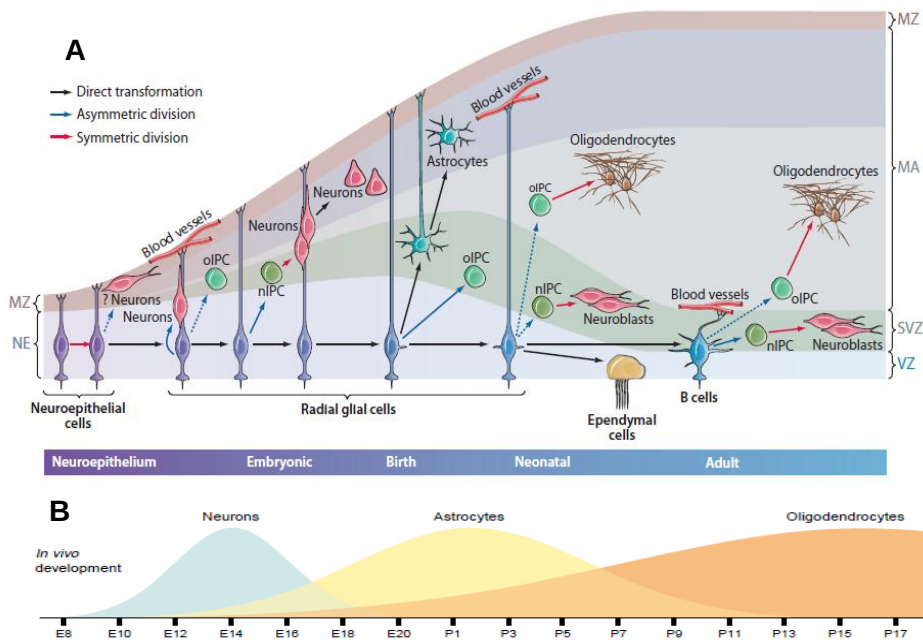


Figura 5. Il differenziamento delle NSCs in vivo. A) Inizialmente le NSCs si dividono simmetricamente, mentre successivamente, mediante divisione asimmetrica, producono neuroni. I progenitori si allungano e si convertono in cellule della RG, le quali originano nuovi neuroni direttamente o a partire dai progenitori intermedi (neurons Intermediate Progenitor Cells, nIPCs). I progenitori degli oligodendrociti (oligodendrocytes Intermediate Progenitor Cells, olIPCs) vengono prodotti a partire dalle cellule RG, mentre gli astroцити e gli oligodendrociti maturi compaiono solo nel periodo neonatale. Alcune cellule RG si convertono in cellule ependimali, mentre altre generano astroцити della SVZ (cellule di tipo B). Al termine della corticogenesi, nell'adulto si distinguono la VZ, la SVZ, la zona "mantello" (Mantle, MA) e la regione marginale (Marginal Zone, MZ). **B)** Le tre principali tipologie di cellule neurali mature vengono generate in vivo secondo una tempistica ben precisa che prevede nel ratto dapprima la neurogenesi, secondariamente la astrogliogenesi ed infine il differenziamento oligodendrogliale. Tratto da Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009 [33].

B) Le tre principali tipologie di cellule neurali mature vengono generate in vivo secondo una tempistica ben precisa che prevede nel ratto dapprima la neurogenesi, secondariamente la astrogliogenesi ed infine il differenziamento oligodendrogliale. Tratto da Sauvageot and Stiles, 2002 [26].

1.4 La nicchia delle NSCs

Un concetto particolarmente interessante, ma ancora scarsamente esplorato, è quello della "nicchia" che, come precedentemente accennato, è un microambiente fondamentale nel preservare la staminalità delle NSCs, mediante interazioni intracellulari, segnali trasmessi dalla matrice extracellulare (*Extracellular Matrix*, ECM) oppure modulati da specifici fattori solubili. In tal modo, il *pull* di progenitori neurali, preziose e rare NSCs rimaste in uno stato indifferenziato anche dopo lo

sviluppo embrionale, può essere mantenuto anche nell'organismo adulto per poter eventualmente fronteggiare nuovi stimoli neurogenici.

Una delle principali evidenze circa l'esistenza di tali nicchie deriva dalla considerazione che, nel caso di trapianti di NSCs, esse possono proliferare solamente in regioni neurogeniche integrandosi perfettamente nel circuito preesistente, mentre, qualora il trapianto venga effettuato in aree prive di tali proprietà, il *self-renewal* è inibito ed è promosso un differenziamento gliale [34-35].

1.4.1 La regione subventricolare

La **SVZ** è una delle nicchie maggiormente studiate ed è localizzata a livello delle pareti dei ventricoli laterali. La superficie ventricolare è formata da uno strato di cellule endoteliali, costituite da corpi basali e lunghe ciglia nella porzione apicale (Figura 6, cellule E1 ed E2), creando una barriera fisica fra il parenchima cerebrale e il fluido cerebrospinale. La SVZ è popolata anche da astrociti GFAP-positivi (Figura 6, cellule B1 e B2) che, grazie alle loro estensioni, rimangono in contatto con il ventricolo e sembrano rappresentare le vere e proprie NSCs dell'adulto. La parete laterale del ventricolo è il sito in cui avvengono le interazioni cellula-cellula, mentre i neuroblasti migranti (Figura 6, cellule di tipo A) vengono separati dal tessuto striatale grazie agli astrociti. Le cosiddette "cellule amplificanti transientemente" (Figura 6, cellule di tipo C), originatesi attraverso divisione asimmetrica dalle cellule B, proliferano molto rapidamente ed originano neuroblasti migranti.

Durante la neurogenesi nell'adulto, i progenitori neurali residenti nella SVZ migrano attraverso il flusso rostrale fino a raggiungere i bulbi olfattivi, laddove differenziano in diversi sottotipi neuronali ed anche in oligodendrociti del corpo calloso. In un solo giorno, ben 30-60000 nuovi neuroni vengono generati nel bulbo olfattivo dei roditori [36-37].

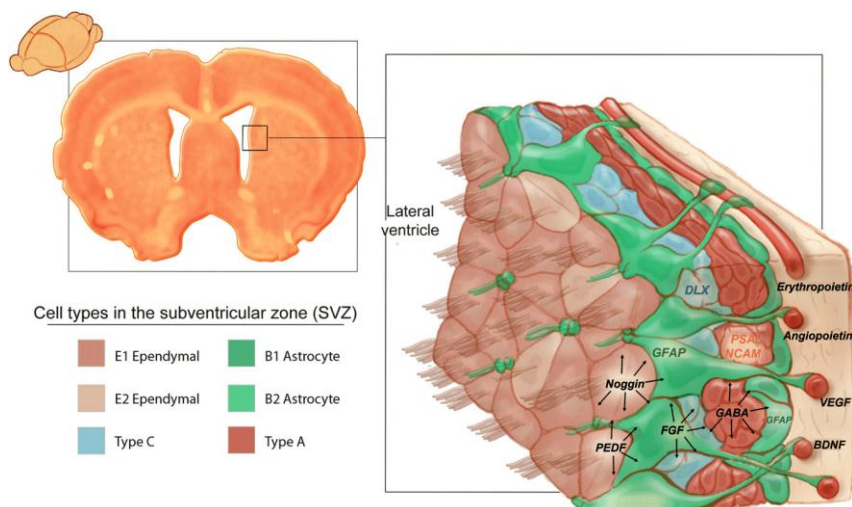


Figura 6. Rappresentazione grafica della SVZ nei roditori adulti. La SVZ è una porzione del cervello situata lungo le pareti laterali dei ventricoli laterali. Essa è costituita da una popolazione cellulare altamente eterogenea e rappresenta un sito fondamentale per la neurogenesi dell'adulto. Figura tratta da Garzón-Muvdi and Quiñones-Hinojosa, 2009 [38].

La SVZ è ricca di diversi fattori solubili che consentono il mantenimento del suo potenziale neurogenico. Nello specifico, le cellule endoteliali producono il **Noggin**, un potente antagonista del **BMP** che regola il differenziamento neurale. Questo fattore solubile consente il mantenimento del *pull* staminale, prevenendo il differenziamento e garantendo la proliferazione degli astrociti con proprietà staminali [39-40]. Come riportato nella Figura 7, i mitogeni **EGF** (*Epidermal Growth Factor*) ed **FGF** (*Fibroblast Growth Factor*) sono fattori di crescita essenziali per la regolazione del *self-renewal* e, almeno *in vitro*, sono capaci di stimolare la proliferazione dei progenitori neurali derivanti dalla SVZ [12]. Inoltre, l'**HGF** (*Hepatocyte Growth Factor*), prodotto da cellule Nestina-positive, provvede al mantenimento delle NSCs [40]. Il **PEDF** (*Pigment Epithelium-Derived Factor*), secreto dalle cellule endoteliali della nicchia neurogenica è stato identificato come un fattore critico per la comunicazione fra il sistema vascolare e le NSCs [42] (Figura 7). In particolare, esso inibisce l'espressione del gene pro-neurale Mash-1, mentre determina un incremento dei livelli di SOX-2 e degli effettori del *pathway* di Notch, HES-1 ed HES-5 [43]. Anche le cellule endoteliali rivestono un ruolo molto importante, poiché, secernendo il **BDNF** (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), riescono a “comunicare” con le NSCs, supportando la neurogenesi [44] (Figura 7). Il *self-renewal* delle NSCs è promosso anche dal **LIF**, dal **VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e dal **PDGF** (*Platelet-Derived Growth Factor*), appositamente secreti dalle cellule endoteliali (Figura 12). Il sistema vascolare della nicchia partecipa alla secrezione di altri fondamentali fattori, quali l'**SCF** (*Stem Cell Factor*), e l'**SDF-1** (*Stromal Cell-derived Factor-1*), anch'essi in grado di modulare il comportamento dei progenitori neurali della nicchia (Figura 7). I vasi sanguigni all'interno della SVZ esprimono sia la **laminina** che il **collagene IV**, due importantissimi componenti della matrice extracellulare, che possono sia influenzare l'adesione cellulare che modulare specifici *pathways*, in modo da conferire alla nicchia le sue specifiche proprietà [45] (Figura 7).

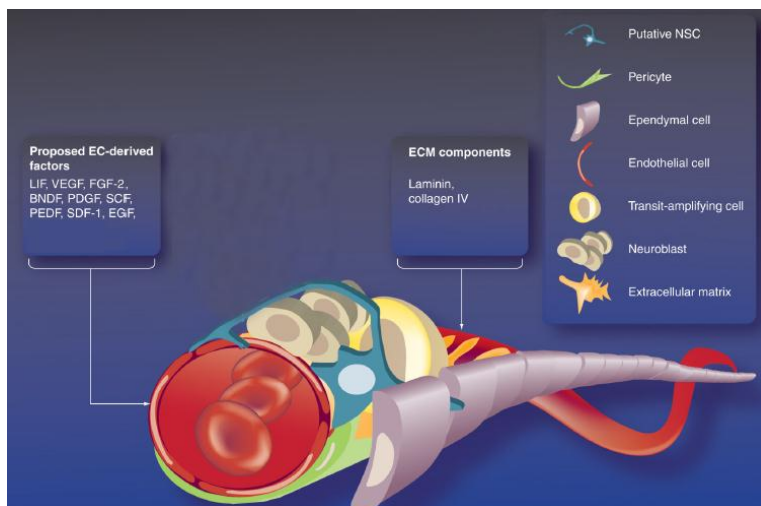


Figura 7. I regolatori della nicchia neurogenica nell'adulto. Diversi fattori solubili secreti da cellule endoteliali ed endoteliali, provvedono al mantenimento

del potenziale neurogenico della SVZ. Figura tratta e modificata da Goldberg and Hirschi, 2009 [45].

1.4.2 La regione subgranulare

Un'altra nicchia neurogenica nell'adulto è rappresentata dalla **SGZ**, situata nel giro dentato dell'ippocampo (Figura 8 A), costituita da un numero ridotto di NSCs, principalmente racchiuse nell'ilo. Le NSCs adulte site in questa regione sono in grado di proliferare, intraprendere uno specifico destino cellulare, maturare, migrare ed eventualmente integrarsi nel circuito neuronale pre-esistente. In particolare, una piccola componente di NSCs quiescenti (qNSCs), caratterizzate dall'espressione di Nestina, SOX-2 e GFAP, popola la SGZ (Figura 8 B). Sussiste comunque una popolazione di NSCs attive (aNSCs), in grado non solo di effettuare *self-renewal*, ma anche di originare astrociti, neuroblasti (NBs) e nuovi neuroni (*New Generated Neurons*, NGNs) [46] (Figura 8 B).

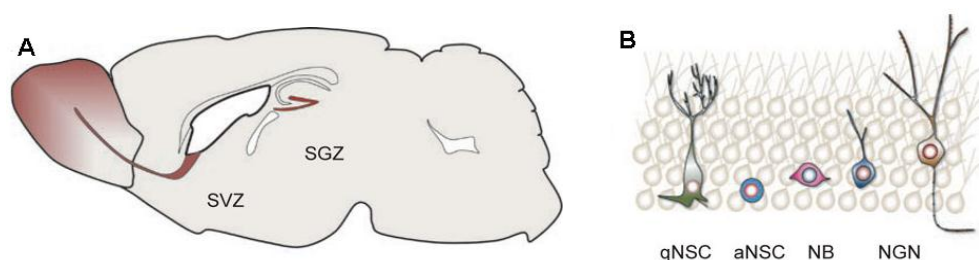


Figura 8. Illustrazione grafica delle principali sedi neurogeniche del cervello murino adulto. A) Sia la SVZ che la SGZ sono dotate di potenziale neurogenico nell'adulto. B) La SGZ è costituita da NSCs che, in seguito ad attivazione (aNSCs), generano NBs e NGNs. Figura tratta da Ma et al., 2009 [46] e modificata.

La neurogenesi nell'adulto, sia che avvenga nella SVZ o nella SGZ, è particolarmente suscettibile ai differenti stimoli ambientali o condizioni fisiologiche dell'intorno cellulare. Il differenziamento neurale è tuttavia piuttosto stereotipato, consentendo la generazione di interneuroni inibitori granulo-periglomerulari nei bulbi olfattivi o neuroni granulari eccitatori nel giro dentato [46]. La capacità neurogenica è pesantemente alterata durante l'invecchiamento cellulare; è noto, infatti, che la diminuzione dei fattori di crescita, l'abbassamento dei livelli della telomerasi, così come i cambiamenti dei modulatori del ciclo cellulare [47] possano influenzare negativamente la rigenerazione delle NSCs. In definitiva, le NSCs adulte non solo contribuiscono al mantenimento del tessuto neurale, ma garantiscono anche le principali prestazioni del cervello, quali l'apprendimento e la memoria [46]. Una sfida degli ultimi anni è appunto indagare gli effetti che la prematura perdita delle nicchie neurogeniche può comportare a livello della memoria, favorendo l'insorgenza delle patologie neurodegenerative.

1.5 Le NSCs *in vitro*

I grandissimi passi avanti realizzati nell'ambito della biologia cellulare hanno consentito di riprodurre *in vitro* lo specifico processo di restrizione neurale che si osserva *in vivo*, utilizzando come punto di partenza le ESCs [48]. Nella Figura 9 vengono riassunte le principali tipologie di NSCs ottenute mediante coltura

cellulare, indicando la loro derivazione e gli autori responsabili del loro isolamento. Nello specifico, per primi, Evans e Kaufman [49] furono in grado di stabilire una metodica colturale per la propagazione *in vitro* delle cellule embrionali staminali pluripotenti, direttamente derivate dalla blastocisti murina. A partire da queste, l'acquisizione di un'identità neurale primitiva può essere stimolata mediante definite condizioni colturali [50].

Opportunamente, le ESCs possono originare direttamente le NEPs che, benché caratterizzate dalla ritenzione di alcuni marcatori tipici delle cellule embrionali, mostrano un profilo atigenico già affine a quello delle NSCs. Le NEPs così ottenute sono fondamentalmente caratterizzate da una vita transiente, in quanto, si convertono rapidamente in una popolazione di cellule prive delle caratteristiche "vestigiali" delle ESCs, la cui crescita è fortemente dipendente dall'aggiunta esogena di FGF-2. Recentemente Chambers ed i suoi collaboratori [51] hanno ottenuto una popolazione di NEPs completamente neuralizzate partendo da ESCs umane, inibendo appositamente il *pathway* governato dai fattori TGF- β /SMAD.

Un nuovo tipo di NSCs, chiamate "rosette" (R-NSCs) a causa della peculiare direzione radiale con cui le cellule si dispongono durante la crescita, può essere derivato sia *in vitro* attraverso un opportuno protocollo colturale a partire dalle ESCs, che *in vivo* direttamente dalla piastra neurale [52]. Una popolazione di "rosette" propagabili per lungo tempo è stata ottenuta da ESCs umane (It-hESNSCs) [53] e ha rivelato un'estrema plasticità differenziativa, potendo originare sottopopolazioni diverse con caratteristiche sia ventrali-mesencefaliche che tipiche del midollo spinale.

Durante il differenziamento *in vitro*, le ESCs possono essere indirizzate alla generazione di una popolazione prevalentemente arricchita da cellule della RG [54] o eventualmente costituita da NSCs pure [55].

In definitiva, la possibilità di riprodurre *in vitro* i principali processi di differenziamento e di sviluppo che si osservano *in vivo* nel cervello, ha fornito degli strumenti preziosissimi alla ricerca scientifica, rivoluzionato le conoscenze in questo settore della biologia. Riuscire a manipolare sottotipi cellulari differenti, eventualmente dotati di proprietà funzionali diverse, ha consentito di portare alla luce scoperte dapprima impensabili. E' tuttavia essenziale ricordare che la propagazione *in vitro* rappresenta comunque un sistema isolato e spesso artificioso, in quanto privo dell'architettura tridimensionale del tessuto, così come dell'instaurarsi di interazioni fra cellule eterogenee fra loro e fra le cellule e la matrice extracellulare. Ecco perché è molto spesso fondamentale lavorare simultaneamente su specifici modelli *in vivo*, in modo da avere costantemente un riferimento parallelo alla realtà più complessa e multifattoriale rappresentata da un organismo.

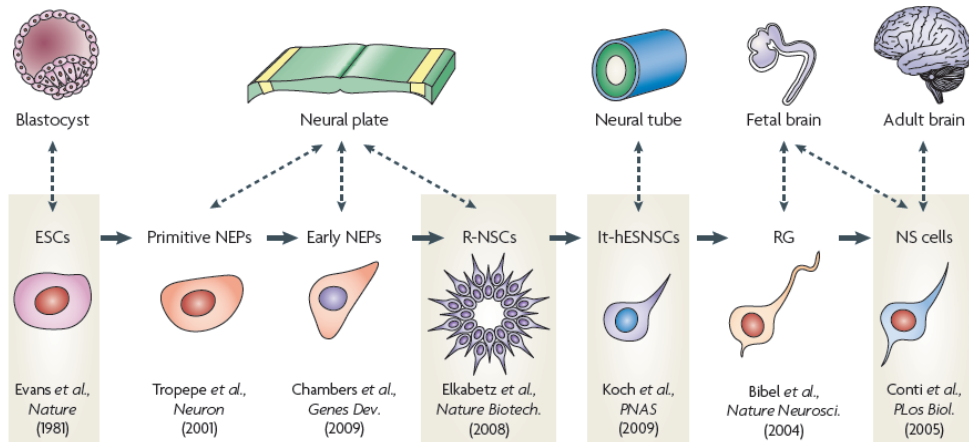


Figura 9. Rappresentazione di differenti tipologie di NSCs generabili in vitro e del loro legame con le diverse fasi di sviluppo neuronale in vivo. I rettangoli ombreggiati contrassegnano le popolazioni di NSCs che si possono ottenere attraverso espansione medio-lunga in vitro. In parallelo sono indicati i relativi stati di sviluppo corrispondenti alla condizione in vivo ed i principali autori che per primi hanno descritto la tipologia cellulare rappresentata. Figura tratta da Conti e Cattaneo, 2010 [19].

1.6 Il bilanciamento fra *self-renewal* e differenziamento

Le fondamentali ed antitetiche proprietà delle NSCs (*self-renewal* vs differenziamento) le pongono continuamente ad un bivio: impedire l'uscita dal ciclo cellulare ed il conseguente differenziamento o evitare una crescita incontrollata e la possibile formazione di tumori. E' indispensabile ricercare i punti critici in questo fine bilanciamento per poter comprendere la regolazione dei più importanti meccanismi cellulari, quali lo sviluppo, il differenziamento e la proliferazione. Nei mammiferi, le cellule neuroepiteliali e quelle della glia radiale hanno una comune morfologia epitelio-colonnare; la loro porzione apicale è esposta al fluido ventricolare, la parte basale comunica con l' ECM, mentre le regioni laterali sono a diretto contatto l'una con l'altra [56]. Gli specifici segnali provenienti da questo intorno possono dunque modulare propriamente il *self-renewal* ed il differenziamento, promuovendo o disattivando importantissimi *pathway*, fra i quali spiccano principalmente quelli governati da Wnt, Sonic hedgehog e Notch.

1.6.1 Il *pathway* di Wnt

Il *pathway* di Wnt è altamente conservato in tutto il regno animale ed è essenziale nei processi di embriogenesi, carcinogenesi, differenziamento, definizione della polarità cellulare, migrazione, apoptosi ma anche per la regolazione dei normali processi fisiologici che garantiscono la funzionalità della cellula nell'adulto. In particolare, nell'ambito delle NSCs, questo *signaling* promuove e garantisce l'identità delle cellule della glia radiale e di quelle neuroepiteliali. Infatti, la deplezione di una delle principali componenti di tale *pathway*, la **beta-catenina**, determina un differenziamento neuronale precoce, mentre l'espressione della sua forma attivata incrementa significativamente la popolazione di precursori neurali

[57]. Artefice della regolazione dell'intero *pathway* è appunto la proteina multifunzionale beta-catenina, responsabile non solo della stabilizzazione del citoscheletro e delle giunzioni intercellulari, ma anche dell'attivazione di questa importante cascata del segnale (Figura 10). Le proteine codificate dai geni Wnt sono lipoproteine palmitoilate che fungono da ligandi per il recettore Fz (*Frizzled*), attivando così una serie di fenomeni a valle. In assenza di tale interazione, la forma citoplasmatica della beta-catenina viene fosforilata grazie all'azione specifica del macro-complesso Axina/APC/GSK3 β /CK1a, per poi essere riconosciuta dall'ubiquitin ligasi β -TrcP ed essere sottoposta a degradazione ubiquitina-dipendente. Quando il *pathway* di Wnt è invece attivo, il recettore Fz, a sua volta recluta l'effettore citoplasmatico Dvl (*Dishevelled*). In seguito a fosforilazione, Lrp lega l'Axina, impedendo dunque la fosforilazione e la conseguente degradazione della beta-catenina (Figura 10), la quale si addensa attorno al nucleo, per essere poi traslocata al suo interno e stimolare la trascrizione dei suoi geni target [58]. Il *pathway* di Wnt promuove il *self-renewal* anche a livello post-natale [59], mediante la diretta attivazione della ciclina D e dei fattori SOX-2 e Rest (*Repressor Element 1-Silencing Transcription factor*) [60-62], favorendo dunque il *self-renewal* dei precursori neurali. Tuttavia, durante lo sviluppo corticale, Wnt è essenziale per indurre il differenziamento neuronale, stimolando l'espressione del gene pro-neuronale Neurogenina 1 (Ngn1) [63]. Esiste quindi una duplice e contrapposta funzione del *pathway* di Wnt: durante le fasi iniziali dello sviluppo promuove il *self-renewal* e la proliferazione, mentre successivamente stimola il differenziamento neuronale. Risulta dunque fondamentale identificare quei fattori esogeni od endogeni alla cellula che siano in grado di stabilire l'intorno idoneo, affinché Wnt espleti l'una o l'altra funzione.

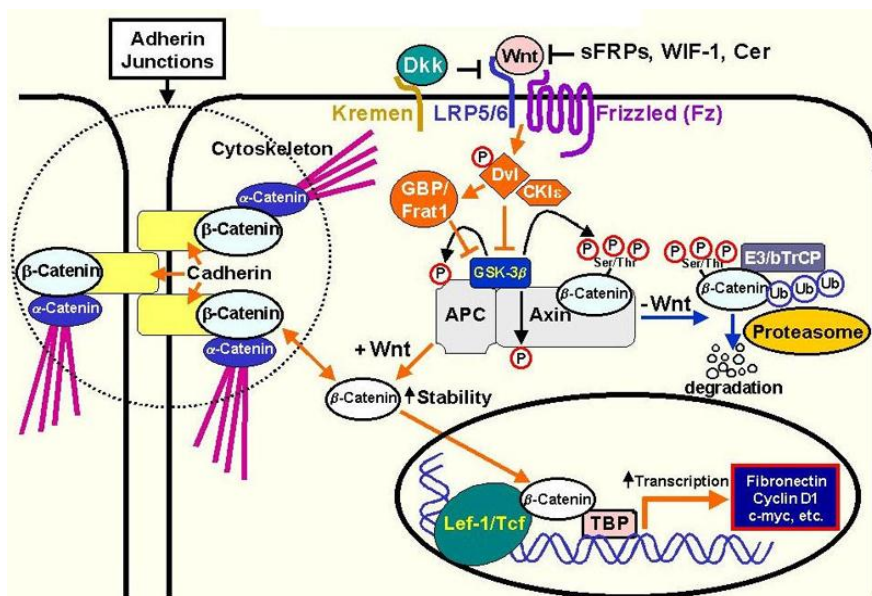


Figura 10. Il pathway canonico di Wnt. Il pathway di Wnt riguarda il complesso di segnali cellulari che derivano dal legame delle proteine Wnt con i recettori di

membrana appartenenti alla famiglia *Frizzled*, con conseguente variazione dei livelli di *beta-catenina* nel nucleo. Figura tratta da Hoover and Muschler, 2005 [58].

1.6.2 Il pathway di *Sonic hedgehog*

Il *signaling* di ***Sonic hedgehog*** (Shh), altamente conservato da *Drosophila* all'uomo, riveste una notevole importanza nella regolazione della proliferazione cellulare, del differenziamento e particolarmente del *self-renewal* delle NSCs. Durante lo sviluppo, negli insetti Shh è fondamentale per il controllo della segmentazione e per la morfogenesi delle ali, mentre nei vertebrati determina l'asimmetria destra/sinistra e consente la corretta formazione dello scheletro, degli arti, della muscolatura, della pelle, degli occhi, dei polmoni, dei denti, del sistema nervoso e dell'intestino. Nell'organismo adulto, invece, tale *pathway* garantisce la sopravvivenza del limitato *pull* di cellule staminali, eventualmente intervenendo nella rigenerazione e nel riparo tissutale [64]. Il ligando Shh è altamente espresso nel neuroepitelio durante lo sviluppo embrionale, ma anche nelle principali regioni neurogeniche dell'adulto [65-66]. Tuttavia, al fine di poter proficuamente attivare lo specifico segnale, è necessario che Shh subisca specifiche modificazioni post-traduzionali. Dapprima, la sequenza segnale N-terminale del precursore di 45 kDa viene rimossa e successivamente, attraverso un taglio autocatalitico fra due residui di cisteina altamente conservati, il dominio N-terminale responsabile del *signaling* viene liberato. La proteina di 19 kDa effettivamente funzionale è ottenuta in seguito all'aggiunta di una coda di colesterolo all'estremità C-terminale e alla palmitoilazione all'estremità opposta. Shh, così maturata, viene secreta dalla proteina *Dispatched* (Disp) ed è libera di interagire con le proteine transmembrana *Patched* (Ptch). Le diverse componenti del *pathway* di Shh sono molto abbondanti nelle ciglia cellulari, ossia in quelle proiezioni della membrana cellulare presenti negli eucarioti in genere in singola copia, coinvolte nella captazione di segnali chimico-fisici e nella comunicazione. *Smoothed* (Smo), un altro elemento chiave nella propagazione del *signaling* di Shh, è presente nella cellula in tre diversi stati: SmoA (una forma inattiva internalizzata), SmoB (una variante in equilibrio con una forma inattiva legata alle ciglia cellulari) e SmoC (la vera e propria forma attiva derivante da SmoB). Alla base del ciglio primario della cellula, Ptch inibisce la conversione di SmoB in SmoC. L'indisponibilità della forma attiva di Smo determina il processamento proteolitico dei fattori trascrizionali della famiglia Gli. Differentemente, in seguito all'interazione con Shh, Ptch trasloca esternamente dal ciglio primario e subisce una degradazione lisosomale. A questo punto, Smo si converte nella forma attivata SmoC e, inibendo la PKA, CK1, e GSK3B, previene la degradazione di Gli. In seguito, la forma attiva di tale fattore trascrizionale trasloca nel nucleo promuovendo la trascrizione dei principali *Shh-responsive genes* [64] (Figura 11).

Diverse evidenze scientifiche suggeriscono che questo intricato *signaling* possa promuovere la proliferazione ed inibire il differenziamento postnatale nel cervelletto [67] ed inoltre è stata dimostrata la sua azione nello stimolare la transizione dallo stato di "cellula staminale" in senso stretto al "progenitore" vero e proprio, caratterizzato da una più rapida e intensa proliferazione [68].

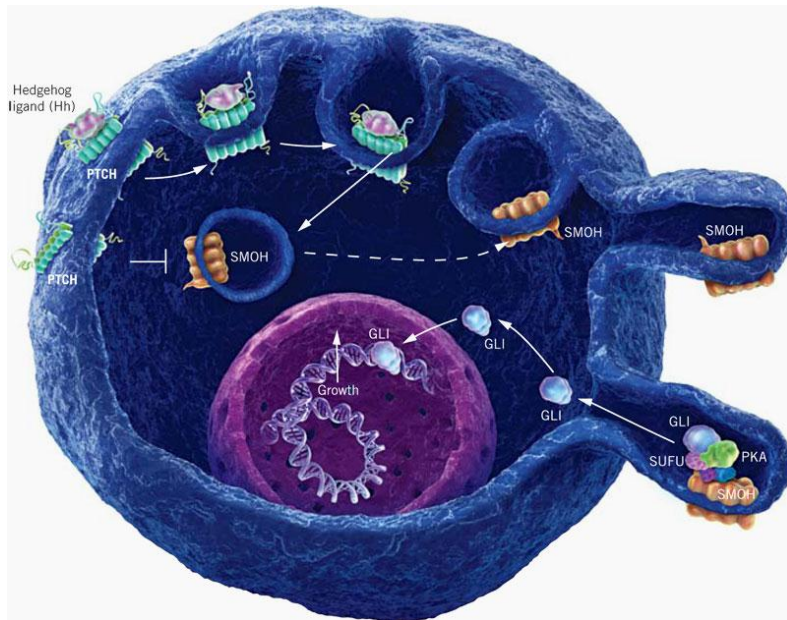


Figura 11. Il pathway di Shh. Il ligando Shh, attraverso l'interazione con Ptch, ne determina la degradazione lisosomale. Smo si converte in uno stato attivo (SmoC) e, inibendo la PKA, CK1, e GSK3B, consente al fattore trascrizionale Gli di essere appositamente processato, di essere traslocato nel nucleo e di attivare la trascrizione di specifici geni. Figura tratta dalla pagina web <http://www.bnet.com/blog/drug-business/roche-developing-a-8220hedgehog-inhibitor-8221-for-cancer/3249>.

1.6.3 Il pathway di Notch

Un altro importantissimo *pathway* nell'ambito delle NSCs è quello di **Notch**, fondamentale per la definizione del *fate* della cellula ed altamente conservato in tutti gli organismi multicellulari. Da esperimenti di "loss of function" è chiaramente emerso il fenotipo "neurogenico" determinato da tale gene, in quanto in grado di modificare il destino di cellule destinate a dar luogo all'epidermide, inducendole a creare tessuti neurali [69].

I recettori Notch sono proteine transmembrana costituite da una porzione extracellulare (*Notch Extracellular Domain*, NECD) contenente fino a 36 *EGF-like repeats* essenziali per il *binding* agli specifici ligandi, un dominio transmembrana (*transmembrane*, TM) ed una regione intracellulare (*Notch Intracellular Domain*, NICD). Nei mammiferi sono stati identificati 4 diversi recettori Notch (Notch 1-4) e 5 differenti ligandi (DLL1, DLL3, DLL4, JAG1, JAG2). Il corretto processamento nel reticolo endoplasmico e nel Golgi determina la formazione di un eterodimero costituito dalla porzione NECD legata in modo non covalente alle regioni TM-NICD. Notch è espresso sulla cosiddetta cellula "ricevente il segnale", mentre la cellula che lo trasmette, esprime appunto i suoi specifici ligandi. In seguito all'interazione ligando-recettore, il dominio NECD viene rimosso mediante l'azione enzimatica di TACE (*ADAM metalloprotease TNF- α converting enzyme*) ed il complesso NECD-ligando viene endocitato e riciclato/degradato dalla cellula che ha inviato il segnale. Il processamento di Notch continua ulteriormente, culminando in seguito ad un

secondo taglio proteolitico effettuato dal complesso enzimatico della γ -secretasi, nel rilascio della regione NICD e nella sua traslocazione nel nucleo. Qui, la forma attivata di NOTCH non può legarsi direttamente al DNA, ma eterodimerizza con la proteina RBP-J (*Recombinant Signal Sequence-Binding Protein Jk*), anche detta CSL, promuovendo l'attivazione dei suoi principali *target*, quali Myc, p21, la famiglia dei fattori trascrizionali HES (*Hairy and Enhancer of Split*) e HEY (*Hes-related with YRPW motif*) (Figura 12). Questi ultimi hanno un ruolo essenziale nel reprimere l'espressione dei fattori trascrizionali bHLH pro-neuronali Mash1, Neurogenina-1 e Neurogenina-2, mantenendo dunque intatto lo stato di staminalità della cellula. Nel momento in cui nel nucleo non sia presente la forma attivata di Notch, RBP-J si associa ad un complesso corepressore, inibendo la trascrizione dei geni *target* di Notch [70].

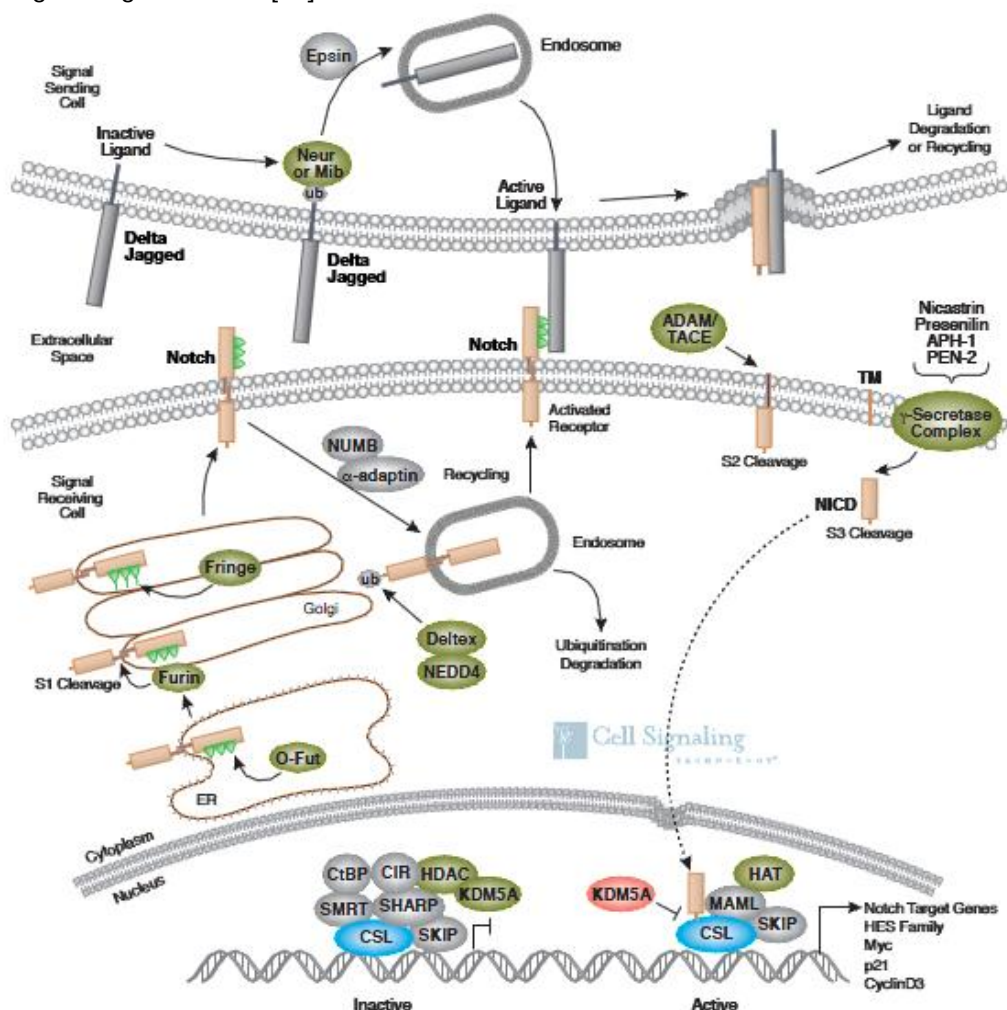


Figura 12. Il pathway di Notch. La corretta maturazione del recettore Notch prevede una serie di processi proteolitici all'interno della cellula che culminano nel rilascio di una forma attiva nel nucleo, in grado di regolare specificamente

l'espressione di determinati geni target. Figura tratta dalla pagina web <http://www.cellsignal.com/pathways/wnt-hedgehog.jsp>.

La cascata del segnale generata dall'interazione fra Notch ed i suoi ligandi è responsabile delle più importanti funzioni biologiche, quali l'apoptosi, la proliferazione, il differenziamento, lo sviluppo embrionale, l'organogenesi e l'omeostasi dei tessuti adulti dotati della proprietà di *self-renewal* [70]. I principali protagonisti del *pathway* di Notch sono espressi già a livello embrionale, così come nelle cellule della glia radiale e nelle NSCs adulte. Durante lo sviluppo del sistema nervoso, Notch preserva l'identità staminale, prevenendo la prematura neurogenesi. Le alterazioni funzionali dei ligandi di Notch, del recettore e dei suoi effettori finali sono connesse all'impoverimento del *pull* dei progenitori neurali che culmina con un differenziamento neuronale precoce [71-73]. Nell'adulto, invece, l'effetto è più drastico e comporta la completa deplezione dei progenitori stessi [74]. La connessione del *pathway* di Notch con il processo di *self-renewal* è evidente valutando l'incapacità delle NSCs derivanti da modelli murini mutanti per i geni Notch-1, HES-1, HES-5 o del ligando DLL-1 di formare neurosfere *in vitro* [75-76]. Le potenzialità di un singolo precursore neurale di generare una struttura sferoidale fluttuante, definita appunto neurosfera che, a sua volta, ridotta a sospensione di singole cellule si mostra capace di ricostituire nuove neurosfere, rappresenta l'inequivocabile capacità di *self-renewal* delle NSCs [77] (Figura 13).

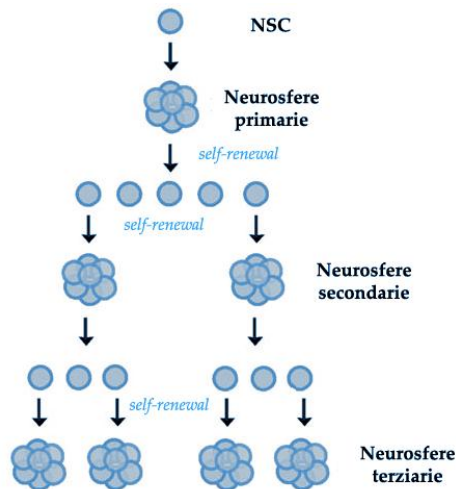


Figura 13. Self-renewal nelle neurosfere. Una NSC è in grado di replicarsi dando origine ad una struttura sferoidale detta neurosfera. In essa risiedono altre NSCs che, una volta disgregate dal complesso, possono ricostituire nuovamente le neurosfere. Tale processo potrebbe perpetuarsi verosimilmente all'infinito, data la proprietà di *self-renewal* delle NSCs. Figura tratta da Jensen and Parmar 2006 e modificata [77].

Bilanciare secondo una ben precisa logica spazio-temporale il potenziale di auto-rinnovamento e quello differenziativo di una NSC, rappresenta un punto cruciale per lo sviluppo dell'intero sistema nervoso centrale. Infatti, nelle prime fasi della

neurogenesi, le cellule neuroepiteliali si dividono dapprima simmetricamente al fine di espandere il *pull* di staminali, mentre successivamente intraprendono la strada della divisione asimmetrica, generando cellule della glia radiale che poi provvederanno ad originare una progenie differenziata [78]. Il passaggio da una modalità replicativa all'altra deve essere finemente regolato al fine di prevenire da un canto l'eccessiva proliferazione, dall'altro il prematuro differenziamento e quindi una massa cerebrale ridotta [79]. E' fondamentale che il *pull* di cellule progenitrici non venga completamente esaurito, in modo da consentire di generare nuovi neuroni o di riparare tessuti danneggiati nel periodo postnatale. La divisione asimmetrica sembra essere regolata da due meccanismi principali, uno che vede agire principalmente fattori intrinseci, l'altro che prevede l'azione di fattori estrinseci. Infatti, durante la divisione, i regolatori della polarità cellulare, oppure i fattori responsabili dell'indirizzamento del *cell fate* potrebbero distribuirsi in modo asimmetrico nelle due cellule figlie, stimolando il differenziamento di una cellula ed il mantenimento dell'altra in uno stato staminale. Oppure, durante la citodieresi, solo una cellula figlia viene mantenuta nella "nicchia" delle SCs, ossia in quel microhabitat ben definito che ne preserva la staminalità, mentre l'altra cellula, esposta a condizioni biochimiche differenti, differenzia [79]. Un modello di studio ampiamente utilizzato per approfondire la regolazione della divisione cellulare simmetrica e quella asimmetrica è lo sviluppo del lobo ottico in *Drosophila*. Inizialmente, questo è formato da cellule neuroepiteliali che si dividono simmetricamente, ma successivamente originano i neuroblasti, i quali si dividono ad un ritmo molto più elevato in modo asimmetrico, producendo i neuroni che popoleranno il lobo ottico. La comparazione del loro trascrittoma ha messo in luce che diversi geni facenti parte del *pathway* di Notch sono altamente espressi nelle cellule neuroepiteliali, suggerendo il coinvolgimento di tale *signaling* nel mantenere attivo il processo di divisione simmetrica delle NSCs, prevenendone il differenziamento [80].

Un filo conduttore estremamente interessante fra questi *pathways* è rappresentato dalla presenza di specifici meccanismi che a momento debito possono stimolare la degradazione di fattori chiave del *signaling*, limitandone dunque la biodisponibilità. Particolarmente, la degradazione ubiquitina-proteasoma dipendente è fondamentale nel regolare l'abbondanza di proteine che rivestono uno specifico ruolo nella staminalità. Infatti, come precedentemente descritto, l'espressione non solo della beta-catenina [58] e di svariate componenti del *signaling* di Notch/Delta/Numb [81-83], ma anche del marcatore staminale Nestina [84], del repressore dell'espressione dei geni neuronali REST [85-88] e della proteina N-Myc essenziale per il differenziamento dei progenitori neurali [89], vengono appunto accuratamente controllate dall'azione concertata di ubiquitin-ligasi e proteasoma. Condurre studi in merito ai fattori che governano l'attivazione o la disattivazione di tali *pathways* potrebbe fornire moltissime informazioni in merito all'intricato mondo delle cellule staminali.

1.7 Il controllo epigenetico

La regolazione epigenetica è di fondamentale importanza nell'indirizzare una cellula staminale verso un determinato destino. Si definiscono epigenetici quei meccanismi cellulari che producono effetti persistenti nel sistema biologico, senza comunque alterare la sequenza genomica. L'epigenetica consente dunque la

modulazione dell'espressione del DNA o di strutture ad esso associate mediante particolari processi, quali ad esempio la metilazione del DNA e l'associata azione delle *Methyl Binding Proteins* (MBDs), la modificazione degli istoni con le proteine appartenenti al *Polycomb Group* (PcG) e al *Trithorax Group* (TrxG), il rimodellamento cromatinico o i meccanismi di attivazione trascrizionale a “*feedback*”. Nello specifico, dei segnali extra- o intra- cellulari possono andare a stimolare specifici “propagatori” di segnale interni alla cellula, i quali, dopo aver attivato determinati *pathways*, producono effetti durevoli nel tempo, pur non avendo alterato in alcun modo la sequenza genomica [90] (Figura 14).

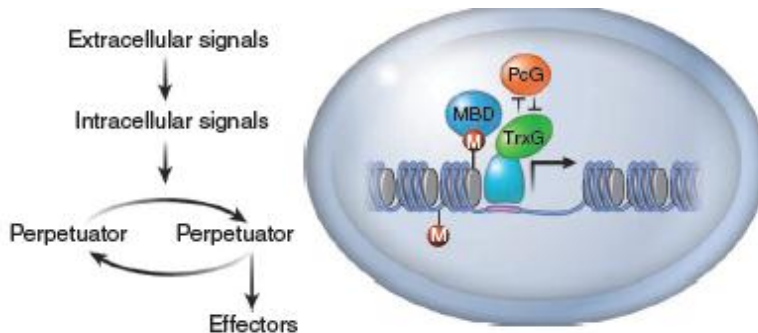


Figura 14. Modello esemplificato dei principali meccanismi epigenetici. Il controllo epigenetico avviene grazie all'instaurarsi di specifici segnali extra- ed intra-cellulari che danno avvio ad un'azione prolungata nel tempo, anche in mancanza dello stimolo originario stesso. I meccanismi con cui ciò principalmente si esplica prevedono l'azione delle Methyl Binding Proteins (MBDs), del Polycomb Group (PcG), del Trithorax Group (TrxG) e la metilazione dell'istone H3K27. Figura tratta da Ma et al., 2010 [90].

Le cellule embrionali pluripotenti possono garantire il loro stato altamente indifferenziato mantenendo bassa o addirittura inibendo totalmente l'espressione di geni essenziali nello sviluppo, evidenziando che il sistema cellulare dispone dunque di differenti strumenti per raggiungere tale obiettivo. E' interessante sottolineare che le ESCs mostrano un elevato tasso di metilazione a livello delle CpG site nei *Low CpG density promoters* (LCPs), generalmente associati a geni dall'espressione tessuto-specifica. Diversamente, più del 95% dei *High CpG density promoters* (HCPs), connessi a geni *housekeeping* o a geni dello sviluppo sottoposti ad un'elevata regolazione, contengono isole CpG non metilate. La regolazione dell'espressione di tali geni avviene grazie alla metilazione/demetilazione di elementi regolatori distali, *enhancers* o *silencers*, durante il dinamico processo differenziativo delle ESCs nel *lineage* neurale [91]. Un altro importantissimo meccanismo epigenetico è la modificazione di particolari residui amminoacidici nella porzione N-terminale degli istoni, i quali, infatti, possono essere acetilati, fosforilati, metilati, ubiquitinati, SUMOilati o sottoposti ad isomerizzazione (Figura 15) perseguendo differenti obiettivi biologici [92].

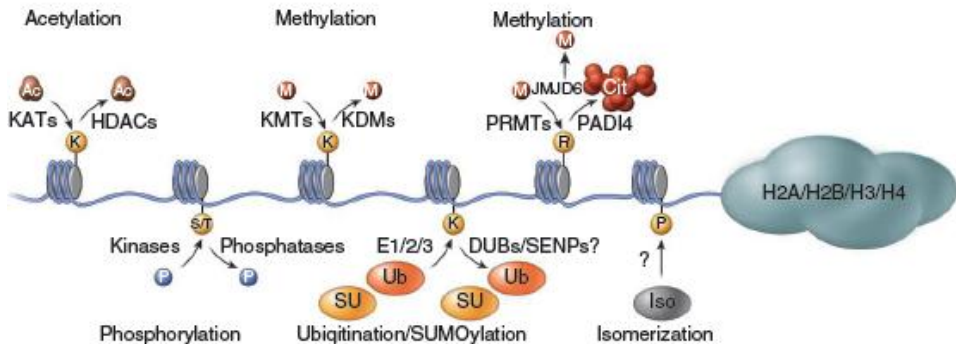


Figura 15. La modificazione epigenetica degli istoni. Gli istoni possono essere reversibilmente modificati nella porzione N-terminale in seguito ad acetilazione (ac), fosforilazione (p), metilazione (me), ubiquitinazione (ub), SUMOilazione (su) ed isomerizzazione (iso). Figura tratta da Ma et al., 2010 [90].

In particolare, nelle ESCs le proteine PcG rivestono un ruolo essenziale nella repressione di geni differenziativi, come testimonia il fatto che i nucleosomi in corrispondenza dei principali geni dello sviluppo sono trimetilati a livello della lisina 27 dell'istone 3 (H3K27) proprio per merito di Bmi-1, membro del *Polycomb Repressor Complex* (PRCs) [93-94]. Antagonisti del PcG sono le proteine del TrxG, in grado di attivare gli stessi loci silenziati dal *polycomb group*, mediante la catalisi della metilazione sulla lisina 4 dell'istone 3 (H3K4). Bmi1 è in grado di preservare il *self-renewal* delle NSCs nella SVZ, appunto regolando la metilazione del target H3K27 [90]. Durante il *commitment* neurale, le ESCs perdono la loro principale caratteristica, rendendo inaccessibili quei fattori trascrizionali che governano la pluripotenza, ma attivano specifici loci genici che promuovono il differenziamento. Nella prima fase di transizione, l'espressione della demetilasi specifica per l'H3K27 (KDM6B) viene indotta, determinando la rimozione dei gruppi trimetilici dai promotori dei geni neurali, come quelli della Nestina (filamento intermedio, marcatore delle NSCs) e di PAX-6 (fattore trascrizionale neurale). Alcuni geni che rivestono un'importante funzione nei neuroni terminalmente differenziati, vengono trimetilati sull'H3K27 e dimetilati sull'H3K4 durante la neuralizzazione delle ESCs, per essere poi demetilati sull'H3K27 durante la maturazione neuronale finale [91].

Oltre alla metilazione e alla modificazione istonica, esistono dei *loop a feedback* "auto-sostentante" mediati da specifici fattori trascrizionali che operano un ruolo chiave nel mantenimento delle cellule staminali adulte. Ad esempio, il fattore trascrizionale SOX-2, altamente espresso sia nella SGZ che nella SVZ, è in grado di interagire con numerosi target a livello genomico, fra i quali il suo stesso promotore, in modo da costituire un *loop a feedback*, tale da consentire la sua autoregolazione. Inoltre, SOX-2 promuove l'incremento dei livelli dell'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), il quale, a sua volta, determina l'incremento dell'espressione di SOX-2 nelle cellule neurali [95].

Riassumendo, la neurogenesi durante lo sviluppo embrionale, ma anche nell'organismo adulto, viene finemente regolata da sofisticati meccanismi

epigenetici che assicurano la corretta transizione da uno stato differenziativo all'altro, coordinando il tutto con gli altri programmi cellulari.

1.8 I miRNA e le NSCs

Il *self-renewal* delle NSCs, la definizione del loro destino cellulare, la maturazione, la migrazione, l'integrazione delle cellule differenziate nel circuito preesistente sono alcuni dei processi cellulari regolati non solo dai segnali provenienti dalla "nicchia", dai regolatori trascrizionali o dai fini processi epigenetici, ma anche dai microRNA (miRNA, Figura 16). Si tratta di una specifica categoria di *small RNA*, piccole sequenze di RNA (circa 20-22 nucleotidi), che fungono da regolatori negativi post-trascrizionali dell'espressione genica, i quali, appaiandosi mediante complementarità imperfetta a specifiche sequenze nucleotidiche nella regione 3'UTR degli mRNA target, ne stimolano la degradazione o piuttosto ne inibiscono la traduzione [96]. Ad oggi, nel genoma umano sono state identificate ben 885 sequenze codificanti per diversi microRNAs, mentre nel genoma murino ne sono state caratterizzate 689 (miRBASE Release 13.0, Marzo 2009). L'aspetto straordinario che bisogna considerare in merito ai miRNA è la capacità che uno solo di essi può avere di controllare ben 200-800 diversi geni target e si stima che ben il 60% delle proteine umane risenta di tale regolazione [97].

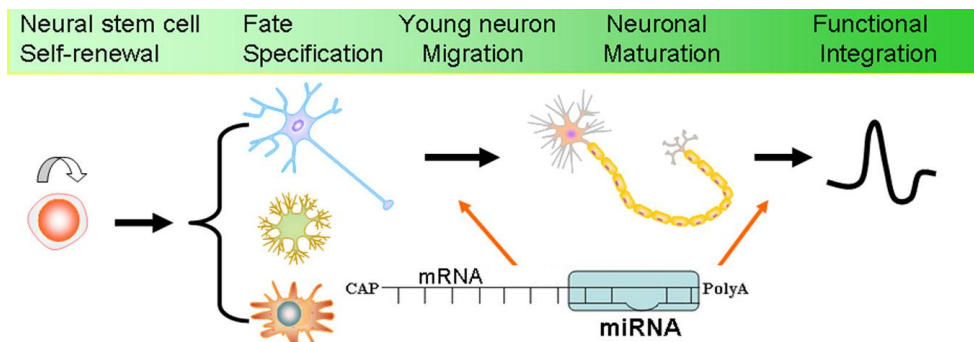


Figura 16. La regolazione della neurogenesi da parte dei microRNA. I miRNA sono responsabili della regolazione delle principali tappe della neurogenesi: *self-renewal*, differenziamento, definizione del destino cellulare, migrazione, maturazione ed integrazione dei nuovi neuroni nel circuito cellulare preesistente. Figura tratta da Shi et al., 2010 e modificata [98].

1.8.1 Il miR-9

La ricerca circa l'influenza dei miRNA sulla staminalità è ancora agli albori, tuttavia quotidianamente moltissimi studi concordano nell'attribuire a questi piccoli regolatori un ruolo davvero essenziale. Ad esempio, TLX è un recettore nucleare orfano, estremamente importante per consentire il funzionamento del cervello nei vertebrati: esso regola il *self-renewal* delle NSCs, modulando il funzionamento di alcuni geni coinvolti nella proliferazione. Il **miR-9**, espresso nelle regioni neurogeniche dell'embrione e dell'adulto, è connesso a TLX da un sofisticato *feedback* negativo. TLX è altamente espresso nelle NSCs, mentre i suoi livelli si riducono durante il differenziamento; al contrario, l'espressione del miR-9 è indotta proprio durante la maturazione delle NSCs per poter regolare negativamente TLX.

I miRNAs la cui espressione s'intensifica durante il differenziamento assicurano una corretta transizione verso il fenotipo maturo, abrogando l'espressione di quei fattori importanti per il mantenimento della staminalità [98]. Tuttavia, TLX funge da repressore trascrizionale del gene codificante per mir-9, creando dunque un *feedback* negativo che agevola una rapida transizione dallo stato "staminale" a quello "differenziato" [99]. Oltre al legame con TLX, miR-9 agirebbe come regolatore chiave del differenziamento neurale, governando l'espressione di altre proteine importantissime nell'ambito delle NSCs, quali REST (un repressore trascrizionale che inibisce l'espressione dei geni neuronali), FoxG1 (fattore trascrizionale coinvolto nello sviluppo cerebrale), diverse componenti del signaling dell'FGF ed i fattori trascrizionali HER-5 e HER-9 (*Hairy-Enhancer of split-Related gene*) [98].

1.8.2 Il miR let-7b

Anche il miRNA **let-7b** è particolarmente importante nella biologia delle NSCs, in quanto una sua elevata espressione ne inibisce la proliferazione, stimolandone il differenziamento. I suoi principali target sono ancora una volta TLX, ma anche il suo effettore Ciclina D1. Inoltre, let-7b è responsabile delle ridotte capacità proliferative delle NSCs durante l'invecchiamento cerebrale, regolando negativamente l'espressione di Hmga2, una proteina associata alla cromatina, importante nella regolazione del *self-renewal* delle cellule staminali [100-101].

1.8.3 Il miR-124

Il più abbondante dei microRNA del cervello è il **miR-124**, un fattore necessario e sufficiente a promuovere il differenziamento neuronale nella SVZ, in modo da garantire una transizione temporalmente corretta durante la neurogenesi, mediante regolazione negativa di SOX-9 [102]. Il miR-124 è praticamente assente nei progenitori neurali e comincia ad intensificarsi nei neuroni in fase differenziativa o terminalmente maturi. E' interessante notare che tale miRNA promuova il differenziamento e che una proteina "pro-staminalità" quale REST ne determini il silenziamento, al fine di preservare l'identità delle NSCs quando questo sia necessario.

1.8.4 Il miR-183

Il **miR-183** appartiene al cluster miR-183/96/182 ed è stato inizialmente identificato nei tessuti ed organi con proprietà sensoriali, nei fotorecettori e negli interneuroni [103-104]. E' stato descritto come un microRNA estremamente importante nei processi differenziativi [105], in grado di sopprimere l'espressione di fattori attivi sia nelle cellule staminali tumorali che in quelle embrionali [106]. Fra i principali target del miR-183 spiccano la $\beta 1$ -Integrina [107] e Bmi-1 [106], proteine il cui ruolo nel mantenimento della staminalità è estremamente importante. Nello specifico, la $\beta 1$ -Integrina permette alle NSCs di ricevere ed elaborare i segnali ricevuti dalla "nicchia", per poi consentire ai progenitori di intraprendere il corretto destino, ossia di favorirne il mantenimento della staminalità o promuoverne il differenziamento e la successiva migrazione. Bmi-1, come già precedentemente accennato, preserva le proprietà staminali reprimendo gli inibitori della chinasi ciclina-dipendente p16^{Ink4a} e p19^{Arf} [108].

Oggi sempre più ricerche concordano nell'attribuire al miR-183 una funzione di biomarcatore, o comunque di biomolecola la cui espressione è strettamente correlata all'insorgenza di tumori di vario genere. Infatti, l'elevata espressione del miR-183 nei carcinomi midollari della tiroide è stata associata alla presenza di

linfonodi laterali metastatici, a metastasi distali e ad un elevato tasso di mortalità [109]. L'innalzamento dei livelli del miR-183 è connesso al tumore alla vescica [120], al carcinoma duttale in situ [111], al medulloblastoma [112], al carcinoma uroteliale [113] al carcinoma epatocellulare [114]. Il miR-183 è risultato molto importante nel controllare la migrazione cellulare in alcuni tipi di tumore, quali quello mammario [115], il sarcoma sinoviale, il rhabdomyosarcoma, il tumore del colon in cui è altamente espresso e si pensa che abbia un potenziale oncogenico, poiché in grado di regolare due importanti onco-soppressori quali EGR-1 e PTEN [116].

Sembra che l'espressione del miR-183 sia indotta dall'onco-soppressore p53 [117], e sia in grado di inibire l'espressione di *stem cell factors*, quali SOX-2 e Klf-4 [118] e di altri importanti proteine quali ZEB-1 e Snai-1, cruciali per l'attivazione della transizione epitelio-mesenchimale e per i processi metastatici [119] (Figura 17).

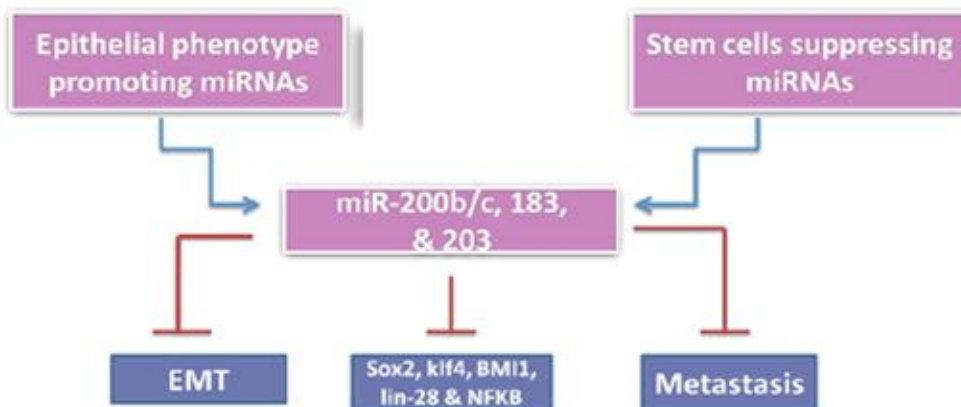


Figura 17. Azione del miR-183. Il miR-183, così come il miR-200b/c e miR-203, inibisce la transizione epitelio-mesenchimale, l'espressione di importanti fattori staminali ed i processi metastatici. Tratto da Boominathan 2010 e modificato [119].

Approfondendo il ruolo di tali *smallRNA* nella fine regolazione delle funzioni delle NSCs si potrebbe comprendere molto di più circa il loro potenziale applicativo, utilizzandoli come bersagli di terapie farmacologiche o come veri e propri strumenti terapeutici.

2. SEL-1L

Il gene umano SEL-1L (Suppressor/Enhancer Lin12-like) codifica per una glicoproteina residente nel reticolo endoplasmico (RE), denominata SEL-1L A, e, mediante meccanismi di *splicing* alternativo, genera le isoforme alternative SEL-1L B e SEL-1L C. Tali varianti proteiche, prive della porzione transmembrana C-terminale, si localizzano principalmente lungo la via secretoria e nelle giunzioni cellula-cellula [120]. Recentemente sono state identificate altre due varianti proteiche, denominate p38 e p28, le quali, comprensive del solo dominio N-terminale, vengono appunto secrete [121].

Nei paragrafi successivi si approfondirà esclusivamente il ruolo dell'isoforma principale SEL-1L A che, per comodità, verrà nominata unicamente "SEL-1L".

2.1 SEL-1L e il pathway ERAD

La proteina SEL-1L è coinvolta nei processi di retrotraslocazione dei peptidi non correttamente conformati dal lume del RE fino al citoplasma, laddove vengono degradati mediante un meccanismo ubiquitina/proteasoma dipendente. SEL-1L è, infatti, un membro dell'*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation* (ERAD) *pathway* e, agendo in sinergia con il suo partner molecolare HRD-1, promuove lo smaltimento di diversi substrati ERAD [122-124]. In particolare, le glicoproteine in fase di sintesi interagiscono con lo chaperone CNX (Calnexina) per poter essere assistite nell'acquisizione del corretto *folding* ed essere trasferite nel Golgi. Qualora non riescano ad assumere la giusta conformazione, rientrano nel ciclo della CNX, ma se questo dovesse nuovamente fallire, l' α -mannosidasi I provvede a de-mannosilare la proteina, successivamente riconosciuta da EDEM. A questo punto OS-9 espone i peptidi non correttamente conformati agli chaperoni GRP94 e BiP e successivamente, legandosi a XTP3-B, si avvale di SEL-1L come adattatore, in modo da trasferire il "carico" all'E3 ligasi HRD-1 [123] (Figura 18).

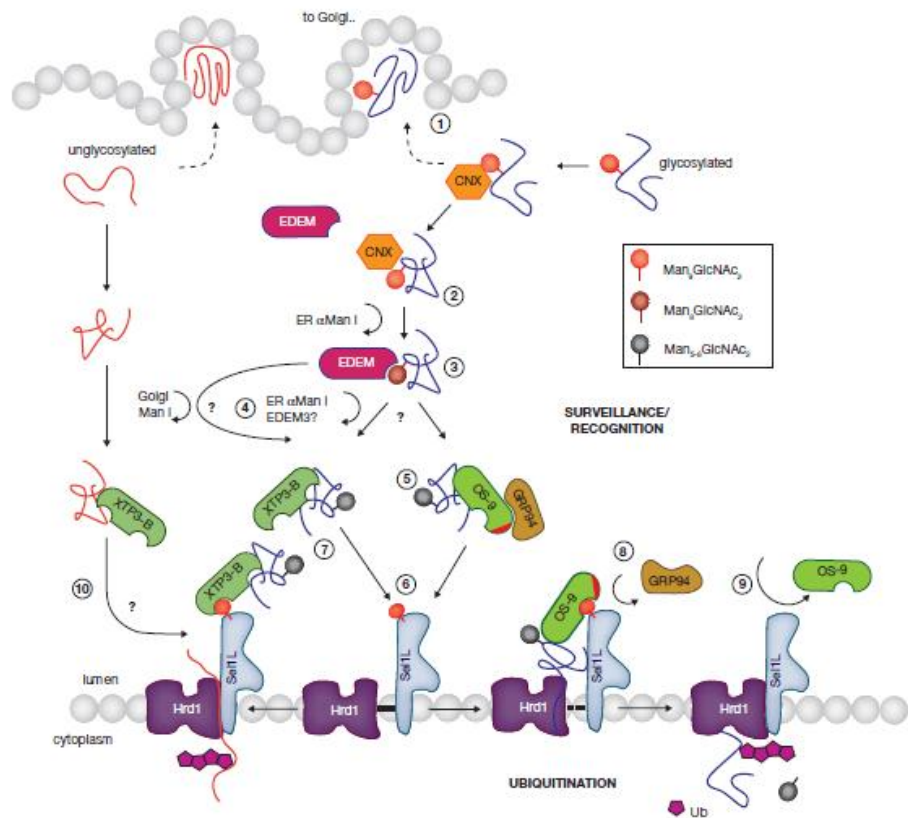


Figura 18. Modello del pathway ERAD. Nel complesso pathway ERAD, SEL-1L funge da adattatore fra i substrati non correttamente conformati e HRD-1, per consentire la loro retrotraslocazione nel citoplasma. Tratto da Christianson et al. 2008 [123].

A questo punto, appositamente poliubiquitinati grazie all'azione degli enzimi E1, E2, E3, i substrati non correttamente conformati sono trasferiti nel citoplasma per essere poi degradati dal proteasoma.

Come già accennato nei capitoli precedenti, i meccanismi di degradazione ubiquitina-proteasoma dipendenti e più in generale di controllo di qualità del RE [125-126] sembrano essere estremamente importanti nella regolazione delle principali funzioni delle NSCs, quali la loro stessa sopravvivenza ed il *self-renewal*.

2.2 SEL-1L ed il tumore

Sussiste una correlazione estremamente interessante fra l'espressione di SEL-1L nei tessuti tumorali e la loro aggressività. Nei tumori primari al [127] e negli adenocarcinomi pancreatici [128] è stata evidenziata una connessione statisticamente rilevante fra i livelli di SEL-1L e la progressione del tumore stesso, in quanto la sua de-regolazione è associata ad elevata aggressività della patologia. SEL-1L sembra rivestire un ruolo particolarmente importante nell'inibire la

proliferazione delle cellule tumorali, in quanto la sua over-espressione in cellule umane pancreatiche tumorali e di carcinoma mammario, ne limita sensibilmente le capacità di crescita ancoraggio-dipendente ed -indipendente [127-128]. L'espressione ectopica di SEL-1L in cellule pancreatiche tumorali ed il loro successivo impianto in modelli murini immunosoppressi, comporta un rallentamento significativo nello sviluppo del tumore [128], sottolineando una correlazione interessante fra i livelli della proteina e l'evoluzione del tumore anche *in vivo*.

Intensive ricerche sono state svolte al fine di correlare le variazioni mutazionali nel gene SEL-1L alla predisposizione verso talune patologie, ma sembra che anche alterazioni a singolo nucleotide siano particolarmente rare. Uno SNP (*single polymorphism*) riscontrato nell'introne 3 di SEL-1L è stato associato ad una maggiore suscettibilità al morbo di Alzheimer [129], ma recentemente è emersa anche la sua influenza sugli esiti clinici dei pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico [130]. Tale polimorfismo sarebbe associato all'età di diagnosi della patologia, così come alle possibilità di sopravvivenza in seguito ad intervento chirurgico e chemioterapico. Tali dati rendono SEL-1L e tale polimorfismo estremamente interessanti nell'ambito della ricerca di nuovi marcatori utilizzabili in ambito prognostico e terapeutico.

Inoltre, le isoforme proteiche di SEL-1L p28 e p38 sembrano essere secrete esclusivamente da cellule tumorigeniche, assumendo probabilmente un ruolo attivo nei processi idrolitici pro-infiammatori associati al tumore, ed anch'esse potrebbero fungere da nuovi biomarcatori in grado di tracciare il tumore [121].

2.3 SEL-1L nello sviluppo del pancreas

Durante lo sviluppo embrionale umano, l'espressione di SEL-1L è estremamente precoce, particolarmente intensa nelle strutture neuroepiteliali, a livello del tubo neurale ed in corrispondenza del midollo spinale. Con il proseguire dello sviluppo, la proteina si circoscrive ai soli organi contraddistinti da spiccate proprietà secretorie, principalmente nel pancreas [131]. L'importanza di SEL-1L nell'ambito dell'organogenesi è giustificabile se si pensa che in *C. elegans* essa sia stata identificata come regolatore del *pathway* di lin12, l'omologo di Notch [132], precedentemente estensivamente descritto come fattore vitale in grado di orchestrare l'intera genesi dell'organismo.

Recentemente, un gruppo di ricerca statunitense, ha sviluppato dei topi recanti una mutazione nel gene SEL-1L murino (mSEL-1L), generata mediante l'inserzione di una cassetta di *gene trapping*. La mutazione in omozigosi è associata a letalità embrionale, infatti, tali topi (mSEL-1L KO) muoiono in utero durante la *mid-gestation* (E12.5-E13.5) a seguito di una generale compromissione dello sviluppo [134-134] (Figura 19). Nella tabella in Figura 19 è stato riportato un dato molto interessante: la progenie mSEL-1L KO risente di una mortalità elevata anche negli stati più precoci dello sviluppo, come dimostra il fatto che al giorno E11.5 solo il 14% degli embrioni vitali sia KO (28 casi su 191 totali), anziché il 25%, come atteso secondo leggi Mendeliane.

Inoltre, è emerso che il differenziamento e la morfologia epiteliale pancreatiche vengono pesantemente alterati dalla distruzione dell'integrità del gene mSEL-1L, in quanto le cellule epiteliali pancreatiche degli embrioni mutanti sembrano intrappolate in uno stato di progenitori [133]. I topi recanti un solo allele funzionale

di mSEL-1L (mSEL-1L HET) sono maggiormente suscettibili ad una dieta ricca di grassi, sviluppando precocemente iperglicemia. La massa delle cellule pancreatiche β è ridotta, quindi tali topi sono maggiormente intolleranti al glucosio rispetto ai controlli, mostrando anche un significativo ritardo nella secrezione di insulina [135]. Tali dati rendono SEL-1L un appetibile target terapeutico, eventualmente utilizzabile per sviluppare nuove strategie farmacologiche contro il diabete mellito di tipo 2.

Genotype	E11.5	E12.5	E13.5	E14.5	E15.5	Weaning
<i>Sel1l^{+/+}</i>	56 (47)	52 (52)	20 (21)	52 (37)	42 (34)	145 (117)
<i>Sel1l^{+/-}</i>	107 (97)	124 (104)	56 (42)	97 (75)	96 (69)	324 (234)
<i>Sel1l^{-/-}</i>	28 (47)	32 (52)	8 (21)	2 (37)	0 (34)	0 (117)
Total	191	208	84	151	138	469

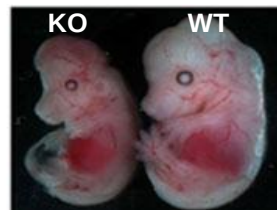


Figura 19. Distribuzione dei genotipi mSEL-1L WT (*Sel1l^{+/+}*), HET (*Sel1l^{+/-}*), KO (*Sel1l^{-/-}*) nella progenie e fenotipo del modello murino mSEL-1L KO. La frequenza dei genotipi negli embrioni transgenici mette in luce che i topi mSEL-1L KO risentono di una drastica morte intrauterina fra i giorni E12.5 e E13.5. Fra parentesi è riportato il dato atteso secondo le leggi Mendeliane. All'età embrionale di E13.5, i pochi topi mSEL-1L KO sopravvissuti mostrano un vistoso ritardo proliferativo. Tratto da Francisco et al., 2010 [134].

Nel corso dei capitoli successivi verrà esplorata una nuova funzione di mSEL-1L: il suo contributo alla staminalità. Si tratta di un concetto molto complesso da sfidare, poiché gli ambiti biologici in esame sono altrettanto complicati ed articolati e trovare il filo conduttore in grado di correlarli rappresenta un'impresa piuttosto ardua. Si utilizzeranno specifici modelli di studio sia *in vivo* che *in vitro* e, con apposite strategie di biologia molecolare e cellulare, si cercherà di chiarire la relazione fra mSEL-1L e le NSCs.

MATERIALI E METODI

1. Linee cellulari, condizioni colturali e differenziamento

Le cellule staminali embrionali murine ES46C sono state coltivate su gelatina 0.1% (Sigma) nel *Glasgow Minimum Essential Medium* (Sigma), appositamente addizionato del 10% di FBS (*Fetal Bovine Serum*, Sigma), L-glutamina 2 mM, sodio piruvato 1 mM (Invitrogen), amminoacidi non essenziali (Invitrogen), β -mercaptoetanolo 100 μ M, 1000 unità/ml di LIF (Millipore); il terreno è stato cambiato ogni due giorni.

Al fine di ottenere i precursori neurali (NEP46C), le ES46C sono state piastrate ad una densità di 6.5×10^3 cellule/ml e coltivate per 7 giorni nel medium N2/B27, costituito da DMEM/F-12 (Invitrogen) e Neurobasal (Invitrogen) (1:1), addizionandovi appositamente B27 1% (Invitrogen), N2 0.5% (Invitrogen), β -mercaptoetanolo 50 μ M, L-glutamina 1 mM. Successivamente, le cellule così predifferenziate sono state piastrate su plastica non trattata in un mix di DMEM/F-12 e Neurobasal (1:3), a cui sono stati aggiunti B27 1%, N2 0.5%, β -mercaptoetanolo 50 μ M, L-glutamina 1 mM e FGF-2 20 ng/ml (Peprotech).

Tutte le NSCs murine utilizzate negli esperimenti ivi esposti, sono state coltivate nel medium di espansione Euromed-N (Euroclone) a cui sono stati aggiunti N2 1%, EGF (Peprotech) e FGF-2 20 ng/ml, come già descritto precedentemente [55].

Il differenziamento astrocitario è stato invece promosso piastrando le NSCs nel canonico terreno di espansione per 24 ore, dopo le quali il medium è stato sostituito con Euromed a cui è stato aggiunto FBS 5%, N2 1% e B27 2% (Invitrogen), mantenendo le cellule in coltura per 7 giorni.

Per la maturazione oligodendrogliale, è stato invece seguito il protocollo ideato da Glaser [137] con opportune modificazioni. Le cellule sono state piastrate su laminina in terreno di espansione per 24 ore, nutrendole nei 4 giorni successivi con DMEM-F12, supplementato di N2 1%, FGF-2 10 ng/ml, PDGF 10 ng/ml (Sigma), forskolina 10 μ M (Sigma), insulina 20 μ g/ml (Sigma), BSA 75 μ g/ml (Rockland). La maturazione finale è stata stimolata eliminando i fattori di crescita per altri 4 giorni ed addizionandovi l'ormone T3 30 ng/ml (Sigma), l'acido ascorbico 200 μ M (Sigma), insulina 20 μ g/ml, BSA 75 μ g/ml.

I neuroni, invece, sono stati differenziati seguendo il protocollo descritto da Spiliotopoulos ed i suoi collaboratori [139], con piccole modificazioni. In breve, le cellule sono state pre-differenziate in Euromed-N a cui sono stati aggiunti B27 1%, N2 0.5%, FGF-2 10 ng/ml, insulina 20 μ g/ml, BSA 75 μ g/ml. In seguito, le cellule sono state coltivate in un mix di DMEM-12 e Neurobasal 1:3, B27 1%, N2 0.5%, quantitativi gradualmente ridotti di FGF-2 (da 10 a 5 ng/ml), concentrazioni via via crescenti di BDNF (Sigma, da 20 a 30 ng/ml), insulina 20 μ g/ml, BSA 75 μ g/ml. La maturazione completa è stata raggiunta dopo 21 giorni.

Nel corso dei tre sottotipi di differenziamento delle NSCs, il mezzo di crescita è stato parzialmente rimpiazzato ogni 2-3 giorni.

Le cellule di glioblastoma umano G179 [138] sono state coltivate su laminina 10 μ g/ml (Invitrogen) in terreno Euromed addizionato di N2 1%, B27 2%, EGF e FGF-2 20 ng/ml.

1.2. Trasfezione e trattamenti delle NSCs

La stabilità della proteina mSEL-1L nelle NSCs indifferenziate e in quelle indirizzate ad un differenziamento astrocitario è stata valutata mediante trattamento con la cicloesimide (Sigma) 200 µg/ml per 4 e 7 ore.

La trasfezione transiente delle NSCs è stata ottenuta attraverso nucleofezione con 250 pmol del pre-miR-183 e del relativo controllo negativo, 250 pmol del siRNA diretto contro l'esone 3 di mSEL-1L e del suo controllo negativo (Applied BioSystems, Tabella 1), oppure con 5 µg del plasmide Notch-1 ICD/HIS (gentilmente concesso dal Dr. Oliver Brustle, costruito sul *backbone* del vettore pTriEx-1, Novagen, Figura 20), utilizzando la tecnologia del Nucleofector (Lonza) e seguendo appositamente le istruzioni presentate nel "*Mouse neural stem cells kit*" (Lonza). Dopo 24 ore, il mezzo di crescita è stato appositamente rimpiazzato con il tradizionale terreno di espansione, mentre l'espressione del mmu-miR-183 o dei diversi geni d'interesse è stata valutata dopo 48 ore dalla trasfezione.

Per l'ottenimento di linee stabili in cui mSEL-1L fosse stabilmente interferito, le cellule NS46C sono state lipofettate (Lipofectamin 2000, Invitrogen) con costrutti recanti *short hairpin* RNA (shRNA) diretti contro mSEL-1L ed il relativo controllo negativo (*SureSilencing™ shRNA Plasmids*, SABiosciences, Tabella 1). La selezione delle cellule esprimenti il costrutto di interesse è stata effettuata grazie alla presenza nei plasmidi in questione del gene di resistenza al farmaco G418. Infatti, dopo 24 ore dalla trasfezione, il terreno è stato sostituito con nuovo mezzo di espansione a cui sono stati aggiunti 0.15 mg/ml di G418 (Sigma). La selezione delle linee stabili è stata effettuata per 15 giorni, dopo i quali, mediante qRT-PCR, è stata verificata l'effettiva interferenza nell'espressione di mSEL-1L rispetto al controllo.

Oligonucleotide	Sequenza (5'- ... -3')	Esone	Casa produttrice
siRNA mSEL-1L	Senso: GCUUUUUAGAAUCUCCGAtt Antisense: UUCGGAGAUUCUAAAAAGCtg	3	Applied BioSystems
shRNA mSEL-1L (inserto)	AGCAAACATTTCGAGATCTATT	20-21	SABiosciences

Tabella 1. Elenco delle sequenze di siRNA e shRNA diretti contro mSEL-1L. Il siRNA diretto contro mSEL-1L è stato utilizzato per inibire transientemente l'espressione del gene, mentre i plasmidi recanti la sequenza di shRNA riportata hanno consentito di de-regolarlo stabilmente.

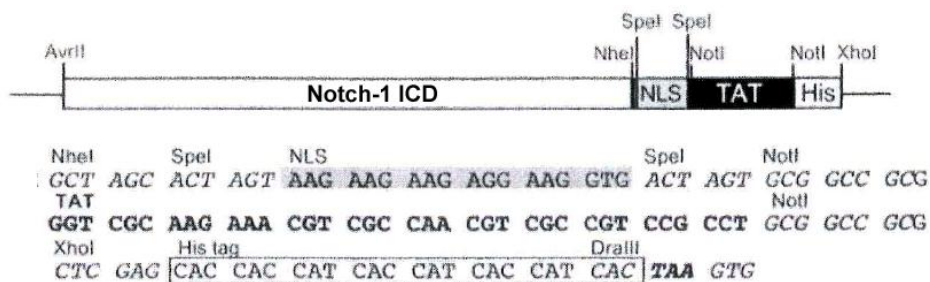


Figura 20. Schematizzazione del sito di clonaggio del vettore Notch-1 ICD/HIS. L'inserto codificante per la forma attivata del recettore Notch-1, appositamente seguito da un tag di HIS (istidine), è contenuto nel vettore pTriEx-1.

1.3. Valutazione della crescita cellulare

La crescita delle linee cellulari NS46C (trasfettate stabilmente con lo shRNA diretto contro mSEL-1L o con il relativo controllo) è stata valutata seminando in triplicato 20000 cellule su una superficie di 10 cm² (densità di 10000 cellule/cm²) e seguendone la proliferazione per 6 giorni ogni 24 ore mediante conta delle cellule vitali (esclusione delle cellule morte colorate con eritrosina) alla camera di Burkner. Il tempo di duplicazione (TD) è stato calcolato durante la fase di crescita esponenziale, secondo la seguente formula:

$$TD = \frac{T1 - T0}{\log_2(C1 \div C0)}$$

T1= Tempo osservazione 1 (hr)
T0= Tempo osservazione 0 (hr)
C1= numero cellule rilevate in corrispondenza del T1
C0= numero cellule rilevate in corrispondenza del T0

2. Modelli murini

I modelli murini transgenici mSEL-1L KO, gentilmente concessi dal Dr. Q. Long, sono stati generati mediante la metodica del *gene trapping* [133-134]. Gli animali sono stati mantenuti in un apposito stabulario (CNR-ITB, Segrate), con libero accesso a cibo ed acqua in un ambiente a temperatura controllata e con un ciclo di 12 ore tra luce e buio. Al momento opportuno, essi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale e sono stati successivamente sottoposti a specifica dissezione al fine di isolare gli embrioni o il cervello nell'adulto.

2.1 Genotipizzazione

Il DNA genomico è stato estratto da piccole biopsie di coda o dal sacco vitellino dei topi transgenici, previa digestione con Proteinasi K 0.2 mg/ml in apposito buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, SDS 0.2%), per una notte a 50°C. Successivamente, la purificazione del DNA è stata effettuata utilizzando la metodica di estrazione descritta da Malferrari ed i suoi collaboratori [139], avvalendosi di colonnine dalla resina cationica per isolare l'acido nucleico (Epoch Biolabs). La genotipizzazione è stata effettuata mediante PCR, servendosi dei seguenti primers (Figura 21):

mSEL-1L 14F: 5-catcttctgatgtacacagga-3

mSEL-1L 15R: 5-ccagggtcataattctgtagaa-3
Geo R2: 5-tggcctccagacaagtagat-3

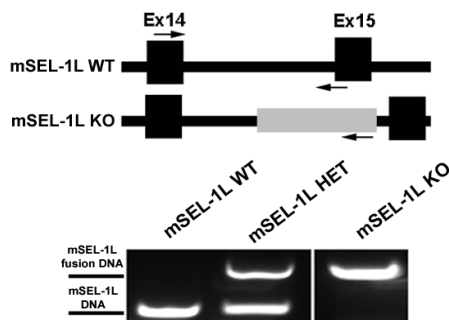


Figura 21. Schematizzazione dell'analisi genotipica condotta sui modelli murini mSEL-1L KO. L'analisi di PCR mostra la presenza del gene mSEL-1L wild-type esclusivamente nei modelli murini WT ed HET. Differentemente, il DNA di fusione, comprensivo della cassetta di gene trapping, viene amplificato nei topi KO ed HET.

2.2 Preparazione dei campioni paraffinati o congelati

I cervelli prelevati dagli embrioni murini mSEL-1L WT e KO all'età embrionale E11.5 sono stati fissati in paraformaldeide (PFA) 4% (Sigma) per una notte a 4° C. Successivamente, i tessuti sono stati immersi in sucrosio 20% (Sigma) per un'ulteriore notte, inclusi in OCT (VWR International) ed infine sottoposti a taglio al criostato, ottenendo sezioni coronali dallo spessore di 10 µm.

Differentemente, i cervelli degli embrioni murini all'età di E12.5 o dei topi adulti WT sono stati fissati per una notte a 4°C in PFA 4%, disidratati mediante un processore di tessuti automatico (Leica ASP300S), inclusi in paraffina e sezionati al microtomo per ricavarne sezioni orizzontali, coronali e sagittali di 5 µm.

2.3 Saggio delle neurosfere e colture primarie di NSCs

Le neurosfere derivanti dagli embrioni murini mSEL-1L WT, HET e KO (E11.5) sono state coltivate in DMEM-F12 Glutamax a cui sono stati addizionati N2 1%, FGF-2 ed EGF 20 ng/ml. In dettaglio, gli embrioni sono stati appositamente dissezionati e decapitati al di sotto degli archi branchiali del telencefalo, come precedentemente descritto [140] ed il tessuto è stato dissociato meccanicamente in modo da ottenere una sospensione di cellule singole. Dopo alcuni giorni, una volta osservata la formazione di neurosfere primarie, le cellule sono state raccolte, dissociate meccanicamente e riseminate nel mezzo di crescita alla densità di 1000 cellule/pozzetto (2000 cellule/ml) in triplicato. Dopo 3 giorni è stato valutato il numero di neurosfere secondarie ottenute, misurandone il diametro attraverso un'applicazione del software *Leica Application Suite* (Leica).

Differentemente, le colture primarie di NSCs sono state ottenute piastrando le cellule dissociate dalla corteccia telencefalica di embrioni mSEL-1L WT, HET e KO (E11.5) in *multi-well* da 96 pozzetti appositamente trattati con laminina 10 µg/ml nel canonico medium di espansione. Una volta selezionata e purificata la

popolazione di precursori normali, si è proceduto all'espansione e caratterizzazione della linea.

3. *Analisi immunofenotipiche*

Nel corso di questi studi, sono state effettuate sia analisi di immunofluorescenza su tessuti cerebrali e colture cellulari che analisi immunistochemiche sull'intero embrione.

3.1 Immunofluorescenza

Le analisi di immunofluorescenza sono state condotte sia su cellule fissate in PFA 4% per 20' a 4°C, che su tessuti embrionali o adulti fissati in PFA 4% e successivamente paraffinati o congelati. Per le sezioni paraffinate è stata effettuata la deparaffinizzazione mediante Neoclear (Merck), successiva reidratazione con scala alcolica decrescente e smascheramento degli antigeni mediante bollitura per 15' in buffer citrato (citrato di sodio 10 mM, Tween20 0.05%, pH 6). Nel caso di sezioni congelate o cellule fissate, dopo un lavaggio in PBS è stata effettuata la permeabilizzazione con Triton X-100 per 10' a 4°C. Particolarmente, per la marcatura con gli anticorpi diretti contro la bromodesossiridina (BrdU) e contro il Notch-1 ICD, si è prima proceduto a trattamento con HCl 1M a 60°C per 10', al fine di denaturare la cromatina. Successivamente, i diversi campioni sono stati trattati allo stesso modo, bloccando per 45' i siti di legame aspecifici con la soluzione di bloccaggio (siero d'asino 2%, BSA 1.5%, gelatina di pesce 0.5%, pH 7.4). In seguito i campioni sono stati immunomarcati lungo tutta la notte a 4°C con gli anticorpi primari descritti nella Tabella 2, appositamente diluiti nella soluzione di bloccaggio.

<i>Anticorpo</i>	<i>Casa produttrice</i>	<i>Specie</i>	<i>Concentrazione/ Diluizione</i>
<i>Anti-SOX-2</i>	Chemicon	Coniglio	1:400
<i>anti-Nestina, clone RAT401</i>	Developmental Studies, HybridomaBank	Topo	1:100
<i>anti-Nestina</i>	Sigma	Coniglio	1:50
<i>anti-GFAP</i>	Sigma	Coniglio	1:1000
<i>anti-βIII-Tubulina</i>	Promega	Topo	1:200
<i>anti-βIII-Tubulina</i>	Sigma	Coniglio	1:100
<i>anti-O4</i>	Chemicon	Topo	1:50
<i>anti-OCT-4</i>	Santa Cruz Biotechnology	Coniglio	1:100
<i>anti-Caspasi III attivata</i>	Cell Signaling	Coniglio	1:500

anti-SEL1L	[141]	Topo	10 µg/ml
anti-CNPasi	Sigma	Topo	1:200
anti-Notch1 TM-ICD	Sant Cruz	Capra	1:70
anti-Notch1 ICD	Cell Signaling	Coniglio	1:70
anti-BrdU	Sigma	Topo	1:100

Tabella 2. Elenco degli anticorpi utilizzati nelle analisi di immunofluorescenza. La tabella riporta i differenti anticorpi, la ditta produttrice, le specie animali in cui sono stati sviluppati e le concentrazioni/diluizioni a cui sono stati utilizzati.

L'indomani, dopo diversi lavaggi nella soluzione di bloccaggio diluita 1:10 in PBS, i campioni sono stati incubati con gli specifici anticorpi secondari (*Rhodamine-Red anti-mouse IgG* o *IgM*, *Rhodamine-Red anti-rabbit IgG*; *Rhodamine-Red anti-goat IgG*, Jackson Immuno Research; *AlexaFluor 488 anti-mouse IgG*; Molecular Probes, Invitrogen). Dopo ulteriori lavaggi, i nuclei sono stati marcati con l'Hoechst 33258 ed i campioni sono stati montati su specifici vetrini utilizzando un gel idrofilo (*Fluoromount*, Sigma). Le immagini sono state acquisite con il microscopio a fluorescenza invertito Leica DMI4000B, con annessa fotocamera DFC360FX (Leica Microsystems). Laddove sia stato necessario valutare la quantità di cellule immunopositive, a seconda dello specifico esperimento un numero variabile dalle 100 alle 1000 cellule è stato contato in 5 campi scelti arbitrariamente, calcolando successivamente la media e la deviazione standard fra i dati ottenuti.

3.2 Whole mount

Feti murini all'età embrionale di E9.5 sono stati isolati dalla placenta e dal loro sacco vitellino, successivamente utilizzato per stabilirne il genotipo. Dopo averli fissati per una notte in PFA 4%, sono stati sottoposti ad uno specifico protocollo di marcatura per PECAM-1. In seguito a disidratazione in metanolo, si è proceduto al blocco delle perossidasi endogene in metanolo ed H₂O₂ 5% per 2 hr a temperatura ambiente. Successivamente è stata effettuata la reidratazione degli embrioni incubandoli per 20' in metanolo 50%, per altri 20' in metanolo 15% ed infine in PBS per 20'. I feti sono stati poi incubati in PMT (PBS, latte 3%, TritonX 1000 0.5%) per 2 h a temperatura ambiente e successivamente marcati per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo monoclonale anti-PECAM-1 (clone MEC13.3, BD Pharmingen), diluito in PM (PBS, latte 3%). L'indomani, dopo aver effettuato 3 lavaggi in PMT da 1 h ciascuno a temperatura ambiente, gli embrioni sono stati incubati con l'anticorpo secondario (*anti-rat HRP*, Jackson Immuno Research) diluito 1:250 in PM. Si sono ripetuti i 3 lavaggi da 1 h ciascuno in PMT e, dopo 3 ulteriori brevi lavaggi in PBS, si è proceduto allo sviluppo della colorazione mediante DAB (Pierce). Le immagini sono state acquisite con il microscopio Leica M165FC, associato a fotocamera DFC310FX.

4. Western blot

4.1 Estrazione proteica e frazionamento subcellulare

Al fine di ottenere estratti proteici totali, i campioni cellulari e le biopsie murine sono state lisate in Tris-HCl (pH 7.4) 10 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, inibitori di proteasi (Roche Applied Sciences), PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, sodio fluoride 1 mM.

Differentemente, la purificazione delle componenti proteiche citoplasmatiche e nucleari è stata effettuata lisando le cellule NS46C confluenti nell'apposito buffer di lisi A (Tabella 3). In seguito a un delicato *scraping*, le cellule sono state raccolte, poste in ghiaccio per 5' e successivamente centrifugate a 12000 rpm a 4°C per 3': il surnatante così ottenuto rappresenta l'estratto citoplasmatico. In seguito, il pellet è stato risospeso mediante diverse pipettate nel buffer B (Tabella 3) in ghiaccio ed incubato in agitazione 2 ore a 4°C. In seguito, dopo una centrifugata di 5' a 12000 rpm a 4°C, è stato recuperato l'estratto nucleare.

La concentrazione degli estratti proteici totali è stata determinata mediante il saggio BCA (Thermo Fisher Scientific), mentre quella dei lisati citoplasmatici e nucleari è stata definita mediante saggio Bradford (Sigma).

Buffer A		Buffer B	
Hepes 10 mM KCl 10 mM EDTA 0.1 mM		Hepes 20 mM NaCl 400 mM EDTA 0.1 mM Glicerolo 10%	
Da aggiungere poco prima dell'uso	Nonidet P-40 0.4%	Da aggiungere poco prima dell'uso	DTT 1 mM
	DTT 1 mM		PMSF 1 mM
	PMSF 1 mM		Inibitori di proteasi
	Inibitori di proteasi		

Tabella 3. Composizione delle soluzioni utilizzate per ottenere lisati proteici citoplasmatici e nucleari. Sia nel Buffer A che nel Buffer B, gli inibitori delle proteasi, il DTT e il Nonidet P-40 vanno addizionati solo poco prima dell'utilizzo.

4.2 Immunoprecipitazione

Le cellule NS46C e G419 sono state lisate nello specifico buffer di lisi (Hepes 50 mM, NaCl 250 mM, Nonidet P40 1%), a cui sono stati addizionati gli inibitori delle proteasi ed il PMSF 1 mM. 600 ng di estratto grezzo sono stati incubati per 2 h a 4°C con 5 µg dell'anticorpo anti-HIS (AbCam), o anti-Notch-4 (Cell Signaling), o del relativo controllo isotipico (IgG murine, Jackson Immuno Research). Successivamente, 30 µl di sfere di agarosio ricoperte con proteina G/proteina A (Calbiochem), lavate per due volte nel buffer di lisi, sono state incubate con l'immunocomplesso per tutta la notte a 4°C. L'indomani, dopo 2 lavaggi in apposito buffer (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM), le proteine immunoprecipitate sono state staccate dalle microsfeere di agarosio mediante bollitura per 5' nel *loading* buffer, per poi essere risolte su SDS-PAGE.

4.3 SDS-PAGE e blotting

I lisati proteici sono stati risolti in SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 9%, sottoposti a successivo *blotting* su membrane di PVDF, bloccati con latte o BSA al 5% ed ibridati in sacchetti in plastica sigillati con gli anticorpi elencati nelle Tabella 4, avvalendosi dell'apparecchio X-blot-100 (*Integrated Systems Engineering*).

Anticorpo	Casa produttrice	Specie	Concentrazione/ Diluizione	Bloccaggio
anti-β-galattosidasi	Chemicon	Coniglio	1:1000	Latte 5%
anti-Nestina, clone RAT401	Developmental Studies, HybridomaBank	Topo	1:1000	Latte 5%
anti-SEL1L	[141]	Topo	1.6 μ g/ml	Latte 5%
anti-β-Tubulina	Sigma	Topo	1:1000	Latte 5%
anti-Notch1 TM-ICD	Sant Cruz	Capra	1:500	Latte 5%
anti-Notch1 ICD	Cell Signaling	Coniglio	1:500	BSA 5%
anti-ZEB-1	Sant Cruz	Coniglio	1:1000	Latte 5%
anti-βIII- Tubulina	Promega	Topo	1:1000	Latte 5%
anti-Notch-4 ICD	Cell Signaling	Topo	1:1000	BSA 5%

Tabella 4. Elenco degli anticorpi utilizzati nelle analisi di western blot. La tabella riassume i differenti anticorpi, la ditta produttrice, le specie animali in cui sono stati sviluppati e la concentrazione/diluizione a cui sono stati utilizzati.

L'indomani, dopo diversi lavaggi in TBS-Tween20 0.1%, è stata effettuata l'ibridazione con gli anticorpi secondari coniugati all'HRP (Jackson ImmunoResearch) ed infine le proteine di interesse sono state rivelate mediante il sistema ECL (Thermo Fisher Scientific) nella camera oscura BioSpectrum (UVP). I livelli d'espressione delle proteine sono stati valutati previa normalizzazione per la β -Tubulina, effettuando l'analisi densitometrica delle bande attraverso il software Vision Works LS (Euroclone).

5. RT-PCR e Real Time PCR quantitativa

Dopo aver estratto l'RNA totale da colture cellulari o biopsie tissutali fresche mediante il *Tri-Reagent* (Applied BioSystems) secondo il protocollo raccomandato

dalla ditta produttrice, esso è stato appositamente retrotrascritto utilizzando il *Revert-Aid cDNA Synthesis kit* (Fermentas).

Le reazioni di PCR sono state effettuate utilizzando 2 µl di cDNA come template, primer *forward* e *reverse* 0.5 µM ciascuno (Tabella 5), buffer 1X (Fermentas), 1U *Dream Taq* (Fermentas). L'amplificazione è stata condotta secondo il seguente protocollo: denaturazione iniziale a 94°C per 3', 32 cicli in cui il DNA è stato denaturato a 94°C per 45", l'*annealing* è stato effettuato a 59° C per 45" e l'amplificazione è stata eseguita a 72°C per 45", con un'estensione finale a 72°C per 7'. I prodotti della reazione sono stati valutati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% in presenza di etidio bromuro.

Per analizzare l'espressione del miR-183, 100 ng di RNA totale precedentemente purificati mediante Tri-Reagent sono stati utilizzati come template in un saggio TaqMan a due step. *In primis*, l'RNA totale è stato sottoposto ad una trascrizione inversa mediante il "*TaqMan microRNA reverse transcription kit*" (Applied BioSystems); successivamente il prodotto di tale reazione (3µl) è stato utilizzato come template in una reazione di real time quantitativa (qRT-PCR), assemblata in due esperimenti indipendenti in triplicato, secondo le prescrizioni della casa produttrice mediante il Rotor-GeneQ (Qiagen). L'espressione del mmu-miR-183 è stata normalizzata in ogni campione per l'espressione dello sno-202 ed i dati così ottenuti sono stati comparati a quelli di un opportuno controllo.

L'espressione dei geni mSEL-1L, GFAP, SOX-2, β III-Tubulina, HES-5, HES-1, PAX-6, OLIG-2 è stata analizzata mediante qRT-PCR, effettuando due esperimenti indipendenti in triplicato ed utilizzando la *Maxima Sybr Green qPCR Master Mix* (Fermentas) ed il Rotor-GeneQ. Il protocollo di amplificazione utilizzato è il seguente: denaturazione iniziale a 95°C per 10', 40 cicli in cui la denaturazione del DNA avviene a 95°C per 15", l'*annealing* a 60° C per 30" e l'amplificazione a 72°C per 30". I dati sono stati normalizzati rispetto ai livelli di espressione del GAPDH, comparandoli a quelli di un opportuno controllo ed utilizzando il metodo $\Delta\Delta Ct$. I primers utilizzati sono elencati nella Tabella 5.

<i>GENE</i>	<i>Sequenza dei primers (5'- ... -3')</i>	<i>Annealing T (°C)</i>	<i>Dimensione ampliconi (pb)</i>
SEL1L	FW: GCCCGATGAAGTGGAAAAC REV: CATTCTTAAACAACCTCCAGTGC	59	620
βIII-Tubulina	FW: CAATGAGGCCTCCTCTCACAAG REV: AGGCCTGAAGAGATGTCCAA	56	156
GFAP	FW: TGGAGGAGGAGATCCAGTTC REV: GCGTCTGTGAGGTCTGCAAACCTT	59	223
NANOG	FW: ATGAAGTGCAAGCGGTGGCAGAAA REV: CCTGGTGGAGTCACAGAGTAGTTC	59	464
OCT 4	FW: GCGTTTCTCTTTGGAAAGGTGTTT REV: CTCGAACCACATCCTTCTCT	59	312
SOX-2	FW: GGCGGCAACCAGAAGAACAG REV: GCTTGGCCTGCGTCGATGAAC	59	196
OLIG-2	FW: GGCGGTGGCTTCAAGTCATC REV: TAGTTTCGCGCCAGCAGCAG	59	250

PAX-6	FW: GCTTCATCCGAGTCTTCTCCGTTAG REV: CCATCTTTGCTTGGGAAATCCG	58	312
HES-5	FW: ATGCTCAGTCCCAAGGAGAA REV: TAGTCCTGGTGCAGGCTCTT	58	235
HES-1	FW:ATCATGGAGAAGAGGCGAAG REV:GTCACCTCGTTCATGCACTC	59	245
HPRT	FW: GTGCTCAAGGGGGGCTATAA REV: GGTCCCTTTTCACCAGCAAGC	59	306
GAPDH	FW: GTGGAAGGGGCTCATGACC REV: GGATGCAGGGATGATGTTCT	59	120
ACTINA	FW: CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT REV: CACAGCCTGGATGGCTACGT	59	83

Tabella 5. Elenco dei primers utilizzati nelle reazioni di PCR e qRT-PCR. La tabella riassume la sequenza di ciascuna coppia di primers, la temperatura d'annealing e la dimensione di ogni amplicone.

RISULTATI

1. Caratterizzazione dell'espressione di mSEL-1L nel SNC

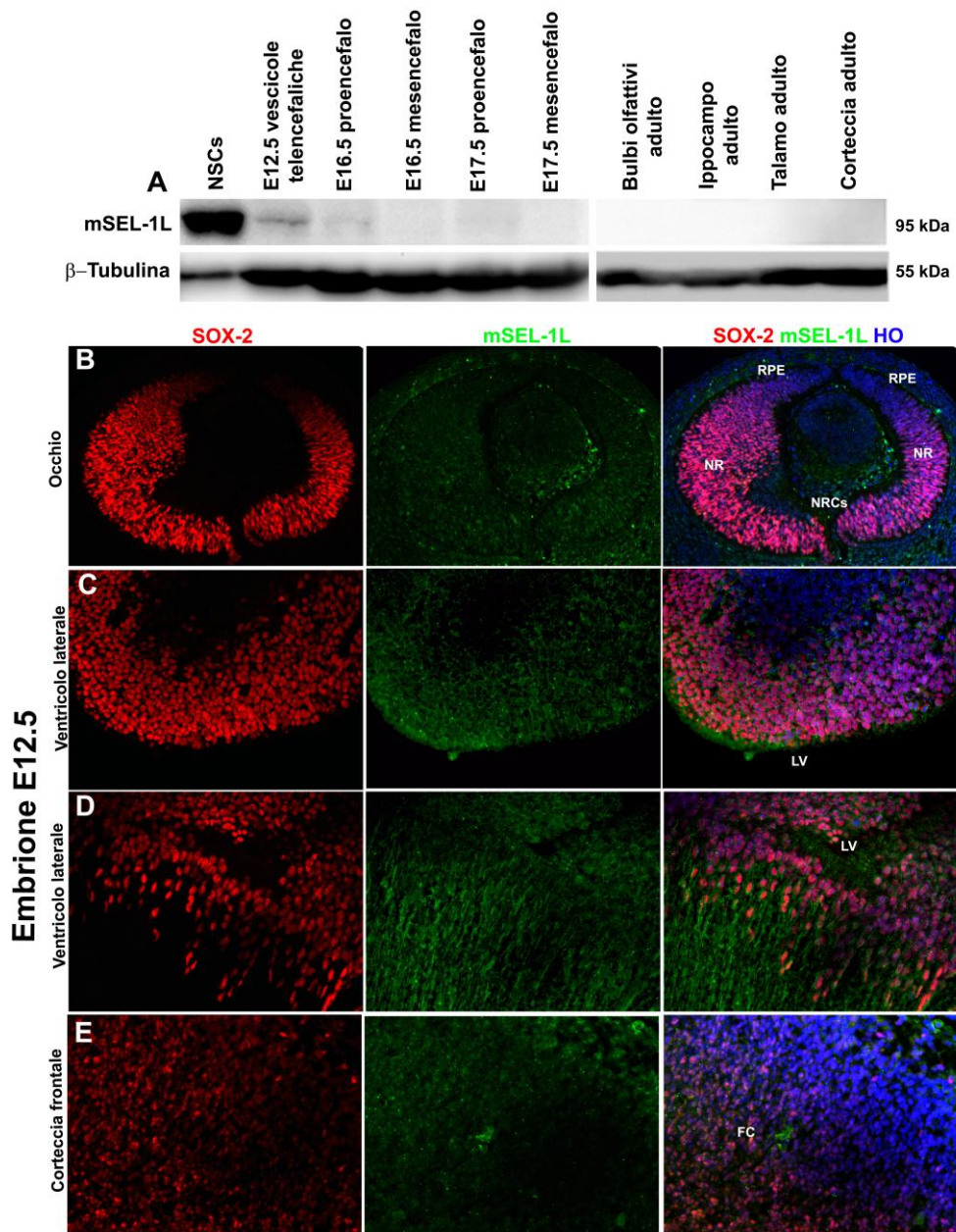
L'espressione di mSEL-1L è stata inizialmente studiata nell'ambito tumorale al fine di evidenziare il suo ruolo nella biogenesi dei tumori [128, 130, 142-145]. Tuttavia, un dato scarsamente esplorato, ma sicuramente estremamente importante per capire la funzione di mSEL-1L nell'organismo è indagare il suo profilo durante l'embriogenesi e lo sviluppo.

1.1 L'espressione di mSEL-1L durante lo sviluppo

Come già accennato nel capitolo "Introduzione", nei primi stadi dell'organogenesi murina, l'espressione di mSEL-1L è particolarmente spiccata a livello del tubo neurale [146], ad indicare un probabile ruolo della proteina nelle fasi più precoci di sviluppo del SNC. Dati questi presupposti, si è deciso di esplorare intensivamente il contributo di mSEL-1L proprio in tale ambito, utilizzando appositamente modelli biologici sia *in vivo* che *in vitro*.

Nelle prime fasi delle nostre ricerche è stata evidenziata la marcata presenza di mSEL-1L nelle NSCs indifferenziate [147] e ciò ha consentito di utilizzarle come controllo positivo per seguire il profilo di espressione della proteina in campioni di cervello murino dissezionati a diverse età embrionali (E12.5, E16.5 ed E17.5) ed in alcune regioni del cervello adulto (bulbi olfattivi, ippocampo, talamo e corteccia telencefalica, Figura 22 A). mSEL-1L è particolarmente espressa nelle NSCs, mentre durante la *mid-gestation* (E12.5) gli embrioni sono caratterizzati da residue tracce della proteina nelle vescicole telencefaliche (Figura 22 A). Alla stessa età embrionale, la retina neurale (*Neural Retina*, NR), ricca di cellule mitotiche SOX-2 positive, ed in particolar modo l'epitelio retinale pigmentato (*Retinal Pigment Epithelium*, RPE, figura 22 B) hanno mostrato livelli cospicui di mSEL-1L. Inoltre, nei ventricoli laterali si è potuta riscontrare la co-espressione di mSEL-1L e SOX-2 (Figure 22 C e D), mentre la proteina è risultata debolmente espressa nella corteccia frontale (Figura 22 E). Con il proseguire dello sviluppo (E16.5, E17.5), sia nel proencefalo che nel mesencefalo si è potuto osservare il declino dell'espressione di mSEL-1L, fino a verificare la sua completa assenza nell'adulto (Figura 22 A).

Considerando l'elevata espressione di mSEL-1L nelle NSCs, si è quindi esplorata la sua presenza nelle "nicchie" di cellule staminali indifferenziate persistenti nel cervello adulto. I risultati ottenuti hanno confermato la permanenza della proteina sia nel giro dentato dell'ippocampo (Figura 22 F) che nelle regioni ventricolari (Figura 22 G). In particolare, le analisi di immunofluorescenza hanno indicato la co-espressione di mSEL-1L e SOX-2 in una specifica sottopopolazione di NSCs in suddette regioni neurogeniche, a testimoniare che nel cervello adulto solo le cellule confinate nella "nicchia" preservano l'espressione di tale proteina.



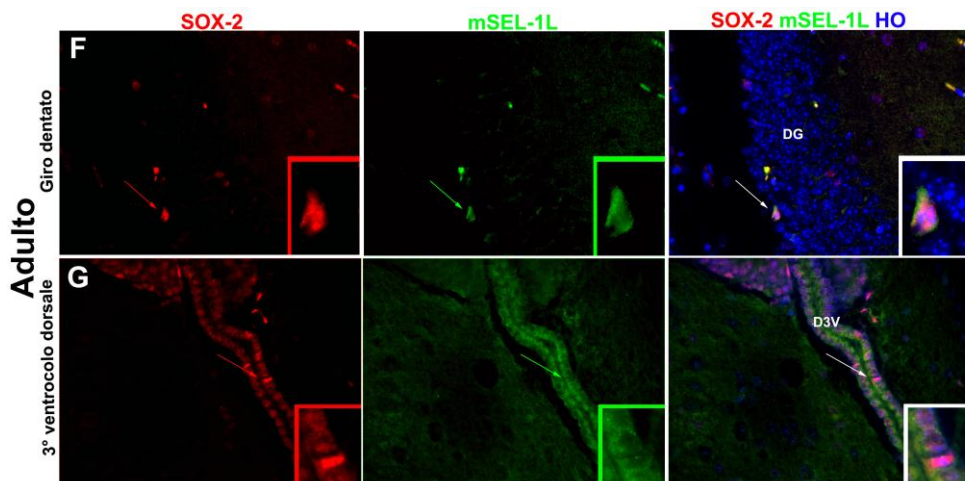


Figura 22. Espressione di mSEL-1L durante lo sviluppo del SNC murino.

A) L'analisi di western blot condotta su 25 μ g di lisato proteico totale ricavato da NSCs murine (cellule NS46C), dalle vescicole telencefaliche di un feto murino di età embrionale E12.5, dal proencefalo e mesencefalo isolati da embrioni di età E16.5 ed E17.5, dai bulbi olfattivi, ippocampo, talamo e corteccia telencefalica dissezionati da un topo adulto, mostra il repentino declino dell'espressione di mSEL-1L con il procedere dello sviluppo. La β -Tubulina è stata utilizzata come controllo di equo carico. **B)** Le analisi di immunofluorescenza condotte su sezioni orizzontali ottenute da feti murini all'età embrionale di E12.5 hanno rivelato un'elevata espressione di SOX-2 nella retina neurale (Neural Retina, NR), associata a co-espressione con mSEL-1L in talune cellule. Questa proteina è espressa più cospicuamente a livello del pigmento epiteliale della retina (RPE) e nei globuli rossi nucleati (Nucleated Red blood Cells, NRCs). Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 40 X. **C)** Le cellule che si affacciano sui ventricoli laterali (Lateral Ventricle, LV), visibili sia in sezioni orizzontali che sagittali (**D**) mostrano un'elevata espressione di SOX-2 e mSEL-1L. **E)** La corteccia frontale (Frontal Cortex, FC) è invece caratterizzata da una minore espressione sia di mSEL-1L che di SOX-2. **F)** Il giro dentato (Dentate Gyrus, DG) dell'ippocampo del cervello murino adulto è caratterizzato dalla permanenza di rare cellule SOX-2 positive che esprimono simultaneamente mSEL-1L. Una di tali cellule, indicata con una freccia, è mostrata ingrandita nell'inserto. **G)** Nel terzo ventricolo dorsale (Dorsal 3rd Ventricle, D3V) è possibile evidenziare cellule che co-esprimono mSEL-1L e stato SOX-2, indicate mediante una freccia ed ingrandite nell'inserto. Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 63X.

1.2 Il modello murino mSEL-1L KO

Recentemente, come accennato nel capitolo "Introduzione", è stato generato per la prima volta un modello murino mSEL-1L KO [133], la cui letalità in utero ha rimarcato vistosamente l'estrema importanza di tale proteina per il corretto sviluppo embrionale. E' stata dunque effettuata una preliminare analisi fenotipica su tale topo a diverse età embrionali (E9.5, E11.5, E12.5), comparandolo debitamente al controllo WT e all'embrione con un unico allele esprimente mSEL-1L (mSEL-1L

HET). Come si può chiaramente evincere dalla Figura 23, mentre nel corso dello sviluppo embrionale i feti mSEL-1L HET (Figura 23 B) sono apparsi macroscopicamente del tutto comparabili al riferimento WT (Figura 23 A), i KO si sono rivelati affetti da un globale difetto proliferativo associato ad un fenotipo aberrante e ad una compromissione generale dell'organogenesi (Figura 23 C).

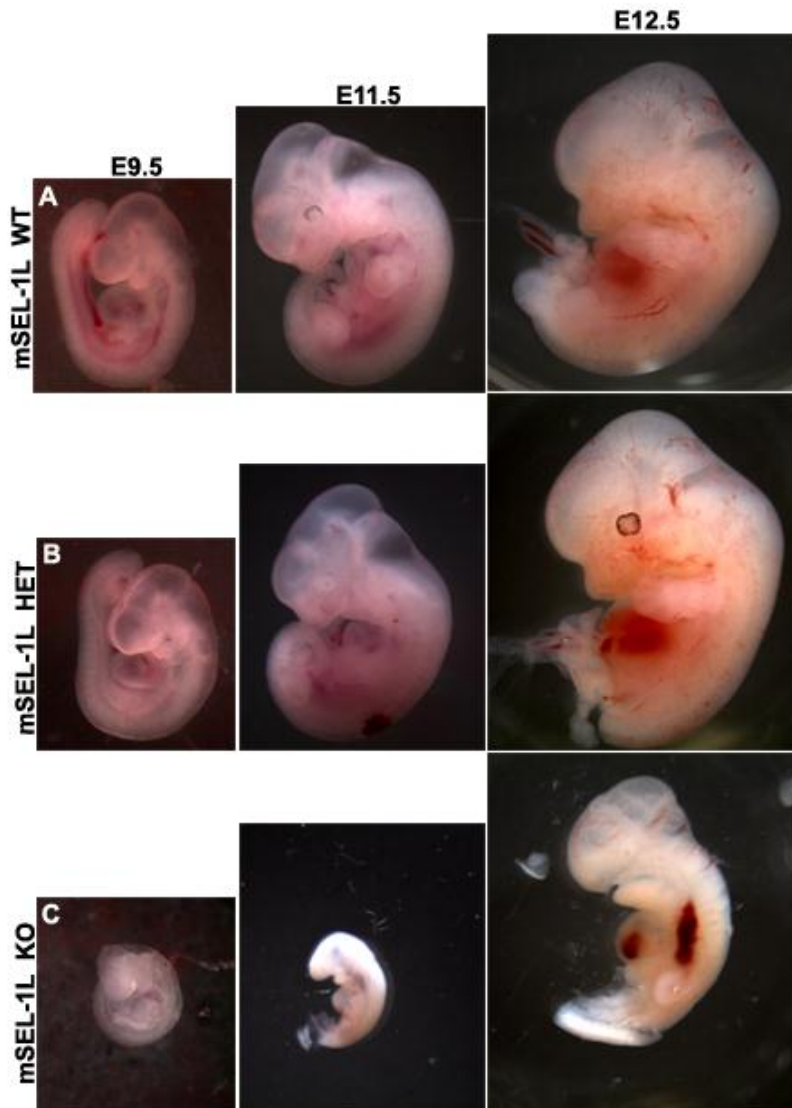


Figura 23. Analisi fenotipica dei modelli murini mSEL-1L WT, HET e KO. Gli embrioni murini mSEL-1L WT (A), HET (B) e KO (C) sono stati isolati dall'utero, dalla placenta e dal loro sacco vitellino a diverse età embrionali (rispettivamente E9.5, E11.5, E12.5). E' particolarmente evidente il ritardo proliferativo generale che caratterizza il modello mSEL-1L KO in tutti gli stadi di sviluppo analizzati.

Focalizzandosi particolarmente sull'embrione mSEL-1L KO all'età embrionale E11.5, è stata condotta un'analisi più accurata sul suo sviluppo cerebrale, esaminando la corteccia telencefalica, il livello proliferativo nella VZ e SVZ, così come il grado di differenziamento neuronale nella *cortical plate*. Si è deciso di non riportare i risultati relativi al topo mSEL-1L HET, poiché, come mostrato nella figura precedente, il suo SNC sembra essere caratterizzato da un fenotipo "*WT-like*".

La figura 24 mostra che lo spessore corticale nel topo mSEL-1L KO è sensibilmente inferiore rispetto a quello del suo controllo. Il deficit proliferativo è con molta probabilità attribuibile ad un difetto di *self-renewal*, come si può dedurre dalla ridotta incorporazione del BrdU nella SVZ dopo 1 ora di *pulse* e dalla bassa espressione della forma fosforilata dell'istone H3 nella VZ (Figura 24 B) rispetto al controllo (Figura 24 A). Analizzando il marcatore delle NSCs SOX-2, è evidente che la sua espressione nella VZ e nella SVZ sia sensibilmente inferiore nell'embrione mSEL-1L KO (Figura 24 B), qualora comparata al WT (Figura 24 A). Anche Notch-1 TM-ICD e Nestina, indicatori della staminalità cellulare, marcano una popolazione di NSCs indifferenziate indubbiamente più cospicua nel WT (Figura 24 A), rispetto al KO (Figura 24 B). La *cortical plate* in cui risiedono in neuroni differenziati è caratterizzata non solo da un ridotto spessore nel KO, ma anche da un'espressione inferiore di β III-Tubulina (Figura 24 B) rispetto al controllo (Figura 24 A). Successivamente è stata condotta una valutazione più accurata dei principali marcatori di staminalità e differenziamento espressi nella corteccia telencefalica degli embrioni WT e KO mediante qRT-PCR. I dati hanno confermato quanto emerso dall'analisi di immunofluorescenza, poiché l'espressione dei marcatori propri dei progenitori neurali SOX-2, PAX-6 e degli effettori del *pathway* di Notch-1, HES-5 ed HES-1, è ridotta nel KO, così come l'espressione del marcatore neuronale β III-Tubulina. In particolare, è stato evidenziato un significativo incremento dell'espressione del marcatore astrocitario GFAP (Figura 24 C). Questo dato risulta indubbiamente inatteso, in quanto, come già discusso nei capitoli introduttivi, durante il periodo della *mid-gestation*, i principali geni gliali non vengono espressi a causa dell'elevata metilazione a cui sono sottoposti i loro promotori.

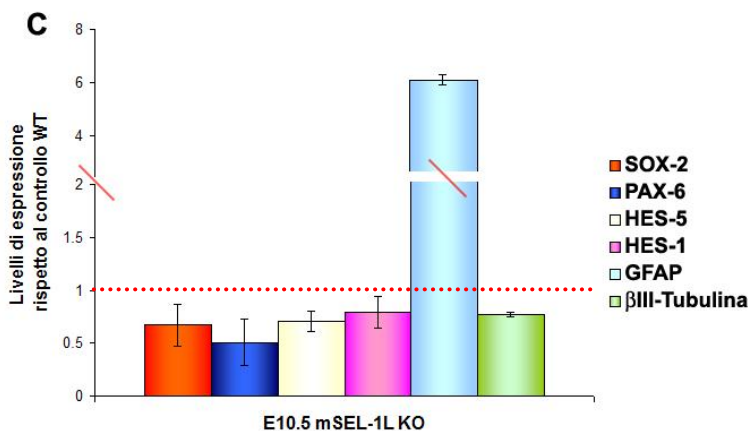
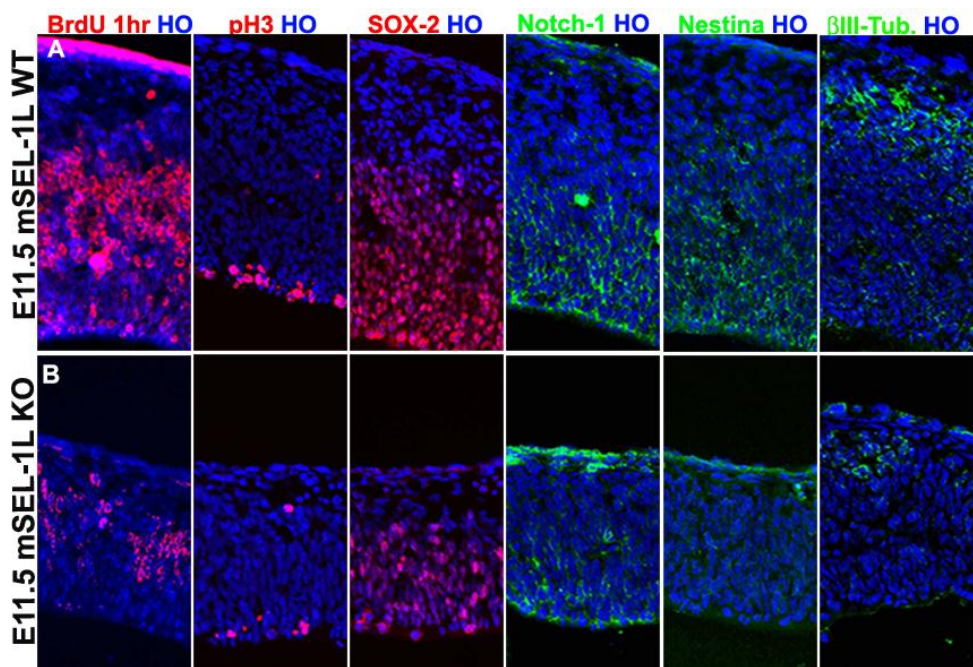


Figura 24. La corteccia telencefalica del modello mSEL-1L KO. La corteccia telencefalica del modello murino mSEL-1L KO e del suo controllo WT (E11.5) sono state analizzate valutando l'espressione dei principali marcatori di proliferazione, staminalità e differenziamento mediante immunofluorescenza su sezioni consecutive ottenute da campioni congelati in OCT. **A)** Il controllo WT ha esibito una normale incorporazione di BrdU nella SVZ, una normale espressione della forma fosforilata dell'istone H3, così come una canonica espressione dei marcatori di staminalità SOX-2, Notch-1 TM-ICD, Nestina nella VZ e SVZ e della βIII-Tubulina nella cortical plate. **B)** Differentemente, sia l'incorporazione del BrdU nella SVZ che l'espressione della forma fosforilata dell'istone H3 risultano chiaramente

ridotte nel KO. I livelli dei marcatori di staminalità sono significativamente inferiori e la cortical plate è caratterizzata da un numero più basso di neuroni β III-Tubulina positivi rispetto al controllo. Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 40X, ritagliando successivamente un inserto delle stesse dimensioni a partire da tutte le microfotografie. **C)** L'analisi di qRT-PCR condotta mediante SYBR-green sui campioni di cDNA derivanti dalla corteccia telencefalica di embrioni mSEL-1L KO e WT (E11.5) ha mostrato una riduzione dei livelli dei marcatori tipicamente espressi dai progenitori neurali SOX-2, PAX-6, HES-5 e del marcatore neuronale β III-Tubulina correlata alla deplezione di mSEL-1L. Differentemente, i livelli del marcatore astrocitario GFAP hanno risentito di un sensibile incremento nel cervello dell'embrione KO. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte in triplicato, normalizzando i dati rispetto ai livelli di espressione del gene GAPDH. I dati relativi all'embrione mSEL-1L WT sono stati utilizzati come riferimento avvalendosi del metodo $\Delta\Delta Ct$ e calcolando successivamente media e deviazione standard.

La deplezione di mSEL-1L sembra determinare un impoverimento della popolazione dei progenitori neurali proliferanti (BrdU e pH3 positivi), caratterizzati dall'espressione dei tipici marcatori neurali (SOX-2, Notch-1, Nestina positivi). In concomitanza, però, si è osservata una riduzione della progenie neuronale differenziata ed un incremento del *commitment* astrocitario. E' come se la mancanza di mSEL-1L alterasse il corretto *self-renewal* delle NSCs, promuovendo un differenziamento precoce. Essendo per definizione la prima fase differenziativa tipicamente neurogenica, i neuroni maturano per primi, ma, partendo da un pull di progenitori ridotto, anche il loro numero è ridotto rispetto al controllo WT. Dal momento che il differenziamento *in toto* appare "velocizzato" dalla deplezione di mSEL-1L, il precoce incremento dei livelli di GFAP nel modello murino KO potrebbe essere appunto giustificato da un precoce arresto del *self-renewal*, seguito da una precoce neurogenesì, a sua volta in grado di promuovere una precoce gliogenesi.

2. Caratterizzazione della relazione fra mSEL-1L e le NSCs

I dati raccolti dall'analisi *in vivo* mostrano un legame molto stretto fra l'espressione di mSEL-1L e le più intrinseche proprietà delle cellule staminali del sistema nervoso. Si è deciso dunque di utilizzare tali NSCs come modello *in vitro* al fine di sviscerare in maniera più dettagliata la natura del rapporto mSEL-1L/staminalità.

2.2 Relazione fra mSEL-1L ed il *self-renewal*

Il primo concetto da chiarire è la relazione fra mSEL-1L ed il *self-renewal*. A questo scopo, è stato utilizzato il saggio delle neurosfere, in quanto, come già descritto nei capitoli introduttivi, la capacità di autorinnovarsi delle NSCs è la proprietà basilare che consente di rigenerare nuove neurosfere a partire da cellule neurali isolate. Dunque, dissezionati e decapitati embrioni murini mSEL-1L KO, HET e WT all'età embrionale di E11.5, si è ottenuta una sospensione cellulare omogenea, appositamente piastrata in uno specifico mezzo di crescita come descritto nel capitolo "Materiali e Metodi" (Figura 25 A). Dopo alcuni giorni, esclusivamente nei campioni mSEL-1L WT ed HET si è assistito alla formazione di strutture sferoidali

costituite da una popolazione più omogenea di NCSs, dette appunto neurosfere primarie. Queste, così come le cellule derivanti dall'embrione KO che pur non hanno originato strutture tridimensionali complesse, sono state dissociate meccanicamente a singole cellule, per essere poi riseminate ad una specifica densità. Le neurosfere secondarie si sono ricostituite esclusivamente nei campioni WT ed HET (Figura 25, pannello di sinistra e centrale) ma non si sono osservate in alcun modo associazioni cellulari complesse nel KO (Figura 25, pannello a destra). Il numero delle neurosfere ottenute sembra essere direttamente proporzionale all'espressione di mSEL-1L, in quanto mentre le NSCs WT hanno formato all'incirca 4 neurosfere e le NSCs HET ne hanno costituite solamente 2, le NSCs KO non ne sono riuscite a generare alcuna (Figura 24 C). Un altro parametro estremamente importante da tenere sotto controllo è il diametro delle neurosfere, indice della loro capacità autorigenativa. Come si può osservare nella figura 25 D, effettivamente la dimensione delle neurosfere è direttamente correlata ai livelli di mSEL-1L, in quanto neurosfere più grandi (diametro di circa 120 μm) sono state osservate nella popolazione WT, mentre neurosfere più piccole (diametro di circa 70 μm) si sono costituite nel campione HET.

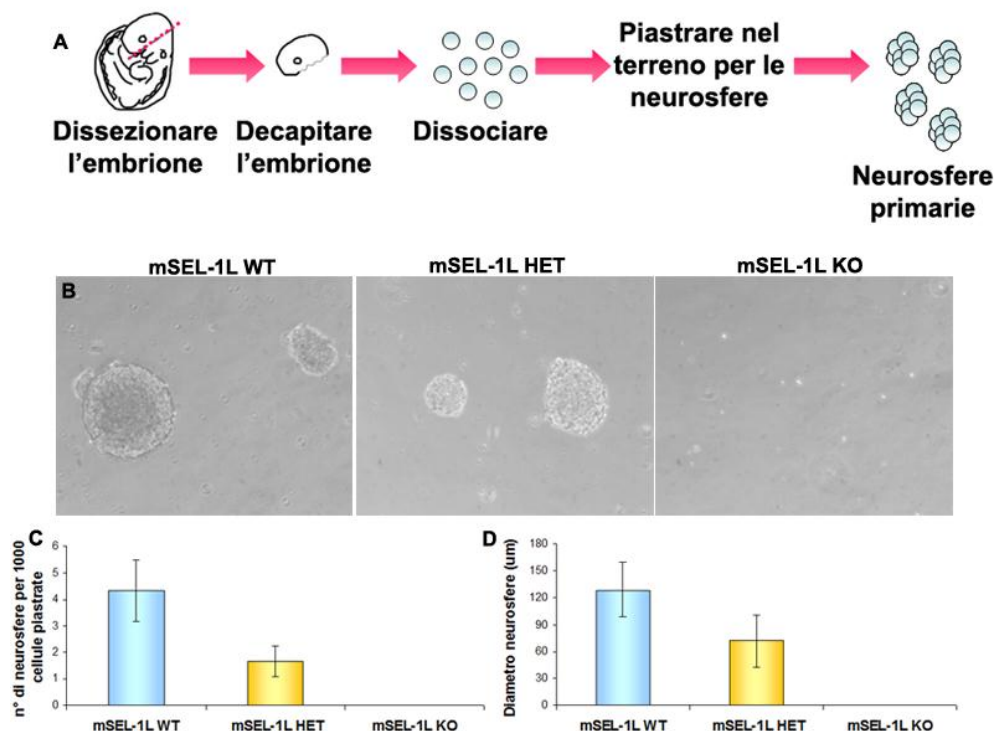


Figura 25. Il saggio di self-renewal delle NSCs mSEL-1L WT, HET e KO.

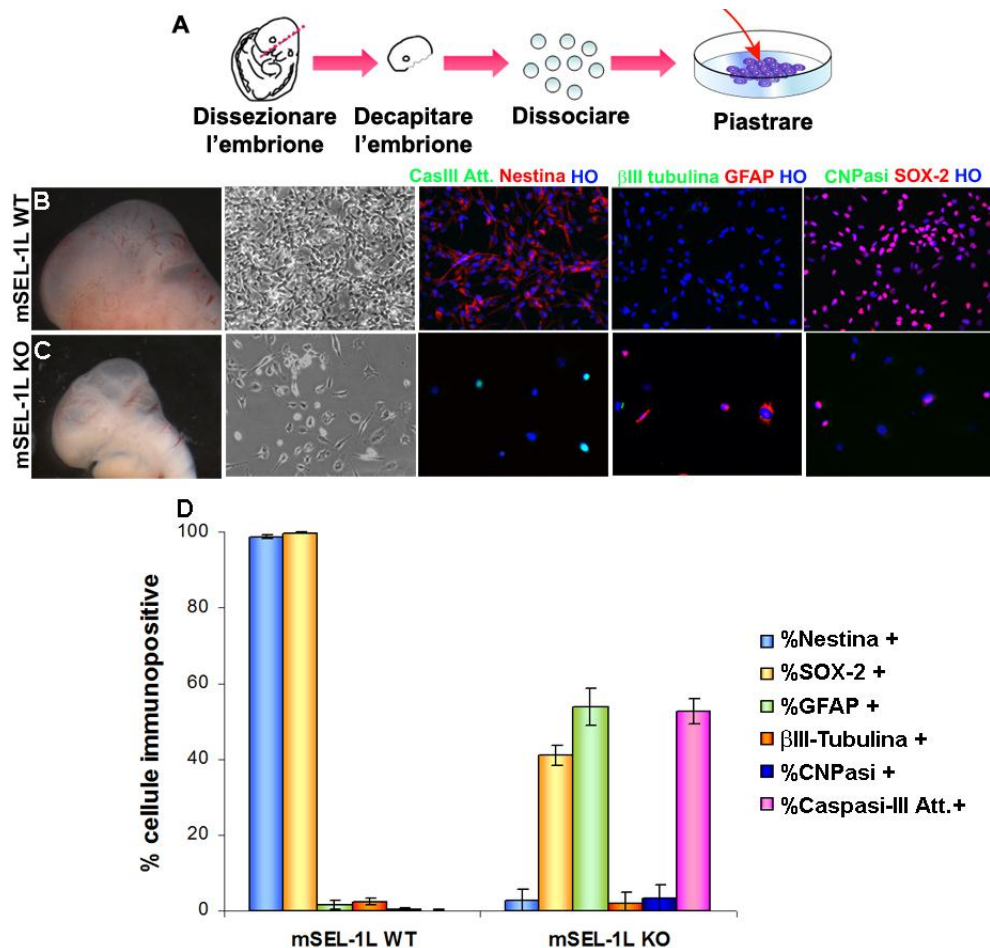
A) Partendo dal cervello appositamente dissezionato di embrioni mSEL-1L WT, HET e KO, è stata ottenuta una sospensione omogenea di cellule, piastrata in uno specifico mezzo di crescita in modo da sostenere la sopravvivenza delle NSCs e la formazione di neurosfere primarie. Queste ultime sono state dissociate e riseminate alla specifica densità di 1000 cellule/pozzetto in triplicato. **B**) Dopo

alcuni giorni si è assistito alla formazione di neurosfere secondarie nei campioni WT ed HET, ma non nel KO, rivelatosi del tutto in capace di ricostituire strutture cellulari tridimensionali. Valutando il numero delle neurosfere totali formatesi (C) ed il loro diametro mediante il software Leica Application Suite D), è emerso chiaramente che sussiste una correlazione diretta fra l'espressione di mSEL-1L e la capacità di self-renewal. Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 20X.

Al fine di escludere che la mancata proliferazione delle cellule derivanti dall'embrione mSEL-1L KO potesse derivare dalla metodica di coltura in sospensione sotto forma di neurosfere, si è cercato successivamente di generare linee cellulari omogenee di NSCs in grado di crescere in adesione. Come descritto nel capitolo "Materiali e Metodi", i precursori neurali primari sono stati dissociati dal telencefalo di embrioni murini mSEL-1L WT, HET e KO (E11.5) e coltivati nel tradizionale mezzo di espansione, favorendone l'adesione mediante utilizzo di una matrice di laminina (Figura 26 A). I dati relativi ai modelli HET non verranno mostrati in questo paragrafo, in quanto i risultati ottenuti sono comparabili a quelli riscontrati nel controllo. Rispetto agli embrioni mSEL-1L WT (Figura 26 B), il KO è caratterizzato da una corteccia telencefalica indubbiamente più sottile (Figura 26 C), costituita dunque da un numero inferiore di cellule totali e verosimilmente, stando ai dati mostrati nella figura 24, da un numero ridotto di precursori neurali. Infatti, poste in coltura, le cellule isolate dal feto mSEL-1L KO immediatamente hanno mostrato un estremo ritardo nella crescita, progredito successivamente in un vero arresto proliferativo dopo soli due passaggi. Se da un canto la popolazione di NSCs mSEL-1L WT ha rivelato la caratteristica morfologia associata ai precursori neurali, tipicamente bipolare e con corpo cellulare leggermente allungato (Figura 26 B), le NSCs completamente prive dell'espressione di mSEL-1L hanno esibito un fenotipo del tutto aberrante ed indicativo di uno stato differenziato (Figura 26 C). Un'analisi più approfondita ha confermato quanto precedentemente ipotizzato: infatti, le NSCs WT si sono rivelate omogeneamente immunopositive per i marcatori di staminalità Nestina e SOX-2, negative per l'espressione dei marker di differenziamento neuronale β III-Tubulina, astrocitario GFAP ed oligodendrogliale CNPasi (Figure 26 B e D). Differentemente, i precursori neurali derivati dal topo mSEL-1L KO si sono mostrati del tutto privi dell'espressione della Nestina e solo circa il 40% della popolazione è caratterizzato dall'espressione SOX-2, associata ad un concomitante differenziamento astrocitario precoce, vista l'immunopositività di circa il 50% della popolazione per la GFAP. Cellule β III-Tubulina- e CNPasi- positive si sono rivelate invece bassamente rappresentate (Figure 26 C e D). E' particolarmente interessante notare che la popolazione di precursori neurali mSEL-1L KO sia caratterizzata non solo da un arresto della crescita e da un differenziamento precoce, ma anche da un elevato tasso apoptotico, come testimonia l'espressione della forma attivata della Caspasi-III da parte del 50% della popolazione mSEL-1L KO (Figure 26 C e D), diversamente da quanto riscontrato nelle NSCs WT in cui l'apoptosi è praticamente assente (Figure 26 B e D). E' stata dunque condotta un'analisi di qRT-PCR al fine di quantificare in modo inequivocabile l'impatto avuto dalla completa deplezione di mSEL-1L sui principali geni chiave per la staminalità ed è emerso in maniera più evidente quanto già valutato *in vivo* dall'analisi della corteccia telencefalica del modello murino (Figura 24 C). Infatti, la deplezione di mSEL-1L ha provocato una

de-regolazione particolarmente significativa di HES-5 e meno vistosa dei marcatori neurali precoci PAX-6 ed OLIG-2 (Figura 26 E). Focalizzandosi particolarmente sul complesso *pathway* di Notch, si sono valutati anche i livelli della Neurogenina 2 (NGN-2), un importante gene in grado di promuovere la trascrizione dei principali fattori neuronali, la cui espressione nelle NSCs indifferenziate viene tenuta sotto controllo dall'inibitore trascrizionale HES-5, attivato appunto dal *signaling* di Notch. Nei sistemi cellulari analizzati, in modo del tutto concorde alla diminuzione dell'espressione di HES-5 dipendente dalla deplezione di mSEL-1L, è stato osservato un incremento significativo sia dei livelli di NGN-2 che di β III-Tubulina (Figura 26 E).

In definitiva, attraverso questi risultati *in vitro* si è riuscito a confermare e a rafforzare il concetto secondo cui la mancata espressione di mSEL-1L possa produrre degli effetti devastanti sulla proliferazione, sul mantenimento della staminalità e in definitiva sulla fondamentale proprietà di *self-renewal* delle NSCs, probabilmente alterando il corretto *signaling* di Notch.



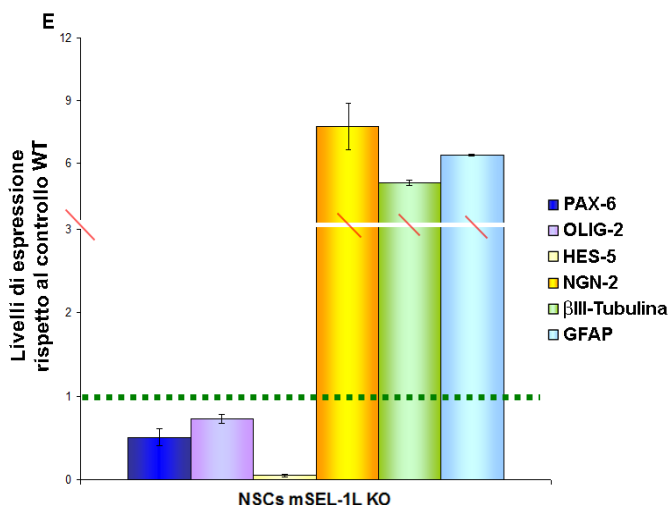


Figura 26. La deplezione di mSEL-1L nelle NSCs è associata alla perdita di staminalità. A) La corteccia telencefalica degli embrioni (E11.5) mSEL-1L WT, HET e KO è stata dissezionata al fine di purificare una popolazione di progenitori neurali, successivamente piastrati in medium di espansione su laminina. Mentre la morfologia cerebrale dell'embrione WT (**B**) si è rivelata del tutto normale, quella del modello KO (**C**) è risultata alquanto compromessa, soprattutto in termini di spessore corticale. **B)** Rapidamente è stata ottenuta una linea di NSCs stabili a partire dal campione mSEL-1L WT, caratterizzate da immunopositività per Nestina e SOX-2, ma non per la forma attivata della Caspasi-III, la GFAP, la βIII-Tubulina e il marcatore CNPasi. **C)** Nel caso delle NSCs mSEL-1L KO è stato evidenziato un arresto proliferativo, associato ad un discreto tasso apoptotico. La popolazione ha rivelato una quasi totale negatività per l'espressione delle Nestina, concomitante ad un prematuro differenziamento astrocitario, non associato tuttavia alla presenza di cellule βIII-Tubulina o CNPasi positive. Le immagini delle colture cellulari sono state acquisite con un obiettivo 20X, mentre la caratterizzazione immunofenotipica è stata effettuata al microscopio a fluorescenza mediante un obiettivo 63X. **D)** L'istogramma rappresenta la percentuale di cellule immunopositive per i diversi marcatori, analizzate su un totale di 800 cellule/vetrino nel caso del campione mSEL-1L WT e sull'intera popolazione (circa 100 cellule) nel caso delle NSCs mSEL-1L KO. Mentre Nestina e SOX-2 sono omogeneamente espresse nel controllo, le NSCs KO si sono contraddistinte per l'assenza di Nestina e per la presenza di SOX-2 solo nel 40% della popolazione. La GFAP è espressa nel 50% delle cellule mSEL-1L KO, mentre non è stata osservata nella linea WT. Entrambi i campioni sono caratterizzati da pochissime cellule βIII-Tubulina e CNPasi positive, mentre, diversamente dal controllo, le NSCs KO mostrano un tasso di positività per l'espressione della Caspasi-III pari al 50%. **E)** L'espressione di HES-5, PAX-6, OLIG-2, NGN-2 e βIII-Tubulina è stata analizzata nelle NSCs mSEL-1L WT e KO mediante qRT-PCR, utilizzando il SYBR-green. L'espressione di HES-5 è particolarmente ridotta in risposta alla deplezione di mSEL-1L, determinando di conseguenza l'incremento dei livelli di NGN-2 e βIII-Tubulina. Diversamente, i livelli di PAX-6 e OLIG-2 si sono rivelati solo parzialmente deregolati. Gli esperimenti sono stati effettuati tre volte in triplicato, normalizzando i

dati rispetto ai livelli di espressione del gene GAPDH. Ci si è avvalsi delle NSCs mSEL-1L WT come riferimento, utilizzando il metodo $\Delta\Delta Ct$ e calcolando successivamente media e deviazione standard.

2.3 Differenziamento delle NSCs mSEL-1L HET

Visti gli effetti del tutto devastanti promossi dalla completa deplezione di mSEL-1L nelle NSCs, si è provato a verificare l'esito di una parziale de-regolazione del gene. Dunque, le NSCs mSEL-1L WT sono state nucleofettate transientemente con un siRNA diretto contro l'esone 3 di mSEL-1L, come precedentemente descritto nel capitolo "Materiali e metodi". Nella figura 27 A si può notare che parallelamente ad una diminuzione dei livelli di mSEL-1L pari al 40% rispetto al controllo, si è potuto osservare un significativo incremento dell'espressione del marcatore astrocitario GFAP. Questo risultato richiama un dato molto interessante relativo alle NSCs derivate dall'embrione mSEL-1L HET, le quali, pur apparentemente del tutto comparabili alla linea cellulare WT, avendo un solo allele di mSEL-1L funzionale, mostrano ovviamente livelli del suo trascritto inferiori, associati ad un incremento dell'espressione della GFAP (Figura 27 B).

Sembra dunque che inducendo una lieve de-regolazione del messaggero di mSEL-1L si riesca comunque a preservare il fenotipo staminale, pur inducendo un incremento dei livelli del marcatore astrocitario. Al fine di verificare se ciò possa ripercuotersi in un'alterazione del potenziale differenziativo delle NSCs mSEL-1L HET, queste sono state sottoposte parallelamente alle NSCs mSEL-1L WT a specifiche condizioni colturali che ne promuovessero il differenziamento. Mentre il potenziale neurogenico non ha rivelato differenze nelle due linee (Figura 27, pannelli C e D), mostrando circa il 20% di cellule β III-Tubulina positive in entrambi i casi (Figura 27 I), il differenziamento gliale ha evidenziato delle disparità. Sebbene durante il differenziamento astrocitario sia le NSCs WT che HET siano caratterizzate da un'espressione basale considerevole della GFAP, solamente il 10% delle cellule WT è contraddistinto da una forte positività (Figure 27 E ed I), mentre ben il 20% delle NSCs HET ha mostrato tale intensa marcatura (Figura 27, pannelli F ed I). Inoltre, durante la maturazione oligodendrogliale, circa il 30% delle cellule WT è risultata positiva per il marcatore O4 (Figure 27 G ed I), mentre solamente il 10% lo esprime nella popolazione HET (Figure 27 H ed I).

Tali risultati indicano che la riduzione dei livelli di mRNA di mSEL-1L, sia prodotta artificialmente mediante siRNA, che verificata fisiologicamente nelle NSCs HET, ha provocato un incremento nell'espressione della GFAP in condizioni basali. Qualora venga stimolato il differenziamento, la presenza di un solo allele funzionale di mSEL-1L sembra promuovere una maturazione astrocitaria piuttosto che oligodendrogliale, senza però intaccare il potenziale neurogenico.

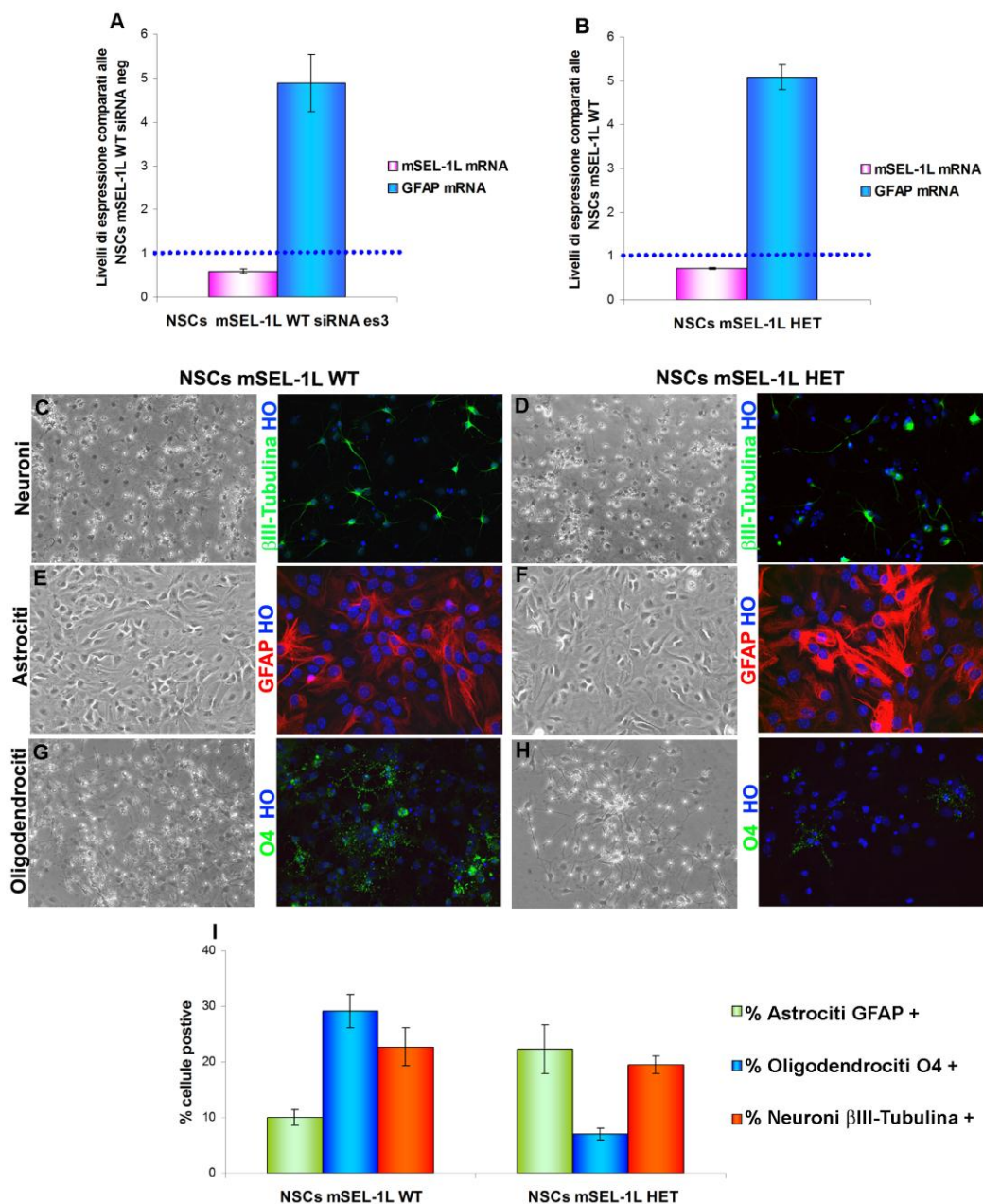


Figura 27. Le NSCs mSEL-1L HET differenziano preferenzialmente in astrociti e mostrano una ridotta propensione alla maturazione oligodendrogliale. A) Le NSCs mSEL-1L WT sono state nucleofettate con 250 pmoli di siRNA diretto contro l'esone 3 di mSEL-1L o con un siRNA che funge da controllo negativo. Dopo 48 ore, l'espressione di mSEL-1L e della GFAP sono state valutate mediante qRT-PCR, effettuando gli esperimenti per tre volte in triplicato ed utilizzando le cellule trasfettate con il controllo negativo del siRNA come riferimento. Si è potuto

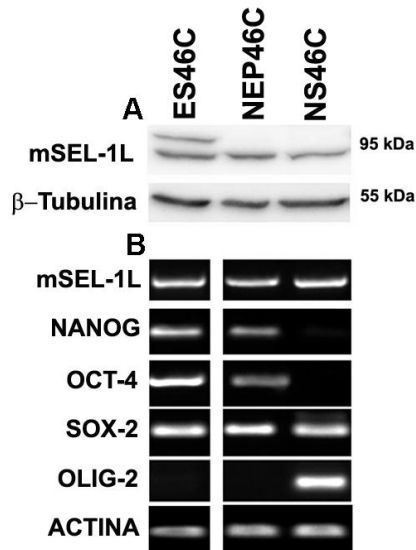
opportunamente valutare l'incremento dell'espressione del marcatore astrocitario in associazione alla de-regolazione di mSEL-1L. B) L'istogramma rappresenta i livelli di espressione di mSEL-1L e di GFAP nelle NSCs mSEL-1L HET, appositamente comparate al controllo WT mediante qRT-PCR, ripetendo gli esperimenti per tre volte in triplicato. Le NSCs HET sono ovviamente caratterizzate da livelli di espressione di mSEL-1L ridotti rispetto al controllo e da una concomitante elevata espressione di GFAP. Nelle analisi di qRT-PCR i dati sono stati normalizzati per i livelli di espressione del GAPDH, utilizzando il metodo $\Delta\Delta Ct$ e calcolando successivamente media e deviazione standard. C e D) Le NSCs mSEL-1L WT ed HET sono state sottoposte a differenziamento neuronale, originando all'incirca lo stesso numero di cellule βIII -Tubulina positive. E e F) La maturazione astrocitaria ha indotto un maggior accumulo di cellule GFAP positive nella linea eterozigote, mentre dopo differenziamento oligodendrogliale (G e H) le cellule esprimenti O4 prevalgono nella popolazione di controllo. Le immagini delle colture cellulari sono state acquisite con un obiettivo 20X, mentre per le analisi di immunofluorescenza si è utilizzato un obiettivo 63X. I) L'istogramma rappresenta il numero di NSCs mSEL-1L WT ed HET immunopositive per i diversi marcatori, valutate su un totale di circa 600 cellule analizzate in 5 differenti campi, scelti in modo arbitrario. Dopo il calcolo della media fra i diversi dati ottenuti, è stata appositamente definita la deviazione standard. Le cellule risultate intensamente GFAP immunopositive rappresentano il 10% nella popolazione WT ed il 20% in quella HET. Durante la maturazione oligodendrogliale, la popolazione mSEL-1L HET ha mostrato un numero di cellule O4 positive 3 volte maggiore rispetto al controllo. Il numero di neuroni βIII -Tubulina positivi è approssimativamente lo stesso nelle due linee di NSCs analizzate.

2.4 Espressione di mSEL-1L durante la neuralizzazione

Purtroppo, data la letalità del modello murino mSEL-1L KO in fase embrionale, oltre che descrivere il vistoso impoverimento del *pull* di progenitori neurali, non è possibile effettuare analisi *in vivo* più approfondite in merito al reale contributo di tale gene nelle prime fasi di sviluppo del SNC. Per questo motivo, si è deciso di investigare il ruolo di mSEL-1L durante il processo di neuralizzazione utilizzando un sistema di differenziamento *in vitro* a partire da cellule embrionali (ES46C) murine. Durante tale maturazione, è possibile generare una popolazione ben definita di progenitori neurali precoci (NEP46C) SOX-1 positivi [148] e successivamente NSCs *radial glia-like* (NSC46C) [55, 19]. L'espressione della proteina mSEL-1L è estremamente precoce durante lo sviluppo, essendo, infatti, rilevata già nella popolazione di cellule embrionali (Figura 28 A) sottoforma di un doppietto, in cui la banda a peso molecolare maggiore potrebbe rappresentare una specifica forma di modificazione post-traduzionale, in particolar modo una variante poli-glicosilata [149]. Anche il messaggero di mSEL-1L è stato evidenziato nelle tre differenti popolazioni (Figura 28 B), per ognuna delle quali è stata verificata l'espressione dei relativi marcatori *stage-specific*, quali NANOG, espresso dalle ESCs e NEPs; OCT-4, la cui espressione, particolarmente intensa nelle ECSs, diminuisce nelle NEPs ed è assente nelle NSCs; SOX-2 che permane durante la neuralizzazione ed OLIG-2, tipicamente espresso dalle NSCs *radial glia-like* (Figura 28 B). Poiché le ES46C sono una particolare linea transgenica in cui il

gene codificante per l' eGFP è sotto il controllo del promotore di SOX-1 [148], è stato possibile monitorare l'efficienza della neuralizzazione seguendo appunto l'espressione del reporter. Come atteso, solamente le NEPs sono apparse positive per eGFP/SOX-1 (Figura 28 D), differentemente dalle ES46C (Figura 28 C) e NS46C (Figura 28 E). Le cellule embrionali sono costituite da una popolazione piuttosto omogenea sia nella morfologia che nell'espressione di OCT-4; inoltre mSEL-1L risulta essere altamente espressa a livello di ogni singola cellula con il caratteristico pattern reticolare-citoplasmatico, mentre il marcatore neurale Nestina è del tutto assente (Figura 28 C). L'analisi di immunofluorescenza ha invece rivelato che le NEP46C sono negative per OCT-4 e positive per Nestina, mentre l'espressione di mSEL-1L si è confermata particolarmente intensa (Figura 28 D). Infine, la linea di NS46C ottenuta al termine nella neuralizzazione ha evidenziato un'omogenea espressione di Nestina e mSEL-1L, e negatività per OCT-4 (Figura 28 E).

Nel complesso, questi risultati dimostrano che l'espressione di mSEL-1L è associata sia allo stato di pluripotenza che a quello di multipotenza, rimanendo particolarmente intensa nel *lineage* neurale.



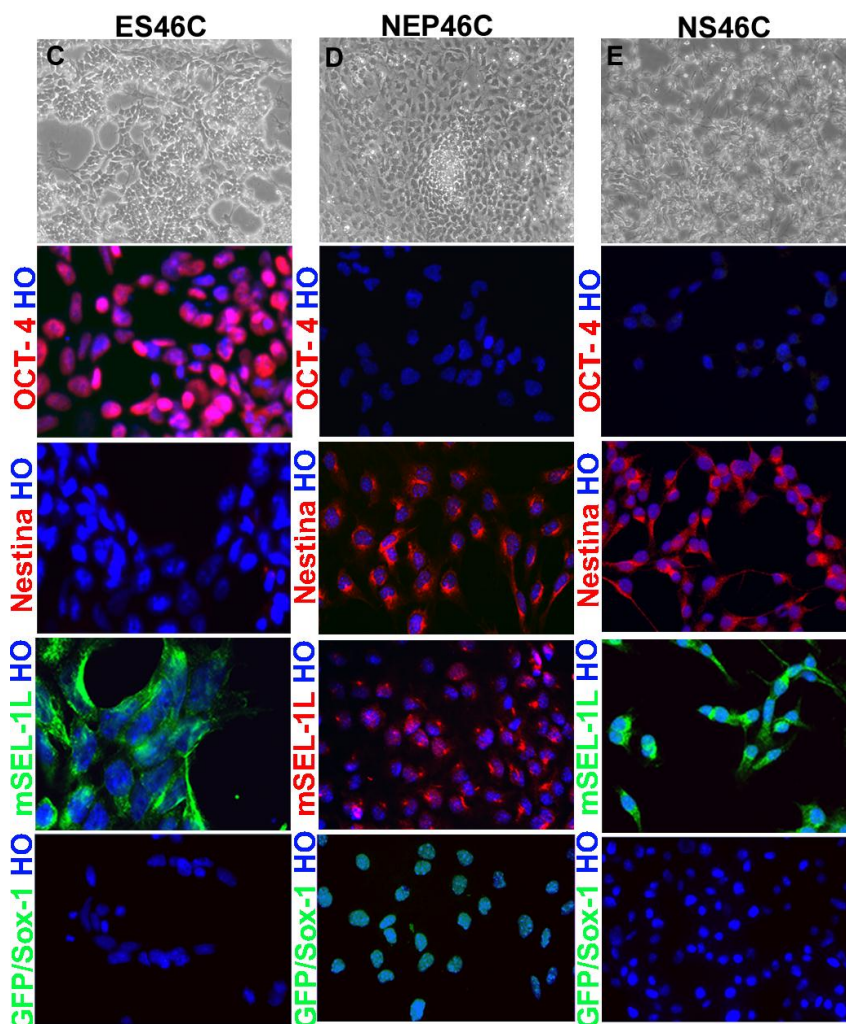


Figura 28. Espressione di mSEL-1L durante la neuralizzazione. **A)** L'analisi di western blot condotta sui listati proteici delle cellule ES46C, NEP46C e NS46C (25 μ g) ha rivelato la persistenza di mSEL-1L (95 kDa) nel corso del processo di neuralizzazione. Tuttavia, una differente variante proteica di 105 kDa è stata rilevata esclusivamente nel campione delle ESCs prima del differenziamento. La β -Tubulina è stata utilizzata come controllo di equo carico. **B)** Attraverso un'analisi di RT-PCR è stato possibile valutare la de-regolazione dei geni NANOG e OCT-4 durante la neuralizzazione, fino alla loro completa scomparsa nella linea di NSCs. mSEL-1L e SOX-2, invece, sono rimasti ugualmente espressi, mentre OLIG-2 è rilevabile esclusivamente nelle NS46C. L'ACTINA è stata utilizzata come gene housekeeping. **C)** Le ES46C hanno creato tipiche colonie di cellule staminali embrionali murine, mostrando un'omogenea espressione sia di OCT-4 che di mSEL-1L, mentre non hanno esibito immunopositività per la Nestina e sono caratterizzate da inattività del il promotore di SOX-1. **D)** Dopo esposizione a specifiche condizioni in grado di indurre il fenotipo neurale, è stata generata una

popolazione di NEPs OCT-4 negative e Nestina positive, le quali sono caratterizzate da elevati livelli di mSEL-1L e hanno il promotore di SOX-1 attivo. E) La popolazione di NSCs radial glia-like non esprime OCT-4 e SOX-1, ma mostra livelli elevati di Nestina e mSEL-1L. Le immagini delle colture cellulari sono state acquisite con un obiettivo 20X, mentre per la caratterizzazione in fluorescenza si è utilizzato un obiettivo 63X.

2.5 mSEL-1L ed il differenziamento delle NSCs

Come precedentemente descritto, l'espressione di mSEL-1L sembra essere particolarmente precoce nelle cellule staminali, permanendo fino allo stadio di NSCs. E' molto interessante notare che nelle cellule NS46C *radial glia-like* mSEL-1L co-esprime e co-localizzi con il marcatore di staminalità Nestina (Figura 29 A), mostrando un pattern di espressione molto peculiare, polarizzato lungo una sola estremità cellulare. Solamente in una piccola percentuale della popolazione (circa 2-3 %) si può apprezzare la co-espressione delle due proteine, ma non la stessa localizzazione subcellulare (Figura 29 A, inserto superiore, indicato con la punta di una freccia). Si tratta di cellule più grandi, contraddistinte da una morfologia poligonale, non ancora ben caratterizzate, probabilmente indicative di quell'esigua frazione cellulare che sta andando incontro a spontanea perdita della multipotenza. Inoltre, queste due proteine associate alla staminalità, si distribuiscono esattamente allo stesso modo durante la divisione cellulare simmetrica nelle due cellule figlie (Figura 29 A, inserto inferiore, indicato con una freccia). Si è dunque successivamente deciso di analizzare l'espressione di mSEL-1L durante il differenziamento terminale delle NSCs in astrociti, oligodendrociti e neuroni. L'analisi di western blot riportata in figura 29 B, mostra un profilo di espressione di mSEL-1L del tutto comparabile a quello della Nestina, in quanto le due proteine vengono evidenziate solamente nella popolazione cellulare immatura o scarsamente differenziata, mentre vengono silenziate nella progenie matura. A conferma di questi dati biochimici, le analisi di immunofluorescenza hanno mostrato che mSEL-1L è espressa dall'intera popolazione di NSCs indifferenziate, simultaneamente a SOX-2 e Nestina (Figura 29 C), mentre la sua espressione decade completamente, così come quella della Nestina, negli astrociti GFAP positivi (Figura 29 D), negli oligodendrociti O4 positivi (Figura 29 E) e nei neuroni β III-Tubulina positivi (Figura 29 F). Solamente rarissime cellule nelle colture differenziate ritengono una residua immunoreattività per mSEL-1L, rappresentando probabilmente una limitata percentuale della popolazione ancora immatura. Dunque, il pattern di espressione di mSEL-1L si mostra profondamente modulato durante la maturazione terminale delle NSCs, indicando che la presenza della proteina è associata essenzialmente ad uno stato staminale (pluripotenza/multipotenza). Se da un canto la sua manipolazione ectopica compromette le proprietà più fondamentali di una cellula staminale, dall'altro, in condizioni fisiologiche, la sua de-regolazione ed infine il suo completo silenziamento è richiesto dal sistema cellulare per promuoverne e consentirne il differenziamento.

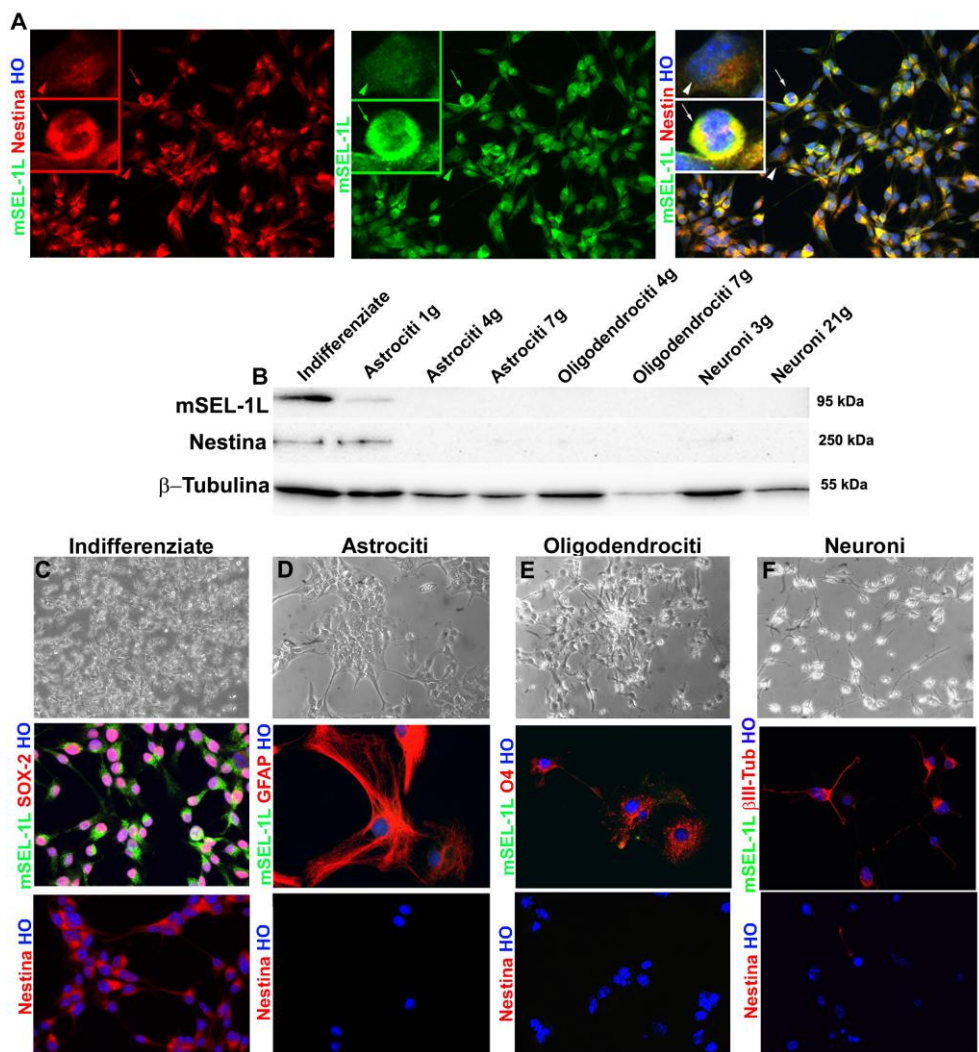


Figura 29. L'espressione di mSEL-1L durante il differenziamento delle NSCs.
A) Le cellule NS46C sono caratterizzate sia dall'espressione di mSEL-1L che da quella della Nestina: le due proteine co-localizzano in quasi tutta la popolazione, mostrando lo stesso pattern di espressione polarizzato. In pochissime cellule (indicate con la punta di una freccia, inserto superiore) si può osservare co-espressione, ma non co-localizzazione. Durante la divisione cellulare, la distribuzione di mSEL-1L e Nestina nelle due cellule figlie è perfettamente comparabile (indicato con una freccia, inserto inferiore). Le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza con un obiettivo 63X. **B)** L'analisi di western blot è stata condotta su 20 µg di lisati proteici ottenuti in seguito al differenziamento delle cellule NSC46. Sia mSEL-1L che la Nestina vengono rapidamente silenziate nel corso della maturazione astrocitaria (dopo 1, 4 e 7 giorni), oligodendrogliale (dopo 4 e 7 giorni) e neuronale (dopo 3 e 21 giorni). La β-Tubulina è stata utilizzata come controllo di un equo carico. **C)** Le cellule NS46C

coltivate in condizioni che ne garantiscano il self-renewal sono omogeneamente immunoreattive per mSEL-1L ed i marcatori staminali SOX-2 e Nestina. In seguito all'esposizione a specifiche condizioni colturali, queste hanno acquisito un fenotipo astrocitario (**D**), divenendo GFAP positive, mSEL-1L e Nestina negative. **E**) Il differenziamento oligodendrogliale ha promosso la formazione di una popolazione cellulare O4 positiva, mSEL-1L e Nestina negativa, mentre la maturazione neuronale (**F**) ha determinato la perdita di immunoreattività per mSEL-1L e Nestina e la positività per la β III-Tubulina. Le fotografie delle colture cellulari sono state effettuate con un obiettivo 20X, mentre quelle in fluorescenza sono state acquisite utilizzando un obiettivo 100X ad immersione.

2.6 Regolazione di mSEL1-1L da parte del mmu-miR-183

Sebbene durante la maturazione delle NSCs la proteina mSEL-1L venga rapidamente de-regolata, fino a divenire del tutto assente sia *in vivo* che *in vitro*, i livelli del suo messaggero rimangono del tutto inalterati sia nel cervello adulto (Figura 30 A), che negli astrociti, oligodendrociti e neuroni maturi (Figura 30 B). Questo dato apparentemente del tutto contraddittorio, indica la presenza di un sistema di regolazione differente fra il messaggero e la proteina da esso codificata. In primo luogo si è esaminata l'ipotesi secondo cui durante il differenziamento la proteina mSEL-1L potesse essere affetta da una certa destabilizzazione che ne promuovesse una rapida degradazione. Per verificare tale supposizione, le cellule NS46C sono state sottoposte ad un pretrattamento con FBS in assenza di agenti mitogeni per 2 ore, come descritto nel capitolo "Materiali e Metodi". Successivamente, verificato che tale *commitment* astrocitario avesse determinato la riduzione del 25% dei livelli proteici di mSEL-1L, le cellule sono state trattate con cicloesimide per valutare il tasso degradativo della proteina. Le NSCs indifferenziate hanno rivelato una riduzione di mSEL-1L del 30% dopo 4 ore e del 40% dopo 7 ore di trattamento, delineando il suo *turn-over* fisiologico. Le cellule stimulate ad intraprendere una maturazione astrocitaria, sia trattate che non trattate con cicloesimide, hanno rivelato lo stesso andamento dei livelli proteici di mSEL-1L, ad indicare che la de-regolazione della proteina durante il differenziamento astrocitario non è dovuto ad un processo degradativo, quanto piuttosto ad un'inibizione della sintesi proteica *de novo*.

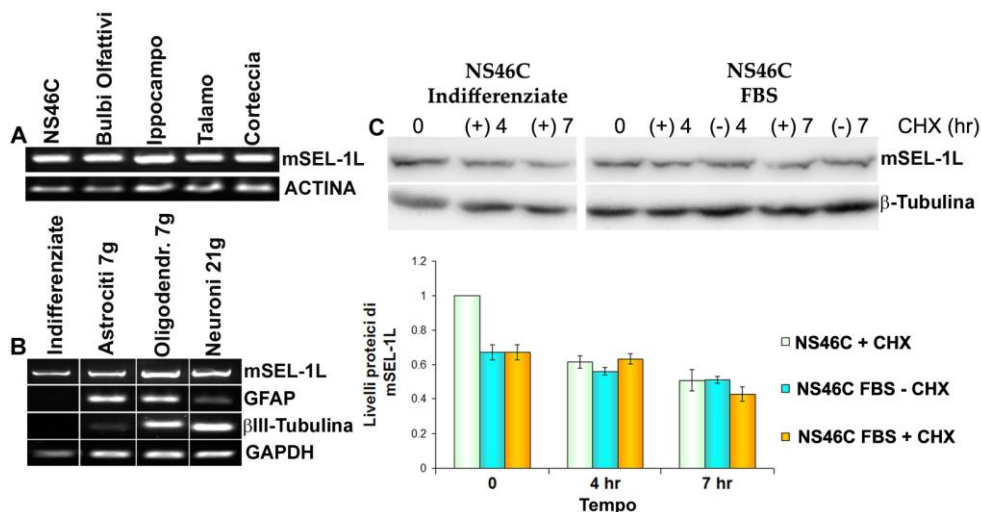


Figura 30. Il messaggero di mSEL-1L permane durante il differenziamento delle NSCs. **A)** L'analisi di RT-PCR ha mostrato che in diverse porzioni del cervello murino adulto, i livelli del messaggero di mSEL-1L rimangono invariati rispetto a quelli riscontrati nelle NSCs indifferenziate (cellule NS46C). L'ACTINA è stata utilizzata come gene housekeeping. **B)** L'RT-PCR ha rivelato che durante il differenziamento delle cellule NS46C, mentre i livelli dei marcatori di differenziamento GFAP e βIII-Tubulina aumentano sensibilmente, il messaggero di mSEL-1L non cambia negli astroci (7 giorni di maturazione), negli oligodendrociti (7 giorni di maturazione) e nei neuroni (21 giorni di maturazione), rispetto al controllo costituito dalle stesse cellule indifferenziate. Il GAPDH è stato utilizzato come gene housekeeping. **C)** Le cellule NS46C sono state espanse in condizioni adeguate a preservarne il self-renewal e successivamente sono state esposte alla presenza di FBS, eliminando i fattori di crescita. Dopo 2 ore, sono state trattate con cicloesimide (200 μg/ml) per 4 e 7 ore. L'analisi di western blot ha mostrato che le cellule indirizzate a differenziare in astroci, trattate o non trattate con cicloesimide, hanno esibito la stessa diminuzione dei livelli di mSEL-1L, indicando che la de-regolazione della proteina durante il differenziamento non è attribuibile ad un aumento della sua degradazione. La β-Tubulina è stata utilizzata come controllo di equo carico. L'istogramma mostra i livelli di espressione della proteina mSEL-1L normalizzati rispetto alla β-Tubulina ed espressi relativamente al controllo (cellule NS46C indifferenziate). I risultati sono frutto della media di due diversi esperimenti.

A questo punto si sono analizzate ulteriori ipotesi che potessero giustificare la destabilizzazione della proteina mSEL-1L senza provocare la concomitante alterazione dei livelli del suo messaggero. L'attivazione dei microRNA rappresenta un particolare meccanismo epigenetico che può regolare a livello post-trascrizionale la sintesi proteica, senza alterare la trascrizione, producendo effetti importantissimi nei processi di differenziamento e self-renewal delle cellule staminali [150]. Per questi motivi si è deciso di effettuare una prima analisi bioinformatica al fine di evidenziare nella sequenza di mSEL-1L eventuali regioni consenso per specifici microRNA. Il 3'UTR di mSEL-1L è particolarmente lungo

mSEL-1L appare conservato in ben 19 specie (M. Musculus, H. sapiens, P. troglodytes, M. mulatta, R. Norvegicus, C. porcellus, O. cuniculus, S. araneus, E. europaeus, C. familiaris, E. caballus, B. taurus, D. novemcinctus, L. africana, E. telfairi, M. domestica, O. anatinus, A. carolinensis, G. gallus) ed il punteggio che lo specifico algoritmo ha assegnato al legame è particolarmente buono. B) Il programma MicroCosm ha identificato un potenziale sito di binding per il mmu-miR-183 nella sequenza genomica di mSEL-1L. L'algoritmo del tool computazionale prevede allineamenti dinamici per evidenziare siti del gene target caratterizzati da un'elevata complementarità con il miRNA, attribuendo uno specifico punteggio che tiene particolarmente conto della complementarità al 5' del miRNA. I siti target così identificati sono sottoposti ad una successiva analisi per stimarne la stabilità termodinamica. Successivamente viene inoltre verificato se il sito nel 3'UTR è conservato nelle specie ortologhe, considerando che un buon candidato dovrebbe essere conservato in almeno due di esse. Nel caso di mSEL-1L, il programma ha evidenziato la conservazione del sito di legame del mmu-miR-183 in ben 7 specie (M. musculus, R. norvegicus, B. taurus, C. familiaris, M. mulatta, M. domestica, O. Anatinus).

A questo punto è stata effettuata un'analisi preliminare circa l'espressione del mmu-miR-183, dalla quale è emersa la sua abbondanza nel sistema nervoso centrale dell'adulto rispetto a quanto riscontrato nelle NSCs indifferenziate (Figura 32 A). Inoltre, anche *in vitro*, durante la maturazione delle NS46C in astrociti, oligodendrociti e neuroni, l'espressione del mmu-miR-183 risente di una significativa sovra-regolazione nel corso del differenziamento (Figura 32 B). Questo dato risulta estremamente importante poiché appare evidente che laddove la proteina mSEL-1L venga silenziata, diversamente dal suo messaggero, l'espressione del mmu-miR-183 subisce un incremento. La correlazione inversa fra mSEL-1L e il microRNA è evidente anche comparando le linee di NSCs mSEL-1L WT e HET precedentemente descritte. Nonostante ovviamente la linea HET abbia un solo allele di mSEL-1L funzionale, sorprendentemente l'espressione della proteina è del tutto comparabile a quella del controllo (Figura 32 C). Analizzando le ragioni di tale discrepanza, si è riscontrato che il mmu-miR-183 è drasticamente sotto-espresso nelle NSCs mSEL-1L HET, consentendo dunque di preservare gli stessi livelli proteici tipici di una linea WT, pur in presenza di un quantitativo di messaggero inferiore (Figura 32 D).

Nel complesso, tali dati associano la proteina mSEL-1L, ma non il suo mRNA, al mmu-miR-183 mediante una caratteristica correlazione inversa.

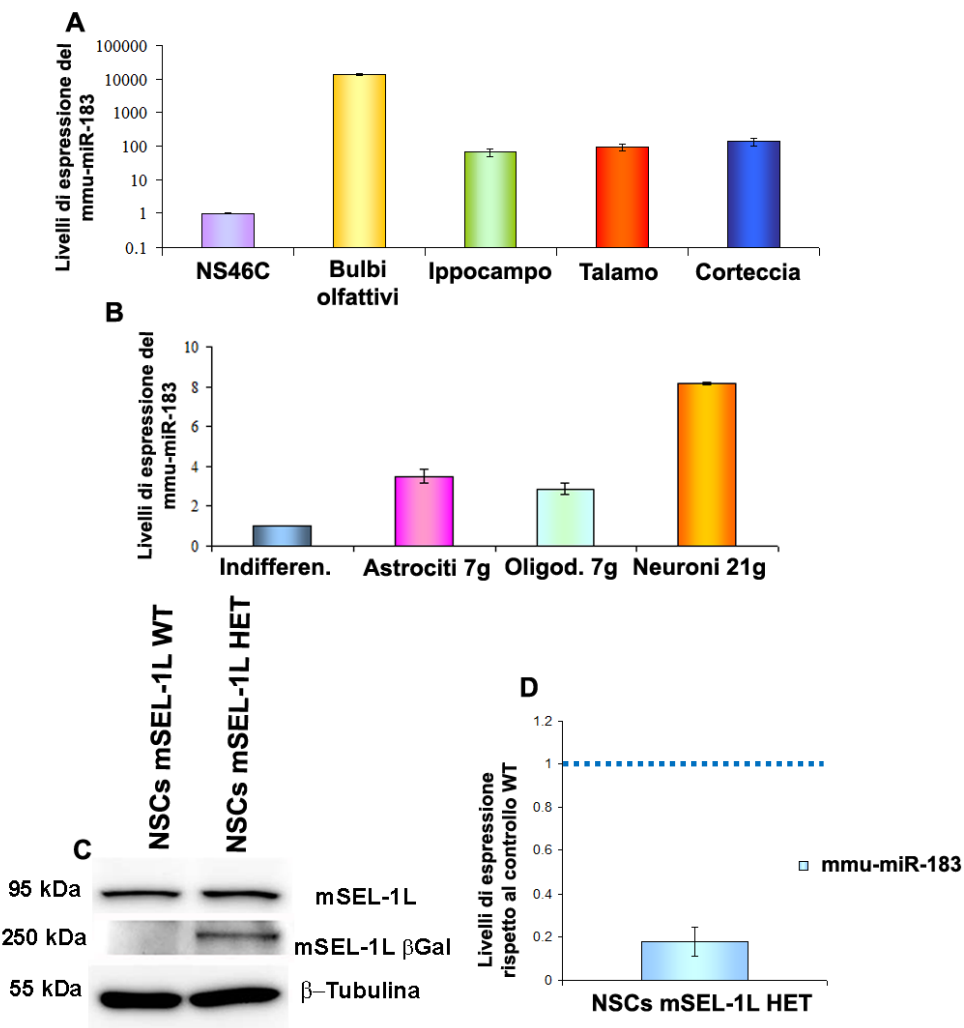
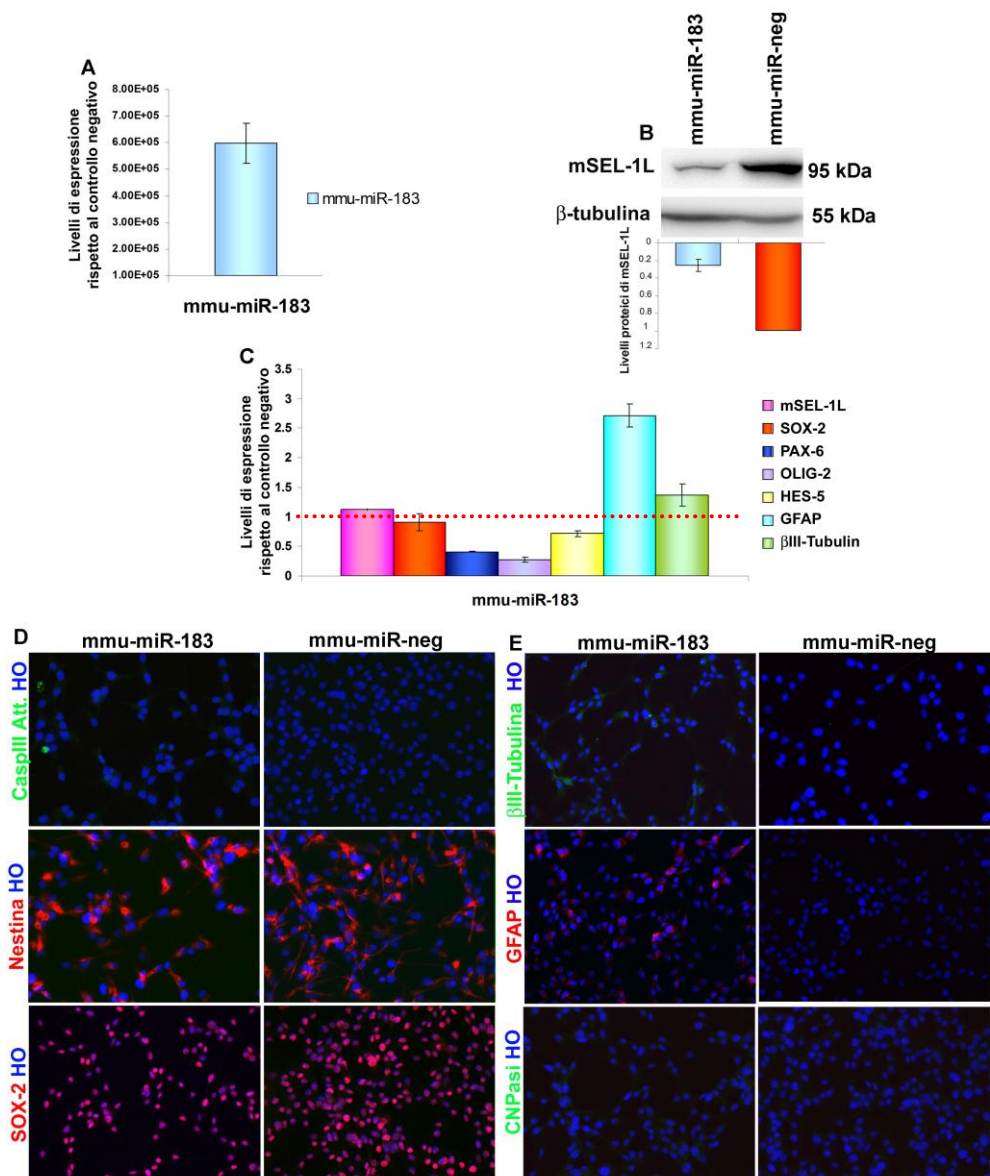


Figura 32. L'espressione del mmu-miR-183 correla inversamente con i livelli proteici di mSEL-1L sia in vivo che in vitro. A) L'analisi di qRT-PCR condotta mediante saggio TaqMan ha evidenziato che l'espressione del mmu-miR-183 è particolarmente elevata in diverse porzioni del cervello murino adulto (bulbi olfattivi, ippocampo, talamo, corteccia), a differenza di quanto riscontrato nel controllo di NSCs indifferenziate in cui il miRNA è presente a bassissimi livelli. **B)** L'espressione del mmu-miR-183 valutata attraverso qRT-PCR subisce un aumento significativo in seguito al differenziamento delle cellule NS46C in astrociti, oligodendrociti e neuroni. I dati presentati sono frutto della media di tre esperimenti ripetuti in triplicato in cui lo snoRNA202 è stato utilizzato come normalizzatore e le NS46C indifferenziate come campione di riferimento. **C)** L'analisi di western blot condotta sui lisati proteici delle NSCs mSEL-1L WT ed HET ha mostrato la presenza di livelli comparabili della proteina mSEL-1L (95 kDa) in entrambi i campioni, mentre la proteina di fusione evidenziata dall'anticorpo diretto contro la β-gal (250 kDa) è stata identificata esclusivamente nella linea HET. La β-Tubulina

è stata utilizzata come controllo di equo carico. D) L'istogramma rappresenta i bassissimi livelli di espressione del mmu-miR-183 nella linea di NSCs mSEL-1L HET, appositamente comparati a quelli della linea WT. Lo stesso esperimento è stato ripetuto per 2 volte in triplicato mediante un saggio TaqMan, utilizzando lo snoRNA202 come normalizzatore e le NSCs WT come riferimento.

Al fine di valutare concretamente i possibili effetti regolatori esercitati dal mmu-miR-183 sulla proteina mSEL-1L, le cellule NS46C sono state nucleofettate con il precursore del miR-183 (pre-miR-183) e successivamente è stata analizzata l'espressione della proteina. Dopo 48 ore dalla trasfezione si è evidenziato un proficuo processamento del precursore del miRNA: i livelli della sua forma matura sono stati sovra-regolati 6×10^5 volte rispetto al controllo (Figura 33 A). In questo contesto, grazie all'azione del mmu-miR-183, è stata verificata una riduzione dell'espressione mSEL-1L di ben 3 volte (Figura 33 B), senza alcuna alterazione dei livelli del suo messaggero (Figura 33 C). La de-regolazione della proteina non ha determinato un'alterazione apprezzabile dei livelli della β III-Tubulina e di SOX-2, ma ha comportato una diminuzione dell'espressione di HES-5 e più marcatamente di quella di PAX-6 ed OLIG-2. Inoltre, l'espressione del gene GFAP è stata indotta di ben 2.5 volte rispetto al campione di controllo (Figura 33 C). Gli effetti della de-modulazione di mSEL-1L causata dall'espressione ectopica del mmu-miR-183 sono stati valutati anche mediante immunofluorescenza, al fine di analizzare individualmente le singole cellule. Il numero delle NSCs apoptotiche positive per la forma attivata della Caspasi-III ha risentito di un incremento di 3 volte in seguito alla de-regolazione di mSEL-1L (Figure 33 D pannello superiore e F), mentre l'immunopositività per Nestina (Figure 33 D pannello centrale e F) e SOX-2 (Figure 33 D pannello inferiore e F) non ha mostrato variazioni rispetto al controllo. Differentemente, le cellule β III-Tubulina (Figure 33 E pannello superiore e F) e particolarmente quelle GFAP positive (Figure 33 D pannello intermedio e F) sono molto più rappresentate nella popolazione cellulare in cui il mmu-miR-183 è stato sovra-espresso, mentre non sono state rilevate cellule positive per il marcatore oligodendrogliale CNPasi (2', 3'-ciclico nucleotide 3'-fosfodiesterasi) (Figure 33 E pannello inferiore e F). Nell'insieme, questi dati indicano che il mmu-miR-183, agendo come regolatore negativo della traduzione della proteina mSEL-1L, possa essere responsabile di un'alterazione del *self-renewal* e di un prematuro indirizzamento verso un *fate* astrogliale.



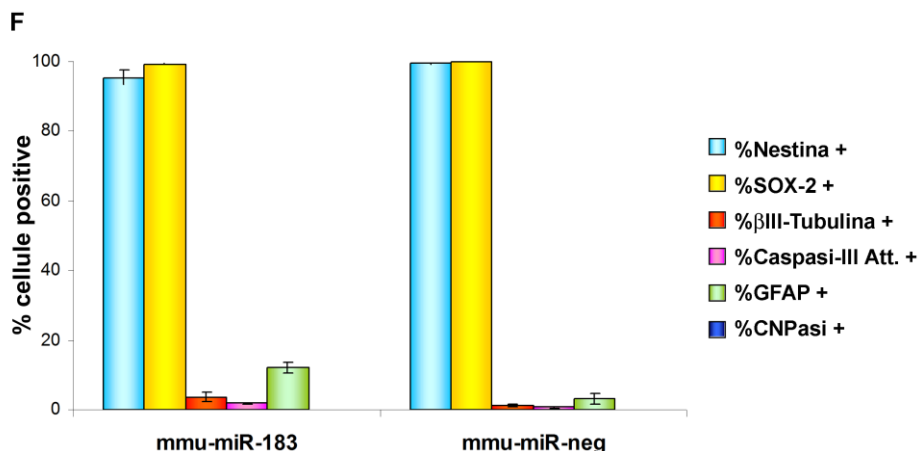


Figura 33. La sovra-espressione del mmu-miR-183 determina la diminuzione dei livelli proteici di mSEL-1L. Le cellule NS46C sono state nucleofettate con il pre-miR-183 ed un pre-miR-controllo negativo. **A)** Dopo 48 ore, il campione cellulare che sovra-esprime il miR-183 ha mostrato un innalzamento dei livelli della sua forma matura di ben 6×10^5 volte. L'esperimento è stato effettuato 3 volte in triplicato mediante saggio TaqMan, utilizzando lo snoRNA202 come normalizzatore e le NSCs mSEL-1L WT trasfettate con il pre-miR-controllo negativo come riferimento. **B)** L'analisi di western blot ha mostrato una riduzione dei livelli di mSEL-1L del 70% in seguito a sovra-espressione del mmu-miR-183. La β -Tubulina è stata utilizzata come normalizzatore per l'analisi densitometrica riportata nell'istogramma, frutto della media di tre esperimenti indipendenti. **C)** Il grafico riporta i risultati del saggio di qRT-PCR condotto: i livelli dei messaggeri di mSEL-1L, β III-Tubulina e SOX-2 non risultano alterati, mentre l'espressione della GFAP viene indotta in seguito ad espressione ectopica del mmu-miR-183. HES-5, PAX-6 ed OLIG-2 risentono, invece, di un'apprezzabile de-regolazione nel campione trasfettato con il pre-miR-183. Le analisi sono state ripetute 3 volte in triplicato, normalizzando i dati rispetto ai livelli di espressione del gene GAPDH, utilizzando come riferimento le NSCs WT trasfettate con il pre-miR-controllo negativo. Ci si è avvalsi del metodo $\Delta\Delta Ct$ e si sono successivamente calcolate la media e deviazione standard. **D)** La popolazione overesprimente il mmu-miR-183 ha rivelato un quantitativo di cellule positive per la forma attivata della Caspasi-III maggiore rispetto al controllo, mentre l'espressione di Nestina e quella di SOX-2 non sembrano essere alterate. **E)** Le cellule β III-Tubulina e soprattutto quelle GFAP positive sono aumentate in seguito ad espressione ectopica del mmu-miR-183, mentre non è stato possibile rilevare nessuna cellula CNPasi positiva. **F)** L'istogramma rappresenta il numero di cellule immunopositive per i diversi marcatori, analizzate in 5 differenti campi scelti arbitrariamente, valutando all'incirca 1000 cellule per vetrino e calcolandone successivamente la media e la deviazione standard. Sebbene sia Nestina che SOX-2 non siano affette dalla sovra-espressione del mmu-miR-183, le cellule β III-Tubulina sono aumentate di 3 volte, le cellule positive per la forma attivata della Caspasi-III hanno risentito di un incremento di 3 volte rispetto al controllo, mentre il numero di cellule GFAP positive si è accresciuto di ben 4 volte. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato

e le immagini al microscopio fluorescenza sono state acquisite con un obiettivo 63X.

3. Caratterizzazione della relazione fra mSEL-1L e Notch

I dati fin'ora raccolti testimoniano concordemente l'estrema importanza rivestita da mSEL-1L nell'ambito dello sviluppo embrionale e nella biologia della cellula staminale. In particolar modo, è emerso che la mancata espressione della proteina possa causare una serie di fenomeni deleteri a valle che culminano nella perdita della staminalità e nella morte stessa delle NSCs. L'analisi del fenotipo correlato alla deplezione di mSEL-1L, sia *in vivo* che *in vitro*, ha portato ad evidenziare una correlazione molto stretta fra questa proteina e Notch, un vero e proprio *master gene* dal ruolo strategico nel preservare il *self-renewal* e dirigere il *fate* cellulare. Si è deciso dunque di approfondire e sviscerare la relazione esistente fra mSEL-1L e Notch, in modo tale da chiarire il contributo che una proteina ha sull'azione dell'altra. Infatti, uno dei primi lavori scientifici in merito al gene *sel-1* in *C. elegans* ha effettivamente evidenziato una relazione funzionale tra le due proteine nell'ambito del *fate* cellulare [132]. Si è dunque voluto esplorare se tale legame fosse conservato negli organismi superiori, visto anche il fenotipo del modello murino mSEL-1L KO estremamente simile a quello riscontrato nei topi transgenici affetti da alterazioni nel *signaling* di Notch [151-153].

3.1 La de-regolazione di mSEL-1L e il *signaling* di Notch-1

Come emerso nei capitoli precedenti, lo studio approfondito e dettagliato in merito alla funzione di mSEL-1L nell'ambito delle NSCs risente purtroppo di una serie di limitazioni. Infatti, sia *in vivo* che *in vitro*, le analisi si scontrano contro il muro della letalità generata dalla deplezione totale della proteina. Volendo studiare gli effetti di una sua de-regolazione parziale, le NSCs mSEL-1L HET non rappresentano un valido strumento. Infatti, sembra che, sfruttando le più semplici leggi Darwiniane, venga a selezionarsi una popolazione in cui, pur essendoci livelli di mRNA inferiori, si riesca ad esprimere un'elevata quantità di proteina grazie alla de-regolazione del mmu-miR-183. Gli esperimenti di siRNA, per la natura stessa di tale tecnica, consentono di valutare solamente gli effetti del silenziamento a breve termine. Si è deciso dunque di generare una linea stabile di NSCs in cui mSEL-1L sia costantemente interferita grazie alla presenza di un plasmide contenente la sequenza di uno shRNA diretto contro il suo messaggero, in modo tale da poterne valutare gli effetti a lungo termine. Come descritto nei "Materiali e Metodi", dopo la trasfezione, grazie alla selezione effettuata con l'antibiotico G418, il cui gene di resistenza è codificato nel plasmide contenente lo shRNA, si sono isolate differenti colture di NS46C in cui l'espressione di mSEL-1L è risultata effettivamente de-regolata (NS46C sh mSEL-1L). La figura 34 A riporta l'aspetto fenotipico della linea cellulare in cui mSEL-1L è maggiormente de-regolata e del relativo controllo: si può immediatamente osservare una morfologia alterata associata alla riduzione dell'espressione di mSEL-1L, poiché prevalgono cellule molto più arrotondate affette da problemi di adesione. Piastrate ad una densità molto bassa, tali cellule sono state seguite per 6 giorni al fine di valutarne il tasso proliferativo. Dal 4° giorno in poi, avendo la coltura raggiunto la densità ottimale in termini di contatti

cellula-cellula, è incominciata effettivamente la fase di crescita esponenziale, ed i ridotti livelli di mSEL-1L hanno determinato un rallentamento proliferativo apprezzabile (Figura 34 B). Come descritto nei “Materiali e Metodi”, si è dunque appositamente calcolato il tempo di duplicazione associato alla linea neogenerata ed al suo controllo: è emerso che se da un canto le cellule NS46C effettuano una duplicazione all'incirca ogni 17 ore, le cellule stabilmente interferite per mSEL-1L duplicano ogni 21 ore (Figura 34 C). Il rallentamento del tasso duplicativo è stato confermato anche dall'analisi dell'incorporazione del BrdU in seguito a *pulse* di 1 ora, in quanto, mentre nelle NS46C sh mSEL-1L solo il 45% circa della popolazione si è mostrato in attiva fase biosintetica del DNA, nel caso della popolazione di controllo la percentuale è salita al 56% (Figura 34 D).

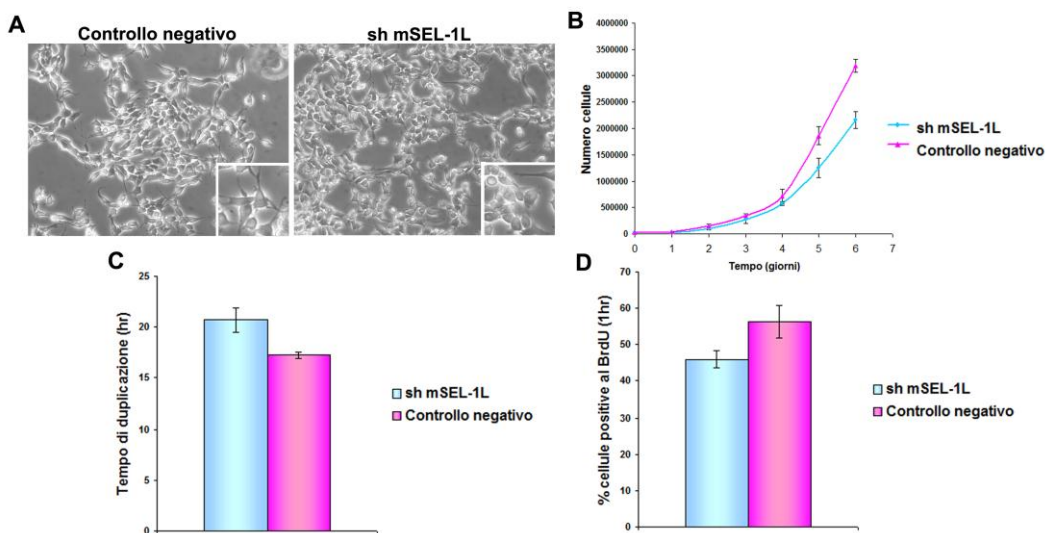


Figura 34. Le cellule interferite stabilmente per mSEL-1L mostrano un ritardo proliferativo. **A)** In seguito a selezione per 15 giorni con l'antibiotico G418, sono state isolate sia cellule NS46C stabilmente interferite per mSEL-1L che il loro relativo controllo negativo. La de-regolazione di mSEL-1L è associata ad un'alterazione morfologica. Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 20X. **B)** Il grafico riporta le curve di crescita della linea stabile NS46C sh mSEL-1L e del suo controllo. Il numero di cellule interferite per mSEL-1L analizzate ad ogni punto è significativamente inferiore rispetto a quello del controllo. Le conte cellulari sono state effettuate in triplicato, potendo successivamente calcolare media e deviazione standard per ogni punto. **C)** L'istogramma riporta i tempi di duplicazione delle due linee a confronto: le cellule sh mSEL-1L replicano più lentamente. Il tempo di duplicazione è stato calcolato effettuando una media fra tre differenti rilevazioni, secondo quanto riportato nei “Materiali e Metodi”. **D)** L'istogramma mostra la percentuale di cellule BrdU positive rilevate in seguito a pulse per 1 ora in 5 differenti campi scelti arbitrariamente, valutando all'incirca 800 cellule per vetrino e calcolandone successivamente la media e la deviazione standard.

La morfologia aberrante ed il difetto proliferativo associati al silenziamento stabile di mSEL-1L potrebbero essere determinati da un'alterazione del *pathway* di Notch.

Al fine di verificare questa ipotesi, è stata effettuata un'analisi di western blot su estratti cellulari citoplasmatici e nucleari, dalla quale è chiaramente emersa la de-regolazione della proteina mSEL-1L (circa il 40% rispetto al controllo) associata all'integrazione dello shRNA diretto contro il suo messaggero nel genoma delle cellule. Parallelamente è stato possibile valutare un'analoga de-regolazione dei livelli del recettore Notch-1 (Notch-1 TM-ICD), connessi ad un concomitante accumulo della proteina neuronale β III-Tubulina (Figure 35 A e C). L'analisi degli estratti nucleari ha messo in luce una vistosa riduzione della forma attiva di Notch-1 (Notch-1ICD) nella linea NS46C sh mSEL-1L (Figure 35 B e C).

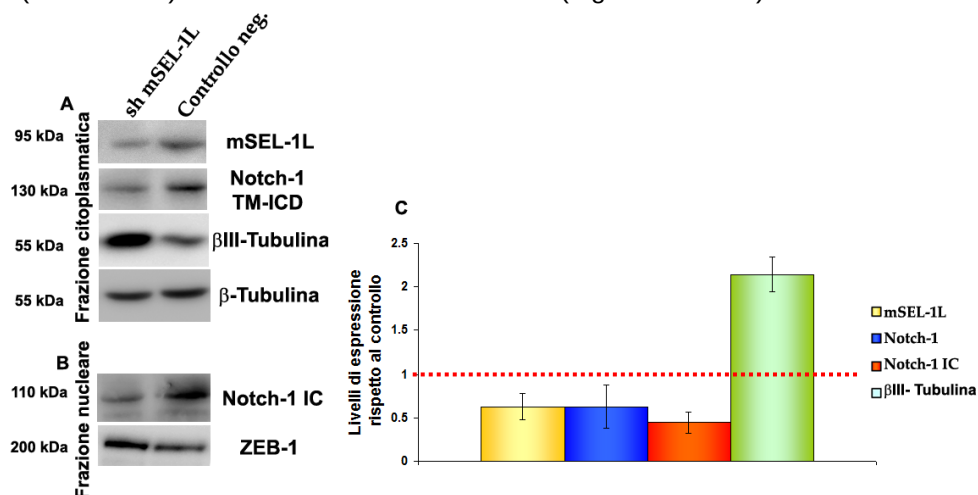


Figura 35. La de-regolazione stabile di mSEL-1L determina un'inibizione del pathway di Notch. **A)** L'analisi di western blot è stata effettuata su estratti citoplasmatici della linea sh mSEL-1L e del suo controllo (17 μ g). La riduzione dei livelli proteici di mSEL-1L è associata riduzione dell'espressione del recettore Notch-1 TM-ICD ed incremento dei livelli di β III-Tubulina. La β -Tubulina è utilizzata per controllare l'equo carico. **B)** 17 μ g di estratti cellulari nucleari della linea stabilmente interferita per mSEL-1L e del suo controllo sono stati analizzati mediante western blot, evidenziando un sensibile decremento dei livelli della forma attivata di Notch-1 (Notch-1 ICD) connesso alla de-regolazione di mSEL-1L. ZEB-1 è stato utilizzato come controllo di equo carico. **C)** L'istogramma rappresenta l'analisi densitometrica dei livelli proteici di mSEL-1L, Notch-1 TM-ICD, β III-Tubulina e Notch-1 ICD nella linea sh mSEL-1L NS46C, previa normalizzazione per la β -Tubulina (estratti citoplasmatici) o ZEB-1 (estratti nucleari) e raffronto con la linea cellulare di controllo. I dati sono frutto della media di tre differenti esperimenti.

Per ottenere un dato meno globale e più specifico a livello di singola cellula, è stata condotta un'analisi immunofenotipica che ha ampiamente confermato quanto già emerso. Infatti, l'immunopositività per mSEL-1L è omogeneamente interferita nell'intera popolazione di NS46C sh mSEL-1L, pur mantenendo la stessa distribuzione qualitativa reticolare e peri-nucleare (Figure 36 A e B, pannelli superiori). Pur rimanendo il numero delle cellule positive pressoché invariato, l'intensità di fluorescenza indicativa dei livelli d'espressione della porzione

citoplasmatica del recettore Notch-1 TM-ICD e della sua forma nucleare attivata sono state sensibilmente inibite dal silenziamento di mSEL-1L (Figure 36 A e B, pannelli centrali). Come già mostrato in termini quantitativi nella figura 34 D, anche qualitativamente l'incorporazione del BrdU è inferiore nella linea di NS46C sh mSEL-1L (Figura 36 B, pannello inferiore) se comparata al suo controllo (Figura 36 A, pannello inferiore), confermando il difetto proliferativo precedentemente descritto. Attraverso un saggio di qRT-PCR si è potuta evidenziare la diminuzione dell'espressione di SOX-2 e dell'effettore di Notch HES-1, associate alla de-regolazione di mSEL-1L. Come già precedentemente emerso, è stata ulteriormente confermata la correlazione inversa esistente fra il grado di espressione di mSEL-1L ed i livelli di GFAP (Figura 36 C).

In definitiva, attraverso la generazione della linea di NS46C sh mSEL-1L in cui gli effetti della de-regolazione del gene sono persistenti nel tempo, ma non compromettono la vitalità cellulare, si è potuto comprendere che realmente mSEL-1L è fondamentale per preservare il corretto *signaling* di Notch, così come la proliferazione ed il mantenimento del *self-renewal*.

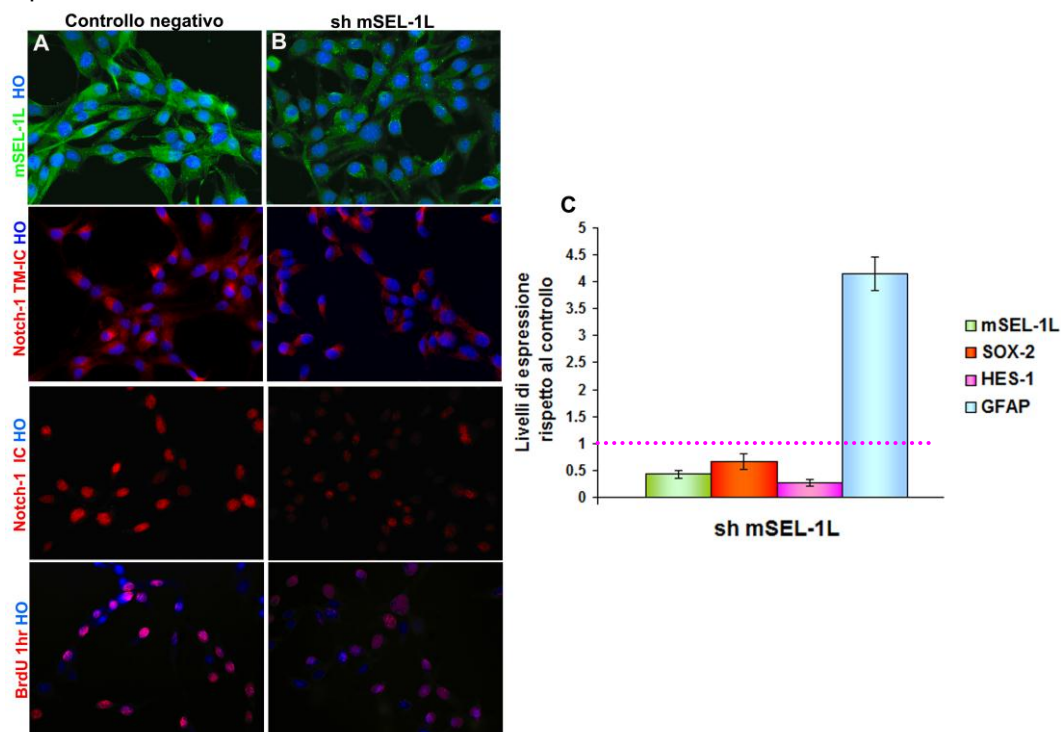


Figura 36. La de-regolazione stabile di mSEL-1L compromette la proliferazione ed il self-renewal. A e B) Le cellule NS46C stabilmente interferite per mSEL-1L ed il loro controllo sono state analizzate mediante immunofluorescenza. La de-regolazione di mSEL-1L è connessa alla riduzione dell'immunopositività per mSEL-1L, per le forme nucleari e citoplasmatiche di Notch-1 e ad una minore incorporazione di BrdU. C) L'analisi di qRT-PCR ha evidenziato nella linea sh mSEL-1L NS46C la riduzione di circa il 60% dei livelli di messaggero di mSEL-1L, del 20% di quelli di SOX-2 e del 70% dell'espressione dell'effettore di Notch, HES-1; parallelamente è stato verificato un incremento di

ben 4 volte dei livelli del marcatore astrocitario GFAP. I dati sono frutto di tre esperimenti indipendenti, ripetuti in duplicato e normalizzati per l'espressione di GAPDH. I risultati così ottenuti sono stati comparati rispetto a quelli della linea di controllo, utilizzando il metodo $\Delta\Delta Ct$ e calcolando successivamente media e deviazione standard.

3.2 Interazione fra mSEL-1L e Notch

I dati ottenuti hanno indicato l'esistenza di un legame fra mSEL-1L e Notch-1, anche se non è ancora emersa la natura di tale relazione. E' importante sottolineare che la de-regolazione di mSEL-1L determina una significativa alterazione del *pathway* di Notch nelle fasi precoci del suo *signaling*, non solo nel processamento finale e nella traslocazione della forma attivata nel nucleo (si veda il capitolo "Introduzione"). Infatti, i livelli proteici della porzione transmembrana e citoplasmatica del recettore (Notch-1 TM-ICD) appaiono ridotti in concomitanza alla de-regolazione di mSEL-1L e ciò si ripercuote a valle, determinando la riduzione del Notch-1-ICD. In primo luogo si è verificata la possibilità di "comunicazione" fra le due proteine all'interno di una popolazione di NSCs in *self-renewal*. Mediante un'analisi di immunofluorescenza è apparso evidente che mSEL-1L e Notch-1 siano co-esprese (Figura 37 A) e nella maggior parte delle cellule co-localizzano nel comparto citoplasmatico-perinucleare (Figura 37 A, inserto inferiore). Solamente una piccola percentuale della popolazione ha mostrato una differente localizzazione sub-cellulare, in cui Notch-1 mantiene la sua espressione citoplasmatica, mentre mSEL-1L sembra rivestire il nucleo (Figura 37 A, inserto superiore). Questo dato rende plausibile l'ipotesi di un *cross-talk* fra mSEL-1L ed il *pathway* di Notch; si è dunque cercato di esaminare l'esistenza di un legame specifico fra queste due proteine, nel quale eventualmente mSEL-1L possa avere un ruolo attivo nell'agevolare il *signaling* in esame. Purtroppo, gli anticorpi commerciali diretti verso Notch-1 non sono particolarmente idonei all'utilizzo in esperimenti di immunoprecipitazione. Si è dunque ricorso all'espressione ectopica di un costrutto recante il Notch-1 ICD, appositamente provvisto di uno specifico *tag* di istidine (si veda il capitolo "Materiali e Metodi"). Grazie a questo accorgimento, l'esperimento di co-immunoprecipitazione ha evidenziato un probabile legame fra mSEL-1L e Notch-1 nella sua forma terminalmente maturata (Figura 37 B). Se mSEL-1L è in grado di legare la variante attiva Notch-1, pronta per la sua traslocazione nel nucleo, ma nello stesso tempo la sua de-regolazione compromette i livelli del recettore dopo il taglio della sua porzione extracellulare mediato da TACE (Figura 36 B), è plausibile che il legame avvenga appunto nella porzione intracellulare di Notch-1, mantenuta nella forma TM-ICD. Infatti, anche l'analisi di immunofluorescenza mostrata nella figura 37 A rivela la co-espressione delle due proteine nel citoplasma o a ridosso del nucleo, entrambi comparti subcellulari in cui la porzione extracellulare di Notch-1 è già stata rimossa (Figura 37 A, inserto inferiore). Inoltre, si è voluto verificare se l'interazione fra mSEL-1L e Notch-1 fosse adducibile alla presenza di un dominio peculiare solo di Notch-1, o potesse essere eventualmente generalizzabile a domini conservati che questo condivide con gli altri recettori della stessa famiglia. Questa indagine è stata supportata da dati pregressi ottenuti nel nostro laboratorio, secondo cui nelle cellule pancreatiche tumorali umane CFPAC-1 SEL-1L interagisce specificamente con Notch-4 (Dr. Diaferia, comunicazione personale). Si è dunque valutato se

questa interazione venisse conservata anche in un sistema biologico costituito da NSCs, effettuando dunque un esperimento di immunoprecipitazione fra mSEL-1L e Notch-4. Nello specifico, si sono utilizzate le cellule di glioblastoma umano G179, poiché caratterizzate da abbondanti livelli endogeni di entrambe le proteine che non rendono necessario l'utilizzo di costrutti per sovra-esprimerle. Come mostra la figura 37 C, anche Notch-4 ICD interagisce specificamente con mSEL-1L, a testimoniare che con molta probabilità il dominio deputato a stabilire il *binding* è conservato nella porzione intracellulare sia di Notch-1 che di Notch-4. L'interazione di mSEL-1L con entrambe le proteine potrebbe spiegare appieno il fenotipo dei modelli murini mSEL-1L KO, giustificando sia il difetto cerebrale (imputabile ad un'alterazione del *signaling* di Notch-1), che le anomalie vascolari (associate a de-regolazione del *pathway* di Notch-4), dettagliatamente presentate nel prossimo paragrafo.

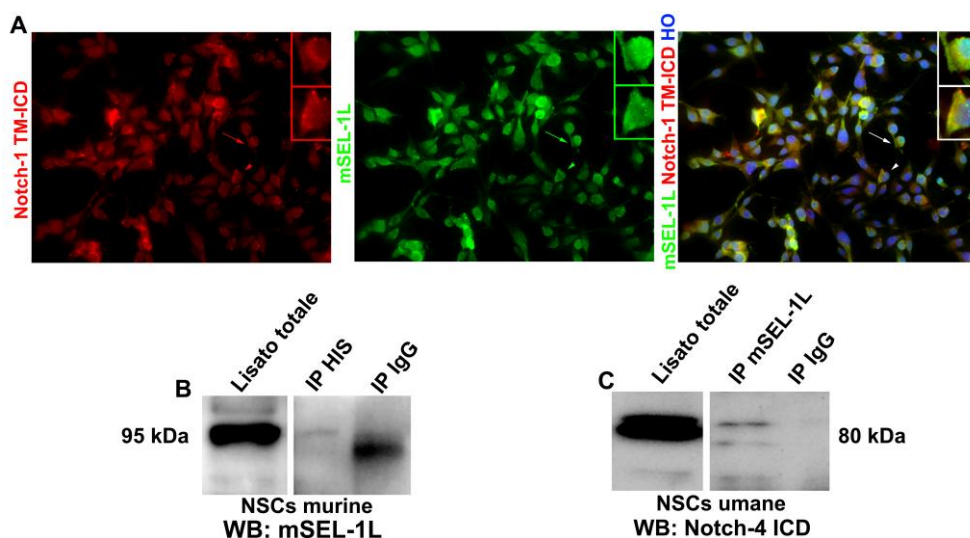


Figura 37. Notch e mSEL-1L interagiscono nelle NSCs. A) L'analisi di immunofluorescenza condotta sulle cellule NS46C mostra che nella quasi totalità della popolazione mSEL-1L e Notch-1 co-esprimono. In particolare, nell'inserto superiore è riportato un esempio dell'esigua percentuale di cellule in cui le due proteine non risiedono nello stesso comparto sub-cellulare, mentre l'inserto inferiore ne mostra la co-localizzazione. **B)** Le cellule NS46C sono state nucleofettate con 5 μ g di DNA plasmidico recante il dominio intracellulare di Notch-1 appositamente seguito da un tag di istidine. Dopo 48 h, l'estratto proteico totale (si veda il capitolo "Materiali e Metodi") è stato immunoprecipitato con l'anticorpo anti-istidina (IP HIS) e con il controllo isotipico (IP IgG). L'analisi di western blot effettuata con l'anticorpo diretto contro mSEL-1L ha rivelato la presenza della proteina in seguito ad immunoprecipitazione del Notch-1 ICD. Il lisato immunoprecipitato con il controllo isotipico mostra una banda di circa 90 kDa di natura aspecifica. **C)** Le NSCs di glioblastoma umano G179 sono state lisate come descritto precedentemente e sottoposte ad immunoprecipitazione con anticorpo diretto contro mSEL-1L (IP mSEL-1L) e con il controllo isotipico (IP IgG). L'analisi

di western blot condotta con l'anticorpo anti- Notch-4 ha rivelato l'interazione della sua forma intracellulare (ICD) con mSEL-1L.

3.3 mSEL-1L, Notch e l'angiogenesi

La formazione del sistema vascolare è uno dei primi eventi che si verifica durante l'embriogenesi dei mammiferi. I precursori endoteliali cominciano a differenziare e si fondono a creare un *network* di vasi sanguigni sia nell'embrione che nelle membrane extraembrioniche in un processo definito vasculogenesi [154]. Il plesso vascolare primario subisce in seguito un ulteriore rimodellamento durante l'angiogenesi che prevede l'insorgenza di nuove ramificazioni e diramazioni a partire dai vasi precedentemente formati. Il *signaling* di Notch riveste un'importanza notevole durante lo sviluppo vascolare e per l'omeostasi dell'angiogenesi; in particolare, oltre a Notch-4, anche Notch-1 è espresso nelle cellule endoteliali embrionali [155]. Alterazioni nel *signaling* di Notch sono connesse a gravissime aberrazioni vascolari che spesso culminano nella letalità embrionale [151, 156-158].

Valutando i modelli murini in nostro possesso all'età embrionale E9.5, è stato possibile riscontrare una significativa disorganizzazione della rete vascolare dei sacchi vitellini e dei feti mSEL-1L HET, ma in maniera indubbiamente più pronunciata degli embrioni mSEL-1L KO e dei relativi annessi extraembrionici. Due differenti nidiate costituite ciascuna da 8 embrioni (E9.5) sono state accuratamente analizzate, stimando la complessità del *network* dei vasi sanguigni. A tale valutazione prettamente qualitativa è stato associato un punteggio da 1 a 10, laddove bassi valori (1-3) corrispondono ad una scarsa articolazione vascolare, valori intermedi (4-7) sono associati alla presenza di un discreto numero di vasi secondari, valori elevati (8-10) indicano una vascolatura ottimale, totalmente sviluppata. Il grafico riportato nella figura 38 A mostra appunto che l'espressione di mSEL-1L è direttamente correlata alla presenza di una rete vascolare correttamente conformata. Nello specifico, il sacco vitellino dell'embrione mSEL-1L WT è risultato ricco di vasi sanguigni ben sviluppati con diverse diramazioni (Figura 38 B, pannello superiore ed inserto), mentre nel sacco dell'embrione mSEL-1L HET i vasi sono apparsi leggermente più piccoli e poco ramificati (Figura 38 C, pannello superiore ed inserto). Il sacco vitellino dell'embrione mSEL-1L KO si è presentato piuttosto pallido, con un *network* di vasi sanguigni primitivo e sottosviluppato (Figura 38 D, pannello superiore ed inserto). Anche lo stesso embrione mSEL-1L KO ha mostrato una chiara alterazione angiogenica (Figura 38 D, pannello inferiore), rispetto ai feti WT (Figura 38 B, pannello inferiore) ed HET (Figura 38 C, pannello inferiore).

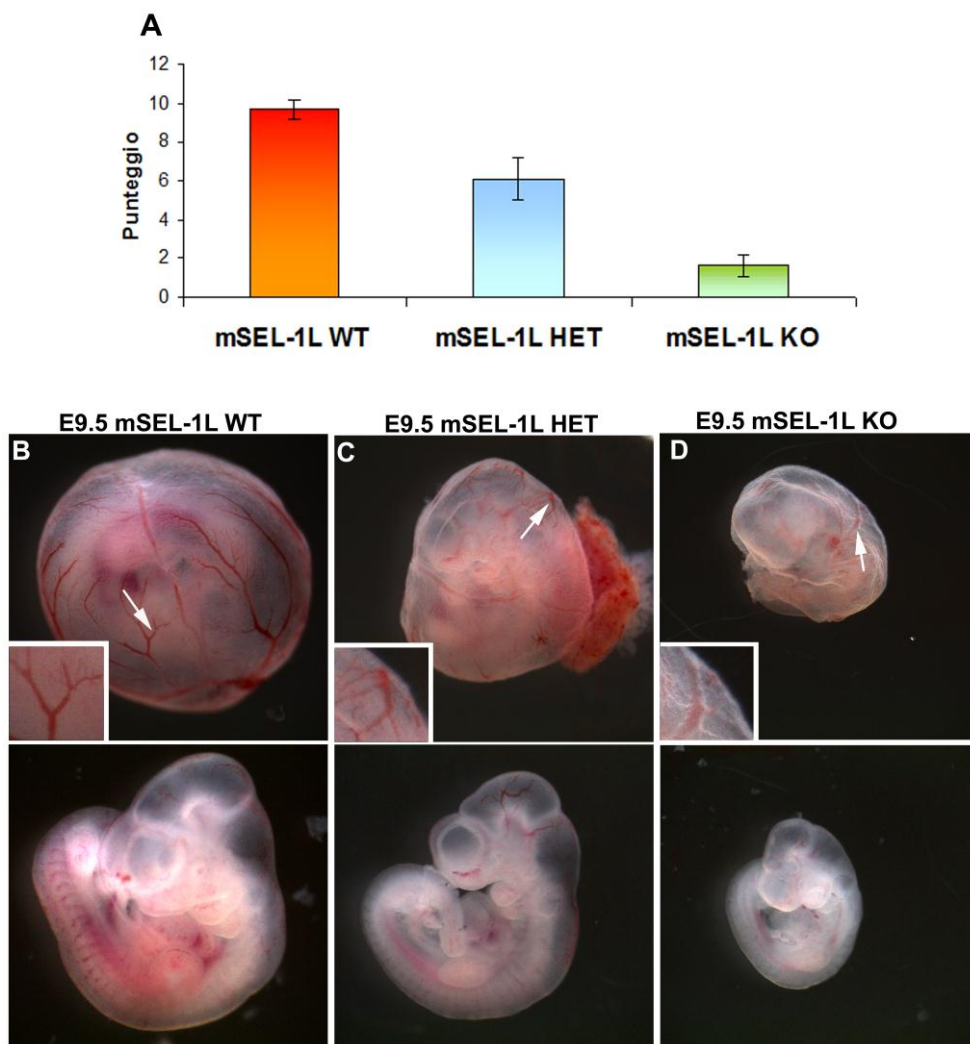


Figura 38. I sacchi vitellini degli embrioni mSEL-1L KO mostrano alterazioni del sistema vascolare. A) La vascolatura di due nidiate (E9.5) ottenute da due diverse madri è stata accuratamente valutata, associandola ad uno specifico punteggio (da 1 a 10) indicativo della complessità vascolare. Punteggi bassi (1-3) indicano una scarsa vascolarizzazione associata alla presenza di vasi principali con poche diramazioni. I punteggi intermedi (4-7) corrispondono alla presenza di una vascolatura più articolata, ma con diramazioni ancora sottosviluppate. Punteggi elevati (8-10) sono attribuiti ad una vascolatura pienamente articolata, con vasi principali ricchi di diramazioni secondarie. L'istogramma riporta la media e la deviazione standard dei punteggi attribuiti agli embrioni mSEL-1L WT, HET e KO, da cui emerge la diretta correlazione fra l'espressione di mSEL-1L e l'instaurarsi di un corretto network vascolare. **B)** All'età embrionale di E9.5, l'embrione mSEL-1L WT ed il suo sacco vitellino sono caratterizzati della presenza di grossi vasi sanguigni, correttamente ramificati. Una vascolatura lievemente

sottosviluppata è riscontrabile nell'embrione mSEL-1L HET e nel suo sacco (C), mentre il feto ed il sacco vitellino mSEL-1L KO sono contraddistinti da un network di vasi sanguigni primitivo (D).

Per approfondire queste osservazioni, gli embrioni sono stati marcati con l'anticorpo monoclonale diretto verso PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion molecule-1*), una proteina specificamente espressa dalle cellule endoteliali. Come risulta evidente osservando la figura 39, l'embrione mSEL-1L WT è caratterizzato da una vascolatura ampiamente sviluppata con un *network* di vasi sanguigni superficiali molto denso, associato alla presenza di vasi più grossi in profondità (Figura 39 A, pannello superiore). Differentemente, l'embrione mSEL-1L HET ha mostrato nel complesso una vascolatura meno articolata (Figura 39 B, pannello superiore), in particolar modo a livello dei vasi cranici, i quali sono presenti in numero e dimensione ridotta (Figura 39 B, pannello centrale) rispetto al controllo (Figura 39 A, pannello centrale). Anche le diramazioni angiogeniche intersomitiche sembrano ridotte nel modello murino HET (Figura 39 B, pannello inferiore) rispetto al WT (Figura 39 A, pannello inferiore). La marcatura con PECAM-1 ha rivelato una vascolarizzazione totalmente compromessa nel feto mSEL-1L KO (Figura 39 C, pannello superiore), particolarmente nella regione cerebrale, laddove i vasi appaiono troncati a formare un *network* estremamente disorganizzato (Figura 39 C, pannello centrale). Anche l'angiogenesi a livello dei vasi intersomitici è risultata gravemente compromessa, poiché è stato possibile riscontare la presenza dei soli vasi principali lievemente abbozzati, dai quali non si diramano altri vasi secondari (Figura 39 C, pannello inferiore).

In definitiva da questi dati emerge che l'espressione di mSEL-1L è connessa al *signaling* di Notch non solo nell'ambito del controllo del *cell fate* neurale, ma anche in un altro *pathway* essenziale per la sopravvivenza dell'organismo, l'angiogenesi.

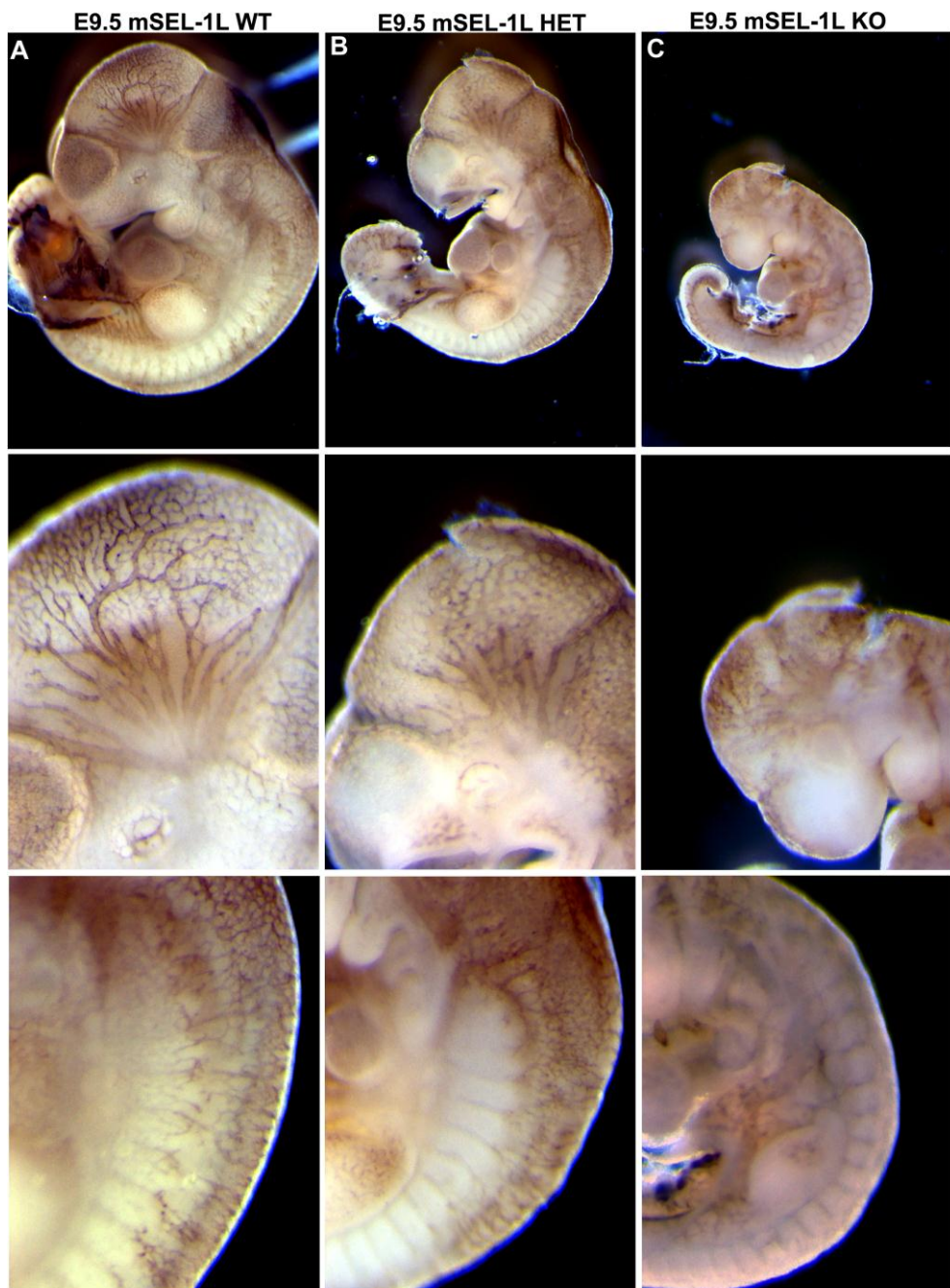


Figura 39. Difetti del sistema vascolare associati agli embrioni mSEL-1L KO. Gli embrioni murini mSEL-1L WT, mSEL-1L HET e mSEL-1L KO mostrati in figura 38 sono stati marcati con l'anticorpo PECAM-1, come descritto nel capitolo "Materiali e Metodi". Mentre l'embrione di controllo (A) esibisce una vascolatura normale, in cui dai vasi sanguigni principali si diparte la ramificazione dei vasi

secondari, ben visibili sia a livello della regione cranica che intersomitica, la vasculogenesi è compromessa solo parzialmente nell'embrione mSEL-1L HET (B) e molto più marcatamente nell'embrione KO (C). In quest'ultimo si osserva il troncamento di diversi vasi sanguigni, caratterizzati da ramificazioni poco articolate e disorganizzazione generalizzata.

DISCUSSIONE

Fino ad oggi, nella maggior parte delle ricerche scientifiche mSEL-1L è stato descritto come membro del sistema di degradazione proteica ubiquitina-proteasoma dipendente all'interno del *pathway* ERAD [122-124, 159]. In particolare, uno dei primi studi condotti in *Caenorhabditis elegans* in merito alla proteina orlogia di mSEL-1L, ha dimostrato il suo potenziale ruolo come regolatore negativo dell'attività di Lin12/Notch [160, 132], probabilmente modulandone la stabilità. Studi in organismi superiori hanno evidenziato il legame esistente fra mSEL-1L e Notch durante lo sviluppo embrionale pancreatico, nel quale mSEL-1L riveste un ruolo fondamentale nel determinare il *fate* cellulare [133].

Lo studio qui presentato analizza per la prima volta il contributo di mSEL-1L durante il differenziamento e lo sviluppo del SNC, approfondendo particolarmente gli aspetti correlati alla regolazione della sua espressione e al suo rapporto con il *pathway* di Notch.

In primo luogo è stato mostrato che durante la *mid-gestation* (E12.5) l'espressione di mSEL-1L è pressoché ubiquitaria nel cervello fetale, con livelli più significativi in corrispondenza dei ventricoli laterali, caratterizzati da una densa popolazione di progenitori neurali indifferenziati. Un'altra area di grande interesse in cui mSEL-1L è particolarmente abbondante in questa fase gestazionale è il RPE. Nell'adulto questo rappresenta lo strato più esterno della retina ed è costituito da cellule epiteliali altamente specializzate in grado di offrire un supporto specifico ai fotorecettori [161]. Si tratta di cellule provviste di melanosoma, un organello simil-lisosomale deputato alla biosintesi ed all'immagazzinamento della melanina. L'importanza delle cellule residenti nel RPE si deve alla loro capacità di trans-differenziare in cellule della retina neurale durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto solo in alcune specie di urodeli [162]. Il fatto che una tipologia cellulare terminalmente differenziata possa perdere le sue caratteristiche di specializzazione per poi rientrare nel ciclo cellulare e formare uno strato di cellule neuroepiteliali dotate di potenzialità differenziative, rappresenta un fenomeno pressoché unico nella biologia cellulare. Inoltre, l'inattivazione del *pathway* di Wnt, uno dei principali *master gene* che governa la staminalità delle NSCs, è fondamentale nel promuovere la trans-differenziazione delle cellule RPE [163]. L'elevata espressione di mSEL-1L in questo strato retinale durante la *mid-gestation* potrebbe essere associata alla natura secretoria delle cellule che lo compongono o alla persistenza di una certa "memoria staminale" delle stesse che le renderebbe capaci di trans-differenziare al momento opportuno.

Successivamente, durante lo sviluppo embrionale, l'espressione della proteina nel cervello murino decresce, rimanendo confinata nell'adulto in una sottopopolazione cellulare residente nel giro dentato dell'ippocampo e nel terzo ventricolo, entrambe nicchie neurogeniche popolate da NSCs [90, 164]. Fisiologicamente tali regioni sono colonizzate da un numero di NSCs quiescenti estremamente ridotto che viene spinto alla proliferazione nel caso di un particolare danno tissutale. Il fatto che mSEL-1L permanga in modo specifico in tali cellule progenitrici dell'adulto ha portato ad indagare in maniera più mirata la relazione fra mSEL-1L e i concetti stessi di staminalità e differenziamento, potendo sfruttare come modello biologico il topo mSEL-1L KO. La delezione in omozigosi di mSEL-1L è letale in utero [133-

134] e provoca una generale compromissione della proliferazione e della corticogenesi a causa di un prematuro impoverimento del *pull* di progenitori neurali. Infatti, sia la regione ventricolare che quella subventricolare sono caratterizzate da un ridotto numero di cellule proliferanti esprimenti i principali marcatori di staminalità, ed una conseguente riduzione della progenie neuronale differenziata. Inaspettatamente, si è riscontrata la prematura espressione del marcatore gliale/astrocitario GFAP, probabilmente causata dall'alterazione del corretto *timing* dello sviluppo cerebrale. Infatti, durante la *mid-gestation* la gliogenesi è inibita dalla metilazione dei promotori dei principali fattori gliali, mentre rimane attiva la neurogenesi. Da questi dati si è potuto speculare il modello presentato nella figura 40, secondo cui gli effetti della mancanza di mSEL-1L *in vivo*, benché eventualmente attutiti da meccanismi compensatori sviluppati dall'organismo per promuoverne la sopravvivenza, determinano un precoce arresto del *self-renewal* a causa di una divisione asimmetrica precoce. Ciò si traduce in un impoverimento del *pull* di progenitori, i quali, a loro volta, potranno originare prematuramente un numero di neuroni altrettanto ridotto. La precoce neurogenesi indurrebbe un'anticipata astrogliogenesi, giustificando così la prematura espressione della GFAP.

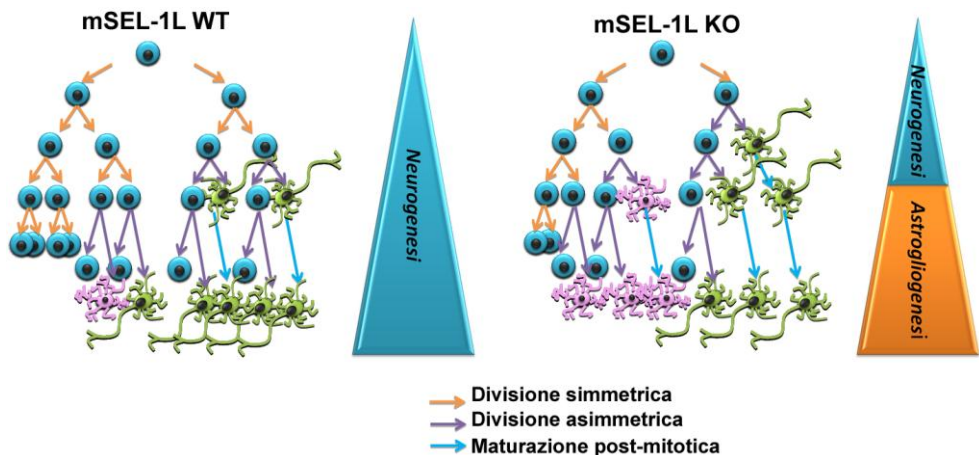


Figura 40. Modello del differenziamento neurale associato alla deplezione di mSEL-1L. Durante il normale sviluppo embrionale, la prima fase differenziativa delle NSCs (cellule azzurre) è quasi esclusivamente neurogenica. Inizialmente i progenitori si dividono simmetricamente (freccia arancione) e successivamente talune cellule iniziano a dividersi asimmetricamente (freccia viola) generando neuroni (cellule verdi). Solamente nelle fasi terminali della *mid-gestation* i progenitori possono originare astrociti (cellule rosa). Differentemente, nel modello murino mSEL-1L KO, la divisione asimmetrica è più precoce, determinando una neurogenesi e un'astrogliogenesi premature, causa dell'impoverimento sia del *pull* dei progenitori che dei neuroni post-mitotici e del concomitante arricchimento in astrociti.

Il fallimento del *self-renewal*, una delle principali proprietà delle cellule staminali, dovuto alla totale deplezione di mSEL-1L è stato inoltre dimostrato *in vitro*

attraverso il test delle neurosfere, in quanto la capacità rigenerativa delle stesse è direttamente correlata all'espressione della proteina.

Riproducendo *in vitro* il processo di neuralizzazione, è emerso che l'espressione di mSEL-1L è estremamente precoce, mostrandosi particolarmente intensa a livello delle cellule staminali embrionali murine, per poi restare immutata nei precursori neurali multipotenti e nella popolazione di NSCs *radial glia-like* da esse generate. Tuttavia, procedendo nel differenziamento ed originando neuroni, astrociti ed oligodendrociti maturi, mSEL-1L viene rapidamente silenziata mediante un raffinato meccanismo di regolazione genica post-trascrizionale operato dal mmu-miR-183. Il controllo dell'espressione proteica nell'ambito delle cellule staminali è finemente disciplinato sia da fattori intrinseci che estrinseci alla cellula [165] e ultimamente i miRNA stanno emergendo come elementi chiave nella regolazione della proliferazione e differenziamento cellulare [166]. Nello specifico, il mmu-miR-183 determinerebbe il silenziamento di mSEL-1L per eliminare una proteina che mantiene la cellula in un "stato indifferenziato" e si rende necessario al fine di consentire il percorso differenziativo. Inoltre, tale miRNA lavora anche con uno scopo opposto: preservare i livelli proteici di mSEL-1L nelle NSCs con un solo allele del gene funzionale. Infatti, benché i livelli di messaggero di mSEL-1L siano dimezzati, l'espressione proteica non viene alterata grazie alla de-regolazione del mmu-miR-183. Attraverso questo meccanismo, dimostrato *in vitro* nelle NSCs mSEL-1L HET, è possibile che si mantenga un fenotipo apparentemente normale anche *in vivo* nei topi mSEL-1L HET, sebbene si osservi la tendenza all'incremento dei livelli della GFAP. Sembra quindi che la parziale de-regolazione di mSEL-1L, sebbene contrastata dalla diminuzione dei livelli del mmu-miR-183, stimoli una rapida conversione delle cellule *radial glia-like* in cellule della glia radiale mature esprimenti GFAP. Effettivamente, anche *in vivo* alcune NSCs iniziano ad incrementare l'espressione della GFAP, originando sia le NSCs della glia radiale che persistono nelle aree neurogeniche dell'adulto, che astrociti maturi [33, 167]. Quindi si può ipotizzare che una debole de-regolazione di mSEL-1L possa intaccare il *self-renewal* stimolando le cellule *radial glia-like* ad originare il sottotipo cellulare differenziato ad esse più vicino, quello delle *GFAP-expressing* NSCs.

Inoltre, la diminuzione dei livelli proteici di mSEL-1L ottenuta attraverso l'espressione ectopica del mmu-miR-183 ha confermato i difetti descritti precedentemente, portando alla de-regolazione dei marcatori dei progenitori neurali PAX-6 ed OLIG-2 e all'intensificazione dell'espressione della GFAP. La spiccata de-regolazione HES-5 (diretto target di Notch), proporzionale ai livelli di espressione di mSEL-1L, ha suggerito una correlazione diretta fra mSEL-1L e il *signaling* di Notch. Come atteso, diminuendo l'espressione del repressore trascrizionale HES-5, aumentano i livelli di NGN-2, da esso negativamente regolato, promuovendo dunque anche l'innalzamento dell'espressione della β III-Tubulina. D'altro canto, la sovra-regolazione del mmu-miR-183 determina un'inibizione dell'espressione di PAX-6 ed OLIG-2 più significativa rispetto a quella prodotta dalla deplezione in omozigosi di mSEL-1L nelle NSCs. Ciò può essere giustificato se si pensa agli effetti pleiotropici dei miRNA, poiché simultaneamente essi possono determinare il silenziamento di diverse proteine, sortendo un effetto globale e più intenso rispetto a quello che verrebbe prodotto da silenziamenti individuali di singole proteine. Infatti, proprio per la loro abilità di controllare simultaneamente una pletora di geni, i miRNA sono i candidati migliori per regolare processi articolati come il *self-renewal* ed il *cell fate*. Nello specifico, come già

accennato nei capitoli introduttivi, il miR-183 è in grado di modulare l'espressione di altre proteine fondamentali nel mantenimento della staminalità, come la $\beta 1$ -Integrina [107] e Bmi-1 [106]. Così come dimostrato per mSEL-1L con questo lavoro, anche l'assenza della $\beta 1$ -Integrina nei progenitori neurali può comprometterne la staminalità, determinando il differenziamento prematuro e la morte cellulare [168]. Inoltre, nelle NSCs la delezione simultanea di Bmi-1 e Ink4a/Arf comporta alterazioni nell'espressione dei geni *collagen-related*, determinando un incremento nella secrezione della matrice extracellulare e dei legami della stessa con la $\beta 1$ -Integrina [108]. E' interessante sottolineare un'ulteriore correlazione, in quanto alcuni anni fa SEL-1L fu descritta come una proteina in grado di mediare le interazioni cellula/matrice extracellulare [127], probabilmente a causa della sua capacità di alterare l'espressione di molecole coinvolte nel rimodellamento del citoscheletro e della matrice stessa [169]. Sarebbe dunque plausibile che mSEL-1L, la $\beta 1$ -Integrina, e Bmi-1 appartengano allo stesso *pathway* cellulare regolato dalla raffinata azione del miR-183. E' probabile che tali proteine agiscano in maniera sinergica, garantendo il *self-renewal* e creando l'ambiente "nicchia" idoneo a controllare la proliferazione, la migrazione e l'adesione delle NSCs (Figura 41).

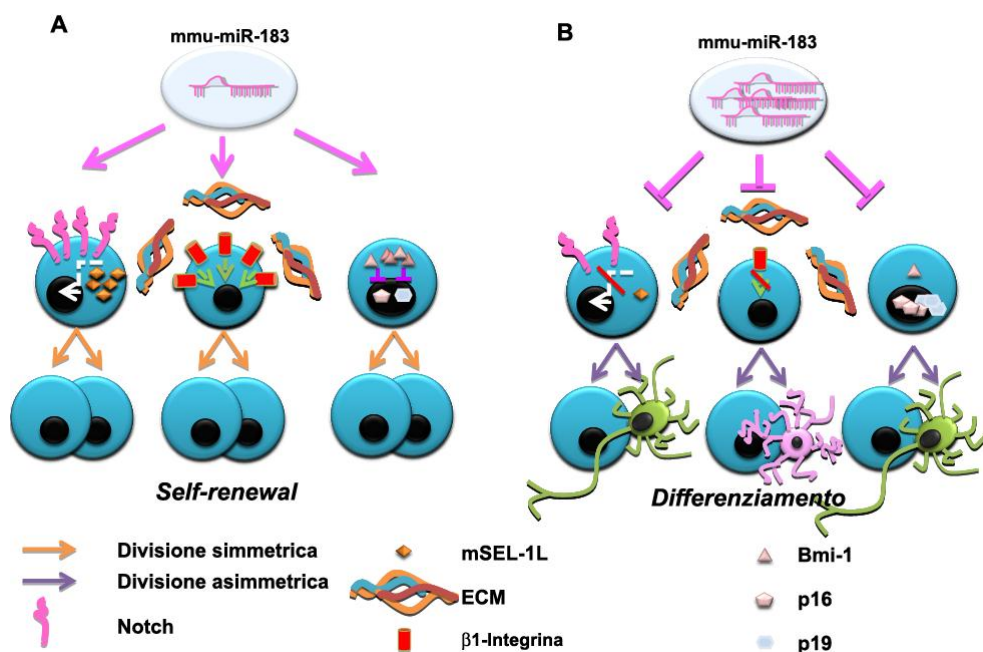


Figura 41. Modello relativo alla coordinazione del fate delle NSCs ad opera del mmu-miR-183. A) Bassi livelli di espressione del mmu-miR-183 sono associati ad un'elevata espressione di mSEL-1L, a sua volta connessa all'instaurarsi di un proficuo signaling di Notch e al conseguente mantenimento della staminalità cellulare. Parallelamente, sono garantiti elevati livelli di $\beta 1$ -Integrina, la quale, modulando specifiche interazioni con la matrice extracellulare, media la comunicazione della cellula con l'ambiente esterno e preserva il self-renewal.

Inoltre i livelli proteici di Bmi-1 sono mantenuti elevati, garantendo l'inibizione dell'espressione degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti p16 e p19, promuovendo così la divisione cellulare. B) La sovra-espressione del mmu-miR-183 favorisce il differenziamento, poiché, inibendo l'espressione di mSEL-1L, β 1-Integrina e Bmi-1, altera rispettivamente il signaling di Notch, la comunicazione cellula-ECM e la proliferazione delle NSCs.

Il drastico difetto proliferativo osservato nelle NSCs isolate dai topi mSEL-1L KO rende impossibile la creazione di un modello cellulare espandibile *in vitro* per studi biochimici e biomolecolari più dettagliati. D'altro canto, la de-regolazione di mSEL-1L prodotta mediante siRNA risulta scarsamente informativa, a causa della natura transiente del silenziamento. Si è dunque generata una linea cellulare in cui l'espressione di mSEL-1L è stabilmente interferita grazie alla presenza di uno specifico shRNA diretto contro il suo messaggero integrato nel genoma cellulare. Tali NSCs sono affette da un'evidente alterazione fenotipica che ricapitola verosimilmente i difetti precedentemente descritti di proliferazione e *commitment* astrocitario. Questo ci ha permesso di verificare che il difetto morfologico osservato fosse imputabile all'alterazione del *pathway* di Notch-1. Le cellule interferite hanno infatti mostrato un significativo decremento della forma di Notch-1 sottoposta al primo taglio proteolitico (Notch-1 TM-ICD), della variante nucleare terminalmente processata (Notch-1 ICD) e del suo effettore finale HES-1. Analisi più approfondite hanno rivelato effettivamente un legame fra mSEL-1L e Notch-1, poiché le due proteine co-esprimono, co-localizzano ed immunoprecipitano nelle NSCs murine. Tuttavia, mSEL-1L mostra una capacità di *binding* non solo con Notch-1, ma anche con Notch-4 ICD, rendendo plausibile l'idea che questa possa interagire con l'intera famiglia dei recettori Notch.

E' noto che uno degli effetti fenotipici osservabili *in vivo* in seguito all'alterazione di tali recettori è un significativo difetto angiogenico. Il *pathway* di Notch riveste infatti un'importanza strategica nelle prime fasi di sviluppo della vascolatura embrionale, così come nelle successive fasi di angiogenesi. Inizialmente, una popolazione di precursori delle cellule endoteliali di origine mesodermica concorre alla formazione *de novo* dei vasi sanguigni. Successivamente, attraverso la vasculogenesi, si crea un reticolo di vasi sanguigni primitivi omogenei fra loro, il plesso vascolare primario. Segue il processo angiogenico che vede la formazione di ramificazioni, invaginazioni, estensioni dei vasi primari, a formare una vascolatura matura [170]. Modelli murini affetti da mutazioni in molecole chiave nel *pathway* di Notch esibiscono allo stesso modo del mutante di mSEL-1L delle alterazioni significative nella formazione dei vasi sanguigni, nella proliferazione delle cellule endoteliali e nel rimodellamento vascolare. Infatti, è stato comprovato il coinvolgimento di Notch-1 [151], Notch-3 [171], Notch-4 [151], dei ligandi Delta-like4 [172-174] e Jagged [156] nella creazione della vascolatura. In particolar modo, sembra che il *signaling* di Notch influenzi non tanto la vasculogenesi, quanto piuttosto l'angiogenesi [170]. Ciò avvala ulteriormente quanto emerso dagli esperimenti condotti sul mutante mSEL-1L KO, il cui difetto vascolare sembra riguardare non tanto i vasi sanguigni principali, quanto piuttosto la neogenesi dei vasi secondari durante l'angiogenesi.

Come precedentemente accennato, la connessione fra mSEL-1L e Notch sembra avere origini abbastanza precoci nella scala evolutiva, in quanto in passato è stata descritta una relazione fra le due proteine in *C. elegans* [132]. Tuttavia,

differentemente da quanto riscontrato nell'ambito delle NSCs murine in cui mSEL-1L sostiene positivamente il *signaling* di Notch, nel nematode sembra accadere esattamente l'opposto. In *C. elegans* la mancata funzionalità di sel-1 non compromette la vitalità dell'organismo e non produce effetti fenotipici rilevabili. In un *background* genetico il cui il *signaling* di lin12 è alterato, l'assenza di sel-1 determina un incremento dell'attività di lin12/Notch, come se sel-1 agisse da regolatore negativo di lin12 o fosse regolato negativamente da questo [132]. Nel modello murino la situazione è significativamente differente: la delezione in omozigosi della funzionalità di mSEL-1L produce un fenotipo drasticamente compromesso che inequivocabilmente corrisponde ad un deficit nel *signaling* di Notch. E' come se durante l'evoluzione mSEL-1L abbia acquisito una differente funzione Notch-correlata essenziale per la sopravvivenza, di cui probabilmente il nematode è sprovvisto. Analizzando la struttura multimodulare di mSEL-1L, appare evidente che negli organismi superiori essa sia più complessa e veda, accanto ai domini conservati (*sel1-like repeats*), anche la presenza di domini acquisiti successivamente quali il dominio della fibronectina di tipo II. Questo si è rivelato particolarmente importante nel mediare l'interazione fra mSEL-1L e la β 1-Integrina, modulando specificamente i processi di adesione cellulare (Dr. Diaferia, comunicazione personale). La β 1-Integrina non solo risente della stessa regolazione post-trascrizionale di mSEL-1L ad opera del mmu-miR-183, rivestendo un ruolo davvero importante per il controllo del *self-renewal*, ma regola anche i processi angiogenici [175]. Sembra inoltre che la stessa β 1-Integrina possa interagire con il Notch-1 ICD per garantirne una segregazione corretta nelle cellule figlie durante la divisione cellulare, a seconda degli stimoli ricevuti dall'ambiente extracellulare [176].

Si potrebbe dunque ipotizzare che negli organismi superiori mSEL-1L possa interagire con la famiglia dei recettori Notch sfruttando dei domini altamente conservati come i *sel1-like repeats*, ugualmente presenti in *C. elegans*. Tuttavia, mentre nel nematode questa interazione comporta una regolazione negativa di lin12 a causa dell'instaurarsi di un *signaling* che non è mai stato ben caratterizzato, negli organismi superiori si associa ad una nuova funzione acquisita. Infatti, il dominio della fibronectina di tipo II mediando l'interazione fra mSEL-1L e la β 1-Integrina, creerebbe un ponte fra Notch ICD (o Notch TM-ICD) e la β 1-Integrina stessa. Laddove i livelli di mSEL-1L siano alti (Figura 42 A), il *link* fra Notch ICD e β 1-Integrina consentirebbe alla β 1-Integrina di captare i segnali dall'ambiente extracellulare, sequestrare Notch ICD durante la divisione mitotica grazie a mSEL-1L per poi lasciarlo libero di traslocare nel nucleo e stimolare la divisione simmetrica. La riduzione dei livelli di mSEL-1L associata al differenziamento cellulare, connessa ai cambiamenti nella composizione della ECM, stimolerebbe una distribuzione orientata delle molecole in esame, con attivazione polarizzata del *signaling* di Notch e conseguente divisione asimmetrica (Figura 42 B). Infine, la totale assenza di mSEL-1L impedirebbe la creazione dell'interazione β 1-Integrina/Notch ICD e, mancando l'eventuale effetto stabilizzante dovuto al *binding*, Notch ICD potrebbe essere degradato o segregato in maniera alterata durante la divisione cellulare, determinando un differenziamento precoce (Figura 42).

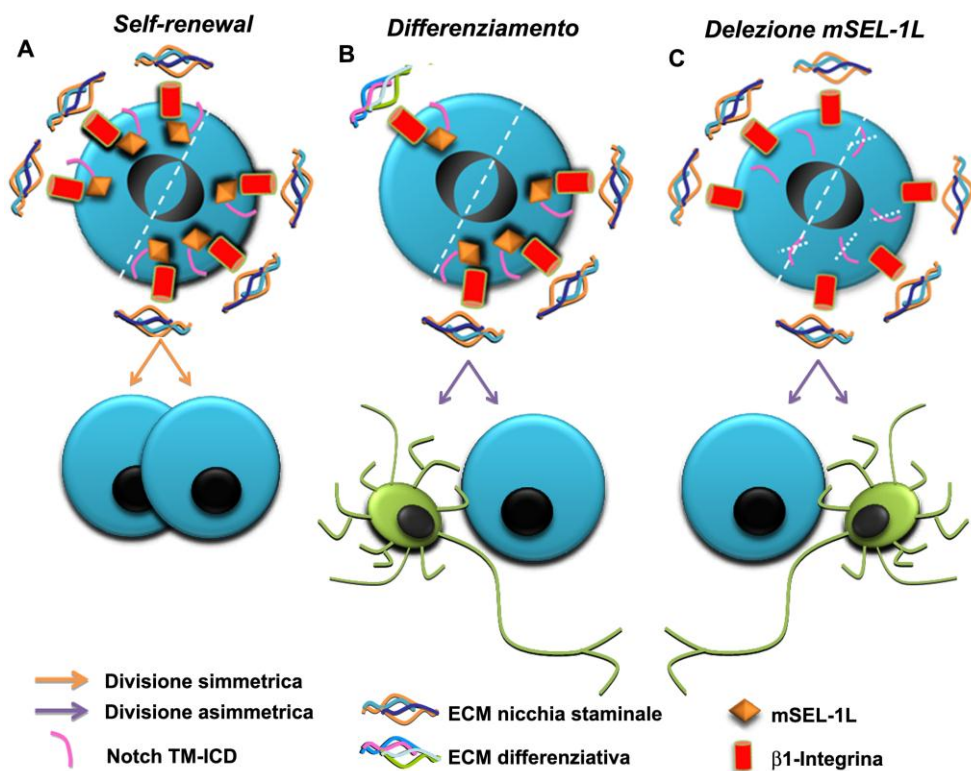


Figura 42. Modello relativo all'interazione fra mSEL-1L, β 1-Integrina e Notch.

A) In condizioni di self-renewal l'espressione di mSEL-1L è elevata, consentendo la creazione di un legame indiretto fra la β 1-Integrina e Notch ICD (o TM-ICM). In questo modo, potendo integrare i segnali dell'ambiente extracellulare con l'interno, grazie a mSEL-1L la β 1-Integrina sequestrerebbe Notch allo stesso modo nelle due cellule figlie, garantendo una divisione simmetrica. **B)** Durante il differenziamento, l'espressione di mSEL-1L decresce e la composizione dell'ECM cambia. Il legame indiretto fra β 1-Integrina e Notch ICD (o TM-ICM) è polarizzato, stimolando la divisione asimmetrica. **C)** La delezione di mSEL-1L stravolge gli equilibri cellulari e non consente alla β 1-Integrina di interagire con Notch ICD (o TM-ICM). Destabilizzato dalla mancata interazione, Notch potrebbe essere degradato, compromettendo il suo signaling e favorendo un differenziamento precoce.

In conclusione, questo lavoro ha consentito di indagare ed approfondire un ruolo ERAD-indipendente di mSEL-1L nell'ambito dello sviluppo e del differenziamento, un ruolo essenziale per la sopravvivenza cellulare in cui mSEL-1L "recita" al fianco di Notch nel governare il cell fate.

CONCLUSIONI

Le cellule staminali rappresentano un'importantissima risorsa poiché dotate della capacità verosimilmente infinita di dividersi generando una progenie illimitata, in grado di differenziare originando una popolazione cellulare matura con caratteristiche funzionali altamente specializzate. Ovviamente, con il procedere dello sviluppo dell'organismo, il *pull* di cellule staminali si riduce e si circoscrive in nicchie ben definite in cui viene custodito e preservato per fronteggiare eventuali necessità rigenerative nella vita adulta. Sono appunto le proprietà rigenerative associate alle cellule staminali che le rendono particolarmente appetibili nell'ambito della ricerca scientifica, stimolando studi sempre più approfonditi e dettagliati sulla loro biologia e sui *pathway* biochimici che ne regolano il *self-renewal* e la multipotenza.

Lo studio scientifico presentato in queste pagine cerca di delucidare alcuni meccanismi che regolano il *cell fate* delle NSCs, focalizzandosi principalmente sul ruolo assunto da mSEL-1L nel governare lo sviluppo e il differenziamento cellulare attraverso modulazione del *signaling* di Notch. In particolare, l'espressione di mSEL-1L è ubiquitaria nelle prime fasi dello sviluppo cerebrale fetale, per poi circoscriversi esclusivamente nelle nicchie neurogeniche persistenti nell'adulto. Il ruolo rivestito da mSEL-1L nelle cellule staminali sembra essere realmente essenziale, poiché la sua delezione è del tutto incompatibile con la vita sia *in vivo* che *in vitro*. Nell'ambito neurale, l'assenza di mSEL-1L determina un repentino impoverimento delle cellule progenitrici, determinando un'alterazione del corretto *timing* neurogenico e astrogliogenico. Ne consegue la compromissione dell'intera corticogenesi *in vivo* ed il fallimento del *self-renewal* associato a letalità cellulare *in vitro*. Inoltre, la deplezione di mSEL-1L è direttamente correlata ad una vistosa alterazione vasculogenica e soprattutto angiogenica durante lo sviluppo embrionale. Data la sua estrema importanza, fisiologicamente mSEL-1L risente di un controllo molto accurato durante il differenziamento neurale per merito del mmu-miR-183 il quale, regolando simultaneamente altri geni essenziali nell'ambito della staminalità [106-107], ne determina il silenziamento per consentire la maturazione cellulare. Si è inoltre dimostrato che mSEL-1L è un partner molecolare di Notch-1 e Notch-4 e può consentirne un corretto *signaling* fino all'attivazione degli specifici geni target nucleari. La de-regolazione di mSEL-1L ne compromette, infatti, l'intero *pathway*, generando le aberrazioni cerebrali e vascolari precedentemente descritte.

In definitiva, attraverso questo studio si è indagato per la prima volta il ruolo di mSEL-1L nell'intricato mondo delle cellule staminali neurali, aprendo il varco a numerosissimi spunti e riflessioni di grande interesse. *In primis*, si approfondirà dettagliatamente il modello di interazione ipotizzato fra mSEL-1L, Notch e β 1-Integrina, sviluppando specifici saggi biochimici che consentano di valutare la stabilità delle singole componenti in seguito ad alterazione di un solo membro del complesso. Riuscendo verosimilmente a connettere tra loro delle molecole così importanti, si riuscirebbe a semplificare la comprensione di processi biologici estremamente complessi in cui esse operano, quali lo sviluppo embrionale, l'angiogenesi, la comunicazione cellula-cellula e cellula-ECM, il *cell fate*, lo sviluppo pancreatico, la migrazione cellulare.

Inoltre, nell'ambito dello sviluppo del SNC cerebrale si approfondirà indubbiamente l'alterazione della corticogenesi murina, analizzando i profili di metilazione dei promotori dei geni gliali GFAP e S100 β [177], associati alla delezione in omozigosi di mSEL-1L nel relativo modello murino. Si esplorerà eventualmente l'aspetto epigenetico, indagando in maniera intensiva quale *pathway* attivato dalla mancanza di mSEL-1L possa promuovere la demetilazione e attivare la prematura astrogliogenesi riscontrata.

In termini più applicativi, essendo emerso un connubio particolarmente forte fra mSEL-1L e la staminalità, si potrebbe associare l'espressione del gene alle capacità neurogeniche dopo danno cerebrale. E' noto, infatti, che nel caso di lesioni acute del SNC, quali ad esempio l'ictus, venga stimolata la neurogenesi a livello delle nicchie in modo che le NSCs in esse residenti in uno stato quiescente, si riattivino cercando di rigenerare l'area intaccata [17]. Sebbene in condizioni fisiologiche il modello murino mSEL-1L HET mostri un fenotipo apparentemente normale grazie a meccanismi compensatori che ne massimizzano la vitalità, è probabile che, se sottoposto a condizioni di stress, questo manifesti delle anomalie. E' stato, infatti, dimostrato che i topi mSEL-1L mutanti in eterozigosi se sottoposti ad una dieta ad alto contenuto lipidico diventano rapidamente iperglicemici, predisponendo l'animale allo sviluppo del diabete [135]. Si potrebbe dunque ricavare dal topo mSEL-1L HET un modello neurodegenerativo sperimentale, somministrando trimetilina (TMT) ed inducendo una lesione ippocampale [178]. Una volta prodotto il danno, il difetto neurorigenerativo connesso alla delezione in eterozigosi di mSEL-1L potrebbe palesarsi, rimarcando l'importanza fisiologica di una corretta espressione di mSEL-1L per garantire la rigenerazione tissutale. Si potrebbe dunque indagare nell'ambito delle principali patologie neurodegenerative l'espressione di mSEL-1L, dei suoi partner molecolari, quali Notch e β 1-Integrina, e del suo regolatore, il mmu-miR-183, alla ricerca di una loro eventuale mis-regolazione che causi la patologia o che comunque determini resistenza alla cura. Un'ipotetica terapia in ambito neurodegenerativo potrebbe prevedere l'induzione dell'espressione di mSEL-1L, magari tramite de-regolazione del mmu-miR-183 attraverso l'utilizzo di *antagomir*. Si potrebbe così stimolare il risveglio nelle NSCs quiescenti, promuovendo la neurogenesi e la rigenerazione del danno.

Inoltre, il ruolo cruciale rivestito da mSEL-1L durante l'angiogenesi embrionale offre un nuovo spunto di riflessione inerente al potenziale utilizzo di queste conoscenze in abito tumorale. L'angiogenesi è da molto tempo uno dei principali target della terapia antitumorale e, considerando che sia Notch-1 che Notch-4 sono altamente espressi nei vasi sanguigni che innervano le masse tumorali [179], la loro inibizione mediata dalla de-regolazione di mSEL-1L sarebbe molto interessante da indagare. Inoltre, visti gli effetti particolarmente deleteri connessi alla mancanza di mSEL-1L durante lo sviluppo embrionale murino, si potrebbe speculare che gli eventi mutazionali che interessano questo gene siano associati a letalità embrionale anche nell'uomo. Infatti, screening genetici condotti in passato nel nostro laboratorio hanno evidenziato rarissime mutazioni puntiformi in regioni introniche o nel promotore del gene, tuttavia non in grado di alterarne significativamente l'espressione. E' come se si fossero analizzate delle casistiche in cui la selezione naturale avesse provveduto ad eliminare le varianti di mSEL-1L non funzionali. Sarebbe dunque di grande interesse condurre analisi genetiche alla ricerca di alterazioni mutazionali di mSEL-1L in feti abortivi umani, in modo da stabilirne

l'effetto in una definita fase gestazionale, associarlo alla letalità embrionale, individuarne approfonditamente le cause per poi eventualmente programmare interventi terapeutici mirati.

In definitiva, questo lavoro rappresenta un piccolo passo avanti nella comprensione di alcuni fra i principali processi biologici che governano lo sviluppo, il differenziamento e l'omeostasi del SNC. Inoltre, i risultati estensivamente discussi, offrono un potenziale punto di partenza per l'elaborazione di strategie terapeutiche eventualmente applicabili nel campo della medicina molecolare e della terapia rigenerativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonizzi G., Cicalese A., Insinga A., Pelicci P.G., The emerging role of p53 in stem cells, *Trends Mol Med*, 2011, [Epub ahead of print].
2. Molofsky A.V., Pardoll R., Morrison S.J., Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal, *Curr Opin Cell Biol*, Vol 16, no 6, 2004, pp 700-707.
3. Cicalese A., Bonizzi G., Pasi C.E., Faretta M., Ronzoni S., Giulini B., Briskin C., Minucci S., Di Fiore P.P., Pelicci P.G., The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells, *Cell*, Vol 138, no 6, 2009, pp 1083-1095.
4. Gonzalez-Cano L., Herreros-Villanueva M., Fernandez-Alonso R., Ayuso-Sacido A., Meyer G., Garcia-Verdugo J.M., Silva A., Marques M.M., Marin M.C., p73 deficiency results in impaired self renewal and premature neuronal differentiation of mouse neural progenitors independently of p53, *Cell Death Dis*, 2010, 1:e109.
5. Shanthly N., Aruva M.R., Zhang K., Mathew B., Thakur M.L., Stem cells: a regenerative pharmaceutical, *Q J Nucl Med Mol Imaging*, Vol. 50, no 3, 2006, pp 205-216.
6. Schöler H.R., The Potential of Stem Cells: An Inventory, Chapter Three (28-29) of "Humanbiotechnology As Social Challenge: An Interdisciplinary Introduction to Bioethics", Knoepffler N., Schipanski D., Sorgner S.L., 2009.
7. Ramón y Cajal S., Degeneration and regeneration of the nervous system (Translated by RM Day from the 1913 Spanish edition). Oxford University Press, Oxford, 1928.
8. Qian X., Shen Q., Goderie S.K., He W., Capela A., Davis A.A., Temple S., Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells, *Neuron*, Vol. 28, no 1, 2000, pp. 69–80.
9. Altman J., Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, Vol 135, 1962, pp 1127–1128.
10. Kaplan M.S., Hinds J.W., Neurogenesis in the adult rat: Electron microscopic analysis of light radioautographs, *Science*, Vol 197, no 4308, 1977, pp 1092–1094.
11. Nottebohm F., Neuronal replacement in adult- hood, *Ann N Y Acad Sci*, Vol 457, 1985, pp 143-161.
12. Reynolds B.A., Weiss S., Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system, *Science*, Vol 255, no 3, 1992, pp 1707–1710.
13. Weiss S., Dunne C., Hewson J., Wohl C., Wheatley M., Peterson A.C., Reynolds B.A., Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis, *Journal Neuroscience* Vol 16, no 23, 1996, pp 7599–7609.

- 14.** Kuhn H.G., Dickinson A.H., Gage F.H., Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation, *Journal of Neuroscience*, Vol 16, no 6, 1996, pp 2027–2033.
- 15.** Enwere E., Shingo T., Gregg C., Fujikawa H., Ohta S., Weiss S., Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination, *Journal of Neuroscience*, Vol 24, no 38, 2004, pp 8354–8365.
- 16.** Shors T.J., From stem cells to grandmother cells: How neurogenesis relates to learning and memory, *Cell Stem Cell*, Vol 3, no 3, 2008, pp 253–258.
- 17.** Abdipranoto A., Wu A., Stayte S., Vissel B., The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development, *CNS Neurol Disord Drug Targets*, Vol 7, no 2, 2008, pp 187–210.
- 18.** Gotz M., Huttner W.B., The cell biology of neurogenesis, *Nature Rev Mol Cell Biol*, Vol 6, no 10, 2005, pp 777–788.
- 19.** Conti L., Cattaneo E., Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities?, *Nat Rev Neurosci*, Vol 11, no 3, 2010, pp 176-187. Review. Erratum in: *Nat Rev Neurosci*. Vol 11, no 11, 2010, 782.
- 20.** Borello U., Pierani A., Patterning the cerebral cortex: traveling with morphogens, *Curr Opin Genet Dev*, Vol 20, no 4, 2010, pp 408-415.
- 21.** Gilmore E.C., Herrup K., Cortical development: layers of complexity, *Curr Biol*, Vol 7, no 4, 1997, R231-234. Review.
- 22.** Campbell K., Cortical neuron specification: it has its time and place, *Neuron*, Vol 46, no 3, 2005, pp 373-376.
- 23.** Hartfuss E., Galli R., Heins N., Gotz M., Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia, *Dev Biol*, Vol 229, no 1, 2001, pp.15-30.
- 24.** Jossin Y., Neuronal migration and the role of reelin during early development of the cerebral cortex, *Mol Neurobiol* Vol 30, no 3, 2004, pp. 225-251.
- 25.** Noctor S.C., Martinez-Cerdeno V., Ivic L., Kriegstein A.R., Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* Vol 7, no 2, 2004, pp. 136-144.
- 26.** Sauvageot C.M., Stiles C.D., Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis, *Curr Opin Neurobiol*, Vol. 12, no 3, 2002, pp. 244–249.
- 27.** Fan G., Martinowich K., Chin M.H., He F., Fouse S.D., Hutnick L., Hattori D., Ge W., Shen Y., Wu H., ten Hoeve J., Shuai K., Sun Y.E., DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling, *Development*, Vol 132, no 15, 2005, pp. 3345-3356.
- 28.** Sun Y., Nadal-Vicens M., Misono S., Lin M.Z., Zubiaga A., Hua X., Fan G., Greenberg, M.E., Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms, *Cell*, Vol 104, no 3, 2001, pp. 365-376.

- 29.** Qian X., Davis A.A., Goderie S.K., Temple S, FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells, *Neuron* Vol 18, no 1, pp. 81-93.
- 30.** Nakashima K., Wiese S., Yanagisawa M., Arakawa H., Kimura N., Hisatsune T., Yoshida K., Kishimoto T., Sendtner M., Taga, T., Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation, *J. Neurosci*, Vol 19, no 13, 1999, pp. 5429-5434.
- 31.** Takizawa T., Nakashima K., Namiyama M., Ochiai W., Uemura A., Yanagisawa M., Fujita N., Nakao M., Taga T., DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain, *Dev Cell*, Vol 1, no 6, 2001, pp 749–758.
- 32.** Lu Q.R., Yuk D., Alberta J.A., Zhu Z., Pawlitzky I., Chan J., McMahon A.P., Stiles C.D., Rowitch DH., Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system, *Neuron*, Vol 25, no 2, 2000, pp. 317-329.
- 33.** Kriegstein A., Alvarez-Buylla A., The glial nature of embryonic and adult neural stem cells, *Annu Rev Neurosci*, Vol 32, 2009, pp 149-184.
- 34.** Doetsch F., Alvarez-Buylla A., Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol 93, no 25, 1996, pp 14895-14900.
- 35.** Herrera D.G., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A., Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain, *Ann Neurol*, Vol 46, no, 1999, pp 867-877.
- 36.** Lois C., Alvarez-Buylla A., Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain, *Science*, Vol 264, no 5162, 1994, pp 1145–1148.
- 37.** Biebl M., Cooper C.M., Winkler J., Kuhn HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain, *Neurosci Lett*, Vol 291, no 1, 2000, pp 17–20.
- 38.** Garzón-Muvdi T., Quiñones-Hinojosa A., Neural stem cell niches and homing: recruitment and integration into functional tissues, *ILAR J*, Vol 51, no 1, 2009, pp 3-23. Review.
- 39.** Li W., LoTurco J.J., Noggin is a negative regulator of neuronal differentiation in developing neocortex, *Dev Neurosci*, Vol 22, no 1-2, 2000, pp 68-73.
- 40.** Bonaguidi M.A., McGuire T., Hu M., Kan L., Samanta J., Kessler J.A., LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP expressing cells, *Development*, Vol 132, no 24, 2005, pp 5503-5514.
- 41.** Nicoleau C., Benzakour O., Agasse F., Thiriet N., Petit J., Prestoz L., Roger M., Jaber M., Coronas V., Endogenous hepatocyte growth factor is a niche signal for subventricular zone neural stem cell amplification and self-renewal, *Stem Cells*, Vol 27, no 2, 2008, pp 408-419.
- 42.** Ramirez-Castillejo C., Sanchez-Sanchez F., Andreu-Agullo C., Ferron S.R., Aroca-Aguilar J.D., Sanchez P., Mira H., Escribano J., Farinas I., Pigment

epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal, *Nat Neurosci*, Vol 9, no 3, 2006, pp 331-339.

43. Pumiglia K., Temple S., PEDF: Bridging neurovascular interactions in the stem cell niche, *Nat Neurosci*, Vol 9, no 3, 2006, pp 299-300.

44. Li Q., Ford M.C., Lavik E.B., Madri J.A., Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study. *J Neurosci Res*, Vol 84, no 8, 2006, pp 1656-1668.

45. Goldberg J.S., Hirschi K.K., Diverse roles of the vasculature within the neural stem cell niche, *Regen Med*, Vol 4, no 6, 2009, pp 879-897.

46. Ma D.K., Bonaguidi M.A., Ming G.L., Song H., Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system, *Cell Res*, Vol 19, no 6, 2009, pp 672-682.

47. Brazel C.Y., Rao M.S., Aging and neuronal replacement, *Ageing Res Rev* 3, no 4, 2004, pp 465-483.

48. Ying Q.L., Stavridis M., Griffiths D., Li M., Smith A., Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture, *Nature Biotech*, Vol 21, no 2, 2003, pp 183-186.

49. Evans M.J., Kaufman M.H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, Vol 292, no 5819, 1981, pp 154-156.

50. Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C., Mak T.W., Rossant J., van der Kooy D., Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism, *Neuron*, Vol 30, no 1, 2001, pp 65-78.

51. Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P., Tomishima M., Sadelain M., Studer L., Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling, *Nature Biotech*, Vol 27, no 3, 2009, pp 275-280.

52. Elkabetz Y., Panagiotakos G., Al Shamy G., Socci N.D., Tabar V., Studer L., Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage, *Genes Dev*, Vol 22, no 2, 2008, pp 152-165.

53. Koch P., Opitz T., Steinbeck J.A., Ladewig J., Brustle O., A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Vol 106, no 9, 2009, pp 3225-3230.

54. Bibel M., Richter J., Schrenk K., Tucker K.L., Staiger V., Korte M., Goetz M., Barde Y.A., Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage, *Nature Neurosci*, Vol 7, no 9, 2004, pp 1003-1009.

55. Conti L., Pollard S.M., Gorba T., Reitano E., Toselli M., Biella G., Sun Y., Sanzone S., Ying Q.L., Cattaneo E., Smith A., Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell, *PLoS Biol*, Vol 3, no 9, 2005, e283.

56. Doe C.Q., Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation, *Development*, Vol 135, no 9, 2008, pp 1575-1587.

- 57.** Zechner D., Fujita Y., Hülsken J., Müller T., Walther I., Taketo M.M., Crenshaw E.B. 3rd, Birchmeier W., Birchmeier C., beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system, *Dev. Biol.*, Vol 258, no 2, 2003, pp 406-418.
- 58.** Hoover B.A., Muschler G., Beta-catenin mediated Wnt signaling as a marker for characterization of human bone marrow-derived connective Tissue Progenitor Cells, *Journal of young investigators*, Vol. 12, no 5, 2005.
- 59.** Machon O., Backman M., Machonova O., Kozmik Z., Vacik T., Andersen L., Krauss S., A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus, *Dev Biol* 2007, Vol 311, no 1, pp 223-237.
- 60.** Megason S.G., McMahon A.P., A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS, *Development*, Vol 129, no 9, 2002, pp 2087-2098.
- 61.** Nishihara S., Tsuda L., Ogura T., The canonical Wnt pathway directly regulates NRSF/REST expression in chick spinal cord, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol 311, no 1, 2003, pp 55-63.
- 62.** Takemoto T., Uchikawa M., Kamachi Y., Kondoh H., Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1, *Development*, Vol 133, no 2, 2006, pp 297-306.
- 63.** Hirabayashi Y., Itoh Y., Tabata H., Nakajima K., Akiyama T., Masuyama N., Gotoh Y., The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells, *Development*, Vol 131, no 12, 2004, pp 2791-2801.
- 64.** Heretsch P., Tzagkaroulaki L., Giannis A., *Bioorg Med Chem*, Vol 18, no 18, 2010, pp 6613-6624. Review.
- 65.** Lai K., Kaspar B.K., Gage F.H., Schaffer D.V., Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo, *Nat. Neurosci*, Vol 6, no 1, 2003, pp 21-27.
- 66.** Palma V., Lim D.A., Dahmane N., Sanchez P., Brionne T.C., Herzberg C.D., Gitton Y., Carleton A., Alvarez-Buylla A., Ruiz i Altaba A., Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain, *Development* Vol 132, no 2, 2005, pp 335-344.
- 67.** Argenti B., Gallo R., Di Marcotullio L., Ferretti E., Napolitano M., Canterini S., De Smaele E., Greco A., Fiorenza M.T., Maroder M., Screpanti I., Alesse E., Gulino A., Hedgehog antagonist REN (KCTD11) regulates proliferation and apoptosis of developing granule cell progenitors, *J Neurosci*, Vol 25, no 36, 2005, pp 8338-8346.
- 68.** Agathocleous M., Locker M., Harris W.A., Perron M., A general role of hedgehog in the regulation of proliferation, *Cell Cycle*, Vol 6, no 2, 2007, pp 156-159.
- 69.** Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., Lake R.J., Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, *Science*, Vol 284, no 5415, 1999, pp 770–776.

- 70.** Borggrefe T., Oswald F., The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes, *Cell Mol. Life Sci*, Vol 66, no 10, 2009, pp 1631–1646.
- 71.** Handler M., Yang X., Shen J., Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis, *Development*, Vol 127, no 12, 2000, pp 2593-2606.
- 72.** Hatakeyama J., Bessho Y., Katoh K., Ookawara S., Fujioka M., Guillemot F. Kageyama R., Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation, *Development*, Vol 131, no 22, 2004, pp 5539-5550.
- 73.** Mizutani K., Yoon K., Dang L., Tokunaga A. Gaiano N., Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors, *Nature*, Vol 449, no 7160, 2007, pp 351-355.
- 74.** Gaiano N., Nye J.S., Fishell G., Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain, *Neuron*, Vol 26, no 2, 2000, pp 395-404.
- 75.** Ohtsuka T., Sakamoto M., Guillemot F., Kageyama R., Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain, *J. Biol. Chem*, Vol 276, no 32, 2001, pp 30467-30474.
- 76.** Yoon K., Nery S., Rutlin M.L., Radtke F., Fishell G., Gaiano N., Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors, *J. Neurosci*, Vol 24, no 43, 2004, pp 9497-9506.
- 77.** Jensen J.B., Parmar M., Strengths and limitations of the neurosphere culture system, *Mol Neurobiol*, Vol 34, no 3, 2006, pp 153-161.
- 78.** Farkas L.M., Huttner W.B., The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Vol 20, no 6, 2008, pp 707-715.
- 79.** Morrison S.J., Kimble J., Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, Vol 441, no 7097, 2006, pp 1068-1074.
- 80.** Egger B., Gold K.S., Brand A.H., Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the *Drosophila* optic lobe, *Development*, Vol 137, no 18, 2010, pp 2981-2987.
- 81.** McGill M.A., McGlade C.J., Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain, *J Biol Chem*, Vol 278, no 25, 2003, pp 23196-23203.
- 82.** Kuo C.T., Mirzadeh Z., Soriano-Navarro M., Rasin M., Wang D., Shen J., Sestan N., Garcia-Verdugo J., Alvarez-Buylla A., Jan L.Y., Jan Y.N., Postnatal deletion of Numb/Numbl like reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche, *Cell*, Vol 127, no 6, 2006, pp 1253-1264.
- 83.** Zhang X., Szabo E., Michalak M., Opas M., Endoplasmic reticulum stress during the embryonic development of the central nervous system in the mouse, *Int J Dev Neurosci*, Vol 25, no 7, 2007, pp 455-463.

- 84.** Mellodew K., Suhr R., Uwanogho D.A., Reuter I., Lendahl U., Hodges H., Price J., Nestin expression is lost in a neural stem cell line through a mechanism involving the proteasome and Notch signalling, *Brain Res Dev Brain Res*, Vol 151, no 1-2, 2006, pp 13-23.
- 85.** Schoenherr C.J., Anderson D.J., The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes, *Science*, Vol 267, no 5202, 1995, pp 1360-1363.
- 86.** Ballas N., Grunseich C., Lu D.D., Speh J.C., Mandel G., REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis, *Cell*, Vol 121, no 4, 2005 pp 645-657.
- 87.** Johnson R., Teh C.H., Kunarso G., Wong K.Y., Srinivasan G., Cooper M.L., Volta M., Chan S.S., Lipovich L., Pollard S.M., Karuturi R.K., Wei C.L., Buckley N.J., Stanton L.W., REST regulates distinct transcriptional networks in embryonic and neural stem cells. *PLoS Biol*, Vol 6, no 10, 2008, e256.
- 88.** Westbrook T.F., Hu G., Ang X.L., Mulligan P., Pavlova N.N., Liang A., Leng Y., Maehr R., Shi Y., Harper J.W., Elledge S.J., SCFbeta-TRCP controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation, *Nature*, Vol 452, no 7185, 2008, pp 370-374.
- 89.** Bonvini P., Nguyen P., Trepel J., Neckers L.M., In vivo degradation of N-myc in neuroblastoma cells is mediated by the 26S proteasome, *Oncogene*, Vol 16, no 9, 1998, pp 1131-1139.
- 90.** Ma D.K., Marchetto M.C., Guo J.U., Ming G.L., Gage F.H., Song H., Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain, *Nat Neurosci*, Vol 13, no 11, 2010, pp 1338-1344.
- 91.** Hirabayashi Y., Gotoh Y., Epigenetic control of neural precursor cell fate during development, *Nat Rev Neurosci*, Vol 11, no 6, pp 377-388, 2010. Review.
- 92.** Cedar H., Bergman Y., Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms, *Nat Rev Genet*, Vol. 10, no 5, 2009, pp 295–304.
- 93.** Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., Brambrink T., Medeiros L.A., Lee T.I., Levine S.S., Wernig M., Tajonar A., Ray M.K., Bell G.W., Otte A.P., Vidal M., Gifford D.K., Young R.A., Jaenisch R., Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells, *Nature*, Vol 441, no 7091, 2006, pp 349–353.
- 94.** Lee S.T., Park J.E., Lee K., Kang L., Chu K., Kim S.U., Kim M., Roh J.K., Noninvasive method of immortalized neural stem-like cell transplantation in an experimental model of Huntington's disease, *J Neurosci Methods*, Vol 152, no 1-2, 2006, pp 250–254.
- 95.** Hu Q., Zhang L., Wen J., Wang S., Li M., Feng R., Yang X, Li L., The EGF receptor-sox2-EGF receptor feedback loop positively regulates the self-renewal of neural precursor cells, *Stem Cells*, Vol 28, no 2, 2010, pp 279-286.
- 96.** Ambros V., The functions of animal microRNAs, *Nature*, Vol 431, no 7006, 2004, pp 350-355.

- 97.** Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B., Bartel, D.P., Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs, *Genome Res*, Vol 19, no 1, 2009, pp 92-105.
- 98.** Shi Y., Zhao X., Hsieh J., Wichterle H., Impey S., Banerjee S., Neveu P., Kosik K.S. MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis, *J Neurosci*, Vol 30, no 45, 2010, pp 14931-14936.
- 99.** Zhao C., Sun G., Li S., Shi Y., A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat Struct Mol Biol*, Vol 16, no 4, 2009, pp 365-371.
- 100.** Nishino J., Kim I., Chada K., Morrison S.J., Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression, *Cell*, Vol 135, no 2, 2008, pp 227-239.
- 101.** Hammond S.M., Sharpless N.E., HMGA2, microRNAs, and stem cell aging. *Cell*, Vol 135, no 6, 2008, pp 1013-1016. Review.
- 102.** Cheng L.C., Pastrana E., Tavazoie M., Doetsch F., miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche, *Nat Neurosci*, Vol 12, no 4, 2009, pp 399-408.
- 103.** Xu S., Witmer P.D., Lumayag S., Kovacs B., Valle D., MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster, *J Biol Chem*, Vol 282, no 34, 2007, pp 25053-25066.
- 104.** Zhu Q., Sun W., Okano K., Chen Y., Zhang N., Maeda T., Palczewski K., .A sponge transgenic mouse model reveals important roles for the miRNA-183/96/182 cluster in post-mitotic photoreceptors of the retina, *J Biol Chem*, [Epub ahead of print], 2011.
- 105.** Houbaviy H.B., Murray M.F., Sharp P.A., Embryonic stem cell-specific MicroRNAs, *Dev Cell*, Vol 5, no 2, 2003, pp 351-358.
- 106.** Wellner U., Schubert J., Burk U.C., Schmalhofer O., Zhu F., Sonntag A., Waldvogel B., Vannier C., Darling D., zur Hausen A., Brunton V.G., Morton J., Sansom O., Schüler J., Stemmler M.P., Herzberger C., Hopt U., Keck T., Brabletz S., Brabletz T., The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness inhibiting microRNAs, *Nat Cell Biol*, Vol 11, no 12, 2009, pp 1487-1495.
- 107.** Li G., Luna C., Qiu J., Epstein D.L., Gonzalez P., Targeting of integrin beta1 and kinesin 2alpha by microRNA 183, *J Biol Chem*, Vol 285, no 8, pp 2010, pp 5461-5471.
- 108.** Bruggeman S.W., Hulsman D., van Lohuizen M., Bmi1 deficient neural stem cells have increased integrin dependent adhesion to self-secreted matrix, *Biochim Biophys Acta*, Vol 1790, no 5, 2009, pp 351-360.
- 109.** Abraham D., Jackson N., Gundara J.S., Zhao J., Gill A.J., Delbridge L., Robinson B.G., Sidhu S.B., MicroRNA Profiling of Sporadic and Hereditary Medullary Thyroid Cancer Identifies Predictors of Nodal Metastasis, Prognosis, and Potential Therapeutic Targets, *Clin Cancer Res*, Vol 17, no 14, 2011, pp 4772-4781.

- 110.**Han Y., Chen J., Zhao X., Liang C., Wang Y., Sun L., Jiang Z., Zhang Z., Yang R., Chen J., Li Z., Tang A., Li X., Ye J., Guan Z., Gui Y., Cai Z., MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing, *PLoS One*, Vol 6, no 3, 2011, e18286.
- 111.**Hannafon B.N., Sebastiani P., de Las Morenas A., Lu J., Rosenberg C.L., Expression of microRNA and their gene targets are dysregulated in preinvasive breast cancer, *Breast Cancer Res*, Vol 13, no 2, 2011, Epub ahead of print.
- 112.**Gokhale A., Kunder R., Goel A., Sarin R., Moiyadi A., Shenoy A., Mamidipally C., Noronha S., Kannan S., Shirsat N.V., Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway, *J Cancer Res Ther*, Vol 6, no 4, 2010, pp 521-529.
- 113.**Yamada Y., Enokida H., Kojima S., Kawakami K., Chiyomaru T., Tatarano S., Yoshino H., Kawahara K., Nishiyama K., Seki N., Nakagawa M., MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology, *Cancer Sci*, Vol 102, no 3, 2011, pp 522-529.
- 114.**Li J., Fu H., Xu C., Tie Y., Xing R., Zhu J., Qin Y., Sun Z., Zheng X., miR-183 inhibits TGF-beta1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer*, Vol 10, no 354, 2010.
- 115.**Lowery A.J., Miller N., Dwyer R.M., Kerin M.J., Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells., *BMC Cancer*, Vol 10, no 502, 2010.
- 116.**Sarver A.L., Li L., Subramanian S., MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration, *Cancer Res*, Vol 20, no 23, 2010, pp 9570-9580.
- 117.**Tarasov V., Jung P., Verdoodt B., Lodygin D., Epanchintsev A., Menssen A., Meister G., Hermeking H., Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest, *CellCycle*, Vol 6, no 13, 2007, pp 1586–1593.
- 118.**Boominathan L., Tumor suppressors p53, p63, and p73 inhibit migrating cancer stem cells by increasing the expression of stem cell suppressing miRNAs, *Nature Precedings*, hdl:10101/npre.2010.4385.1, 2010.
- 119.**Boominathan L., The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex, *PLoS One*, Vol 5, no 5, 2010, e10615.
- 120.**Cattaneo M., Lotti L.V., Martino S., Cardano M., Orlandi R., Mariani-Costantini R., Biunno I., Functional characterization of two secreted SEL1L isoforms capable of exporting unassembled substrate, *J Biol Chem*, Vol 284, no 17, 2009, pp 11405-11415.
- 121.**Cattaneo M., Lotti L.V., Martino S., Alessio M., Conti A., Bachi A., Mariani-Costantini R., Biunno I., Secretion of novel SEL1L endogenous variants is promoted by ER stress/UPR via endosomes and shed vesicles in human cancer cells,*PLoS One*, Vol 16, no 2, 2011, e17206.

- 122.**Mueller B., Lilley B. N., Ploegh H.L., SEL1L, the homologue of yeast Hrd3p, is involved in protein dislocation from the mammalian ER, *J Cell Biol*, Vol 175, no 2, 2006, pp 261-270.
- 123.**Christianson J.C., Shaler T.A., Tyler R.E., Kopito R.R., OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD, *Nat Cell Biol*, Vol 10, no 3, 2008, pp 272-282.
- 124.**Cattaneo M., Otsu M., Fagioli C., Martino S., Lotti L.V., Sitia R., Biunno I., SEL1L and HRD1 are involved in the degradation of unassembled secretory Ig-mu chains, *J Cell Physiol*, Vol 215, no 3, 2008, pp 794-802.
- 125.**Szutorisz H., Georgiou A., Tora L., Dillon N., The proteasome restricts permissive transcription at tissue-specific gene loci in embryonic stem cells, *Cell*, Vol 127, no 7, 2006, pp 1375-1388.
- 126.**Naujokat C., Role of ubiquitin ligases in neural stem and progenitor cells, *Arch Immunol Ther Exp*, Vol 57, no 3, 2009, pp 177–188.
- 127.**Orlandi R., Cattaneo M., Troglio F., Casalini P., Ronchini C., Menard S., Biunno I., SEL1L expression decreases breast tumor cell aggressiveness in vivo and in vitro. *Cancer Res*, Vol 62, no 2, 2002, pp. 567–574.
- 128.**Cattaneo M., Orlandini S., Beghelli S., Moore P.S., Sorio C., Bonora A., Bassi C., Talamini G., Zamboni G., Orlandi R., Menard S., Bernardi L.R., Biunno I., Scarpa A., SEL1L expression in pancreatic adenocarcinoma parallels SMAD4 expression and delays tumor growth in vitro and in vivo, *Oncogene*, Vol 22, no 41, 2003, pp. 6359–6368.
- 129.**Saltini G., Dominici R., Lovati C., Cattaneo M., Michelini S., Malferrari G., Caprera A., Milanesi L., Finazzi D., Bertora P., Scarpini E., Galimberti D., Venturelli E., Musicco M., Adorni F., Mariani C., Biunno I., A novel polymorphism in SEL1L confers susceptibility to Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, Vol 398, no 1-2, 2006, pp. 53-58.
- 130.**Liu Q., Chen J., Mai B., Amos C., Killary A.M., Sen S., Wei C., Frazier M.L., A single-nucleotide polymorphism in tumor suppressor gene SEL1L as a predictive and prognostic marker for pancreatic ductal adenocarcinoma in Caucasians, *Mol Carcinog*, 2011, doi: 10.1002/mc.20808. [Epub ahead of print].
- 131.**Biunno I., Cattaneo M., Orlandi R., Canton C., Biagiotti L., Ferrero S., Barberis M., Pupa S.M., Scarpa A., Ménard S., SEL1L a multifaceted protein playing a role in tumor progression, *J Cell Physiol*, Vol 208, no 1, 2006, pp 23-38.
- 132.**Grant B., Greenwald I., The *Caenorhabditis elegans* sel-1 gene, a negative regulator of lin-12 and glp-1, encodes a predicted extracellular protein, *Genetics*, Vol 143, no 1, 1996, pp 237-247.
- 133.**Li S., Francisco A.B., Munroe R.J., Schimenti J.C., Long Q., SEL1L deficiency impairs growth and differentiation of pancreatic epithelial cells, *BMC Dev Biol.*, Vol 10, no 19, 2010.
- 134.**Francisco A.B., Singh R., Li S., Vani A.K., Yang L., Munroe R.J., Diaferia G., Cardano M., Biunno I., Qi L., Schimenti J.C., Long Q., Deficiency of suppressor enhancer Lin12 1 like (SEL1L) in mice leads to systemic endoplasmic reticulum

stress and embryonic lethality, *J Biol Chem*, Vol 285, no 18, 2010, pp 13694-13703.

135.Francisco A.B., Singh R., Sha H., Yan X., Qi L., Lei X., Long Q., *J Biol Chem*, Vol 286, no 25, 2011, pp 22275-22282.

136.Glaser T., Pollard S.M., Smith A., Brüstle O., Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells, *PLoS One*, Vol 2, no 3, 2007, e298.

137.Spiliotopoulos D., Goffredo D., Conti L., Di Febo F., Biella G., Toselli M., Cattaneo E., An optimized experimental strategy for efficient conversion of embryonic stem (ES)-derived mouse neural stem (NS) cells into a nearly homogeneous mature neuronal population, *Neurobiol Dis*, Vol 34, no 2, 2009, pp 320-331.

138.Pollard S.M., Yoshikawa K., Clarke I.D., Danovi D., Stricker S., Russell R., Bayani J., Head R., Lee M., Bernstein M., Squire J.A., Smith A., Dirks P., Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens, *Cell Stem Cell*, Vol 4, no 6, 2009, pp 568-580.

139.Malferrari G., Monferini E., DeBlasio P., Diaferia G., Saltini G., Del Vecchio E., Rossi-Bernardi L., Biunno I., High-quality genomic DNA from human whole blood and mononuclear cells, *Biotechniques*, Vol 33, 2002, no 6, pp 1228-1230.

140.Watson E.D, Mattar P., Schuurmans C., Cross J.C., Neural Stem Cell Self-renewal Requires the Mrj Co-chaperone, *Developmental dynamics*, Vol 238, no 10, 2009, pp 2564–2574.

141.Orlandi R., Cattaneo M., Troglio F., Campiglio M., Biunno I., Ménard S., Production of a monoclonal antibody directed against the recombinant SEL1L protein, *Int J Biol Markers*, Vol 17, no 2, 2002, pp 104-111.

142.Granelli P., Cattaneo M., Ferrero S., Bottiglieri L., Bosari S., Fichera G., Biunno I., SEL1L and squamous cell carcinoma of the esophagus, *Clin Cancer Res*, Vol 10, no 17, 2004, pp 5857-5861.

143.Barberis M.C., Roz E., Biunno I., SEL1L expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: an immunohistochemical study, *Histopathology*, Vol 48, no 5, 2006, pp 614-616.

144.Ferrero S., Falleni M., Cattaneo M., Malferrari G., Canton C., Biagiotti L., Maggioni M., Nosotti M., Coggi G., Bosari S., Biunno I., SEL1L expression in non-small cell lung cancer, *Hum Pathol*, Vol 37, no 5, 2006, pp 505-512.

145.Bae J.S., Cheong H.S., Kim J.O., Lee S.O., Kim E.M., Lee H.W., Kim S., Kim J.W., Cui T., Inoue I., Shin H.D., Identification of SNP markers for common CNV regions and association analysis of risk of subarachnoid aneurysmal hemorrhage in Japanese population, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol 373, no 4, 2008, pp 593-596.

146.Donoviel D.B., Donovan M.S., Fan E., Hadjantonakis A., Bernstein A., Cloning and characterization of Sel-1l, a murine homolog of the *C. elegans* sel-1 gene, *Mech Dev*, Vol 78, no 1-2, 1998, pp 203-207.

- 147.**Cardano M., Diaferia G.R., Cattaneo M., Dessì S.S., Long Q., Conti L., Deblasio P., Cattaneo E., Biunno I., mSEL-1L (Suppressor/enhancer Lin12-like) protein levels influence murine neural stem cell self-renewal and lineage commitment, *Biol Chem*, Vol 286, no 21, 2011, pp 18708-18719.
- 148.**Ying Q.L., Smith A.G., Defined conditions for neural commitment and differentiation, *Methods Enzymol*, Vol 365, 2003, pp 327-341.
- 149.**Alvarez-Manilla G., Warren N.L., Atwood J. 3rd, Orland, R., Dalton S., Pierce M., Glycoproteomic analysis of embryonic stem cells: identification of potential glycobiomarkers using lectin affinity chromatography of glycopeptides, *J. Proteome*, Vol 9, no 5, 2010, pp 2062-2075.
- 150.**Namihira M., Kohyama J., Abematsu M., Nakashima K., Epigenetic mechanisms regulating fate specification of neural stem cells, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, Vol 363, no 1500, 2008, pp 2099-2109. Review.
- 151.**Krebs L.T., Xue Y., Norton C.R., Shutter J.R., Maguire M., Sundberg J.P., Gallahan D., Closson V., Kitajewski J., Callahan R., Smith G.H., Stark K.L., Gridley T., Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice, *Genes Dev*, Vol 14, no 11, 2000, pp 1343-1352.
- 152.**Imayoshi I., Sakamoto M., Yamaguchi M., Mori K., Kageyama R., Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains, *J Neurosci*, Vol 3, no 9, 2010, pp 3489-3498.
- 153.**Yoon K., Gaiano N., Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants, *Nat Neurosci*, Vol 8, no 6, 2005, pp 709-715.
- 154.**Risau W., Flamme I., Vasculogenesis, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, Vol 11, 1995, pp 73–91.
- 155.**Reaume A.G., Conlon R.A., Zirngibl R., Yamaguchi T.P., Rossant J., Expression analysis of a Notch homologue in the mouse embryo, *Dev. Biol.*, Vol 154, no 2, 1992, pp 377–387.
- 156.**Xue Y., Gao X., Lindsell C.E., Norton C.R., Chang B., Hicks C., Gendron-Maguire M., Rand E.B., Weinmaster G., Gridley T., Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1, *Hum Mol Genet*, Vol 8, no 5, 1999, pp 723–730.
- 157.**Hrabě de Angelis M., McIntyre J. 2nd, Gossler A., Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1, *Nature*, Vol 386, no 6626, 1997, pp 717-721.
- 158.**Fischer A., Schumacher N., Maier M., Sendtner M., Gessler M., The Notch target genes *Hey1* and *Hey2* are required for embryonic vascular development, *Genes Dev*, Vol 18, no 8, 2004, pp 901-911.
- 159.**Bernasconi R., Galli C., Calanca V., Nakajima T., Molinari M., Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates, *J Cell Biol*, Vol 188, no 2, 2010, pp 223-235.

- 160.**Sundaram M., Greenwald I., Suppressors of a lin-12 hypomorph define genes that interact with both lin-12 and glp-1 in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, Vol 135, no 3, 1993, pp 765-783.
- 161.**Del Rio-Tsonis K., Tsonis P.A., Eye regeneration at the molecular age, *Dev Dyn*, Vol 226, no 2, 2003, pp 211-224.
- 162.**Martínez-Morales J.R., Rodrigo I., Bovolenta P., Eye development: a view from the retina pigmented epithelium, *Bioessays*, Vol 26, no 7, 2004, pp 766-777.
- 163.**Fujimura N., Taketo M.M., Mori M., Korinek V., Kozmik Z., Spatial and temporal regulation of Wnt/beta-catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium, *Dev Biol*, Vol 334, no 1, 2009, pp 31-45.
- 164.**Xu Y., Tamamaki N., Noda T., Kimura K., Itokazu Y., Matsumoto N., Dezawa M., Ide C., Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle, *Exp Neurol*, Vol 192, no 2, 2005, pp 251-264.
- 165.**Chen D., McKearin D., Gene circuitry controlling a stem cell niche, *Curr Biol.*, Vol 15, no 2, 2005, pp 179-184.
- 166.**Hatfield S.D., Shcherbata H.R., Fischer K.A., Nakahara K., Carthew R.W., Ruohola-Baker H., Stem cell division is regulated by the microRNA pathway, *Nature*, Vol 435, no 7044, 2005, pp 974-978.
- 167.**Merkle F.T., Tramontin A.D., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A., Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol 101, no 50, 2004, pp 17528–17532.
- 168.**Campos L.S., Beta1 integrins and neural stem cells: making sense of the extracellular environment, *Bioessays*, Vol 27, no 7, 2005, pp 698-707. Review.
- 169.**Bianchi L., Canton C., Bini L., Orlandi R., Ménard S., Armini A., Cattaneo M., Pallini V., Bernardi L.R., Biunno I., Protein profile changes in the human breast cancer cell line MCF-7 in response to SEL1L gene induction, *Proteomics*, Vol 5, no 9, 2005, pp 2433-2442.
- 170.**Iso T., Hamamori Y., Kedes L., Notch signaling in vascular development, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol 23, no 4, 2003, pp 543-553.
- 171.**Domenga V., Fardoux P., Lacombe P., Monet M., Maciazek J., Krebs L.T., Klonjowski B., Berrou E., Mericskay M., Li Z., Tournier-Lasserre E., Gridley T., Joutel A., Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev*, Vol 18, no 22, 2004, pp 2730–2735.
- 172.**Duarte A., Hirashima M., Benedito R., Trindade A., Diniz P., Bekman E., Costa L., Henrique D., Rossant J., Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development, *Genes Dev*, Vol 18, no 20, 2004, pp 2474–2478.
- 173.**Gale N.W., Dominguez M.G., Noguera I., Pan L., Hughes V., Valenzuela D.M., Murphy A.J., Adams N.C., Lin H.C., Holash J., Thurston G., Yancopoulos G.D., Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol 101, no 45, 2004, pp 15949–15954.

- 174.**Krebs L.T., Shutter J.R., Tanigaki K., Honjo T., Stark K.L., Gridley T., Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants, *Genes Dev*, Vol 18, no 20, 2004, pp 2469 –2473.
- 175.**Mettouchi A., Meneguzzi G., Distinct roles of beta1 integrins during angiogenesis, *Eur J Cell Biol*, Vol 85, no 3-4, 2006, pp 243-247.
- 176.**Campos L.S., Decker L., Taylor V., Skarnes W., Notch, epidermal growth factor receptor, and beta1-integrin pathways are coordinated in neural stem cells, *J Biol Chem*, Vol 281, no 8, 2006, pp 5300-5309.
- 177.**Namihira M., Nakashima K., Taga T., Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in a immature astrocyte specific gene promoter, *FEBS Lett*, Vol 572, no 1-3, 2004, pp 184–188.
- 178.**Geloso M.C., Corvino V., Michetti F., Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes, *Neurochem Int*, 2011, [Epub ahead of print].
- 179.**Mailhos C., Modlich U., Lewis J., Harris A., Bicknell R., Ish-Horowicz D, Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis, *Differentiation*, Vol 69, no 2-3, 2004, pp 135-144.

Ringraziamenti

Al termine di questa lunga tesi, occorre dedicare alcune righe nel ringraziare le persone che mi hanno sostenuto in questo percorso...

Prima di tutto un grazie di cuore va a tutta la Scuola di Dottorato che mi ha consentito di approfondire interessantissime tematiche scientifiche attraverso cui ho potuto sviluppare al meglio il mio progetto di tesi.

La gentilissima Prof.ssa Soldati Laura merita un ringraziamento davvero sentito, per la sua disponibilità, gentilezza e competenza.

Un grazie alla Dott.ssa Ida Biunno, senza la quale oggi non sarei qui a scrivere la mia seconda tesi sul nostro caro gene "SEL-1L". In più di cinque anni di lavoro insieme, mi ha permesso di capire cosa vuol dire fare ricerca... Non è solo curiosità nel comprendere i più minuziosi meccanismi molecolari che governano la vita... Non è solo il desiderio spensierato di rendersi utili alla società scoprendo davvero qualcosa di speciale... Non è solo un lavoro... E' in realtà tanto sudore, tanto sacrificio, tanta dedizione, ma soprattutto tanta passione!

Ringrazio l'Ing. Pasquale De Blasio che mi ha accolto nel suo team a braccia aperte.

Che dire dei miei compagni di bancone? Un grazie enorme va a tutti loro, a Sara, a Chiara, a Giuseppe, a Marilù e a Serena. Insieme abbiamo condiviso momenti esilaranti, stressanti, estenuanti... Abbiamo riso e discusso... A volte abbiamo trascorso più di 12 ore al giorno insieme, lavorando con grande impegno e costruendo quello che oggi siamo diventati: un gruppo unito e compatto, un gruppo di colleghi ma soprattutto di amici!

I miei genitori meritano un grazie tutto speciale! Se qualcosa di buono ho potuto realizzare in questi anni, il merito è in gran parte il loro. Mi hanno sostenuta e incoraggiata continuamente, la loro fiducia in me è stato un punto fermo affinché io mi sentissi davvero in grado di raggiungere i vari traguardi della mia vita. Dedico questa tesi a loro, che sono fisicamente così lontani da me, ma che sento davvero vicini!

Le mie sorelle, i miei cognati meritano un altro grazie, poiché il loro supporto e la loro stima in me sono stati di grande incoraggiamento in questi anni. I miei 4 nipotini mi hanno offerto un po' di svago dal lavoro e, nonostante mi chiamino "scienziata pazza", diventeranno tutti grandi ricercatori nel futuro!

Dulcis in fundo, un grazie dal profondo del mio cuore va a Vladimiro... Anche questa volta concludiamo un piccolo capitolo della nostra vita insieme. Durante il dottorato mi è stato molto vicino, ha dovuto sopportare tutte le mie digressioni scientifiche, cercando di aiutarmi il più possibile. Il suo credere in me, il suo pensare che io sia una brava ricercatrice mi hanno spinto ad andare avanti, anche quando c'erano delle concrete difficoltà e alla fine insieme ce l'abbiamo fatta!

Grazie!