

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Ciclo XXIV



La riprogrammazione di astrociti umani in cellule neuro-
staminali e neuroni come possibile strumento terapeutico
per le patologie neurologiche

Dott.ssa Marianna Falcone
Tutore: Prof. Giacomo COMI

Anno accademico
2010/2011

*Al mio babbo, alla mia mamma
e ai miei fratelli*

SOMMARIO

Il trapianto di cellule staminali può rappresentare una possibile strategia terapeutica per alcune malattie neurodegenerative e neurologiche attraverso molteplici meccanismi tra cui la sostituzione cellulare e la produzione di fattori neuroprotettivi. Una possibile alternativa potrebbe essere rappresentata dalla riprogrammazione in vivo di cellule endogene come ad esempio gli astrociti in cellule staminali neuronali o neuroni, senza la necessità di trapianto invasivo di cellule dall'esterno.

Recentemente è stato dimostrato che gli astrociti derivati dalla corteccia cerebrale murina possono essere differenziati in neuroni mediante l'espressione di un singolo fattore di trascrizione (Heinrich et al., 2010). Mentre questo studio ha evidenziato la conversione degli astrociti in un contesto murino, una strategia simile non è ancora stata descritta in un contesto umano.

Un elemento essenziale per lo sviluppo di tali applicazioni con valore terapeutico è la comprensione dei meccanismi che regolano la riprogrammazione delle cellule adulte in particolare in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) (Hanna et al., 2010) o direttamente in un'altra linea cellulare come i fibroblasti convertiti in neuroni (Pang et al., 2011, Caiazzo et al., 2011).

La riprogrammazione verso lo stato di pluripotenza coinvolge l'espressione di specifici fattori di staminalità. L'overespressione di un singolo fattore come OCT4 nelle cellule adulte può indurre la completa riprogrammazione quando è espresso nelle cellule neurali (Kim et al., 2009a,b), o promuovere la formazione di un altro fenotipo cellulare, come le cellule del sangue, per esempio, se espresso nei fibroblasti (Szabo et al., 2010). Questi dati suggeriscono che l'effetto dei fattori staminali di riprogrammazione cambi in relazione alla linea e al grado di differenziamento delle cellule stesse.

In questo lavoro, usando l'espressione individuale di fattori di trascrizione staminali, OCT4, SOX2 o NANOG dimostriamo la possibilità di ottenere, direttamente dagli astrociti corticali della corteccia cerebrale umana, progenitori e cellule mature con un fenotipo neuronale.

L'espressione ectopica dei fattori di riprogrammazione in astrociti, insieme a citochine e condizioni di coltura specifiche, attiva il programma genico proprio delle cellule staminali neuronali e induce la generazione di cellule esprimenti i marker staminali neuronali, come viene dimostrato dall'analisi di espressione genica e proteomica. Questo cambiamento è stato ottenuto anche in astrociti maturi CD44+ (dimostrando che questo evento non è il risultato della presenza di cellule staminali/precursori nelle colture cellulari) e non richiede il passaggio attraverso lo stato di pluripotenza simile alle iPSC. Le cellule staminali neuronali derivate dagli astrociti hanno capacità di autorinnovarsi dando luogo a colonie secondarie e terziarie e di differenziare nei tre fenotipi neuroectodermici generando neuroni, astrociti e oligodendrociti. Quando sono trapiantate nei tessuti cerebrali di roditori sono in grado di attecchire e integrarsi nei tessuti dell'ospite con fenotipi neuronali e gliali appropriati.

L'overespressione di ASCL1 può indurre neurogenesi nelle cellule staminali neuronali (Kim et al., 2009), negli astrociti (Heinrich et al., 2010) e in associazione con altri fattori, nei fibroblasti (Vierbuchen et al., 2010; Pang et al., 2011).

Abbiamo dimostrato che l'espressione esogena di ASCL1 nelle cellule neurostaminali derivate dagli astrociti promuove l'acquisizione del fenotipo neurale sia in vitro che in vivo, suggerendo una possibile specifica modulazione del destino neuronale. Per comprendere meglio il meccanismo di riprogrammazione degli astrociti è stata effettuata una analisi di metilazione genomica (usando un array NimbleGen) e abbiamo dimostrato che modificazioni epigenetiche sono alla base di tale processo. L'analisi delle diverse regioni metilate rivela che la riprogrammazione correla con la demetilazione di specifiche regioni. Questi dati dimostrano la possibilità di ripristino della multipotenzialità degli astrociti ed indicano una possibile applicazione della riprogrammazione cellulare delle cellule endogene del SNC per la riparazione del danno tissutale che si verifica nelle malattie neurodegenerative e neurologiche.

ABSTRACT

Generating neural stem cells and neurons from reprogrammed human astrocytes is a potential strategy for repair in neurological diseases.

It has been recently showed that astrocytes from murine cerebral cortex can be differentiated into neurons by the forced expression of a single transcription factor (Heinrich et al., 2010). While these studies have evaluated astrocyte conversion in the murine context, a similar possibility has yet to be demonstrated in human cells. An essential element for developing such applications with therapeutic value is a thorough comprehension of the mechanisms that regulate reprogramming of adult cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs) (Hanna et al., 2010) or directly into another committed lineage, such as fibroblasts converted into neurons and also specific neuronal subpopulations like dopaminergic neurons (Pang et al., 2011, Caiazzo et al., 2011).

Here we demonstrate the possibility to obtain progenitors and mature cells of the neural fate directly from human cortical astrocytes with a dedifferentiation into neural stem/progenitor phenotype.

Even if for the purpose of autologous cell transplantation in neurological disorders, fibroblasts from patients resemble a much more suitable source of neurons than astrocytes from patients, nevertheless, shedding light in the mechanisms that make possible to reprogram astrocytes into NSCs is useful for the final goal of using these cells as endogenous cell source for in situ neural repair in the CNS without any invasive cell graft. Human astrocytes can be reprogrammed into iPSCs, with similar efficiencies to other cells, using the viral expression of four reprogramming factors (Oct4, Sox2, Klf4, and cMyc) (Riuz et al., 2008). Remarkably, overexpression of a single factor like OCT4 in adult cells can induce full reprogramming, as when it is expressed in NSCs (human and mouse) (Kim et al., 2009 a, b) or promote the formation of another phenotype, such as the generation of blood cells with its expression in human fibroblasts (Szabo et al., 2010). These data suggest that the effect of these stem reprogramming factors changes in relationship to the lineage and the differentiation stage of the cells expressing them. In the current work, using the individual expression of OCT4, SOX2, or NANOG, we demonstrated and characterized the direct neural fate conversion of human astrocytes into multipotent neural progenitors, in vitro and in vivo. These cells were generated in a manner that is independent of iPSC production. Individual ectopic expression of the reprogramming factors OCT4 or SOX2 or NANOG into astrocytes, together with specific cytokine/culture conditions, activated the neural stem gene program and induced the generation of cells expressing neural stem/precursors markers. This change of lineage commitment was obtained also in pure CD44+ mature astrocytes and did not require passing through a pluripotent state. These unique astrocytes-derived neural stem cells gave rise to neurons, astrocytes and oligodendrocytes, and showed in vivo engraftment properties. ASCL1 expression further promotes the acquisition of a neuronal phenotype in vitro and in vivo. ASCL1 expression further promotes the acquisition of a neuronal phenotype in vitro and in vivo (Kim et al., 2009). To develop a broader understanding of astrocytes reprogramming we performed a

methylation analysis demonstrating that epigenetic modifications underlie this process.

These observations indicated that the sites of epigenetic and gene expression changes during reprogramming of astrocytes to NSCs are tightly linked to genes that are functionally important for pluripotency. These data demonstrate restoration of multipotency from human astrocytes, and point out a possible application of cellular reprogramming to endogenous CNS cells for repair of neurological disorders.

INDICE

SOMMARIO.....	I
ABSTRACT	III
INDICE	V
ABBREVIAZIONI.....	VII
1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 L'APPROCCIO CELLULO-MEDIATO PER IL TRATTAMENTO DELLE MALATTIE NEUROLOGICHE E NEURODEGENERATIVE	1
1.2 TRAPIANTO CELLULARE	2
1.2.1 Overview sulle cellule staminali	2
1.2.2 Tipi di cellule staminali	3
1.2.3 La riprogrammazione delle cellule somatiche a uno stato pluripotente (iPS).....	5
1.2.4 LA RIPROGRAMMAZIONE DIRETTA DELLE CELLULE SOMATICHE IN UN ALTRO FENOTIPO	6
1.2.5 Potenziali utilizzi delle cellule staminali nelle malattie neurologiche.....	6
1.3 TRASDIFFERENZIAMENTO.....	7
1.3.1 Trasdifferenziamento in neuroni	7
1.4 ASTROCITI COME SORGENTE DI CELLULE STAMINALI	10
1.4.1 La Glia nel parenchima cerebrale adulto	11
1.4.2 Markers condivisi da astrociti, cellule gliali radiale e NSC... 11	11
1.4.3 Differenze funzionali tra astrociti maturi e progenitori	14
1.4.4 I difetti di importo mitocondriale nelle patologie umane	13
1.5 RIPROGRAMMAZIONE DEGLI ASTROCITI IN NEURONI.....	13
1.5.1 Destino neurogenico determinato da PAX6.....	14
1.5.2 Altri fattori determinanti il destino neurogeno	15
1.5.3 Gli astrociti postnatali	15
2. MATERIALI E METODI	19
2.1. COLTURE CELLULARI ASTROCITARIE	19
2.2. RIPROGRAMMAZIONE DEGLI ASTROCITI IN NSC	19
2.3. LA RIPROGRAMMAZIONE DEI FIBROBLASTI IN iPS.....	20
2.4. ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE NSC	II

segnalibro non è definito.

2.5. ANALISI IMMUNOCITOCHIMICA	Errore. Il segnalibro non è definito.
2.6. ANALISI D'ESPRESSIONE GENICA: Astro vs AstroNANOG21
2.7. TRAPIANTO CELLULARE22
2.8. ANALISI TESSUTALE22
2.9. LA MARCATURA E L'IBRIDAZIONE DELL'ARRAY NimbleGen PER L'ANALISI DI METILAZIONE23
2.10. L'ANALISI DI METILAZIONE DEL DNA FIND-PEAKS23
3. RISULTATI24
3.1. RIPROGRAMMAZIONE DI ASTROCITI UMANI ATTRAVERSO L'ESPRESSIONE ECTOPICA DI FATTORI TRASCRIZIONALI STAMINALI24
3.2. LA RIPROGRAMMAZIONE DIRETTA IN NSC NON RICHIEDE IL PASSAGGIO AD UNO STATO PLURIPOTENTE SIMILE ALLE iPSC	29
3.3. DIFFERENZIAMENTO NEURONALE DELLE NSC DERIVATE DAGLI ASTROCITI IN VITRO Errore. Il segnalibro non è definito.
3.4. DIFFERENZIAMENTO NEURONALE DELLE NSC DA ASTROCITI IN VIVO39
3.5. LE MODIFICAZIONI EPIGENETICHE SONO ALLA BASE DELLA RIPROGRAMMAZIONE DEGLI ASTROCITI IN NSC43
4. DISCUSSIONE46
5. CONCLUSIONI49
BIBLIOGRAFIA51

ABBREVIAZIONI

AD: Malattia di Alzheimer
ASCL1: Achaete-scute homolog 1
DCX: Doublecortina
ChAT: Acetil colin transferasi
EB: Corpi embrionali
ES/ESC: Cellule Staminali Embrionali
FACS: Fluorescence-activated cell sorting
GFAP: Proteina acida gliale fibrillare
GFP: Green fluorescent protein
GLAST: Trasportatore di aminoacidi eccitatori 1
GLT1: Trasportatore di aminoacidi eccitatori 2
iPS: Induced Pluripotent Stem cell (cellule staminali pluripotenti indotte)
LIF: Leukemia Inhibitor Factor
MAP2: Proteina 2 associata ai microtubuli
Mash1: Mammalian achate schute Homolog 1 and 2
MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus
Ngn 1,2: Neurogenina
NF: Neurofilamento
NMJ: Neuronal Muscular Junction
NSC: Cellule Staminali Neuronali
OPC: Cellule progenitrici degli oligodendrociti
PMN: Motoneuroni spinali primari
RA: Retinoic Acid
Shh: Sonic hedgehog
SLA: Sclerosi Laterale Amiotrofica
SMA: Atrofia Muscolare Spinale
SNC: Sistema Nervoso Centrale
TRICT: Tetrametilrodamina isotiocinata
TBR 1,2: T-box brain 2

1 INTRODUZIONE

1.1 L'APPROCCIO CELLULO-MEDIATO PER IL TRATTAMENTO DELLE MALATTIE NEUROLOGICHE E NEURODEGENERATIVE

Le malattie neurologiche sono, nella maggior parte dei casi, caratterizzate dalla perdita di neuroni nell'encefalo e nel midollo spinale sia per processi di natura acuta come ischemia o trauma, che danno origine ad una perdita neuronale locale, che di tipo cronico come i processi neurodegenerativi che risultano nella perdita di un particolare sottotipo di neuroni o in una perdita generalizzata di più popolazioni neuronali. A livello cerebrale, la Malattia di Alzheimer (AD) o la Corea di Huntington sono associate ad una perdita neuronale relativamente diffusa, mentre nel Morbo di Parkinson vi è una perdita selettiva dei neuroni dopaminergici della sostanza nera. La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e l'Amiotrofia Spinale muscolare (SMA) sono invece caratterizzate dalla perdita selettiva dei motoneuroni. La sostituzione neuronale, dopo una perdita acuta o cronica, non avviene nella maggior parte delle aree del Sistema Nervoso Centrale (SNC) dei mammiferi adulti e la perdita neuronale è per lo più da considerarsi definitiva (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Nonostante queste patologie presentino uno specifico quadro neuropatologico, gli esatti meccanismi della perdita neuronale rimangono non sono completamente definiti, cosa che rende l'identificazione di trattamenti efficaci complessa.

La mancanza di una terapia risolutiva per la maggior parte delle malattie neurologiche e neurodegenerative crea un importante impatto sulla vita dei pazienti, delle loro famiglie e sulla società. Sulla base di queste considerazioni, la ricerca scientifica si è recentemente concentrata su nuove tecnologie basate sull'utilizzo di cellule staminali come strumento per lo sviluppo di strategie terapeutiche cellulo-mediate.

Il trapianto cellulare potrebbe rappresentare un approccio terapeutico per tali patologie attraverso molteplici meccanismi: 1) la sostituzione neuronale, 2) Il rilascio di fattori neuroprotettivi, 3) la riduzione delle sostanze tossiche nel microambiente, 4) la sostituzione di altre cellule non neuronali. Le cellule staminali sono cellule primitive non specializzate dotate della capacità di autorinnovarsi e di dare origine a cellule differenziate. Per comprendere le possibilità di applicazione delle cellule staminali nelle malattie neurologiche, è importante conoscere il fatto che esistono molti tipi di cellule staminali con caratteristiche biologiche diverse e conseguentemente con diverse potenzialità di impatto sulla malattia attraverso vari meccanismi (Nizzardo et al., 2010, Lunn et al., 2011). Le cellule staminali sono classificate in base ai possibili tipi cellulari in cui possono differenziare e/o alla modalità con cui sono ottenute e al tessuto di origine. Di seguito discuteremo dei differenti tipi di cellule staminali che sono attualmente oggetto di studio e che includono cellule somatiche adulte (cellule staminali neuronali), cellule pluripotenti (embrionali e cellule staminali pluripotenti indotte), e cellule generate dalla riprogrammazione diretta di cellule adulte in un altro fenotipo tissutale (ad esempio fibroblasti differenziati direttamente in neuroni).

1.2. TRAPIANTO CELLULARE

Le terapie cellulari per le patologie neurodegenerative si basano anche sulla possibilità di utilizzare cellule staminali per sostituire neuroni ed altre cellule danneggiate. La sostituzione diretta dei circuiti neuronali è l'aspetto più arduo perché le cellule trapiantate non solo devono differenziarsi in neuroni, ma questi devono a loro volta essere riconosciuti e connessi ai neuroni del SNC e devono essere in grado di comunicare funzionalmente con essi (Monani et al., 2000). Oltre alla sostituzione cellulare, le cellule staminali possono esercitare una funzione neuroprotettiva sui neuroni e sul microambiente endogeno secernendo fattori di crescita e fattori trofici.

1.2.1 OVERVIEW SULLE CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali sono cellule che hanno sia la capacità di autorinnovarsi che di generare molteplici tipi cellulari maturi. La totipotenza è definita come la capacità di differenziarsi in qualsiasi tipo cellulare; la pluripotenza è la capacità di differenziarsi in molti ma non in tutti i tipi cellulari, l'unipotenza è invece la capacità di differenziarsi in un solo tipo cellulare.

Le cellule staminali vengono generalmente classificate in cellule staminali embrionali (ES) e in cellule staminali somatiche (progenitrici). Le cellule staminali embrionali si ricavano dall'inner cell mass dalle colture di blastocisti (Evans et al., 1981; Martin et al., 1981; Thomson et al., 1998). Queste cellule sono pluripotenti perché sono in grado di formare molti tipi cellulari maturi in coltura e anche di generare topi chimerici se iniettate in una blastocisti ricevente. Le cellule staminali somatiche hanno una capacità più limitata di autorinnovarsi e un potenziale differenziativo più ristretto (cioè sono spesso multi o unipotenti, generando cellule differenziate del tessuto a cui appartengono).

Le fonti di cellule staminali sono numerose e comprendono embrioni allo stato di blastocisti, tessuti fetali ed adulti. Le cellule staminali si ritrovano anche nel SNC dei mammiferi; diversi gruppi di ricercatori hanno isolato ed espanso cellule staminali umane da specifiche regioni del cervello e del midollo spinale (Gage et al., 2000; Alvarez-Buylla et al., 2002).

Il razionale biologico nell'uso delle cellule staminali nei disordini neurodegenerativi risiede nella capacità di queste cellule di differenziarsi in tipi cellulari maturi in risposta a segnali di sviluppo appropriati per quel tipo cellulare. Questi messaggi possono essere ottenuti in modo stocastico entro gruppi di cellule staminali in fase di differenziamento in vitro oppure essere indotti direttamente su cellule o tessuti in vivo. Recentemente si stanno sviluppando strategie per orientare il differenziamento delle cellule staminali verso una specifica linea cellulare in vitro. Questo è un importante progresso della biologia delle cellule staminali in quanto permette di generare una riserva potenzialmente inesauribile di tipi cellulari maturi puri commissionati o completamente differenziati. Queste cellule possono essere utilizzate per studi biologici di base in vitro oppure come terapia cellulare di diverse malattie. In ogni caso, per il loro utilizzo è necessaria la comprensione dei processi di sviluppo che inducono uno specifico lineage. Poiché molti di questi processi

rimangono scarsamente compresi, il potenziale delle cellule staminali nel trattamento delle malattie sarà realizzato solamente con una più approfondita comprensione della loro biologia cellulare.

1.2.2 TIPI DI CELLULE STAMINALI

Le cellule ES proliferano indefinitamente in vitro mantenendo comunque la capacità di differenziarsi in tutti i tipi di cellule somatiche. Le cellule ES murine sono state isolate per la prima volta nel 1981 (Martin et al., 1981) e messe in coltura con il LIF (leukemia inhibitory factor) e/o su un feeder layer di fibroblasti embrionali di topi indifferenziati e mitoticamente inattivati (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988; Nichols et al., 1990). In assenza di LIF o rimuovendo il feeder layer, le cellule ES si differenziano spontaneamente in aggregati multicellulari che assomigliano a embrioni post impianto, detti corpi embrionali (Thompson et al., 1995-1998).

Una volta trapiantate nel SNC, le cellule ES rispondono agli stimoli ambientali e seguono il destino cellulare proprio della regione trapiantata. Tuttavia la dipendenza dagli stimoli ambientali, preclude un'efficace generazione di neuroni in regioni non-neurogeniche del SNC, Inoltre le cellule indifferenziate possono formare teratomi. E' necessario quindi prima di trapiantare queste cellule, differenziarle nel fenotipo desiderato. Il diretto differenziamento delle cellule ES in un particolare tipo di cellula matura può essere ottenuto in alcuni casi, tramite diversi fattori di trascrizione e morfogeni, sebbene in questo campo siano necessari ulteriori studi (Grepin et al., 1997; Fujikura et al., 2002; Kanda et al., 2003).

Sono stati infatti sviluppati diversi protocolli di differenziamento in vitro, col fine di ottenere specifici sottotipi cellulari neuronali e gliali. L'esposizione all'acido retinoico (RA) ed al Sonic hedgehog (Shh) indirizza le cellule ES verso un destino motoneuronale ed interneuronale (Wichterle et al., 2002; Li et al., 2005), mentre altre molecole possono portare al differenziamento in neuroni dopaminergici (Lee et al., 2000; Kawasaki et al., 2000-2002; Barbieri 2003; Perrier et al., 2004; Roy et al., 2006), neuroni telencefalici (Watanabe et al., 2005), astrociti (Gossrau et al., 2007), oligodendrociti (Glaser et al., 2005; Nistor et al., 2005) e microglia (Tsuchiya et al., 2005).

L'identificazione e la separazione delle cellule differenziate dalle cellule ES residue o da altri tipi di cellule mature può essere ottenuta attraverso l'espressione di markers fluorescenti o geni di resistenza ai farmaci sotto il controllo di uno specifico promotore di un tipo cellulare (Tanget et al., 2002; Billon et al., 2002).

Le cellule staminali neurali (NSC) sono cellule in grado di autorinnovarsi e di differenziare in neuroni ed astrociti. Sono presenti in diverse regioni del sistema nervoso (zona subventricolare, giro dentato dell'ippocampo, midollo spinale). Negli ultimi decenni è stato possibile isolare ed espandere queste cellule multipotenti dal sistema nervoso adulto e fetale (Weiss et al., 1996; Morshead et al., 1998; Doetsch et al., 1999; Tropepe et al., 2001). Spesso queste cellule sono espansive in vitro sotto forma di aggregati cellulari, le cosiddette "neurosfeere".

Le NSC adulte si dividono meno frequentemente di quelle embrionali e per questo potrebbe essere più difficile espanderle in ampie colture richieste per le applicazioni cliniche. In ogni caso, le NSC adulte hanno dimostrato di essere multipotenti, di rispondere efficientemente ai segnali locali che le inducono a differenziarsi in tipi cellulari maturi e in alcuni casi di integrarsi nei tessuti nervosi dell'ospite (Gage et al., 2000; Gao et al., 2005).

Anche le cellule del bulbo olfattorio hanno dimostrato di essere una fonte di cellule staminali multipotenti del SNC in sviluppo e adulto; queste potrebbero essere anche utilizzate come fonte cellulare autologa (Barnett et al., 2004).

Gli studi sulle NSC murine, sono stati recentemente applicati anche ai tessuti umani al fine di isolare ed espandere NSC umane da diverse regioni del cervello e del midollo spinale (il giro dentato dell'ippocampo e le zone subventricolari) (Gage et al., 2000; Alvarez-Buylla et al., 2002). Queste cellule possono essere espanse e sottoposte ad un metodo di selezione basato sull'attivazione di specifici promotori cellulo-specifici associati ad un gene reporter come la green fluorescent protein (GFP) (Keyoung et al. 2001; Nunes et al., 2003). Con questa strategia possono essere generate popolazioni di progenitori commissionati o tipi cellulari maturi per i trapianti.

L'immortalizzazione dei progenitori umani ottenuta con l'espressione della telomerasi umana indotta con meccanismi retrovirali potrebbe essere importante per permettere a queste cellule di essere sufficientemente espanse, al fine di ottenere una quantità sufficiente per applicazioni di rilevanza clinica nelle malattie neurologiche (Roy et al., 2004).

Il trapianto di NSCs in certi esperimenti dà origine a una produzione di astrociti (dalle cellule trapiantate) e occasionalmente di oligodendrociti; questo suggerisce che gli effetti positivi del trapianto potrebbero essere dati dalla produzione di fattori trofici da parte degli astrociti (Lu et al., 2003) o dalla rimielinizzazione degli assoni da parte degli oligodendrociti provenienti dall'innesto.

Il trapianto di cellule staminali neurali può essere una potenziale strategia terapeutica per le malattie neurodegenerative attraverso molteplici meccanismi tra i quali:

- 1) la sostituzione neuronale associata al rilascio di fattori neuroprotettivi prodotti dalle staminali (Flax et al., 1998);
- 2) la riduzione di sostanze tossiche nel microambiente (Park et al., 2002);
- 3) la sostituzione di altre cellule non-neuronali (Lee et al., 2007).

E' stato dimostrato, sia dal nostro gruppo che da altri, che il trapianto di NSC può migliorare il fenotipo delle malattie del motoneurone in modelli animali (Corti et al., 2006-2010; Maragakis et al., 2009). Abbiamo precedentemente descritto l'efficacia del trapianto delle NSC derivate dal midollo spinale nel migliorare il fenotipo del modello murino di SMA SMN-Delta7 (Corti et al., 2008). I topi SMA trattati hanno dimostrato un miglioramento delle funzioni motorie, un aumento della durata di vita e un miglioramento della patologia dell'unità motoria rispetto ai topi non trattati. Questi dati hanno dimostrato per la prima volta che il trapianto di NSCs influenza positivamente il fenotipo SMA mostrandosi, quindi, come una potenziale strategia terapeutica per la SMA (Corti et al., 2008). In un successivo studio abbiamo verificato se le NSC derivate da cellule staminali pluripotenti murine possano modificare il fenotipo della SMA in un modello murino affetto da tale patologia e

abbiamo osservato che, dopo il trapianto nel topo malato, le cellule NSC sono in grado di migrare nel parenchima generando motoneuroni e di migliorare il fenotipo e la sopravvivenza grazie al loro effetto neuroprotettivo (Corti et al., 2010).

Le cellule umane ES o le recenti cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) possono, quindi, rappresentare una potenziale sorgente cellulare per una strategia cellulo-mediata anche in una patologia come la SMA. I dati ottenuti con le cellule selezionabili indicano inoltre che il differenziamento in motoneuroni potrebbe essere ottimizzato partendo da NSC fenotipicamente stabili.

1.2.3 LA RIPROGRAMMAZIONE DELLE CELLULE SOMATICHE A UNO STATO PLURIPOTENTE (iPS)

Recentemente si è riusciti con successo a riprogrammare delle cellule somatiche differenziate ad uno stato di pluripotenza, tramite l'introduzione di un limitato e definito set di fattori di trascrizione. Queste cellule sono state chiamate induced pluripotent stem cells (iPSC) (Takahashi e Yamanka, 2006, Nishikawa et al., 2008). Il metodo è stato descritto per la prima volta da Yamanaka e colleghi, i quali hanno dimostrato come l'introduzione di quattro fattori di trascrizione (Oct3/4, Sox2, Myc, e Klf4), tramite vettori retrovirali all'interno di fibroblasti murini, inducesse la pluripotenza cellulare (Takahashi et al., 2006; Okita et al., 2007; Werning et al., 2007). Il protocollo è stato poi applicato su altri tipi di cellule murine (Okita et al., 2007; Aoi et al., 2008) e su cellule umane somatiche (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Park et al., 2008; Lowry et al., 2008). Sebbene il set originale per la riprogrammazione genica comprendesse Oct3/4, Sox2, c-Myc, e Klf4, recenti studi (Yu et al., 2007; Lowry et al., 2008) hanno dimostrato che diverse combinazioni di fattori possono sostituire c-Myc e Klf4 per produrre le iPSC. L'omissione dell'oncogene c-Myc, elimina il problema dell'aumentato rischio oncogenico che viene evidenziato nelle cellule derivate dalle iPSC, rischio che è legato all'espressione persistente di c-myc nelle iPSC stesse (Okita et al., 2007; Dimos et al., 2008). Si è inoltre dimostrato che possono essere usati vettori che non si integrano nel genoma per introdurre nelle cellule il set di fattori di trascrizione, e che è sufficiente un'espressione transiente di questi ultimi per riprogrammare le cellule allo stato di pluripotenza (Stadtfeld et al., 2008; Yamanaka et al., 2009). Questo risolve il problema dell'integrazione casuale all'interno del genoma dei vettori retrovirali, con l'associato rischio potenziale di tumorigenesi. Le iPSC hanno le stesse potenzialità delle ES, con le quali condividono la morfologia, l'attività della fosfatasi alcalina e i marker cellulari quali l'espressione di SSEA-4, TRA 1-60, e TRA 1-81 (Dimos et al., 2008). Differenza sostanziale è che le iPSC non derivano da embrioni, non vi sono quindi prolemi di carattere etico legati al loro utilizzo.

Recentemente Dimos et al., hanno ottenuto iPSC a partire da fibroblasti cutanei di una donna di 82 anni affetta da una forma familiare di SLA ed in modo analogo Ebert et al., hanno ottenuto iPSC partendo da fibroblasti cutanei di un paziente SMA. In entrambi gli studi viene dimostrato che le cellule iPS ottenute possiedono tutte le proprietà tipiche delle ES e sono in grado di differenziarsi in una gran varietà di cellule, comprese quelle con fenotipo motoneuronale. Questi motoneuroni, dopo essere stati fatti crescere in coltura per qualche settimana,

hanno presentato le tipiche alterazioni presenti nei motoneuroni di pazienti affetti rispettivamente da SLA e SMA (Dimos et al., 2008; Ebert et al., 2008).

La generazione di cellule staminali pluripotenti, a partire da cellule somatiche di pazienti affetti da malattie neurodegenerative, permette dunque di creare tipi cellulari malattia-specifici. Queste cellule potrebbero essere utilizzate per creare modelli di malattia in vitro, per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche, ed eventualmente per terapie cellulari con trapianto autologo. In modo analogo alle ES, le iPSC rappresentano una potenziale fonte di neuroni per il trattamento delle malattie degenerative; ma al contrario delle ES non presentano problemi etici riguardo al loro trattamento ed utilizzo e potrebbero risolvere o mitigare il problema della reazione immune di rigetto dopo il trapianto cellulare.

1.2.4 LA RIPROGRAMMAZIONE DIRETTA DELLE CELLULE SOMATICHE IN UN ALTRO FENOTIPO

La riprogrammazione diretta di una cellula adulta in un'altra differenziata, come fibroblasti in neuroni, cardiomiociti, o cellule del sangue, senza il passaggio attraverso uno stadio pluripotente indifferenziato è una nuova area di ricerca che recentemente è emersa in seguito all'utilizzo delle cellule staminali e alla riprogrammazione di cellule staminali pluripotenti indotte.

Questo percorso di indagine ha iniziato a svolgere un ruolo centrale nella ricerca di base della biologia e nella medicina rigenerativa. Anche se il campo sembra nuovo, le sue origini risalgono al 1980 quando è stato dimostrato che cellule adulte differenziate possono essere convertite in un'altra linea cellulare tramite l'espressione di fattori di trascrizione che stabiliscono il commissionamento delle cellule mature. Vista la rilevanza di tale aspetto per gli obiettivi del nostro lavoro, tale argomento verrà ulteriormente esposto al punto 1.3

1.2.5 POTENZIALI UTILIZZI DELLE CELLULE STAMINALI NELLE MALATTIE NEUROLOGICHE

I potenziali utilizzi delle cellule staminali nelle malattie neurologiche possono essere classificati in diverse categorie. Prima di tutto possono essere utilizzate come strumenti biologici per la comprensione di una malattia neurologica. Per esempio la capacità di isolare ed espandere linee di cellule ES da diversi modelli di animali geneticamente definiti che riproducono patologie umane e di orientare efficacemente le ES verso particolari linee neuronali permette ai ricercatori di esaminare i processi cellulari e molecolari alla base della patogenesi della malattia. Con la generazione delle iPS umane ora è anche possibile ottenere cellule staminali pluripotenti umane malattia-specifiche. Lo scopo è quello di creare un modello di coltura cellulare della patologia umana per capire meglio la patogenesi della malattia e per vagliare potenziali terapie.

In secondo luogo le cellule staminali neuronali endogene presenti nel sistema nervoso dei mammiferi od "esogene", ottenute cioè da cellule pluripotenti, possono essere espanse per riparare i tessuti danneggiati. Le cellule staminali endogene si trovano in diverse regioni del sistema nervoso dei mammiferi ma, al contrario delle cellule staminali di altri tessuti, non sembrano contribuire alla riparazione tissutale,

quindi sarebbe necessario prelevarle ed espanderle in vitro. Le cellule staminali "esogene" possono essere ottenute a partire dalle ES o da cellule somatiche differenziate (iPS). Le cellule staminali o i progenitori commissionati possono essere trapiantati nel SNC per una riparazione tissutale funzionalmente rilevante. Le cellule trapiantate possono rivestire diversi ruoli terapeutici (in ordine di complessità): provvedere al supporto trofico delle cellule dell'ospite, rallentare il processo degenerativo, facilitare la crescita assonale o la funzione gliale, secernere neurotrasmettitori mancanti nell'ospite, differenziarsi in oligodendrociti e mielinizzare gli assoni dell'ospite, differenziarsi in neuroni, formare connessioni neurali in popolazioni di neuroni non connessi o sostituire i circuiti neurali danneggiati.

Le cellule staminali pluripotenti possono rappresentare uno strumento promettente come modello in vitro per lo sviluppo di nuove terapie e come sorgente di cellule per strategie di trapianto per le malattie neurodegenerative. Lo sviluppo di una terapia cellulare sostitutiva usando cellule ES differenziate è limitata non solo da motivi etici che riguardano soprattutto l'uso di embrioni umani, ma anche da motivi tecnici in merito al possibile rigetto delle cellule trapiantate in caso di trapianto non autologo. La possibilità di generare cellule iPS paziente-specifiche, attraverso la diretta riprogrammazione dei fibroblasti umani supera queste barriere e potrebbe risolvere o mitigare il problema della reazione immune di rigetto associata al trapianto. Inoltre le cellule iPS derivate da pazienti possono fornire nuovi modelli in vitro per studiare i meccanismi patogenetici e uno strumento per lo screening di nuove terapie farmacologiche e molecolari.

1.3 TRANSDIFFERENZIAMENTO

Il transdifferenziamento è la riprogrammazione di un tipo cellulare specializzato in un altro, senza una regressione allo stadio pluripotente. Un obiettivo primario della medicina rigenerativa è quello di convertire le cellule adulte già esistenti da un tipo cellulare a un altro per fornire una fonte cellulare paziente-specifica. Il primo passo è quello di identificare i geni chiave per il transdifferenziamento. Per raggiungere questo scopo, è importante considerare geni espressi nel tipo cellulare finale. Il passo successivo è quello di testare in vivo o in vitro i fattori di riprogrammazione selezionati. Le colture in vitro permettono la sperimentazione di un gran numero di fattori in parallelo, invece i sistemi in vivo sono più complessi anche se forniscono il contesto nativo di valutazione del comportamento cellulare.

1.3.1 TRANSDIFFERENZIAMENTO IN NEURONI

Pax6 è uno dei geni chiave responsabili per il differenziamento neuronale, si esprime a livello della glia radiale (Götz et al., 1998) ed è indispensabile per la neurogenesi corticale di queste cellule (Warren et al., 1999; Heins et al., 2002). Inoltre, Pax6 gioca un ruolo cruciale nella generazione dei neuroni da cellule staminali adulte astrogliali nella zona subependimale (Hack et al., 2005). L'astroglia postnatale può essere reindirizzata verso la neurogenesi dall'espressione forzata di Pax6 in vitro (Heins et al., 2002).

Negli ultimi anni molti sforzi sono stati compiuti nel campo della riprogrammazione

neuronale. Berninger e colleghi hanno dimostrato che i geni proneurali neurogenina-2 (Ngn2) e mammalian achaete scute homolog 1 (Mash1) possono riprogrammare le cellule astrogliali in neuroni (Berninger et al., 2007). Questi fattori sono stati scelti in quanto possono indirizzare verso un destino glutamatergico versus GABAergico i precursori del proencefalo in sviluppo e le NSC dalla zona adulta subependimale in vitro (Berninger et al., 2007). L'astroglia postnatale è stata trasfettata usando il vesicular stomatitis virus G protein pseudotyped retroviruses contenente Pax6-internal ribosomal entry site (IRES)-green fluorescent protein (GFP) (Hack et al., 2004), Ngn2-IRES-GFP o Mash1-IRES-GFP (Berninger et al., 2007). L'efficacia della trasfezione è stata di ~ 85%. Dopo 12 giorni, le cellule convertite esprimevano proteine tipiche dei neuroni immaturi, come TuJ1 (Heins et al., 2002), e si differenziavano in cellule eccitabili come dimostrato dall'analisi elettrofisiologica. Tuttavia, i neuroni derivati dall'astroglia non mostravano alcuna attività sinaptica spontanea o evocata, una limitazione cruciale per la neurogenesi funzionale, probabilmente causata da un ritardo nel processo di maturazione o da una riprogrammazione incompleta. Inoltre, data la mancanza di funzionalità presinaptica, il sottotipo neuronale generato non poteva essere definito (Berninger et al., 2007).

Pochi anni dopo, Heinrich et al. hanno sperimentato un'espressione più elevata e più persistente dei fattori che indirizzano verso un destino neurogeno per ottenere una riprogrammazione più completa dell'astroglia in neuroni con sinapsi attive (Heinrich et al., 2010). I costrutti retrovirali TR (long terminal repeat)-driven MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) utilizzati da Berninger sono stati espressi solo circa 2-3-volte rispetto alla espressione endogena (Heins et al., 2001; 2002) e sono inclini al silenziamento (Gaiano et al., 1999). Quindi Ngn2 o Dlx2 sono stati espressi sotto il controllo del promotore interno chicken β -actin con cytomegalovirus enhancer (pCAG) ottimizzato per espressione a lungo termine nel cervello di topo adulto insieme al DsRed localizzato dietro un IRES (Zhao et al., 2006). L'astroglia corticale postnatale trasfettata con Ngn2, che dirige la generazione esclusivamente di neuroni eccitatori glutamatergici nel telencefalo dorsale si è differenziata in neuroni glutamatergici TuJ1-positivi e GFAP-negativi che formavano sinapsi con alta efficienza dopo 10 giorni in coltura. Il gruppo ha anche testato un altro fattore di trascrizione, Dlx2, che è coinvolto nell'indirizzamento in neuroni GABAergici durante lo sviluppo del telencefalo ventrale (Zhao et al., 2006) e nella neurogenesi adulta (Brille et al., 2008). L'espressione forzata di Dlx2 nell'astroglia postnatale corticale ha dato luogo a cellule con un'identità neuronale come rivelato dall'espressione di TuJ1 o della proteina associata ai microtubuli 2 (MAP2); tuttavia, l'efficacia della neurogenesi è risultata significativamente inferiore rispetto a quella ottenuta con Ngn2. Registrazioni con la tecnica patch-clamp hanno rivelato che Dlx2 induceva una identità GABAergica nella astroglia riprogrammata, anche se la riprogrammazione indotta da Dlx2 rimaneva parziale nella maggior parte delle cellule. La co-espressione di Dlx2 e Mash1, un fattore di trascrizione a monte di Dlx2 nell'individuazione del destino interneuronale (Poitras et al., 2007), ha prodotto una percentuale maggiore di neuroni trasfettati che esprimevano specifici picchi interneuronali rispetto a quelli trasfettati con solo Dlx2 indicando che questi due fattori agiscono in maniera sinergica. Inoltre, l'efficienza della riprogrammazione

verso un sottotipo neuronale GABAergico risultava aumentata espandendo l'astroglia corticale postnatale in condizioni di coltura di neuro sfere. Inoltre è stato dimostrato che l'overespressione di Ngn2 o Dlx2 può riprogrammare l'astroglia della corteccia adulta a seguito di un danno dopo una prima espansione come neurosfere (Heinrich C et al., 2010).

Nello stesso anno, Vierbuchen e colleghi hanno ottenuto neuroni da fibroblasti murini (Vierbuchen et al., 2010). A partire da un pool di 19 geni candidati hanno identificato una combinazione di tre fattori, scute omologo achaete 1 (Ascl1), Brn2 e il gene del fattore di trascrizione della mielina (Myt1l), che sono sufficienti a convertire rapidamente ed efficacemente i fibroblasti embrionali e postnatali di topo in neuroni funzionali in vitro. Fibroblasti embrionali murini (MEF) da topi TauEGFP knock-in, che esprimono GFP specificatamente nei neuroni (Tucker et al., 2001; Wernig et al., 2002), sono stati infettati con lentivirus contenenti geni selezionati sotto il controllo della tetraciclina (Wernig et al., 2008). Dopo 16-20 ore è stato aggiunto un medium MEF contenente doxyciclina al terreno contenente lentivirus per attivare l'espressione dei geni trasdotti. Queste cellule neuronali esprimevano specifiche proteine neuronali, come MAP2 e β -tubulina, generavano potenziali d'azione e formavano sinapsi funzionali. In particolare, la maggior parte delle cellule neuronali era eccitatoria ed esprimeva markers d'identità corticale. Nessun altro fenotipo neurotrasmettitoriale è stato rilevato oltre che neuroni glutamatergici e una bassa percentuale di neuroni GABAergici. La conversione è stata rapida ed efficiente, dopo soli cinque giorni sono state individuate cellule neuronali con lunghi processi di ramificazione. Il singolo fattore Ascl1 è stato sufficiente per induzione caratteristiche neuronali immature, e viceversa, l'omissione di Ascl1 aveva un effetto drammatico sull'efficienza. Per generare cellule neuronali mature, l'espressione aggiuntiva di Brn2 e Myt1l è necessaria (Vierbuchen et al., 2010). Recentemente, lo stesso gruppo (Pang et al, 2011) ha dimostrato che anche fibroblasti umani fetali potrebbero essere direttamente convertite in neuroni attraverso un'infezione con gli stessi fattori di trascrizione: Ascl1, Brn2 e Myt1l (BAM). Solo con l'aggiunta di NeuroD1, un altro fattore di trascrizione, l'efficienza è stata migliorata. Infatti sono state ottenute cellule con morfologie neuronale, evidenziati con marcatori pan-neuronali (Tuj1, NeuN, PSA-NCAM e MAP2) e con le proprietà della membrana attiva (Pang et al, 2011).

Oltre l'uso di fattori di trascrizione, è stata recentemente sottolineata la possibilità di utilizzare microRNA (miRNA) per promuovere il processo di riprogrammazione e transdifferenziamento, senza l'utilizzo di vettori virali. È stato dimostrato che l'uso di miRNA rende più efficiente la generazione di iPSCs (Anokye-Danso et al., 2011), suggerendo che la down-regolazione in aggiunta all'up-regolazione di geni specifici può modulare la riprogrammazione.

Per quanto riguarda il transdifferenziamento, Yoo e colleghi (2011) hanno recentemente dimostrato che l'espressione di miR-9 / 9 e miR-124 in fibroblasti umani promuove il loro differenziamento in neuroni. Le cellule ottenute hanno dimostrato una riduzione della capacità di proliferazione e una morfologia simile ai neuroni, ma solo una bassa percentuale (meno del 5%) è risultata positiva a MAP2. Per aumentare la percentuale di cellule neuronali il gruppo di Yoo ha infettato i fibroblasti con miR-09/09 *- 124 insieme a NeuroD2, Ascl1 e Myt1l e circa l'80% delle cellule era positivo per MAP2 e con una crescita estesa dei neuriti

come dimostrato dalla colorazione immunoistochimica con la beta-tubulina III colorazione. Inoltre le cellule ottenute sono state in grado di produrre potenziali d'azione specifici (Yoo et al., 2011). L'esplorazione dei miRNA come strumento per applicazioni di transdifferenziamento merita ulteriori indagini. In modo complementare, è stato dimostrato che l'induzione transitoria dei quattro fattori di riprogrammazione per le iPS (Oct4, Sox2, Klf4, e c-Myc) può direttamente differenziare i fibroblasti murini in staminali / cellule progenitrici neuronali (NPC), in associazione con specifiche condizioni di coltura (Kim et al., 2011). Rispetto ai neuroni indotti dal transdifferenziamento le NPC presentano il vantaggio di poter essere espanse numericamente in vitro e di mantenere la capacità di dare origine a più sottotipi neuronali e cellule gliali. Questi risultati sottolineano l'utilità potenziale dei fattori di riprogrammazione per le iPSC come strumento non solo per la riprogrammazione completa, ma anche per il transdifferenziamento.

Interessante notare che la strategia di transdifferenziamento può anche essere applicata con successo per ottenere specifiche popolazioni di neuroni con un significato clinico, come il fenotipo dopaminergico. Infatti, in un esperimento parallelo e indipendente, un altro gruppo ha ottenuto risultati simili mostrando che la sovra-espressione dei fattori di trascrizione *Ascl1*, *Brn2* e *Myt1l* sono sufficienti a trasformare fibroblasti umani in neuroni funzionali, e con *Lmx1a* e *FoxA2* a generare neuroni dopaminergici (Pfisterer et al., 2011). Questi neuroni potrebbe essere utili come modello di malattia in vitro così come per lo studio delle terapie di sostituzione cellulare per il trattamento del morbo di Parkinson. Resta ancora da chiarire se altre popolazioni neuroectodermiche rilevanti come gli astrociti e gli oligodendrociti possono essere ottenute per studi patogenetici di base (come lo studio di eventi patogenetici non cell-autonomous) o come sorgente cellulare per la terapia cellulare.

Al momento non vi sono trattamenti efficaci per la maggior parte delle malattie neurodegenerative e le lesioni del sistema nervoso. La sostituzione delle cellule danneggiate e il ripristino della funzione sono considerate le strategie ideali terapeutiche che possono essere affrontate con i neuroni riprogrammati. Infatti, l'uso di neuroni differenziati evita la formazione di teratomi, che può verificarsi con trapianto di cellule staminali indifferenziate. Inoltre, le cellule terminalmente differenziate possono potenzialmente essere utilizzate come modello in vitro per scoprire e testare nuovi farmaci e studiare i meccanismi di malattia. Inoltre, è possibile che la conversione diretta di fibroblasti in neuroni o gruppi specifici quali i neuroni dopaminergici e motoneuroni possa essere più efficace in vitro in termini di tempo rispetto alla generazione di iPSCs per gli studi di base e le applicazioni della terapia cellulare.

1.4 ASTROCITI COME SORGENTE DI CELLULE STAMINALI

La potenzialità delle cellule gliali di agire come cellule staminali o progenitrici è stata solo riconosciuta da circa un decennio (Malatesta et al., 2000; Johansson et al., 1999; Doetsch et al., 1999; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001; Seri et al., 2001). In precedenza, la glia era vista come insieme di cellule differenziate di supporto nel cervello adulto. Tuttavia, le NSC adulte nelle due regioni più importanti per la neurogenesi adulta - la zona subependimale (SEZ) e la zona subgranulare (SGZ) del giro dentato - erano sorprendentemente identificate come

cellule di identità gliale (Johansson et al., 1999; Seri et al., 2001; Doetsch et al., 1999; Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla et al., 2009). Successivamente, è stato dimostrato che le cellule gliali radiali - il tipo cellulare gliale ubiquitario durante lo sviluppo cerebrale di tutti vertebrati - agiscono anche come cellule staminali e progenitrici, ed sono fonte di molti, se non della maggior parte, dei neuroni cerebrali nel topo (Malatesta et al., 2000; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001). Mentre le cellule della glia radiale sono in gran parte assenti nel cervello adulto dei mammiferi (Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla et al., 2009) esse persistono in fasi mature in molti altri vertebrati come ependimoglia o taniciti (Adolf et al., 2006; Becker et al., 2008; Grandel et al., 2006; Chapouton et al., 2010; Zupanc et al., 2005). Questo potrebbe spiegare perché la neurogenesi continua in modo più diffuso in altri vertebrati, ma è limitata a poche nicchie nella maggior parte cervelli del Sistema Nervoso Centrale (SNC) dei mammiferi adulti che sono stati esaminati finora. È interessante notare che le NSC adulte localizzate nelle due nicchie importanti del cervello adulto assomigliano alle cellule gliali radiali o ai taniciti, cellule gliali radiali sulla parete del ventricolo nel cervello adulto. Queste cellule sembrano essere uniche in quanto possiedono le caratteristiche di cellule staminali, come ad esempio la possibilità di auto-rinnovarsi per molti passaggi e la multipotenza, la capacità di generare neuroni e tutte le cellule macrogliali del cervello adulto. Questi dati, che dimostrano che le cellule gliali, presenti a livello delle nicchie neurogene nel cervello adulto e durante lo sviluppo, possono agire come progenitrici neuronale e come cellule staminali, pongono la questione se altre cellule gliali possedano questo potenziale. Per valutare questi interrogativi, è necessario prima esaminare la glia al di fuori delle nicchie neurogene e poi chiedersi in che misura la glia parenchimale condivide le proprietà comuni e i pathways di segnalazione con le cellule staminali di identità gliali.

1.4.1 LA GLIA NEL PARENCHIMA CEREBRALE ADULTO

Attraverso l'ontogenesi e la filogenesi, le cellule gliali aumentano di numero e di diversità (Kettenmann et al., 2005; Oberheim et al., 2009). I pesci ossei e la maggior parte degli anfibi mantiene la glia radiale, dallo sviluppo allo stadio adulto. Nei mammiferi e nella maggior parte degli uccelli, cellule specializzate cuboidali ependimali si spostano nella parete del ventricolo e altre cellule gliali - gli astrociti protoplasmatici o parenchimali a forma di stella - si moltiplicano e si stabiliscono nel parenchima in tutto il cervello (Fig. 1). Un'altra classe di cellule gliali che sembra essere di recente evoluzione nei vertebrati - la glia NG2 (nota anche come sinantociti) - è dispersa nel parenchima di tutto il cervello adulto (Nishiyama et al., 2009). Durante lo sviluppo, le cellule che esprimono proteine simili a quelle della glia NG2 agiscono come cellule progenitrici degli oligodendrociti (OPC) e la maggior parte delle cellule gliali NG2 prosegue questo ruolo anche in età adulta, in numero crescente dai teleostei ai mammiferi (Nishiyama et al., 2009).

1.4.2 MARKER CONDIVISI DA ASTROCITI, CELLULE GLIALI RADIALI E NSC

Gli astrociti sono principalmente coinvolti nella regolazione dell'attività di rete neurale, attraverso la modulazione dei trasmettitori extracellulari, delle concentrazioni ioniche del segnale diretto alla sinapsi tripartita e ai siti di

accoppiamento neurovascolare (Kettenmann et al., 2005). Gli astrociti regolano i livelli di trasmissione attraverso l'espressione dei trasportatori astrocita-specifici del glutammato tra i quali il trasportatore di aminoacidi eccitatori 1 (noto anche come GLAST) (Fig. 1) e il trasportatore di aminoacidi eccitatori 2 (noto anche come GLT1), che permette di prendere glutammato e convertirlo utilizzando l'enzima glutammina sintetasi in glutammina che viene trasportata indietro ai neuroni (Goetz et al., 2005; Liu et al., 2006; Parpura et al., 2009; Ninkovic et al., 2007). Queste proteine sono anche espresse da cellule gliali radiali nel SNC in sviluppo e dalle NSC nel cervello dei mammiferi adulti. Inoltre, gli astrociti esprimono alcune proteine, come la proteina acida fibrillare gliale (GFAP), S100 β e l'aldeide deidrogenasi famiglia1, membro L1 (ALDL1H1), che sono anche espresse dalle NSC adulte nella SEZ e nel SGZ (Sofroniew et al., 2009; Cahoy et al., 2008; Sofroniew et al., 2010; Beckervordersandforth et al., 2010).

Inoltre, gli astrociti sono caratterizzati da propri marcatori ultrastrutturali, compresi i granuli di glicogeno, che sono condivisi anche dalle NSCs adulte. Nella SEZ, il contatto ventricolare delle NSCs li distingue da normali astrociti. Tuttavia, le NSC nel giro dentato, l'altra importante nicchia delle NSC adulte, non hanno contatti ventricolare, ma sono simili ad 'astrociti radiali' avendo una morfologia radiale. Le NSC nel giro dentato possiedono anche marker astrocitari a livello ultrastrutturale e condividono l'espressione di GFAP, GLAST, S100 β , glutammina sintetasi e altre proteine con prototipo astrocitario (Kempermann et al., 2004; Seri et al., 2004) (Fig. 1)

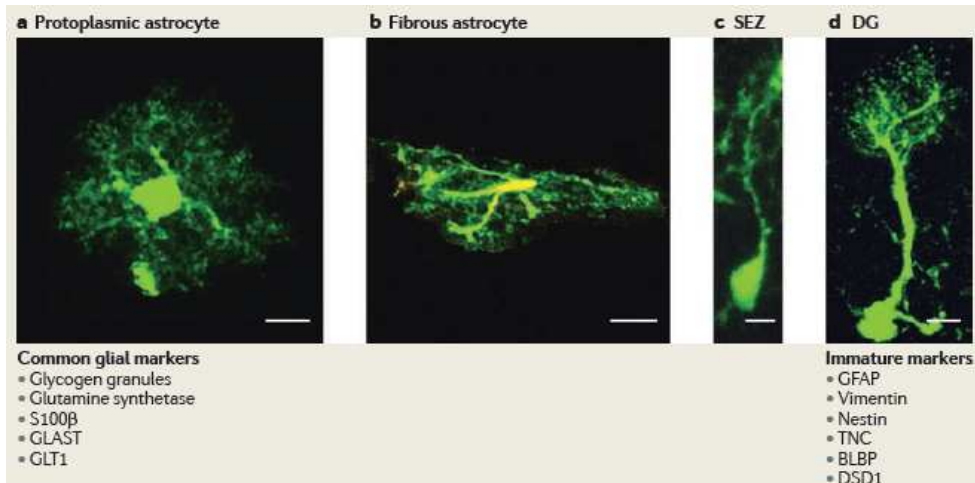


Figura 1

LA DIVERSITA' DEGLI ASTROCITI A LIVELLO CEREBRALE

Nel cervello sano, gli astrociti si differenziano per morfologia (visualizzati tramite l'uso della proteina fluorescente verde (GFP)). L'espressione di GFP è stata attivata dalla ricombinazione inducibile CRE sotto il promotore specifico del gene che codifica per il trasportatore aminoacidico 1 (noto anche come GLAST) in topi

adulti.

- a) Nella sostanza grigia gli astrociti sono detti protoplasmatici, risultano cioè altamente ramificati con prolungamenti che raggiungono la membrana basale, inoltre circondano i vasi sanguigni e avvolgono le connessioni sinaptiche.
- b) Gli astrociti nella sostanza bianca, gli astrociti fibrosi, hanno processi più spessi e meno ramificati che raggiungono gli assoni - per esempio, i nodi di Ranvier. Alcuni astrociti hanno una morfologia radiale e comprendono la glia di Bergmann nel cervelletto e la glia di Müller nella retina. Simili agli astrociti protoplasmatici (Kettenmann et al., 2005), gli astrociti radiali si estendono in modo finemente ramificato con processi che avvolgono le sinapsi e sono in contatto con la membrana basale. Nonostante la diversità degli astrociti nella loro morfologia, alcune caratteristiche funzionali sono condivise, come ad esempio l'accoppiamento neurovascolare (Carmignoto et al., 2010) e la regolazione delle funzioni metaboliche, tra cui l'omeostasi degli ioni e del glutammato (Simard et al., 2004).
- c,d) Raffigurano la glia radiale come le cellule staminali nella zona subependimale (SEZ) sulla parete laterale del ventricolo laterale e nel giro dentato (DG) dell'ippocampo. Queste esprimono non solo gli indicatori comuni astrocitari ma anche proteine che sono normalmente presenti nelle cellule gliali immature e nella glia radiale. La scale bar rappresenta 10 micron (modificato da Robel S et al., 2011).

1.4.3 DIFFERENZE FUNZIONALI TRA ASTROCITI MATURI E PROGENITORI

Ci sono importanti differenze funzionali tra i sottotipi cellulari simili agli astrociti come le NSC e gli astrociti prototipici nel parenchima cerebrale. Gli astrociti parenchimali non si dividono nel cervello sano. Inoltre, quando vengono isolati in vitro (Buffo et al., 2008), non presentano le potenzialità delle cellule staminali, come la capacità di formare neurosfere auto-rinnovanti e multipotenti, perlomeno quando sono isolate da cervello murino sano. Le neurosfere originano da cellule staminali isolate che proliferano in vitro a dosi elevate di fattori di crescita. Possono essere propagate per molti passaggi e possono differenziarsi in neuroni, astrociti e oligodendrociti. In vivo, tuttavia, le NSC si dividono a frequenza piuttosto bassa e generano costantemente neuroni (Kriegstein et al., 2009; Beckervordersandforth et al., 2010; Curtis et al., 2007). In vitro, le NSC rivelano la loro natura multipotente (Kriegstein et al., 2009; Chojnacki et al., 2009), mentre rimane ancora da dimostrare se una singola NSC adulta possa generare sia neuroni che cellule gliali in vivo. Date le caratteristiche di auto-rinnovamento e multipotenzialità delle cellule staminali, alcuni hanno suggerito che le NSC possano essere una classe di queste stesse cellule (Sofroniew et al., 2009), anche se condividono funzioni nell'omeostasi e nella gliotrasmissione con i veri astrociti.

1.5 RIPROGRAMMAZIONE DEGLI ASTROCITI IN NEURONI

Date le considerazioni precedenti, si pone la questione se un tale numero di segnali contrastanti possano essere superati per ottenere cellule neuronali. Infatti, i neuroblasti in migrazione dalle nicchie neurogene ai siti di lesione cerebrale non devono solo attraversare l'ambiente antineurogenico nel parenchima del cervello adulto (Seidenfaden et al., 2006), ma devono anche apparentemente generare il

sottotipo appropriato neuronale affetto dalla lesione. Ciò potrebbe fornire un punto di partenza nella ricerca del legame mancante tra l'acquisizione di uno stato di dedifferenziamento e la successiva neurogenesi. Alcune intuizioni sulla possibile natura di questo legame mancante sono state fornite da studi su colture di astrociti postnatali, che non sono ancora pienamente maturi e quindi più plastici rispetto agli astrociti nel parenchima adulto.

1.5.1 DESTINO NEUROGENICO DETERMINATO DA PAX6

Sebbene gli astrociti reattivi siano in grado di generare neuroni in vitro, non riescono a farlo in vivo, suggerendo che è la progressione di lineage tra una cellula staminale indifferenziata a neuroblasto differenziato che non riesce ad essere attivata in vivo. Per esempio, la dedifferenziazione degli astrociti reattivi potrebbe non essere sufficiente per rendere accessibili i loci dei geni che codificano per i fattori determinanti il destino neurogeno, prevenendo la loro riattivazione. Le NSC che esprimono mRNA di fattori neurogeni, ne possiedono anche le relative specifiche proteine (Beckervordersandforth et al., 2010), mentre gli astrociti reattivi nella corteccia cerebrale sembrano upregolare l'mRNA del fattore di trascrizione PAX6 dopo una lesione focale (Sirko et al., 2009), mentre mancano livelli rilevabili della proteina PAX6 (Buffo et al., 2009). Nelle nicchie neurogene, i livelli di mRNA di PAX6 sono ulteriormente sovraregolati nella progenie delle NSC, che quindi possiedono la proteina PAX6 (Buffo et al., 2009), giocando un ruolo cruciale per la neurogenesi sia durante lo sviluppo (Heins et al., 2002) che in età adulta (Hack et al., 2005). È interessante notare che, nella retina, anche la glia reattiva di Müller, che presenta un grado limitato di neurogenesi spontanea, recupera PAX6 a livello proteico a seguito di danno indotto da NMDA nei topi. Quindi potrebbe essere possibile entrare in un programma neurogenico tramite l'espressione diretta di determinanti del destino neurogenico negli astrociti reattivi per raggiungere livelli sufficientemente elevati di proteina PAX6 (Fig.2). Rispetto al concetto che gli astrociti non neurogeni possano essere indirizzati a generare neuroni ciò è stato chiaramente confermato in vitro. All'interno della corteccia in sviluppo, PAX6 è normalmente presente nelle cellule gliali radiali, ma la sua espressione è drasticamente ridotta negli astrociti post-natali (Heins et al., 2002). Quando gli astrociti isolati dalla corteccia cerebrale del topo sono stati costretti a ri-esprimere PAX6 per mezzo di vettori retrovirali, hanno perso l'espressione di GFAP e hanno acquisito una morfologia neuronale e il marcatore neuronale precoce β -III-tubulina (Heins et al., 2002). Un ulteriore lavoro ha confermato che PAX6 e altri fattori neurogeni possono causare una vera conversione glia-neurone. Dopo aver perso i marcatori gliali, come GFAP e la passiva conduttanza elettrica, le cellule gradualmente acquisiscono le proprietà elettriche dei neuroni, come i potenziali di azione ripetitivi dopo stimolo elettrico.

In modo consistente rispetto ai lavori descritti prima, la somministrazione retrovirale di determinanti del destino neurogeno, come PAX6, nella corteccia cerebrale del topo adulto danneggiato o Neurog2, che codifica per la neurogenina 2 (NGN2), nel midollo spinale danneggiato del ratto adulto può indurre l'espressione di marcatori precoci e maturi neuronale come la doublecortina (DCX) o NeuN in una sottopopolazione di cellule trasdotte (Buffo et al., 2005; Ohori et al., 2006).

Questi studi forniscono l'evidenza che le cellule proliferanti possono essere riprogrammate in vivo verso la neurogenesi. Dato che i vettori retrovirali utilizzati in questi studi vengono incorporati solo dalle cellule proliferanti e che i neuroni sono postmitotici, sembra che l'origine di questi nuovi neuroni sia nella glia la cui proliferazione è rafforzata dopo il danno (Buffo et al., 2005; Buffo et al., 2008; Barnabe-Heider et al., 2010). Tuttavia, il tipo esatto di cellule gliali proliferative infettate in questi esempi non è noto e potrebbe rivelarsi importante, dato che differenti tipi di cellule gliali possono avere diversa suscettibilità alla riprogrammazione neurogenica.

Anche se gli astrociti reattivi rappresentano un bersaglio particolarmente attraente per ottenere neurogenesi dopo un danno attraverso il loro de-differenziamento, come discusso in precedenza, ci potrebbero essere notevoli differenze nella risposta tra astrociti reattivi a seconda del grado di riattivazione e del reinserimento nel ciclo cellulare. Inoltre, ci potrebbe essere una finestra di tempo ottimale per l'induzione della neurogenesi, dato che i marcatori di proliferazione e di de-differenziamento nelle cellule gliali reattive sono transitori (Carlen et al., 2009; Sirko et al., 2009; Barnabe-Heider et al., 2010). Inoltre, altri tipi di cellule proliferanti, come le cellule NG2, potrebbero essere suscettibili di riprogrammazione in vivo, data la recente scoperta che gli OPC derivate dal nervo ottico di ratto possono essere riprogrammate verso uno stato simile alle NSC attraverso un intermedio astrocitario (Kondo et al., 2000).

1.5.2 ALTRI FATTORI DETERMINANTI IL DESTINO NEUROGENO

Altri fattori determinanti il destino neurogeno, come ad esempio i geni proneurali NEUROG2 e l'omologo in mammifero MASH1, noto anche come ASCL1, sono ancora più efficaci di PAX6 nella riprogrammazione degli astrociti in vitro (Berninger et al., 2007). La segnalazione costante di questi fattori attiva un programma completo neuronale in vitro partendo dagli astrociti, differenziando queste cellule in neuroni glutamatergici completamente funzionali in grado di formare sinapsi (Blum et al., 2010; Heinrich et al., 2010) (Fig. 2). Inoltre, ASCL1 o il fattore di trascrizione DLX2 sono sufficienti per indurre un fenotipo neurale GABAergico negli astrociti in vitro (Heinrich et al., 2010). Una possibile spiegazione è che questi determinanti del destino neurogenico non solo inducono un destino neuronale generico, ma possiedono un'attività che specifica il sottotipo neuronale durante lo sviluppo e la neurogenesi adulta (Guillemot et al., 2007).

Il prossimo passo sarà quello di individuare alcune strategie per guidare gli astrociti verso la generazione selettiva di un sottotipo specifico all'interno di ogni sottoclasse, come ad esempio i diversi tipi di neuroni glutamatergici corticali (neuroni corticofugali e callosali) e gli interneuroni GABAergici (a picchi veloci, e a scariche di picchi e/o picchi regolari). Ciò può consentire la rigenerazione di una popolazione selettiva di neuroni che degenerano in condizioni come la SLA (motoneuroni glutamatergici corticospinali) o la modificazione di circuiti neurali iperattivi tramite inserzione di neuroni inibitori distinti (Baraban et al., 2009).

1.5.3 GLI ASTROCITI POSTNATALI

Gli astrociti postnatali rappresentano un punto di transizione tra la glia radiale e gli astrociti maturi. Queste cellule sono ancora proliferative, ma hanno perso la capacità intrinseca neurogena, a causa del silenziamento epigenetico dei loci *NEUROG1* e/o *NEUROG2* da parte dei repressori mediati dal complesso del gruppo Polycomb durante la transizione da neurogenesi corticale a astrogliogenesi (Hirabayashi et al., 2009). *NEUROG1* e *NEUROG2* sono fattori di trascrizione elica-loop-elica regolati direttamente da *PAX6*. Giocano un ruolo importante nell'indurre un'identità neuronale glutamatergica a partire dalle NSC durante lo sviluppo corticale, promuovendo l'espressione della proteina T-box brain 1 (*TBR1*) e T-box brain 2 (*TBR2*) (Schuurmans et al., 2004). L'espressione forzata di *NEUROG1* e *NEUROG2* potrebbe quindi consentire di aggirare questa barriera epigenetica negli astrociti postnatale (Fig. 2), dato che i target a valle di questi geni proneurali non sono stati ancora resi inaccessibili dalle modificazioni epigenetiche. La riprogrammazione degli astrociti postnatali in vitro in neuroni glutamatergici da parte di *NEUROG2* coinvolge infatti la stessa sequenza di espressione di *TBR2* e *TBR1* (Heinrich et al., 2010) come osservato nella specificazione dei neuroni glutamatergici nel cervello in sviluppo e adulto (Brille et al., 2009; Bedogni et al., 2010). Questo suggerisce che i target a valle di *NEUROG2* risultino ancora accessibili negli astrociti postnatali o possano essere resi accessibili dal reclutamento della macchina del rimodellamento della cromatina da parte di *NEUROG2* (Fig. 2). Tuttavia, è probabile che un ulteriore silenziamento progressivo epigenetico durante il differenziamento degli astrociti conferisca una suscettibilità ridotta a un solo fattore di riprogrammazione. E' quindi importante che gli astrociti, quando vengono attivati da una lesione, dedifferenzino e acquisiscano la potenzialità di formare neurosfere. L'espressione forzata di *NEUROG2* o *DLX2* può indurre molte delle cellule delle neurosfere a generare neuroni GABAergici e glutamatergici rispettivamente (Heinrich et al., 2010). Questi dati forniscono l'evidenza che anche gli astrociti adulti possono essere riprogrammati verso destini neuronali distinti. Questo sembra richiedere due tappe: uno che promuove il dedifferenziamento verso uno stato staminale-progenitore seguito da uno step successivo di respecificazione verso un destino neuronale (Fig. 2). Quindi, la riattivazione indotta da lesioni potrebbe coinvolgere modificazioni epigenetiche che rendono il nucleo degli astrociti reattivi più sensibile all'attività dei geni neurogeni. La riattivazione potrebbe coinvolgere il rimodellamento della cromatina nelle cellule gliali, come avviene nel topo nella retina in vivo dopo un danno neurotossico. In particolare, la glia di Muller riesprime il fattore 60C associata all'espressione di *BRG1* (*BAF60C*), un componente del complesso di rimodellamento della cromatina switch/sucrose non-fermentable (*SWI/SNF*), che fisiologicamente è espresso solo in progenitori della retina durante lo sviluppo (Lamba et al., 2008). Comprendere completamente i processi molecolari alla base della riattivazione e del dedifferenziamento degli astrociti potrebbe permettere la definizione di un set di fattori di trascrizione che rendono gli astrociti maturi suscettibili alla successiva riprogrammazione neuronale o che permettono la riprogrammazione diretta senza un precedente dedifferenziamento (Fig. 2), come è stato raggiunto per la conversione di α -cellule pancreatiche in β -cellule (Zhou et al., 2008). Quindi, le cellule gliali che reagiscono alle lesioni potrebbero rappresentare potenziali bersagli per la riprogrammazione diretta in neuroni in situ, date le loro molte

similitudini con le cellule staminali. Tali approcci rappresentano nuove alternative alle fonti esogene di neuroni per l'intervento terapeutico.

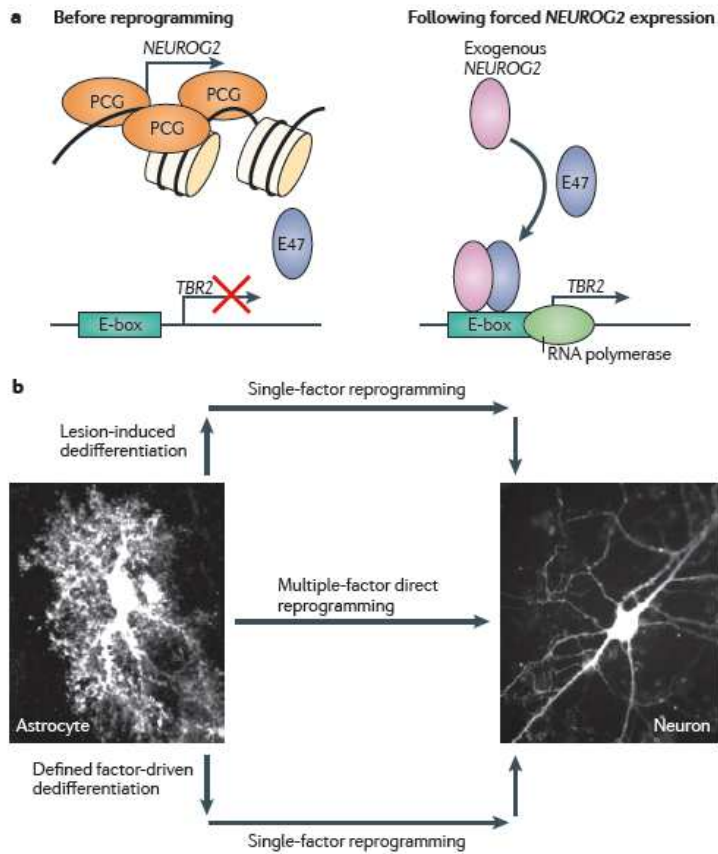


Figura 2 RIPROGRAMMAZIONE DEGLI ASTROCITI PARENCHIMALI IN NEURONI

a) Possibile meccanismo molecolare alla base della riprogrammazione postnatale dell'astroglia.

Negli astrociti postnatali, la cromatina attorno ai loci del gene che codifica per i fattori importanti per la neurogenesi - come NEUROG2, che codifica per il fattore di trascrizione neurogenina 2 (NGN2), e' tenuta in una struttura chiusa dal complesso repressore del gruppo Polycomb (PCG) (Hirabayashi et al., 2009) (pannello di sinistra).

Di conseguenza, gli elementi a valle di questi fattori, come la proteina del cervello T-box 2 (TBR2) nel caso di NGN2, non sono espressi. L'espressione esogena di NEUROG2 può bypassare il silenziamento del locus genico endogeno (pannello a destra). NGN2 si lega con la proteina E47 E-box binding ubiquitariamente espressa alle regioni enhancer dei suoi geni target, inducendo neurogenesi.

b) Disegno schematico delle possibili vie per la generazione di neuroni da astrociti. A seguito di una riattivazione indotta dalla lesione, gli astrociti dedifferenziano, rendendosi affini a cellule staminali simili agli astrociti. In vitro, queste cellule hanno un potenziale neurogeno, che può poi essere potenziato e diretto verso differenti identità di sottotipi da un solo fattore trascrizionale neurogeno (mostrato nel pathway in alto) (Heinrich et al., 2010). Ci sono prove che questo sia possibile anche in vivo, anche se l'identità cellulare delle cellule che generano i neuroni riprogrammati non è attualmente nota (Buffo et al., 2005; Ohori et al., 2006). In alternativa, piuttosto che basarsi sul de-differenziamento indotto da lesioni, un de-differenziamento più controllato potrebbe essere ottenuto dall'espressione forzata di fattori definiti da soli o in combinazione con fattori di crescita (Ghashghaei et al., 2007). In alternativa, la riprogrammazione diretta, bypassando lo stato di dedifferenziamento, può essere raggiunta con un cocktail di fattori definiti (mostrato nel pathway in centro). Anche se questo non è ancora stato realizzato sperimentalmente nel sistema nervoso, un simile approccio ha avuto successo nella riprogrammazione in topi adulti delle cellule esocrine del pancreas in cellule β insulino-secerenti (Zhou et al. 2008) (modificato da Robel S et al., 2011).

2 MATERIALI E METODI

2.1 COLTURE CELLULARI ASTROCITARIE

Le colture primarie di astrociti umani sono state ottenute da ScienCell Research Laboratories. Gli astrociti sono stati isolati dalla corteccia cerebrale umana (nel rispetto dell'osservanza delle procedure etiche e legali) e congelati al primo passaggio. Le cellule sono state caratterizzate per l'espressione della GFAP >90% mediante analisi di immunofluorescenza da parte del fornitore. Gli astrociti sono stati coltivati in un medium astrocitario (ScienCell) supplementato con siero fetale bovino, antibiotici e fattori di crescita secondo le istruzioni del fornitore, in flask ricoperte di poli-L-lisina ad una densità di 5,000 cells/cm².

2.2 RIPROGRAMMAZIONE DEGLI ASTROCITI IN NSC

Per la riprogrammazione sono stati usati vettori lentivirali (pSIN), ottenuti dall'Addgene, contenenti il cDNA dei fattori OCT4, SOX2, NANOG e Lin 28 (Yu et al., 2007).

Gli astrociti sono stati trasfettati con ciascun fattore 24 ore dopo essere stati piastrati nelle piastre da 100 come descritto nel protocollo del lavoro di Yu del 2007 (Yu et al., 2007) o mediante nucleofezione (Yu et al., 2009).

Per ottenere le linee umane di iPSC, fibroblasti umani sono stati trasfettati con plasmidi che trasportano i geni per la Oct4, Sox2, c-Myc, Klf-4, Lin28 o Nanog tramite trasfezione lentivirale. I costrutti del gene erano già disponibili nel nostro laboratorio e i vettori lentivirali sono stati preparati dal Laboratorio, Cell e Gene Therapy Center, Baylor College of Medicine. I fibroblasti umani sono sottoposti a due cicli di trasfezioni e coltivati in condizioni di hESC. Come gold standard per il confronto fenotipo abbiamo utilizzato la linea iPSC 19.9 ottenuta dal Prof. James Thomson (Yu et al., 2007).

Nel caso della nucleofezione, abbiamo trasfettato (mediante sistema NHDF - VPD-1001 con programma U-20, Amaxa, Walkersville, MD), i singoli vettori contenenti i fattori di riprogrammazione.

Le cellule trasfettate sono state quindi seminate in piastre 3 × 10-cm rivestite di Matrigel (BD Bioscience) con terreno per colture per astrociti cambiato ogni due giorni. Dopo 4 giorni dalla trasfezione il medium di coltura è stato sostituito con terreno per staminali embrionali umane (hES) (mTeSR, Stem Cell Inc.) per 8-10 giorni o con medium neuro-staminale umano (Stem Cell Inc.) addizionato con fattori di crescita come EGF (Epidermal Growth Factor) (20 ng/ml, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), bFGF (20 ng/ml, Sigma-Aldrich) ed eparina. Le colonie con la morfologia neurostaminale (colonie NSC) sono state generalmente isolate al 21 giorno dopo la trasfezione.

Per selezionare la popolazione CD44+, gli astrociti primari sono stati incubati con un anticorpo anti-CD44+ PE (BD Pharmingen), e in seguito è stata effettuata un'analisi al FACS (FACS Vantage BD). È stato contemporaneamente marcato un campione con il semplice isotipo Ig PE+ come controllo.

Per promuovere il fenotipo neuronale, ASCL1 (OriGene) è stato trasfettato come descritto per gli altri geni utilizzati per le cellule AstroNSC.

2.3 LA RIPROGRAMMAZIONE DEI FIBROBLASTI IN IPS

Le iPSCs controllo sono state derivate da fibroblasti umani con i vettori OCT4, SOX2, NANOG e LIN28 secondo il protocollo precedentemente descritto (Yu et al., 2007).

Per esaminare le potenzialità di differenziamento in tutti e tre i foglietti embrionali delle cellule iPS umane generate, abbiamo eseguito un'analisi in vitro di formazione di corpi embrionali (EB) e in vivo di formazione di teratomi come descritto (Dimos J. T. et al., 2008).

In questo ultimo caso le cellule, raccolte mediante collagenasi, sono state iniettate nei muscoli delle zampe posteriori di topi immunodeficienti di 6 settimane (circa una piastra da 10 cm con confluenza di 50-80% per topo) (Charles River Laboratory, Wilmington, MA). Dopo 5-10 settimane, abbiamo dissezionato i teratomi formati e li abbiamo fissati in paraformaldeide al 4%. I campioni sono stati inclusi in paraffina, processati e colorati con ematossilina-eosina.

2.4 ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE NSC

Per l'espansione ed il differenziamento dei cloni NSC derivate dagli astrociti, le cellule sono state coltivate rispettivamente in terreno di crescita e differenziativo per le NSC (Stem Cell Inc.). Per l'analisi delle capacità di autorinnovamento le cellule sono state cresciute a densità clonale (tra 1 a 10 cellule per per μ l, in terreno di crescita neuronale in presenza di EGF. Le neurosfere e i cloni sono state quantificate in tempi diversi a 10,14 e 21 giorni. Gli esperimenti sono stati condotti almeno in triplicate per 3 volte. Le differenze nella capacità di formare colonie secondarie e terziarie è stata valutata mediante analisi della varianza (ANOVA) seguita dal Tukey post-hoc test. Per indurre il differenziamento le cellule NSC sono state seminate in piastre rivestite da polisina e utilizzato il medium differenziativo sopracitato. L'acquisizione di un fenotipo differenziato è stato valutato sia mediante analisi morfologica che immunohistochimica come di seguito descritto nel successivo paragrafo. Come controllo sono state utilizzate NSCs murine che sono state isolate da tessuti cerebrali e dal midollo spinale di topi in fase embrionale (E13.5) e in età adulta (6-8 settimane). Per i tessuti cerebrali, è stata sezionata la regione subventricolare (n=10 topi per preparazione), come precedentemente descritto (Tropepe et al., 1999; Doetsch et al., 1999), mentre per i tessuti midollari, è stato utilizzato tutto il parenchima, privo delle meningi, come precedentemente descritto (Corti et al., 2006). I tessuti sono stati dissociati meccanicamente con la pipetta Pasteur e incubati in una soluzione con 0.05% tripsina EDTA per 15 minuti a 37°C. La sospensione cellulare è stata centrifugata a 190g per 5 minuti e risospesa in medium. Le cellule sono state seminate alla densità di 100.000 cellule/ml in Neurobasal (GIBCO TM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenente B-27, N2 (Invitrogen), EGF (Epidermal Growth Factor) (20 ng/ml, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), bFGF (20 ng/ml, Sigma-Aldrich), penicillina (100U) o streptomicina (100 μ g/ml, Invitrogen).

Le cellule sono state cresciute in flask T75 (NUNC, Nalgene Nunc International Corp. IL, USA) come aggregati in sospensione (neurosfere).

Le sfere sono state dissociate e riseminate ogni 5-7 giorni. Le cellule utilizzate per la separazione erano al 3-5 passaggio.

2.5 ANALISI IMMUNOCITOCHIMICA

Le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% (PFA, 10 minuti) a temperatura ambiente (RT). Dopo il lavaggio con PBS e la preincubazione in 5% di siero e 0.25% Triton X-100 in PBS, le colture sono state incubate con anticorpi primari per una notte a 4°C. Le cellule sono state incubate con un anticorpo primario overnight e con un anticorpo secondario per un'ora (Alexa Fluor, Invitrogen). Come anticorpi primari sono stati utilizzati SSEA-3 (1:100, R&D), SSEA-4 (1:500, DSHB), TRA1-60 (1:500, Chemicon), TRA1-81 (1:500, Chemicon), Pax 6 (mouse monoclonal, 1: 200, Chemicon); nestina (mouse monoclonal, 1:200, Chemicon, Temecula, CA, USA), Sox2 (coniglio, 1:200, Chemicon); beta III-tubulin (TuJ-1) (mouse monoclonal, 1:200; Chemicon), mouse Cy3 glial fibrillar acid protein (GFAP) (1:400 dilution; Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-proteina 2 associata ai microtubuli (MAP2), NF (1: 200, SIGMA), sinapsina (1:500, Abcam), and GABA (1:200, Abcam).

E' stato inoltre utilizzato un anticorpo contro la GFP coniugato con Alexa 488 (1:400; rabbit Molecular Probes, Eugene, OR).

Dopo lavaggi ripetuti in PBS gli anticorpi primari non coniugati sono stati ulteriormente incubati con anticorpi secondari FITC e RPE (R-Phycoerythrin) o coniugati con tetrametilrodamina isotiocinata (TRITC) (1:100; DAKO, Carpinteria, CA, USA) (1 ora al buio, RT) in PBS e quindi montati. Sono stati effettuati controlli senza gli anticorpi primari, senza emissione di segnali positivi. Per le analisi quantitative dei fenotipi delle cellule differenziate in vitro, sono stati scelti in modo casuale 10 campi (più di 200 cellule) per ciascun campione. La percentuale di ciascun fenotipo è stata ottenuta attraverso la media delle cellule positive rispetto alle cellule totali per ciascun campo.

Per le immagini abbiamo utilizzato un microscopio confocale LEICA LCS2. La conta cellulare e le misurazioni sono state quantificate come precedentemente descritto (Corti et al., 2008-2010) e analizzate usando NIH Image Software, l'analisi statistica usando il software StatsDirect. La formazione del teratoma è stata eseguita con un'iniezione di cellule nel topo immunocompromesso. I tessuti e i teratomi sono stati valutati mediante analisi istologica utilizzando l'ematossilina e l'eosina che evidenzia la presenza dei tre foglietti embrionali (mesoderma, endoderma e ectoderma)

2.6 ANALISI D'ESPRESSIONE GENICA: Astro vs AstroNANOG

L'analisi di espressione microarray delle cellule NSC AstroNANOG e degli astrociti parentali è stata effettuata con GeneChip Gene 1,0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA). Questa analisi è stata eseguita da Imagenes Laboratory (Germania).

Il GeneChip IVT Express Kit e il GeneChip Hybridization sono stati utilizzati con 100 ng di RNA totale che è stato mescolato con 2 ul di 1 / 500, 000 spikes diluito. La sintesi del primo e del secondo filamento di cDNA è stata effettuata secondo le istruzioni del kit a 42 ° C, trascritto e amplificato in cRNA. Il cRNA è stato quantificato mediante NanoDrop. Poi è stata eseguita la frammentazione di 12,5

ug di cRNA ed è stata quindi effettuata l' ibridizzazione sul GeneChip secondo il protocollo Affymetrix. Una piattaforma Affymetrix RUO è stata utilizzata ed i dati elaborati utilizzando il programma Affymetrix GCOS. Il controllo della qualità è stato effettuato sulla base dei parametri Affymetrix quality-control. Tutti i chip sono stati normalizzati con il metodo quantile. Dopo la normalizzazione, i dati probe-level sono stati riassunti mediante mediana per ottenere la misura del probe set level. .

L' analisi dei cluster gerarchici è stata eseguita con 1-PCC (coefficiente di correlazione di Pearson) come parametro di distanza. La distanza massima tra i membri del cluster è stata utilizzata come base per unire gruppi di livello inferiore (linkage completo) in gruppi di livello superiore. Per valutare la certezza dell'esistenza di un cluster, abbiamo applicato una analisi multiscale di ricampionamento bootstrap (10.000 bootstrap) per il clustering gerarchico dei sei campioni e sono stati calcolati i P value delle ipotesi così come le probabilità bootstrap per i cluster . I dati sono disponibili nella banca GEO.

2.7 TRAPIANTO CELLULARE

Per gli esperimenti in vivo come fonte cellulare sono state utilizzate le AstroNSCs e CD44-NSCs \pm ASCL1 modificate geneticamente ad esprimere il gene reporter della GFP. Le cellule sono state trapiantate a livello dei ventricoli laterali in topi anestetizzati a 1-2 giorni dopo la nascita (Corti et al., 2005); è stata iniettata una sospensione cellulare di 2 μ l (corrispondente a circa 100,000 cellule/ μ l). Come controllo, i topi sono stati trapiantati con fibroblasti umani. L'immunosoppressore FK506 è stato somministrato con un'iniezione intraperitoneale ad una concentrazione di 1.0 mg/kg, ed è stato somministrato a tutti gli animali per l'intera durata dell'esperimento. 12 animali per ciascun gruppo sono stati analizzati.

Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati eseguiti secondo le linee guida istituzionali nel rispetto della legge e delle politiche nazionali e internazionali.

2.8 ANALISI TISSUTALE

Gli animali sono stati sacrificati, perfusi e fissati con PFA 4% in PBS (pH 7.4). E' stato isolato il midollo spinale ed è stato immerso in PFA per 1 ora, quindi in sucrosio al 20% in soluzione PBS (pH 7.4) overnight e congelato in Tissue Tek OCT (Sakura) in azoto liquido. I tessuti sono poi stati criosezionati e montati su vetrini gelatinati. Campioni dello spessore di 20 μ m sono stati prelevati ogni 10 sezioni assiali. Tutte le sezioni prelevate sono state incubate con siero fetale bovino 1% in PBS e permeabilizzate con 0.25% Triton X-100.

Le sezioni sono state poi marcate con diversi anticorpi per determinare il fenotipo cellulare delle cellule GFP. Sono stati effettuati saggi immunostochimici come precedentemente descritto (Corti et al., 2005; 2008; 2010) per le seguenti proteine: 1:200 per nestina (mouse monoclonal, Chemicon), 1:200 per TuJ1 (mouse monoclonal antibody, Chemicon), 1:200 per NeuN (mouse monoclonal antibody, Chemicon), 1:200 per MAP2 (mouse monoclonal antibody, Sigma-Aldrich), 1:200 per NeuN (mouse monoclonal antibody, Chemicon), 1:200 per NF (mouse monoclonal antibody, Chemicon), 1:100 per anti glutamate decarboxylase 67 (GAD 67) (mouse monoclonal, Chemicon), 1: 200 per marker oligodendrocitario O4

(mouse monoclonal, Chemicon) e1:200 per GFAP (mouse monoclonal Cy3 conjugate, Sigma).

E' stato usato inoltre un anticorpo anti GFP coniugato con Alexa 488 (1:400).

Come anticorpi secondari sono stati utilizzati anticorpi anti mouse o rabbit coniugati con i fluorocromi FITC, R-PE, CY3 o biotina, 1:200 (Jackson Immuno Research and DAKO), per 1 ora a temperatura ambiente. I nuclei cellulari sono stati evidenziati mediante colorazione con DAPI

La co-espressione della GFP e dei marcatori tessuto-specifici, è stata evidenziata mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza convenzionale (Zeiss Axiophot, Germany) e mediante l'uso di un microscopio confocale laser scanning (Leica TCS SP2 AOBS, Germany).

Per ottenere una valutazione stereologica imparziale delle cellule positive GFP, sono stati utilizzati dissettori ottici e campionamento casuale. Per quantificare le cellule donatrici, è stata ottenuta una serie casuale sistematica di ogni decima sezione coronale dell'intero midollo spinale (20 μ m, una media di 25 sezioni per animale). La densità numerica dei neuroni è stata valutata usando il metodo del dissetto ottico (Locatelli et al., 2007; Chen et al., 2007). I dissettori ottici di 100 x 70 x 14 μ m sono stati utilizzati in modo casuale e il numero di cellule positive in ogni dissetto è stato misurato. La densità è stata calcolata dividendo il numero totale di cellule GFP positive (cellule trapiantate) per il volume totale dei dissettori ottici. Il volume totale del tessuto per campione (Vcord) che contiene i neuroni identificati è stato calcolato usando il metodo di Cavalieri. Questo volume totale del tessuto, moltiplicato per il numero di neuroni per μ m³, ha dato il numero totale di neuroni per campione ($N=N_v \times V_{cord}$) (Corti et al., 2008).

2.9 LA MARCATURA E L'IBRIDAZIONE DELL'ARRAY NimbleGen PER L'ANALISI DI METILAZIONE

La marcatura del dsDNA, l'ibridazione microarray e la scansione sono stati eseguiti dal Imagenes Laboratory secondo il protocollo standard del produttore. E' stato utilizzato il NimbleGen 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array. Ogni array copre importanti elementi regolatori tra cui promotori genici RefSeq e 27.728 isole CpG con sonde di 100 bp in tutte le regioni. La cella di ogni promotore del gene RefSeq (~ 22.532 in totale) inizia 2,4 kb a monte del sito di inizio della trascrizione e si estende a valle per 0,6 kb per un totale di 3 kb di copertura per il promotore del gene. Questo array copre varie regioni di controllo positivo, negative e non CpG per agevolare la valutazione delle performance sperimentali. I dati sono stati estratti dalle immagini acquisite utilizzando il software di estrazione NimbleScan. I dati microarray sono disponibili nella banca dati GEO.

2.10 L'ANALISI DI METILAZIONE DEL DNA FIND-PEAKS

L'analisi di metilazione del DNA Find-Peaks identifica le regioni di significativo arricchimento di metilazione nei dati microarray, utilizzando un algoritmo ACME modificato per l'identificazione di picco.

L'analisi normalizzata, in scala log₂-ratio dei dati è stata posta in formato GFF. L'analisi Mappa-Peaks associa i picchi con le caratteristiche genomiche, come i siti di inizio della trascrizione o le isole CpG. La posizione del picco, e i punteggi del picco degli Astro e degli AstroNANOG è stata oggetto di una valutazione t-test, che

ha determinato un valore di P per l'osservazione differenziale tra i due gruppi. Il rapporto tra i punteggi di punta dei gruppi (= numero di volte di differenza) è stato calcolato mediante il rapporto dei rispettivi valori mediani.

3 RISULTATI

3.1 RIPROGRAMMAZIONE DI ASTROCITI UMANI ATTRAVERSO L'ESPRESSIONE ECTOPICA DI FATTORI TRASCRIZIONALI STAMINALI.

Al fine di valutare la possibilità di riprogrammare gli astrociti in cellule staminali neuronali (NSC), abbiamo analizzato l'effetto dell'espressione ectopica dei fattori di riprogrammazione OCT4, SOX2, e NANOG negli astrociti umani derivati dalla corteccia cerebrale. Gli astrociti trasfettati sono stati esaminati rispetto a quelli non trasfettati tra il 14 e il 21 giorno (D14–D21) dopo la trasduzione in condizioni di coltura per ESC/iPSC umane. La figura 3a riassume il disegno sperimentale. La popolazione cellulare iniziale era positiva ai marker astrocitari CD44 e GFAP e completamente negativa per i marker neuro-staminali CD133, CD15, SOX2 e PAX6, dati che confermano il completo differenziamento in astrociti maturi. Non sono stati rilevati cloni di NSC sia come cluster di cellule aderenti che come neurosfere in terreno di coltura proprio delle NSC partendo da astrociti non trasfettati di controllo.

A differenza degli astrociti non trasfettati, gli astrociti trasfettati con OCT4 (AstroOCT4), SOX2 (AstroSOX2), o NANOG (AstroNANOG) hanno dato origine a colonie di piccole cellule simili alle NSC (Fig. 3b). La stragrande maggioranza di queste cellule erano colonie aderenti composte da piccole cellule rotondeggianti/fusiformi mentre le altre popolazioni cellulari presenti avevano assunto una struttura a sfera simile alle neurosfere. Per incrementare il processo di generazione delle NSCs abbiamo utilizzato le condizioni di coltura usate per le NSC umane che comprendono un terreno neuronale addizionato di EGF e FGF (Fig. 3c). Questo trattamento ha aumentato la frequenza delle colonie di NSC emerse dagli astrociti di 2-3 volte, rispetto alle cellule non trattate, mentre nessuno effetto è stato riscontrato negli astrociti di controllo non trasfettati (Fig. 3d). Il numero di colonie ottenuto con la singola espressione di NANOG era significativamente maggiore rispetto a quella ottenuta con SOX2 o OCT4 ($p < 0,00001$) (Fig. 3d). Le NSCs sono state poi clonate selettivamente e espanse in un medium neuronale. Queste colonie di NSC sono risultate positive per proteine specifiche dei precursori neuronali come SOX2, PAX6, CD133 e nestina (Fig. 3e), ed erano negative per i marcatori come CD44 e per i fattori di pluripotenza come SSEA-3 e Tra-1-60.

Abbiamo valutato la capacità di auto-rinnovarsi di tali cellule, che abbiamo denominato AstroNSC, in vitro crescendole a densità clonale. I cloni erano in grado di generare colonie secondarie e terziarie, a dimostrazione della loro capacità di auto-rinnovamento. Questi dati indicano che i fattori di riprogrammazione sono sufficienti per avviare la riprogrammazione di NSC da astrociti e che queste cellule sono sensibili alla stimolazione con fattori di crescita propri delle NSC. Per caratterizzare ulteriormente queste cellule dal punto di vista molecolare, abbiamo effettuato un'analisi genome-wide dei profili di espressione delle NSC derivate da AstroNANOG confrontandoli con quelli degli astrociti parentali (Fig. 3g). Le cellule AstroNANOG hanno dimostrato un'aumentata espressione di marcatori specifici delle NSC/precursori con una parallela riduzione dell'espressione genica astrocito-specifica, comprovando lo spostamento dell'espressione genica verso il fenotipo NSC. Nel complesso, il pattern di espressione genica delle cellule AstroNANOG

era significativamente diverso rispetto a quello degli astrociti non trasfettati come dimostrato dal clustering gerarchico dei segnali, dalla heat map e dal vulcano-plot t-test. Per confermare che gli astrociti corticali fossero convertiti e che i nostri risultati non fossero collegati alla presenza di altre cellule come le NSC/precursori presenti nella coltura, abbiamo selezionato una popolazione di astrociti CD44+ al FACS (Fig. 4a). Le cellule CD44+ indicano una popolazione di astrociti completamente maturi e commisionati che, in condizioni fisiologiche, non si differenziano in linee neuronali o oligodendrocitiche (Fig. 4b) (Liu et al., 2004). Dopo il sorting le cellule purificate erano tutte omogeneamente positive per CD44 come mostrato nella Figura 4c e negative per alcuni marcatori specifici delle cellule staminali neurali come CD133, CD15, Sox2 e PAX6. Successivamente, le cellule CD44+ sono state anche esse trasfettate con i fattori di riprogrammazione (Fig. 4 c,d). Abbiamo dimostrato che anche queste cellule generavano NSC con un'efficienza simile a quella osservata nelle colture astrocitarie primarie. Viceversa, le cellule CD44+ non trasfettate non hanno mai generato cloni simili alle NSC. I cloni isolati dalle NSC-CD44 risultavano negativi per CD44 ma positivi per SOX2, PAX6, CD133 e nestina (Fig. 4e). Queste cellule sono state espanse in vitro in un terreno per NSC e cresciute a densità clonale. Esse hanno generato cloni NSC secondari e terziari sottolineando la loro capacità di auto-rinnovamento (Fig. 4f). Nel complesso questi dati dimostrano che gli astrociti corticali umani possono essere riprogrammati in NSC attraverso l'espressione di singoli fattori di staminalità.

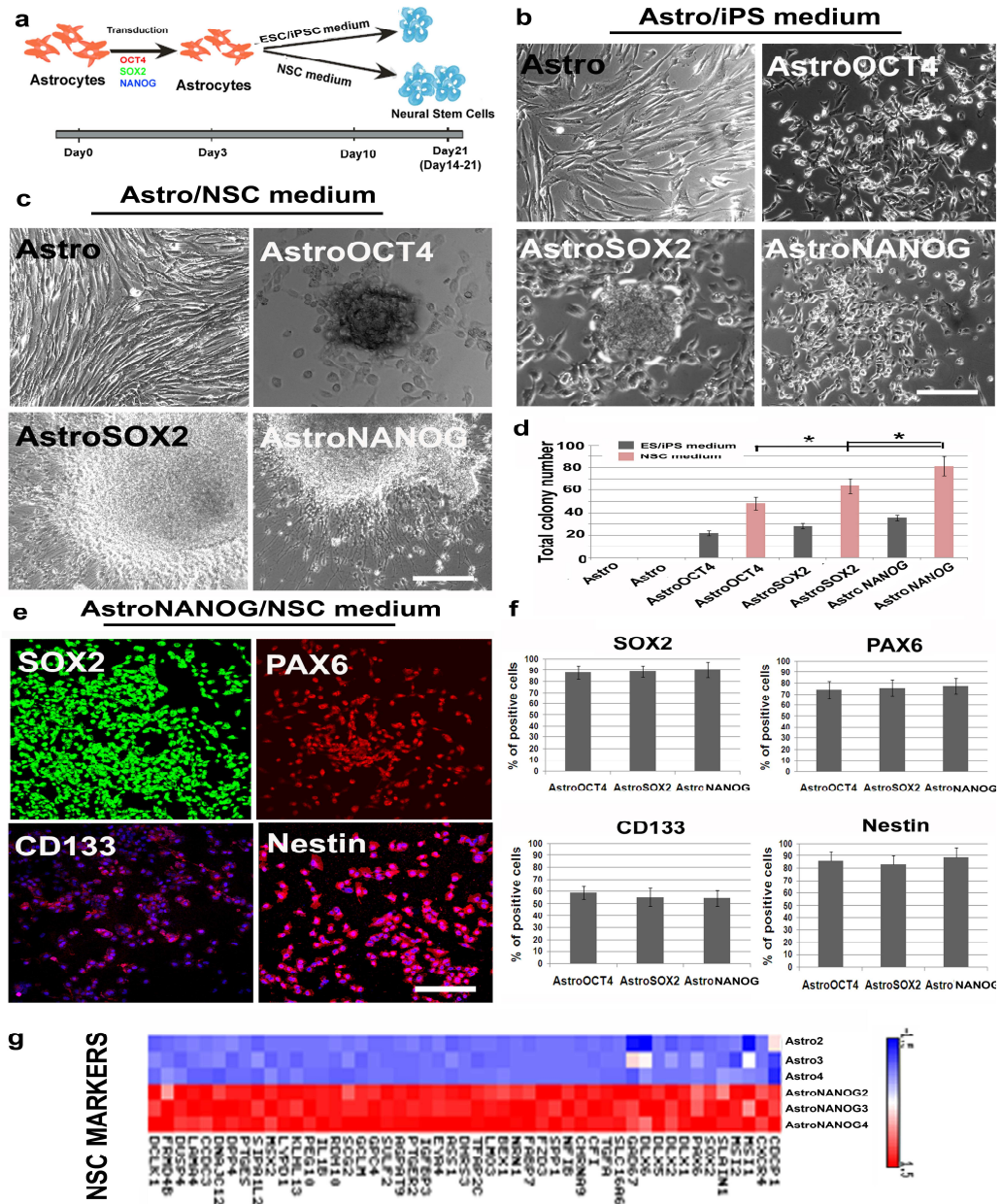


FIGURA 3

Astroцитi umani trasfettati con OCT4/SOX2/NANOG danno origine a colonie di NSC.

a) Illustrazione schematica della generazione di NSC da astroцитi corticali umani (Astro). Gli astroцитi umani sono stati trasfettati con Oct4, Sox2 o NANOG. Le

- cellule sono state coltivate in un medium per le ESC/iPSC o NSC . Le colonie di NSC sono state osservate tra il 14° e 21° giorno dopo la trasfezione.
- b, c) Immagine in campo chiaro di astrociti umani non trasfettati (Astro), trasfettati con OCT4-(AstroOCT4), con SOX2-(AstroSOX2) o con NANOG-(AstroNANOG) (le linee tratteggiate indicano le sfere) in terreno per le ESC/iPSC o per le NSC (n = 12/condizione). B scale bar: 150 μ m; scale bar c, Astro e AstroOCT4: 150 μ m; AstroSOX2: 75 μ m; AstroNANOG: 100 μ m.
- d) Quantificazione delle colonie negli astrociti umani dopo trasfezione in terreno per le ESC/iPSC (barra grigia) o in un medium neuronale (barra rosa) a 21 giorni (12 replicati biologici, le barre di errore, sd; * p <0,00001).
- e) Espressione immunocitochimica di SOX2, PAX6, CD133, e nestina nelle colonie degli AstroNANOG. Risultati simili sono stati ottenuti nelle colonie di AstroOCT4 e di AstroSOX2. Scala grafica: 150 μ m.
- f) Quantificazione dell'espressione dei marcatori delle NSC come percentuale di cellule positive nelle colonie degli AstroOCT4, AstroSOX2 AstroNANOG.
- g) Analisi di espressione genica globale dei marcatori delle NSC negli Astro vs AstroNANOG.

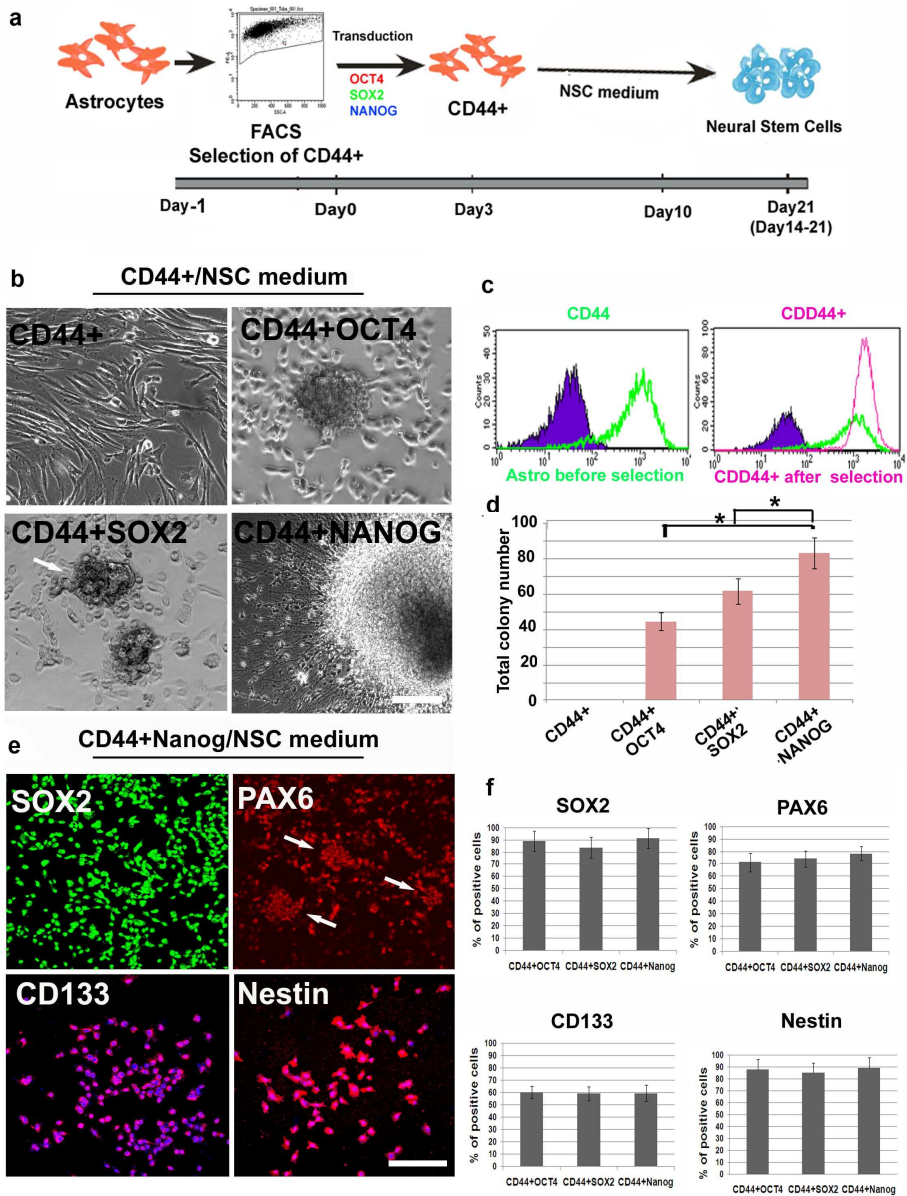


FIGURA 4

Astroцитi umani CD44+ trasfettati con OCT4/SOX2/NANOG danno origine a colonie di NSC.

a) Rappresentazione schematica della generazione di NSC da astroцитi umani CD44+ purificati (CD44). Gli astroцитi umani sono stati purificati mediante FACS per

l'espressione di CD44 e transfettati con SOX2 o OCT4 o NANOG. Le cellule sono state coltivate in un terreno ES/iPS o NSC. Le colonie di NSC sono state osservate tra 14 e 21 giorni dopo la trasfezione.

- b) Immagini in campo chiaro degli astrociti umani non trasfettati selezionati per CD44+ (CD44+) e delle colonie di astrociti trasfettate con OCT4-(CD44+OCT4), SOX2-(CD44+SOX2) o NANOG-(CD44+NANOG) (n = 12) allevate in terreno neurostaminale. Scala grafica: 150 µm
- c) Rappresentazione dell'analisi al FACS dei livelli di CD44 (marcatore degli astrociti) prima (a sinistra) e dopo (a destra) selezione al FACS.
- d) Quantificazione delle colonie di astrociti umani CD44+ dopo trasfezione, in terreno per le NSC a 21 giorni (le barre di errore, SD; * p <0,00001).
- e) Espressione immunostochimica di SOX2, PAX6, CD133 e nestina nelle colonie CD44+-NANOG. Risultati simili sono stati ottenuti con le colonie CD44+-OCT4 e CD44+SOX2.
- f) Quantificazione dell'espressione di marcatori delle NSC come percentuale di cellule positive nelle colonie di AstroOCT4, AstroSox2, e AstroNanog -. Scala grafica: 150 µm.

3.2 LA RIPROGRAMMAZIONE DIRETTA IN NSC NON RICHIEDE IL PASSAGGIO AD UNO STATO PLURIPOTENTE SIMILE ALLE iPSC

È stato precedentemente dimostrato che per riprogrammare le NSC in iPSC è sufficiente la sola espressione di OCT4 (Kim et al., 2009). Abbiamo voluto verificare se l'espressione individuale di OCT4/SOX2/NANOG potesse riprogrammare gli astrociti in iPSC o se la generazione di NSC fosse ottenuta attraverso il passaggio in uno stato pluripotente. Dopo la trasfezione con i singoli fattori, nelle nostre condizioni di coltura, non abbiamo osservato la formazione di iPSC, e le cellule trasfettate non risultavano positive per i marker di pluripotenzialità come SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, e TRA-1-81. Viceversa, trasfettando i fibroblasti umani con i quattro fattori (OCT4/SOX2/NANOG/Lin28) come descritto in precedenza si è osservata la comparsa di colonie simil-ES ed un incremento progressivo dei markers di staminalità (Yu et al., 2007) (Fig. 5 a,b e Fig. 6 a-e). Nelle cellule AstroNANOG abbiamo analizzato l'espressione di un specifico subset genico cruciale per l'induzione e il mantenimento della pluripotenza nelle NSC derivate dagli astrociti. A parte l'upregolazione di Nanog stesso l'espressione di NANOG non modifica i pattern di espressione genica di pluripotenza come valutato mediante analisi microarray (Fig. 5 c).

In contrasto con le iPSC derivate dai fibroblasti completamente riprogrammati, il trapianto di AstroNANOG trasfettati o di astrociti non trasfettati in topi immunodeficienti non genera teratomi formati da tutti e tre i foglietti embrionali o altre formazioni simili a tumori (Fig. 5 d). Nel complesso, i nostri risultati indicano che le NSC derivate dagli astrociti sono state indirizzate verso un destino neuronale staminale senza passare attraverso un fenotipo o uno stato funzionale pluripotente.

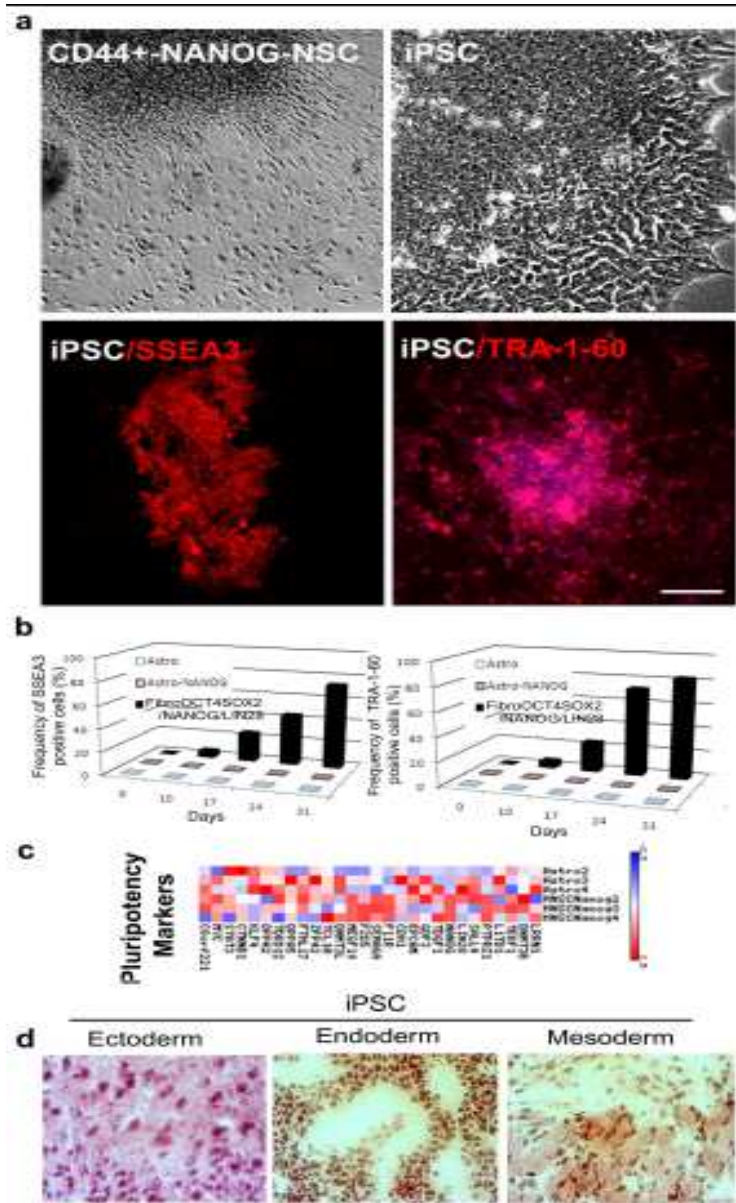


FIGURA 5

La conversione degli astrociti in NSCs da parte dei fattori OCT4/SOX2 e NANOG non richiede il passaggio dallo stato pluripotente

a) La colonia di CD44+NANOG-NSCs presenta un aspetto morfologico diverso al microscopio a contrasto di fase rispetto alla colonia di iPSC ottenuta trasfettando

fibroblasti contemporaneamente con OCT4/SOX2/NANOG/LIN28. Le iPSC erano positive per i marcatori di pluripotenza SSEA3 e TRA-1-60. Scala grafica: 150 μ m.

- b) Analisi quantitativa di SSEA3 e Tra-1-60 negli Astro, AstroNANOG, e in fibroblasti umani trasfettati con Oct4, Sox2, Nanog, e LIN28.
- c) Profilo d'espressione genica pluripotente negli astrociti parentali e in AstroNANOG.
- d) Teratomi derivati dalle iPSCs umane e sezioni di testicoli di topi iniettati con astrociti, AstroNANOG e soluzione salina (CTR). Scala grafica: 300 μ m.

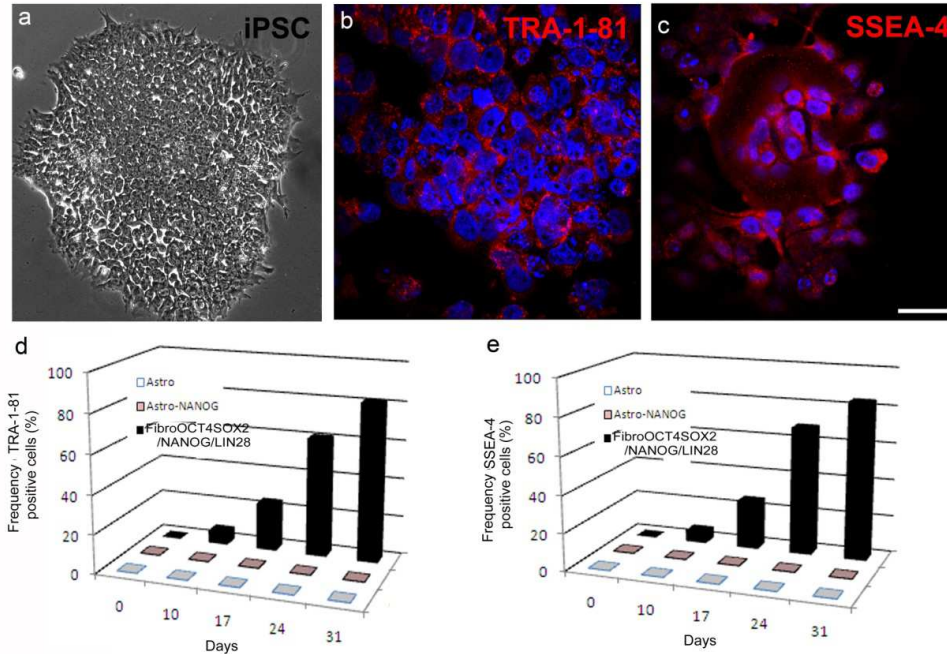


FIGURA 6

La riprogrammazione degli astrociti in NSCs da OCT4/SOX2 o NANOG non richiede il passaggio attraverso uno stato di pluripotenza.

a-c) Analisi a contrasto di fase di una colonia iPSC ottenuta dalla transfezione di fibroblasti di OCT4/SOX2/NANOG/LIN28 contemporaneamente. Le iPSCs sono positive per i marcatori di pluripotenza TRA-1-81 e SSEA-4.

Scala grafica: a: 150 μ m, b-c: 50 μ m

d-e) Analisi quantitativa di TRA-1-81 e SSEA-4 negli Astro, AstroNanog, e in fibroblasti umani trasfettati con Oct4, Sox2, Nanog, Lin28.

3.3 DIFFERENZIAMENTO NEURONALE DELLE NSC DERIVATE DAGLI ASTROCITI IN VITRO

L'analisi di espressione genica ha dimostrato che le cellule derivate dagli AstroNANOG presentavano un pattern d'espressione genica corrispondente a quello delle cellule neuronali staminali/precursori, sostenendo l'ipotesi che esse possano avere proprietà funzionali neurogeniche. Per caratterizzare funzionalmente la capacità di differenziamento neuronale, i cloni AstroNSC (per ogni condizione: Oct4, Sox2, Nanog) sono stati coltivati in un medium neuronale umano differenziativo (Fig. 7a). La progenie risultante presentava caratteristiche di differenziamento nelle tre linee neuroectodermiche, neuroni, astrociti e oligodendrociti (Fig. 7 b-e). Dopo 15 giorni di differenziamento, abbiamo osservato una percentuale di neuroni pari al $41,4 \pm 4,9\%$ (positivi per i marcatori neuronali come TuJ1, MAP2, e NF; quantificazione effettuata con MAP2), il $33,6 \pm 4,2\%$ di astrociti (positivi per GFAP), e il $7,9 \pm 1,3\%$ di oligodendrociti (positivi per O4 nelle AstroNANOG-NSC) (Fig. 7 f-h). Le cellule rimanenti avevano caratteristiche di precursori neuronali positivi per SOX2. Risultati simili sono stati ottenuti con le AstroNSC transfettate con OCT4 o SOX2 e anche con le cellule riprogrammate CD44+ (Fig. 8 a-h). I neuroni derivati dalle AstroNSC presentavano una tipica morfologia neuronale e non solo sono risultati positivi per i marcatori pan-neuronali, ma anche per sinapsina, sostenendo la presenza di contatti sinaptici, e per il neurotrasmettitore GABA, entrambi suggerendo una corretta competenza funzionale di queste cellule (Fig. 7 l-m, 8 l-m).

L'overespressione del fattore elica-loop-elica ASCL1 può indurre neurogenesi nelle NSC (Kim et al., 2009) negli astrociti di roditore (Heinrich C et al., 2010) e, in associazione con altri fattori, in fibroblasti murini e umani (Vierbuchen T et al., 2010). Sulla base di queste evidenze, abbiamo trasdotto le AstroNSCs con ASCL1 (Fig. 9; Fig. 10). Le cellule trasfettate hanno generato un numero di neuroni significativamente più elevato rispetto alle cellule non trattate (cellule transfettate 47,4 vs 36,3%, $p < 0,00001$). I neuroni ASCL1 presentavano morfologie molto complesse e esprimevano diversi marcatori neuronali quali TuJ1, MAP2, e NF. Inoltre erano positivi per la sinapsina e per GAD67, indicativo di un fenotipo gabaergico (Fig. 9 a-h; Fig. 10 a-d).

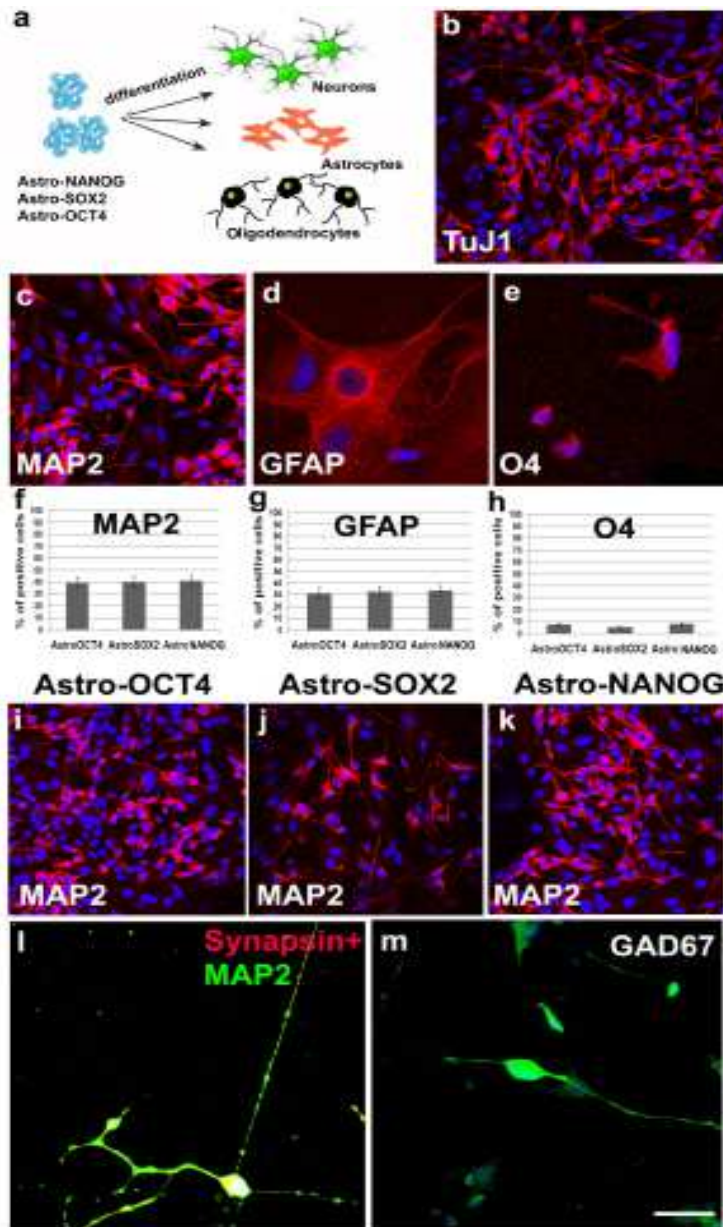


FIGURA 7

Generazione in vitro delle tre linee cellulari neuroectodermiche in particolare in neuroni partendo da AstroOCT4/SOX2 o NANOG

- a) Protocollo di differenziamento degli AstroNSC in neuroni, astrociti e oligodendrociti. Gli AstroNSCs sono stati coltivati in terreno differenziativo neuronale. Il fenotipo delle cellule è stato determinato dopo 15 giorni di differenziamento
- b-e) Differenziamento degli AstroNANOG in neuroni positivi per TuJ1 (b) e MAP2 (c) Gli astrociti risultano positivi per la GFAP (d) gli oligodendrociti per O4 (e)
- f-h) Quantificazione dell'efficienza di differenziamento in neuroni (MAP2), astrociti (GFAP), e oligodendrociti (O4) per le tre condizioni (Nanog, Oct4, Sox2).
- i-k) Gli AstroOCT4/SOX2/NANOG hanno capacità differenziative neuronali simili, come dimostrato con l' immunocitochimica per MAP2.
- l-m) I neuroni derivati dagli AstroNSC acquisiscono un fenotipo complesso e maturo e sono positivi per sinapsina (l, qui marcato in rosso con una doppia colorazione dove viene dimostrata anche la positività per MAP2 in verde), per i neurotrasmettitori come GAD67). Scala grafica: b, c, i, j, k: 150 μ m, d, e: 50 μ m, l, m: 50 μ m.

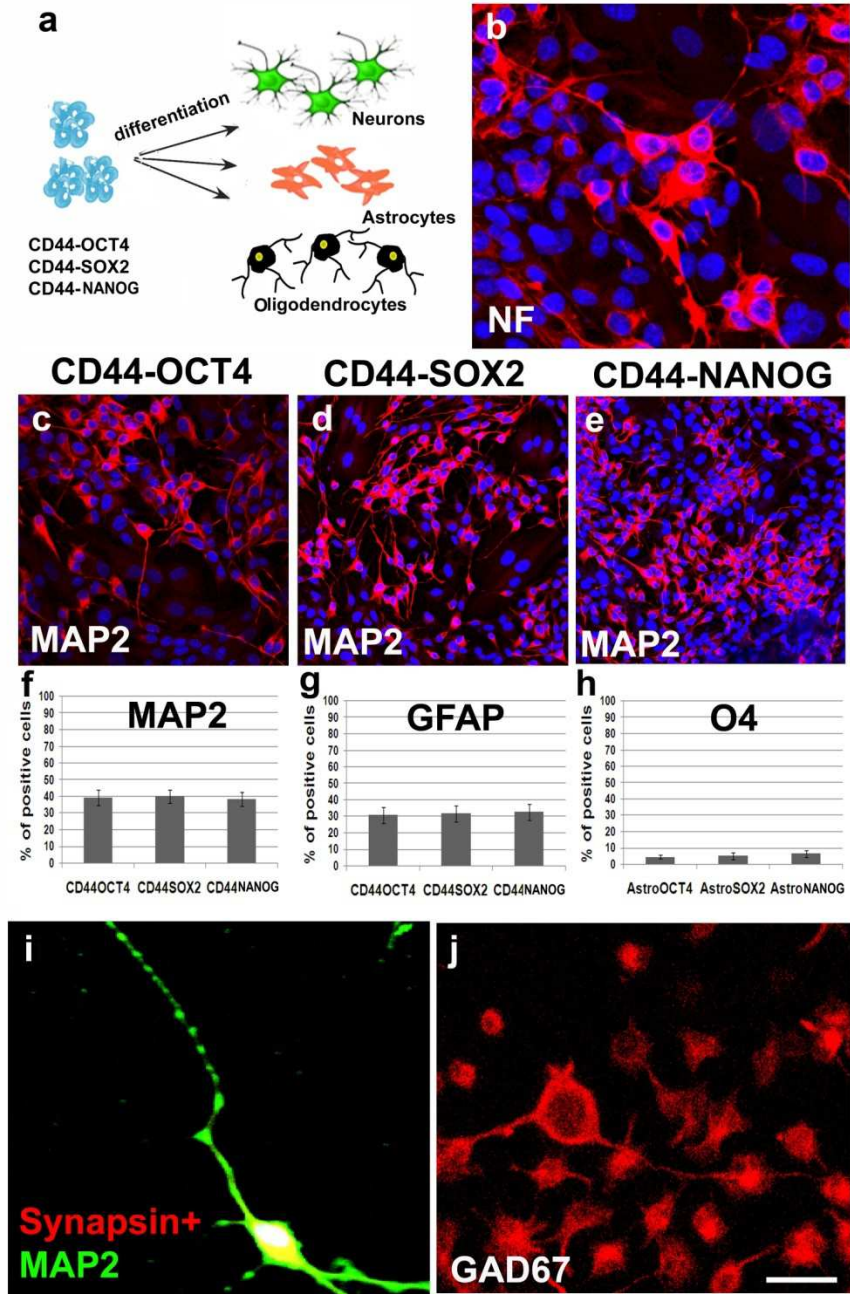


Figura 8

Differenziamento in vitro delle CD44 + OCT4/SOX2 o NANOG

a) Illustrazione schematica di differenziamento delle NSC CD44+ in neuroni, astrociti e oligodendrociti. Gli AstroNSC umani sono stati coltivati in un medium di differenziamento neuronale. Il fenotipo delle cellule è stato determinato dopo 15 giorni di differenziamento.

b-e) Differenziamento delle cellule CD44+NANOG in neuroni positivi per NF(b)

i-k) CD44-OCT4/SOX2/NANOG hanno capacità di differenziamento neuronale simili, come dimostrato con l'analisi immunocitochimica per MAP2.

f-h) Quantificazione del rendimento del differenziamento in neuroni (MAP2), astrociti (GFAP) e O4 per le tre condizioni (CD44+ /NANOG, OCT4 o SOX2).

l-m) I neuroni derivati dalle NSC-CD44 mostrano un fenotipo complesso maturo e risultano positivi per la sinapsina (l, mostrato qui in rosso come colorazione doppia con MAP2 in verde) e per il neurotrasmettitore GABA, sostenendo le corrette proprietà funzionali

Scala grafica: b, a 70 μ m, c, d, e: 150 μ m, i, j: 50 μ m

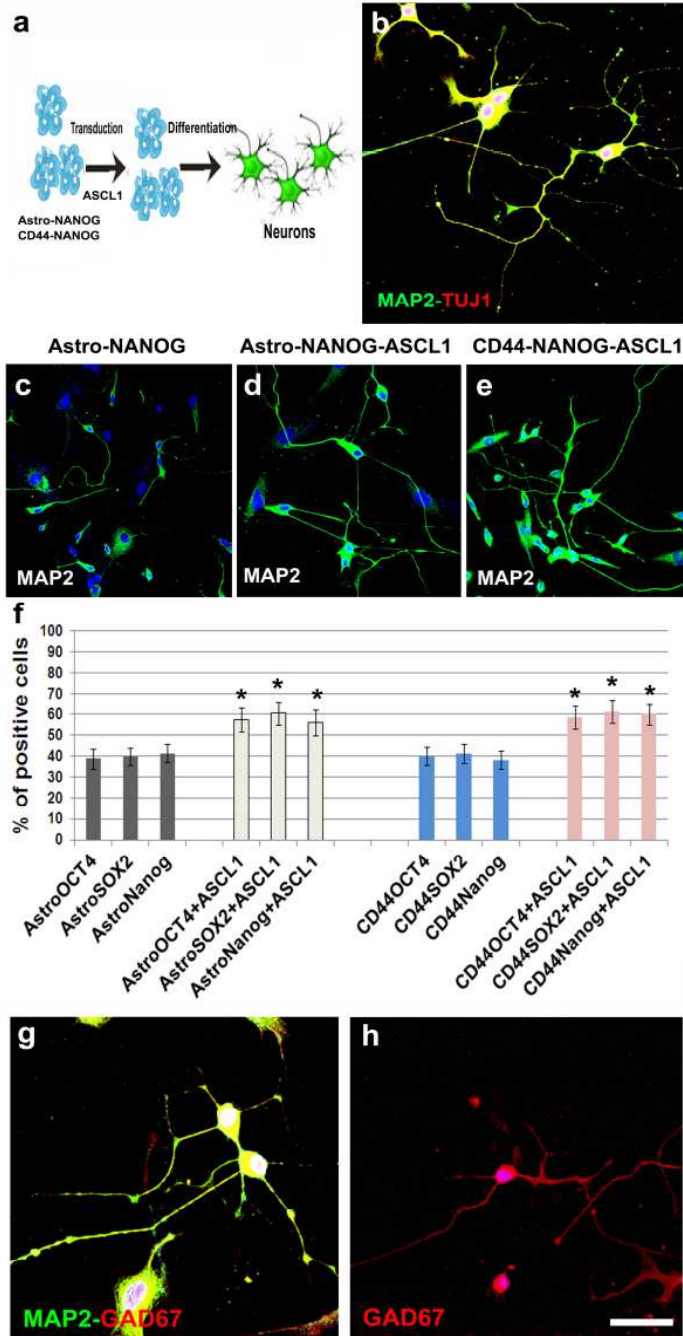


FIGURA 9

ASCL1 promuove il differenziamento neuronale degli Astro e delle cellule CD44+NANOG

- a) Illustrazione schematica del differenziamento degli Astro e CD44+NANOG-ASCL1 in neuroni. LeAstro/CD44+NSC sono state coltivate in un terreno umano differenziativo neuronale. Il fenotipo delle cellule è stato analizzato dopo 15 giorni.
- b) I neuroni AstroNANOG-ASCL presentato una lunga arborizzazione dendritica e assonale e sono risultati positivi per i marcatori neuronali MAP2 (verde) e TuJ1 (rosso)
- c-e) I neuroni differenziati dagli AstroNANOG-ASCL e CD44-NANOG-ASCL1 sono più numerosi e con una morfologia complessa e matura in coltura rispetto agli AstroNANOG. I neuroni sono visibili con l'immunocitochimica per MAP2.
- f) Quantificazione dell'efficienza di differenziamento in neuroni (MAP2), l'efficienza è significativamente più alta con gli AstroNANOG-ASCL1 e CD44NANOG-ASCL1 vs AstroCD44-NANOG.
- g, h) I neuroni derivati dagli AstroNSC risultano positivi per GAD67 (mostrato qui in rosso con doppia colorazione con MAP2 in verde (g) o in un'unica colorazione (h)).
- Scala grafica: b: 50 μ m, c, d: 150 μ m; g: 50 μ m, h: 70 μ m.

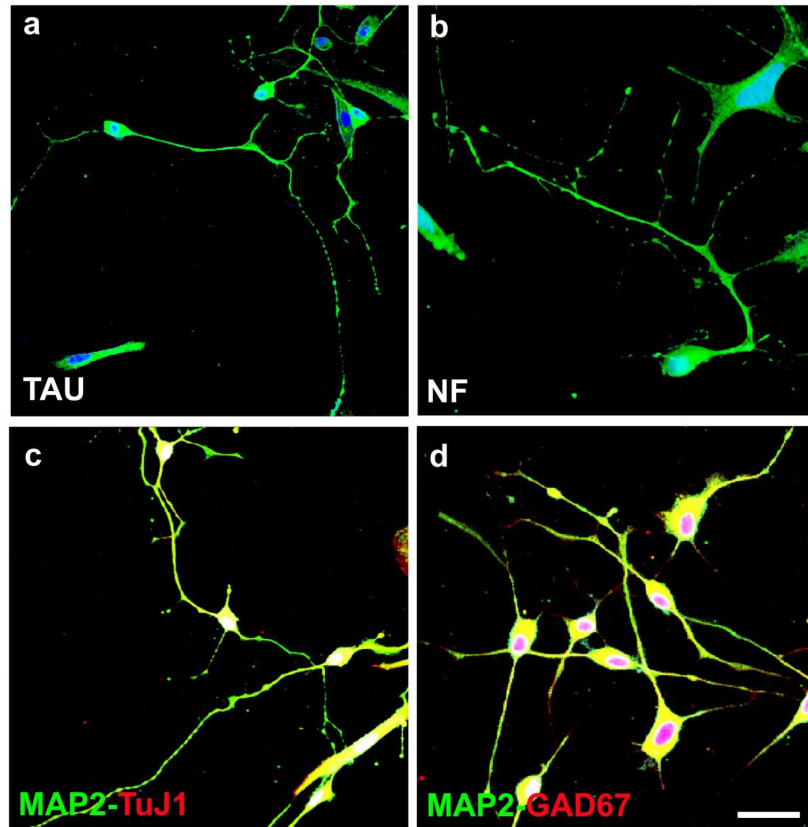


Figure 10

Neuroni derivati in vitro dagli AstroNANOG-ASCL1

a-b) I neuroni, differenziati da AstroNANOG-ASCL e CD44-NANOG-ASCL1 mostrano una complessa morfologia matura con dendriti e assoni lunghi, dati confermati dall'analisi immunocitochimica per TAU e NF.

c-d) Questi neuroni sono positivi per GABA (mostrato qui in rosso come colorazione doppia con MAP2 in verde (g).

Scala grafica: a: 150 μm , b: 100 μm ; c: 150 μm , h: 50 μm

3.4 DIFFERENZIAMENTO NEURONALE DELLE NSC DA ASTROCITI IN VIVO

Per valutare la capacità dei cloni cellulari AstroNSC di attecchire e differenziare in neuroni anche in vivo nel SNC dei mammiferi, le cellule Astro/CD44NANOG sono state trapiantate intracerebroventricolare in topi immunodepressi ($n = 12$) per caratterizzare il loro potenziale in vivo (Fig. 11a). Gli animali trapiantati con fibroblasti e con cellule morte mediante rapido congelamento sono state usati come controllo. Le cellule donatrici AstroNSC umane sono risultate presenti nel

cervello di tutti gli animali trapiantati. In particolare, le cellule donatrici si sono integrate a livello della sostanza grigia e bianca migrando dai ventricoli cerebrali in due mesi. Queste cellule sono state osservate anche nelle aree corticali. Il numero totale di cellule AstroNSC donatrici umane GFP-positivo in sezioni di cervello di animali trattati è stato determinato con una stima stereologica 2 mesi dopo il trapianto (Fig. 11 b-i). I risultati hanno indicato che il numero di cellule era di $131,764 \pm 19,546$ ($65.88 \pm 14.38\%$ della popolazione iniziale di 200,000 cellule) nel caso delle cellule AstroNANOG (fig. 11 j).

Le cellule donatrici mostravano in modo predominante un fenotipo neuronale (MAP2: $39.3 \pm 5.2\%$ AstroNANOG; $37.2 \pm 4.8\%$ CD44NANOG) (Fig. 11k). Queste cellule erano mature, morfologicamente differenziate e con una lunga estensione neuritica. Una porzione di cellule trapiantate conservava le caratteristiche delle NSC, mentre le cellule restanti acquisivano invece un fenotipo gliale (GFAP: $35.4 \pm 4.9\%$ AstroNANOG, $36.3 \pm 3.8\%$ CD44NANOG; O4: $6.1 \pm 1.6\%$ AstroNANOG, $6.6 \pm 1.9\%$ CD44NANOG) (Fig. 11 j-s).

Le cellule neuronali derivate dalle cellule trapiantate esprimevano anche alcune proteine neurotrasmettitoriali come il GABA (Fig. 12 a-f). La capacità di generare precursori neuronali e la presenza delle tre linee neuroectodermiche ha confermato la capacità funzionale in vivo delle cellule derivate dagli astrociti.

Il trapianto di cellule AstroNANOG/ASCL1+ conferma l'effetto pro-neurogenico dell'espressione di ASCL1, in quanto produce un numero simile di cellule attecchite e una grande porzione con fenotipo neuronale (Fig. 11 l-m).

I nostri dati dimostrano così che le cellule AstroNSCs danno origine a cellule simili a progenitori neuronali funzionali che possono differenziarsi in neuroni in vivo ed in vitro.

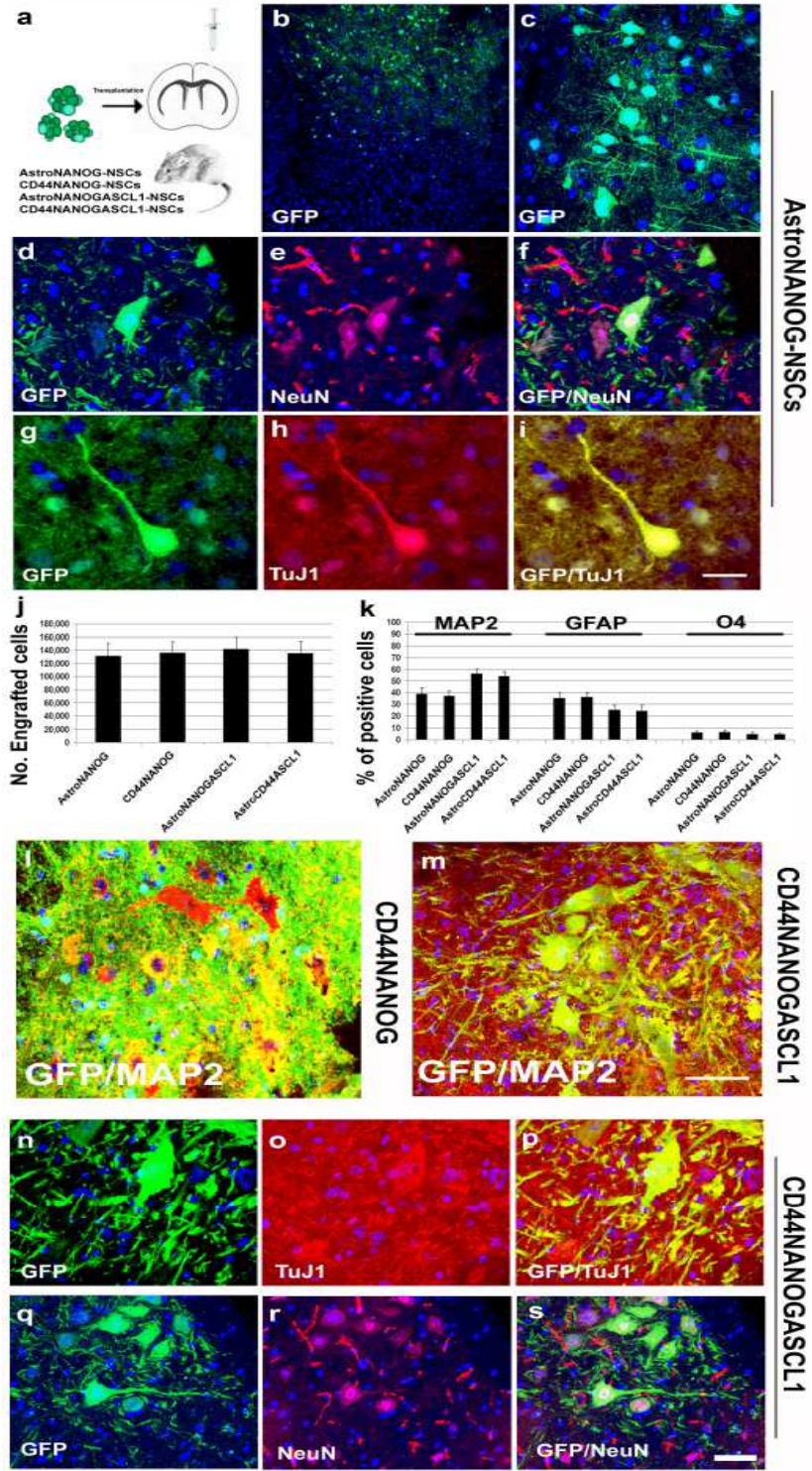


FIGURA 11

Gli AstroNSCs trapiantati nel cervello di roditori sopravvivono e generano neuroni

a) Per gli esperimenti in vivo abbiamo trapiantato gli AstroNSCs (AstroNANOG, CD44NANOG ± ASCL1) a livello intracerebroventricolare nel cervello del topo. Per tracciare il destino delle cellule trapiantate, le cellule sono state modificate per esprimere il gene reporter GFP

b, c) Dopo il trapianto delle cellule AstroNANOG abbiamo dimostrato la presenza di cellule del donatore integrate nelle aree corticali del cervello

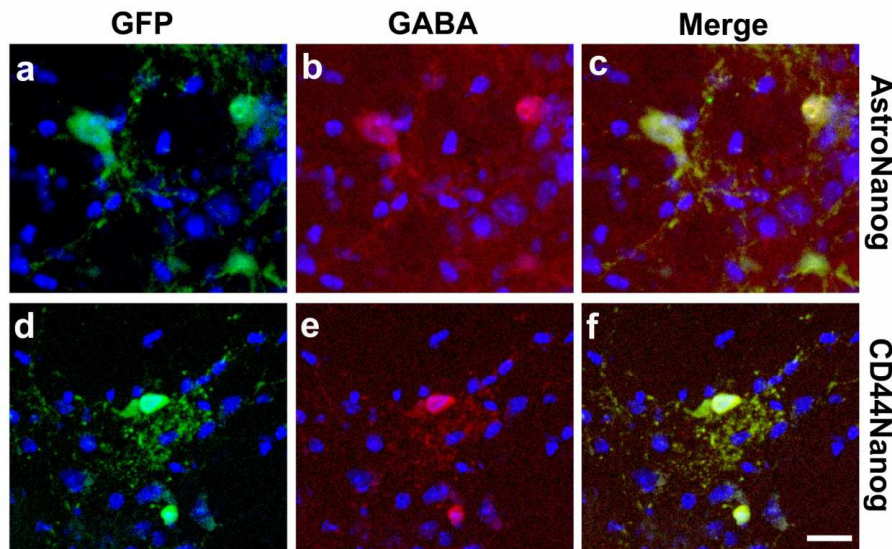
d-i) Una parte significativa di cellule GFP (d, g: verde) acquisisce un fenotipo neuronale, come dimostrato dall'espressione di marcatori neuronali NeuN (e: rosso) e TuJ1 (h: rosso). f, i: merge

j,k) Quantificazione del numero di cellule donatrici (j) e dei diversi fenotipi acquisiti (k, espressione in percentuale delle cellule positive: neuroni (MAP2), astrociti (GFAP) e oligodendrociti (O4)), per ogni condizione.

l, m) Il trapianto di cellule CD44-NANOG-ASCL1 da' luogo a una maggiore percentuale di neuroni maturi rispetto alla popolazione CD44-NANOG come mostrato qui con reazioni di immunistochemica per MAP2 (rosso) (f) merge (giallo) con GFP (verde).

n-s) I neuroni derivati dalle cellule CD44-NANOG-ASCL1-GFP (n, q) presentano un fenotipo complesso e risultano positivi per i marcatori neuronali come TuJ1 (o rosso) e NeuN (r: rosso). p, s: merge.

Scala grafica: b: 300 μ m; c: 80 μ m, d-i: 75 μ m, l, m: 75 μ m, n, p: 50 μ m, q-s: 80 μ m

**FIGURA 12**

I neuroni derivati dagli Astro-NSC esprimono neurotrasmettitori in vivo

a-f): I neuroni derivati dagli Astro-NANOG e CD44NANOG (GFP +: a, d) sono positivi per il GABA (essere).

c-f: Merge
Scale bar: un a--d: 50 μ m, d-f: 70 μ m.

3.5 Le modificazioni epigenetiche sono alla base della riprogrammazione degli astrociti in NSC

Le NSC derivate dagli astrociti sono probabilmente associate anche ad una riprogrammazione epigenetica, abbiamo così analizzato il pattern di metilazione del DNA delle cellule NSC derivate dagli astrociti. Sono stati confrontati 3 cloni umani di AstroNANOG-NSC con gli astrociti dai quali derivavano utilizzando il NimbleGen 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Arrays. Questo approccio permette l'analisi delle regioni del promotore e delle isole CpG.

L'analisi della metilazione del DNA Find-Peaks ha identificato regioni di arricchimento positivo significativo nei dati dei microarray, usando un algoritmo modificato "per identificare l'arricchimento dei microarray" (ACME) per l'identificazione dei picchi (Scacheri, et al. 2006) (Fig. 13a). Per quanto riguarda la posizione del picco, i punteggi dei picchi degli esperimenti degli AstroNANOG e degli astrociti sono stati soggetti al t-test. Un totale di 6,667 delle 67,652 regioni analizzate sono state riscontrate differenti in modo significativo nelle due popolazioni selezionate.

Abbiamo chiamato le regioni metilate diversamente R-DMRs. Il numero di R-DMRs che risultavano ipermetilate negli astrociti è maggiore rispetto a quelle ipometilate, come mostra la figura 13b. Inoltre abbiamo condotto un'analisi genica ontologica dei geni vicini a queste regioni (all'interno di 1,000 bp dal sito d'inizio della trascrizione (TSS) di un gene) che ha rivelato un arricchimento dei geni coinvolti nei processi regolatori e di sviluppo (Fig. 13 c, d).

Per esempio il 22% dei geni che risultavano ipermetilati negli astrociti rispetto agli AstroNSCs e il 38% dei geni ipometilati negli astrociti rispetto agli AstroNANOG erano coinvolti nei processi di sviluppo. Quando abbiamo osservato una sovrapposizione delle R-DMRs con i siti di legame noti per OCT4, SOX2, eNANOG (Doi et al., 2009), abbiamo riscontrato che molte delle R-DMRs appartenevano a queste regioni. In seguito abbiamo messo in relazione il profilo d'espressione genica tra astrociti e AstroNANOG e i siti genici noti per essere target di OCT4 e SOX2. I geni NSC che sono up-regolati nelle cellule AstroNANOG sono significativamente correlati con i siti di legame di OCT4, SOX2 e NANOG (Figs. 13 e-j). Queste osservazioni indicano che i siti epigenetici e i cambiamenti d'espressione genica durante la riprogrammazione degli astrociti in NSC sono strettamente legati ai geni che sono più importanti per la pluripotenza e nella staminalità.

RISULTATI

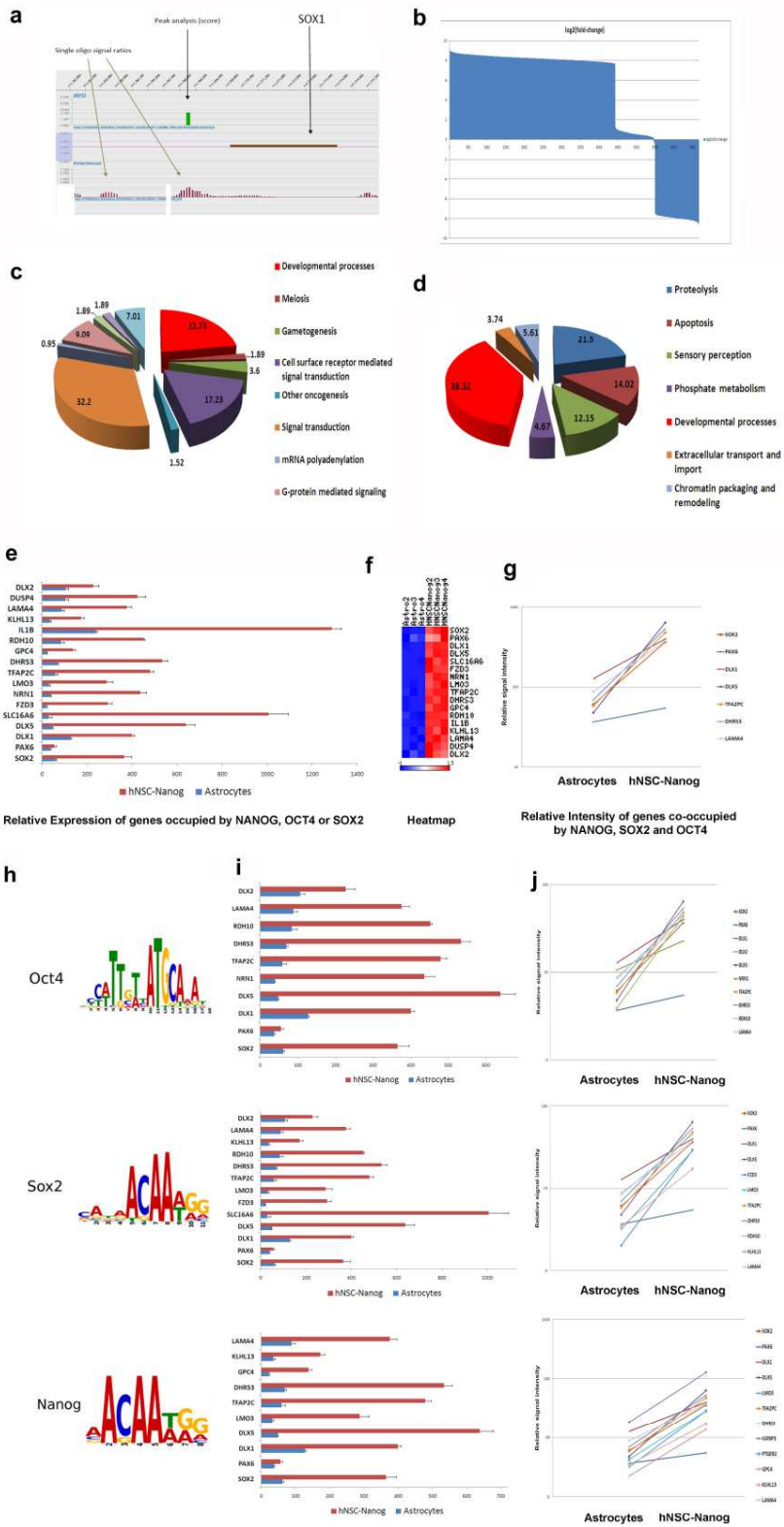


FIGURA 13

Modifiche epigenetiche e di espressione genica associate alla riprogrammazione degli astrociti

- a) Abbiamo confrontato il pattern di metilazione dei tre cloni umani AstroNANOG-NSC con quello degli astrociti da cui sono stati derivati. L'analisi di metilazione del DNA Trova-Peaks ha identificato le regioni arricchite significativamente e positivamente nei dati microarray come mostrato qui nel caso di SOX2.
- b) Un totale di 6.667 sulle 67.652 regioni analizzate sono risultate differire significativamente. Il numero di regioni metilate in modo diverso, R-DMRs, che sono ipermetilate negli astrociti dominano su quelle ipometilate. Questo diagramma mostra i valori log₂ del numero di volte di cambiamento (Astro /NANOG). La distribuzione mostra una netta maggioranza di valori positivi, .
- c, d) Abbiamo quindi effettuato un'analisi genica ontologia (GO): dei geni vicino a queste regioni (all'interno di 1000 bp dal sito di inizio della trascrizione (TSS) di un gene). I geni ipermetilati negli astrociti rispetto agli AstroNSCs sono mostrati in c, mentre i geni che sono stati ipometilati negli astrociti rispetto agli AstroNANOG sono mostrati in d.
- e-j) Correlazioni del profilo globale dell'espressione genica degli astrociti e degli AstroNANOG e siti di legame di Oct4, Sox2, e Nanog. e) Espressione relativa dei geni fisicamente occupati da Oct4, Sox2, e Nanog e la loro rappresentazione heat map (f) e l'intensità relativa (g). Sequenze del sito di legame di Oct4, Sox2, e Nanog (h). Espressione relativa dei geni occupati da Oct4, Sox2, e Nanog, considerati individualmente, e la loro intensità relativa.

4 DISCUSSIONE

Il nostro studio dimostra per la prima volta che l'espressione di un singolo fattore chiave di trascrizione staminale è sufficiente per convertire rapidamente ed efficacemente gli astrociti corticali umani in cellule staminali neurali/precursori neuronali. I geni OCT4/SOX2/NANOG sono stati dai noi selezionati per il ruolo chiaramente dimostrato nel mantenimento della pluripotenza e della riprogrammazione (Hanna et al., 2010). Le NSC derivate dagli astrociti sono risultate multipotenti e avevano la capacità di auto-rinnovamento, presentavano inoltre una morfologia specifica e l'espressione di alcuni marker tipici delle NSC e rispondevano agli stimoli dei fattori di crescita per le NSC.

Per dimostrare in modo inequivocabile che gli astrociti differenziati potevano essere convertiti direttamente in NSC utilizzando questa strategia, abbiamo impiegato anche astrociti maturi selezionati per CD44, escludendo la possibilità che la presenza di cellule staminali/precursori potesse spiegare le nostre osservazioni.

Nessuna conversione spontanea in NSC o in neuroni è stata osservata nelle nostre condizioni di cultura in astrociti controllo trasfettati con plasmidi di controllo o non trasfettati.

Il cambiamento di destino cellulare si è verificato senza la necessità di un passaggio attraverso uno stato pluripotente simile alle iPSCs. Questo approccio di conversione diretta potrebbe evitare alcune complicazioni legate allo stato indifferenziato delle iPSCs, compreso il rischio di formazione di teratoma. Nel contesto della produzione di cellule per l'applicazione clinica per la medicina rigenerativa nelle malattie neurologiche, ulteriori studi sono necessari per indagare se, con una strategia simile, è possibile convertire direttamente in NSC altre cellule che sono di una linea embrionale più distante, come i fibroblasti cutanei umani. La capacità di differenziamento funzionale delle NSC derivate dagli astrociti in neuroni e cellule gliali in vitro e in vivo ha confermato l'acquisizione del destino di NSC da parte degli astrociti umani. Abbiamo osservato una tendenza notevole di queste cellule a differenziarsi in neuroni. Queste cellule risultavano positive non solo per gli antigeni pan-neurali, ma anche per le proteine sinaptiche e per i neurotrasmettitori, supportando le loro caratteristiche funzionalmente corrette. Inserendo il fattore di trascrizione ASCL1, abbiamo ulteriormente modulato e promosso la capacità di differenziamento neuronale delle cellule riprogrammate. ASCL1, noto anche come Mash1, appartiene ai fattori di trascrizione bHLH della famiglia achaete-scute ed è un fattore di trascrizione telencefalico a monte di Dlx2 durante lo sviluppo neuronale (Guillemot et al., 1993, Pattym et al., 2006). E' stato dimostrato che questo fattore, in combinazione con altri geni neurogenici, promuove il fenotipo neuronale in fibroblasti umani e murini (Vierbuchen et al., 2010, Pang et al., 2011) e in astrociti murini (Heinrich et al., 2010, 2011). Anche nei nostri esperimenti, l'espressione di ASCL1 risultava neurogena ed associata alla generazione di un numero maggiore di neuroni con un fenotipo più complesso e maturo. Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che gli astrociti possono essere indotti ad acquisire un fenotipo specifico desiderato anche a seguito di più

modificazioni genetiche sequenziali. Altre combinazioni di molteplici fattori di trascrizione neurogeni potrebbe produrre un più ampio spettro di fenotipi neuronali. L'acquisizione di un fenotipo neuronale è stato ottenuta anche in vivo dopo il trapianto nel cervello di roditori. Questa scoperta è una base promettente per quanto riguarda i tentativi futuri di convertire gli astrociti endogeni direttamente in vivo con l'espressione di fattore di trascrizione.

Per studiare i meccanismi molecolari alla base di questa conversione degli astrociti in NSC, abbiamo effettuato sia l'analisi dell'espressione genica che quella di metilazione. I risultati hanno dimostrato che la presenza di un fattore chiave staminale attiva caratteristiche specifiche del programma trascrizionale delle NSC. E' probabile che l'auto-regolazione e un meccanismo di feedback positivo a loop che coinvolge i fattori di riprogrammazione e i geni bersaglio comuni più a valle (Tam et al., 2008) mantengano l'espressione di geni chiave che determinano il destino neuronale staminale e stabilizzino il fenotipo.

Abbiamo inoltre dimostrato che gli stessi geni subiscono ampie modificazioni epigenetiche. Una significativa modifica del profilo trascrizionale potrebbe anche portare a cambiamenti nelle caratteristiche epigenetiche di tutto il genoma come la metilazione del DNA e il rimodellamento della cromatina che promuovono ulteriormente la stabilità della nuova rete trascrizionale. L'analisi delle regioni differenzialmente metilate evidenzia una metilazione significativamente più alta per quanto riguarda la NSC. Integrando questi dati con i noti siti mappati di legame per OCT4/SOX2/NANOG (Loh et al., 2006) possiamo concludere che la riprogrammazione è probabilmente associata al legame diretto dei fattori di riprogrammazione ai loci regolatori dei geni neuronali specifici.

I nostri risultati contribuiscono a chiarire i meccanismi mediante i quali è possibile attivare direttamente in vivo la riprogrammazione degli astrociti in NSC per favorire i meccanismi di rigenerazione nelle lesioni del SNC.

La possibilità di indurre la neurogenesi ex-novo dagli astrociti dovrà tener conto della necessità di preservare contemporaneamente la presenza del fenotipo gliale che svolge sottoforma di glia reattiva un effetto positivo nella riparazione del danno tissutale. Questo non vale solo per gli astrociti reattivi, ma anche per le cellule ependimali e, potenzialmente per la glia NG2, di cui gli effetti benefici o dannosi dopo una lesione cerebrale sono al momento non ancora compresi. Inoltre, anche se la neurogenesi potrà essere ottenuta in vivo, una sfida cruciale sarà quella di determinare come questi neuroni rigenerati possano essere collegati all'interno della preesistente rete neuronale e in che misura siano di beneficio o dannosi se non appropriatamente integrati. Questi interrogativi sono apparentemente parzialmente superati dalle evidenze sperimentali ottenute con il trapianto di cellule staminali neuronali. Nel complesso il trapianto di cellule staminali neuronali/precursori fa supporre che nuovi neuroni possano essere integrati nei circuiti preesistenti dando un effetto terapeutico positivo sia in modelli murini di malattie neurodegenerative che in pazienti ad esempio nel caso di alcuni soggetti affetti da Morbo di Parkinson sottoposti a trapianto di precursori dopaminergici (Braak et al., 2008; Lane et al., 2010). Un altro elemento fondamentale da affrontare in futuro risiede nel determinare la misura in cui i risultati terapeutici ottenuti nei modelli animali di malattie umane siano rappresentativi di ciò che si potrà verificare nel SNC umano, e in che misura vi possono essere differenze

specifiche (Oberheim et al., 2009). Una sfida correlata sarà determinare se i fenomeni di neurogenesi fisiologica degli astrociti possano essere utilizzati per strategie clinicamente valide per la riparazione del SNC umano. Sono infatti da segnalare alcune evidenze di una reazione proliferativa delle cellule neurali e di una potenziale neurogenesi endogena osservate in materiale post-mortem di pazienti affetti da ictus o emorragia cerebrale, ma anche in altre patologie quali la Corea di Huntington o la sclerosi multipla (Chang et al., 2008; Curtis et al., 2003; Ekonomou et al., 2010; Minger et al., 2007; Curtis et al., 2007). Tuttavia per definire la rilevanza di tali osservazioni sono necessari più dati ottenuti da materiale di soggetti umani e protocolli standard per quanto riguarda la fissazione e le metodiche di immunostochimica che migliorerebbero significativamente la riproducibilità di questi dati. Sulla base dei dati attualmente disponibili, il richiamo indotto da lesioni tissutali nel SNC su progenitori o neuroblasti, come osservato nei roditori, sembra anche verificarsi nel contesto umano (Curtis et al., 2007). Tuttavia, le distanze relativamente grandi da coprire nel cervello umano rispetto al cervello dei roditori e le potenziali differenze tra il comportamento migratorio dei neuroblasti umani e roditori rendono l'analisi dei meccanismi di neurogenesi e migrazione cellulare indotti da lesione complesso. Per le regioni ancora più lontane dai siti neurogeni che non possono essere raggiunti dai neuroblasti endogeni, i neuroni sembrano poter essere rigenerati localmente da cellule gliali attivate, riprogrammate. Infatti, il riscontro di cellule che esprimono il fattore di trascrizione SOX2, Musashi, vimentina e nestina nei siti di ischemia o emorragia cerebrale (Sgubin et al., 2007) (Nakayama et al., 2010) può essere considerata come una prima prova della possibilità di eventi di de-differenziazione delle cellule gliali locali verso uno stato più staminale o progenitore nei siti della lesione. Inoltre, una popolazione simile alle OPC del cervello dei roditori adulti, che esprimono OLIG2 e l'indicatore di proliferazione Ki67, è stata osservata anche a livello del tessuto cerebrale umano integro (Geha et al., 2010). È interessante notare che tali cellule localizzate a livello della sostanza bianca sembrano essere particolarmente pronte alla conversione verso la neurogenesi quando poste in vitro (Nunes et al., 2003) e potrebbero essere una fonte di neuroni vicini alla lesione nella sostanza bianca dei pazienti in vivo (Chang et al., 2008). La glia nel cervello umano quindi fornisce nuove strade per sviluppare strategie di rigenerazione tissutale nei pazienti con diversi disturbi neurologici. Tuttavia, in linea con la crescente diversità della glia durante la filogenesi, le cellule gliali del cervello umano sono in realtà più complesse e diversificate rispetto al cervello dei roditori (Oberheim et al., 2009). È quindi di particolare importanza comprendere meglio questa diversità, con l'obiettivo finale di utilizzare opportunamente la glia per un miglioramento dell'esito neurologico dopo una lesione nel SNC.

Nel 2010 Heinrich ha dimostrato che gli astrociti murini possono essere direttamente differenziati in neuroni con l'espressione forzata di un singolo fattore di trascrizione neurogeno (Heinrich et al., 2010, 2011), tuttavia, prima del nostro lavoro, una simile possibilità non era ancora stata dimostrata nelle cellule umane. Un elemento essenziale per lo sviluppo della riprogrammazione degli astrociti in NSC/precursori neuronali è la comprensione approfondita dei meccanismi che regolano la riprogrammazione delle cellule adulte in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) (Hanna et al., 2010) o direttamente in un altro tipo cellulare, come i

fibroblasti trasformati in neuroni o precursori neuronali (Pang et al., 2011, Caiazzo et al., 2011, Pfisterer et al., 2011, Kim et al., 2011). Anche se per il trapianto di cellule autologhe nei disturbi neurologici, i fibroblasti di pazienti rappresentano una fonte di neuroni molto più adatta rispetto agli astrociti, la comprensione dei meccanismi che rendono possibile riprogrammare gli astrociti in NSC è utile per l'obiettivo finale dell'utilizzo di queste cellule come fonte di cellule endogene per la riparazione in situ neuronale nel sistema nervoso centrale senza alcun innesto invasivo di cellule .

Nel complesso, i nostri risultati supportano l'importanza di indagare la riprogrammazione parziale come una possibile strategia per la terapia cellulare autologa, non solo ex vivo, ma in prospettiva anche in vivo mediante la trasformazione diretta di astrociti endogeni nel SNC per il trattamento delle malattie neurologiche.

5 CONCLUSIONI

In questo lavoro, utilizzando l'espressione individuale di Oct4, Sox2, e Nanog, abbiamo dimostrato e caratterizzato la conversione diretta verso un destino neurale di astrociti umani in progenitori neurali multipotenti, in vitro e in vivo, senza passare attraverso lo stato pluripotente. Gli astrociti trasfettati con Oct4, Sox2, o NANOG hanno dato luogo a colonie di cellule simili alle NSCs (AstroNSC). La generazione di NSC è stata migliorata utilizzando condizioni di coltura neurostaminali, dimostrando che queste cellule rispondono appropriatamente ai segnali a cui fisiologicamente sono sensibili le NSCs. Le cellule AstroNSC erano positive per proteine specifiche di precursori neuronali e negative per i marcatori astrocitari e per i fattori di pluripotenza. Abbiamo inoltre dimostrato la capacità di auto-rinnovamento delle AstroNSCs in vitro: esse possono formare cloni che possono essere espansi e generare cloni secondari e terziari. L'analisi genica di espressione ha confermato che le cellule AstroNANOG presentano un'aumentata espressione dei marker NSC/precursori con una parallela riduzione dell'espressione di specifici geni astrocitari, con un conseguente spostamento verso l'identità neurostaminale. Per confermare che gli astrociti corticali fossero realmente convertiti e che i nostri risultati non fossero collegati alla presenza di altre cellule, come le NSC/precursori, abbiamo selezionato una popolazione di astrociti CD44+. Le cellule CD44+ rappresentano una popolazione di astrociti che non si differenzia in altre linee cellulari (Li et al., 2002). Abbiamo quindi trasdotto le cellule CD44+ purificate con i fattori di riprogrammazione dimostrando che queste cellule generavano NSCs con un rendimento e con caratteristiche simili a quelle osservate per gli astrociti non selezionati.

Abbiamo quindi voluto verificare se l'espressione individuale di OCT4/SOX2/NANOG potesse riprogrammare gli astrociti in iPSCs o se la generazione di NSC fosse stata ottenuta attraverso il passaggio in uno stato pluripotente. Non abbiamo osservato la formazione di iPSCs nella coltura e i marcatori di pluripotenza non erano rilevabili. L'analisi microarray ha evidenziato che l'espressione individuale dei principali fattori di riprogrammazione non ha modificato i pattern di espressione genica associati alla pluripotenzialità. A differenza del trapianto con le iPSCs, il trapianto di AstroNSC in topi immunodeficienti non ha generato teratomi. Andrà ulteriormente verificato se i fattori di riprogrammazione inducano un dedifferenziamento diretto degli astrociti nelle NSCs o sia coinvolto uno stato multipotente più indifferenziato.

Per caratterizzare funzionalmente la capacità di differenziamento neuronale, i cloni di AstroNSC sono stati coltivati in un medium neuronale differenziativo. La progenie presentava caratteristiche in linea con il differenziamento nelle tre linee cellulari neuroectodermiche. I neuroni derivati dagli AstroNSC presentavano una tipica morfologia neuronale e non solo sono risultati positivi per i marcatori pan-neuronali, ma anche per sinapsina, sostenendo la presenza di contatti sinaptici, e per il neurotrasmettitore GABA, suggerendo una corretta competenza funzionale di queste cellule.

La sovraespressione di ASCL1 può indurre neurogenesi nelle NSCs (Kim et al., 2009) e negli astrociti dei roditori (Heinrich et al., 2010) e, in associazione con altri

fattori, nei fibroblasti (Pang et al., 2011). Così, abbiamo trasfettato gli AstroNSCs con ASCL1. Le cellule transfettate presentavano un numero significativamente aumentato di neuroni rispetto alle cellule non trattate. I neuroni ASCL1 presentavano morfologie molto complesse, esprimevano marcatori neuronali e sono risultati positivi anche per i neurotrasmettitori. Andrà ulteriormente verificato se la trasfezione con altri specifici fattori trascrizionali sarà in grado di incrementare lo spettro dei fenotipi neuronali che possono essere ottenuti.

Per valutare la capacità dei cloni AstroNSC di integrarsi e differenziarsi in neuroni in vivo nel SNC di mammifero, sono state trapiantate intracerebroventricolarmente in topi immunodepressi per caratterizzare il loro potenziale in vivo. Le cellule donatrici si sono integrate a livello della sostanza grigia e bianca migrando dai ventricoli cerebrali. Queste cellule sono state osservate anche in aree corticali. Le cellule esibivano un fenotipo prevalentemente neuronale. Il trapianto di cellule AstroNANOG/ASCL1 ha confermato l'effetto neurogeno di ASCL1.

Le NSC derivate dagli Astrociti sono probabilmente generate dalla riprogrammazione epigenetica come dimostrato dal loro pattern di metilazione del DNA rispetto a quello di astrociti non transfettati. Infatti un sottogruppo consistente di regioni analizzate sono risultate differenzialmente metilate (R-DMRs) in maniera significativa. Il numero di R-DMRs che risultavano ipermetilate negli astrociti predominava significativamente su quelle ipometilate. L'analisi dei dati di metilazione ha indicato che i siti dei cambiamenti epigenetici e di espressione genica durante la riprogrammazione degli astrociti in NSCs sono strettamente legati a geni che sono funzionalmente importanti per la pluripotenza.

Il nostro studio dimostra per la prima volta che l'espressione di un singolo fattore chiave di trascrizione staminale è sufficiente per convertire rapidamente ed efficacemente gli astrociti umani corticali in staminali neurali/precursori cellulari. Nel complesso, i nostri risultati supportano l'importanza di indagare la riprogrammazione parziale come una possibile strategia per la terapia cellulare autologa, non solo ex vivo, ma in prospettiva anche in vivo mediante la trasformazione diretta di astrociti endogeni nel SNC per il trattamento delle malattie neurologiche.

BIBLIOGRAFIA

Adolf B., Chapouton P., Lam C.S., Topp S., Tannhäuser B., Strähle U., Götz M., Bally-Cuif L. "Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon" *Dev. Biol.* Vol. 295, 2006, pp. 278–293.

Alvarez-Buylla A. and Garcia-Verdugo J.M. "Neurogenesis in adult subventricular zone" *The Journal of neuroscience*, Vol. 22, no. 3, 2002, pp. 629-634.

Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T., Okita K., Takahashi K., Chiba T., Yamanaka S. "Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells" *Science*, Vol. 321, no. 5889, 2008, pp. 699-702.

Baraban S.C., Southwell D.G., Estrada R.C., Jones D.L., Sebe J.Y., Alfaro-Cervello C., García-Verdugo J.M., Rubenstein J.L., Alvarez-Buylla A. "Reduction of seizures by transplantation of cortical GABAergic interneuron precursors into Kv1.1 mutant mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* Vol. 106, 2009, pp. 15472–15477.

Barberi T., Klivenyi P., Calingasan N.Y., Lee H., Kawamata H., Loonam K., Perrier A.L., Bruses J., Rubio M.E., Topf N., Tabar V., Harrison N.L., Beal M.F., Moore M.A., Studer L. "Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice" *Nature Biotechnology*, Vol. 21, no. 10, 2003, pp. 1200-1207.

Barnabé-Heider F., Göritz C., Sabelström H., Takebayashi H., Pfrieger F.W., Meletis K., Frisén J. "Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord". *Cell Stem Cell* Vol.7, 2010, pp.470–482.

Barnett S.C. and Chang L. "Olfactory ensheathing cells and CNS repair: going solo or in need of a friend?" *Trends in Neuroscience*, Vol. 27, 2004, pp. 54-60.

Becker C.G., Becker T. "Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration" *Restor. Neurol. Neurosci.* Vol. 26, 2008, pp. 71–80.

Beckervordersandforth R., Tripathi P., Ninkovic J., Bayam E., Lepier A., Stempfhuber B., Kirchhoff F., Hirrlinger J., Haslinger A., Lie D.C., Beckers J., Yoder B., Irmeler M., Götz M. "In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. " *Cell Stem Cell* Vol. 7, 2010, pp. 744–758.

Bedogni F., Hodge R.D., Elsen G.E., Nelson B.R., Daza R.A., Beyer R.P., Bammler T.K., Rubenstein J.L., Hevner R.F. "Regulates regional and laminar identity of postmitotic neurons in developing neocortex." *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Vol. 107, 2010, pp. 13129–13134.

Berninger B., Costa M.R., Koch U., Schroeder T., Sutor B., Grothe B., Götz M.

"Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia." *J. Neurosci.* Vol. 27, 2007, pp. 8654–8664.

Billon N., Jolicoeur C., Ying Q.L., Smith A., Raff M. "Normal timing of oligodendrocyte development from genetically engineered, lineage-selectable mouse ES cells" *Journal of Cell Science*, Vol. 115, no. Pt.18, 2002, pp. 3657-65.

Blum R., Heinrich C., Sánchez R., Lepier A., Gundelfinger E.D., Berninger B., Götz M. "Neuronal network formation from reprogrammed early postnatal rat cortical glial cells." *Cereb Cortex*. Vol. 21, n.2, 2011, pp. 413-24.

Braak H., Del Tredici K. "Assessing fetal nerve cell grafts in Parkinson's disease." *Nature Med.* Vol.14, no. 5,2008, pp. 483-5.

Brill M.S., Snappyan M., Wohlfrom H., Ninkovic J., Jawerka M., Mastick G.S., Ashery-Padan R., Saghatelyan A., Berninger B., Götz M. "A *dlx2*- and *pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb" *J Neurosci.*, Vol. 28, 2008, pp. 6439–52.

Brill M.S., Ninkovic J., Winpenny E., Hodge R.D., Ozen I., Yang R., Lepier A., Gascón S., Erdelyi F., Szabo G., Parras C., Guillemot F., Frotscher M., Berninger B., Hevner R.F., Raineteau O., Götz M. "Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons." *Nature Neurosci.* Vol. 12, 2009, pp. 1524–1533.

Buffo A., Vosko M.R., Ertürk D., Hamann G.F., Jucker M., Rowitch D., Götz M. "Expression pattern of the transcription factor *Olig2* in response to brain injuries: implications for neuronal repair." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* Vol. 102, 2005, pp. 18183–18188.

Buffo A., Rite I., Tripathi P., Lepier A., Colak D., Horn A.P., Mori T., Götz M. "Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain" *Proc. Natl Acad. Sci. USA* Vol. 105, 2008, pp. 3581–3586.

Cahoy J.D., Emery B., Kaushal A., Foo L.C., Zamanian J.L., Christopherson K.S., Xing Y., Lubischer J.L., Krieg P.A., Krupenko S.A., Thompson W.J., Barres B.A. "A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function" *J. Neurosci.* Vol. 28, 2008, pp. 264–278.

Caiazzo M., Dell'Anno M.T., Dvoretzkova E., Lazarevic D., Taverna S., Leo D., Sotnikova T.D., Menegon A., Roncaglia P., Colciago G., Russo G., Carninci P., Pezzoli G., Gainetdinov R.R., Gustincich S., Dityatev A., Broccoli V. "Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts." *Nature*. Vol. 476, 2010, pp. 224-7.

Carlén M., Meletis K., Göritz C., Darsalia V., Evergren E., Tanigaki K., Amendola M., Barnabé-Heider F., Yeung M.S., Naldini L., Honjo T., Kokaia Z., Shupliakov O.,

Cassidy R.M., Lindvall O., Frisén J. "Forebrain ependymal cells are Notchdependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke." *Nature Neurosci* Vol.12, 2009 , pp. 259–267.

Carmignoto G., Gomez-Gonzalo M. "The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling." *Brain Res. Rev.* Vol. 63, 2010, pp. 138–148

Chapouton P., Skupien P., Hesl B., Coolen M., Moore J.C., Madelaine R., Kremmer E., Faus-Kessler T., Blader P., Lawson N.D., Bally-Cuif L. "Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells" *J. Neurosci.* Vol. 30, 2010, pp. 7961–7974.

Chang A., Smith M.C., Yin X., Fox R.J., Staugaitis S.M., Trapp B.D. "Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis." *Brain* Vol.131,2008, pp 2366–2375.

Chen X., Abair T.D., Ibanez M.R., Su Y., Frey M.R., Dise R.S., Polk D.B., Singh A.B., Harris R.C., Zent R., Pozzi A., "Integrin alpha1beta1 controls reactive oxygen species synthesis by negatively regulating epidermal growth factor receptor-mediated Rac activation", *Molecular and cellular biology*, Vol, 27, no. 9, 2007, pp. 3313-3126.

Chojnacki A.K., Mak G.K., Weiss S. "Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?" *Nature Rev. Neurosci.* Vol. 10, 2008, pp. 153–163.

Corti S., Locatelli F., Papadimitriou D., Del Bo R., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Fortunato F., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P. "Multipotentiality, homing properties, and pyramidal neurogenesis of CNS-derived LeX(ssa-1)+/CXCR4+ stem cells." *FASEB J* Vol. 19, 2005, pp. 1860-1862.

Corti S., Locatelli F., Papadimitriou D., Donadoni C., Del Bo R., Crimi M., Bordoni A., Fortunato F., Strazzer S., Menozzi G., Salani S., Bresolin N., Comi G.P., "Transplanted ALDHhiSSC1o neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of nmd mice, an animal model of SMARD1", *Human molecular genetics*, Vol. 15, no. 2, 2006, pp. 167-187.

Corti S., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Ronchi D., Saladino F., Bordoni A., Fortunato F., Del Bo R., Papadimitriou D., Locatelli F., Menozzi G., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P. "Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy" *J Clin Invest* Vol. 118, 2008, pp. 3316-3330.

Corti S., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Ronchi D., Simone C., Falcone M., Papadimitriou D., Locatelli F., Mezzina N., Gianni F., Bresolin N., Comi G.P. "Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular

atrophy phenotype in mice." *Brain* Vol., 133, 2010, pp. 465-481.

Curtis M.A., Kam M., Nannmark U., Anderson M.F., Axell M.Z., Wikkelso C., Holtås S., van Roon-Mom W.M., Björk-Eriksson T., Nordborg C., Frisé J., Dragunow M., Faull R.L., Eriksson P.S. "Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension " *Science*, Vol. 315, 2007, pp. 1243–1249 (2007).

Curtis M.A., Penney E.B., Pearson A.G., van Roon-Mom W.M., Butterworth N.J., Dragunow M., Connor B., Faull R.L. "Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* Vol. 100, 2003, pp. 9023–9027.

Curtis M.A., Faull R.L., Eriksson P.S. "The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone." *Nature Rev. Neurosci.* Vol. 8, 2007, pp. 712–723.

Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., Weisenthal L.M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Goland R., Wichterle H., Henderson C.E., and Eggan K. "Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons", *Science*, Vol.321, no. 5893, 2008, pp. 1218-1221.

Doetsch F., Caille I., Lim D.A., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain" *Cell*, Vol. 97, no. 6, 1999, pp. 703-716.

Doetsch F., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. "Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain" *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Vol., 96, 1999, pp. 11619–11624.

Ebert A.D., Yu J., Rose F.F. Jr, Mattis V.B., Lorson C.L., Thomson J.A., Svendsen C.N. "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient", *Nature*, Vol. 457, no. 7227, 2008, pp. 277-280.

Evans M.J. and Kaufman M.H. "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos" *Nature*, Vol. 292, 1981, pp. 154–156.

Ekonomou A., Ballard C.G., Pathmanaban O.N., Perry R.H., Perry E.K., Kalaria R.N., Minger S.L. "Increased neural progenitors in vascular dementia." *Neurobiol. Aging* Vol. 32, no.12, 2010, pp. 2152-61.

Fujikura J., Yamato E., Yonemura S., Hosoda K., Masui S., Nakao K., Miyazaki Ji J., Niwa H. "Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors" *Genes and Development*, Vol. 16, no. 7, 2002, pp. 784-789.

Gage F.H. "Mammalian neural stem cells" *Science*, Vol. 287, no. 5457, 2000, pp. 1433-1438.

Gaiano N., Kohtz J.D., Turnbull D.H., Fishell G. "A method for rapid gainof-function studies in the mouse embryonic nervous system" *Nat. Neurosci.* Vol. 2, 1999, pp. 812–819.

Gao J., Coggeshall R.E., Tarasenko Y.I., Wu P. "Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats" *Neuroscience*, Vol. 131, no. 2, 2005, pp. 257-262.

Geha S., Pallud J., Junier M.P., Devaux B., Leonard N., Chassoux F., Chneiweiss H., Daumas-Duport C., Varlet P. "NG2+/Olig2+ cells are the major cyclereleated cell population of the adult human normal brain." *Brain Pathol.* Vol. 20, 2010, 399–411.

Ghashghaei H.T., Weimer J.M., Schmid R.S., Yokota Y., McCarthy K.D., Popko B., Anton E.S. "Reinduction of ErbB2 in astrocytes promotes radial glial progenitor identity in adult cerebral cortex." *Genes Dev.* Vol 21,2007, pp. 3258–327.

Glaser T., Perez-Bouza A., Klein K., Brustle O. "Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells" *FASEB Journal*, Vol. 19, 2005, pp. 112–114.

Gossrau G., Thiele J., Konang R., Schmandt T., Brustle O. "Bone morphogenetic protein-mediated modulation of lineage diversification during neural differentiation of embryonic stem cells" *Stem Cells*, Vol. 25, no. 4, 2007, pp. 939-949.

Götz M., Stoykova A., Gruss P. "Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex" *Neuron*, Vol. 21, 1998, pp. 1031-44.

Gotz M., Huttner W.B. "The cell biology of neurogenesis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 6, 2005, pp. 777–788

Grandel H., Kaslin J., Ganz J., Wenzel I., Brand M. " Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate" *Dev. Biol.* Vol. 295, 2006, pp. 263–277.

Grepin C., Nemer G., Nemer M. "Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor" *Development*, Vol. 124, no. 12, 1997, pp, 2387-2395.

Guillemot F., Lo L.C., Johnson J.E., Auerbach A., Anderson D.J., Joyner A.L. "Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons." *Cell*, Vol.75, 1993, pp. 463-476.

Guillemot F. "Cell fate specification in the mammalian telencephalon." *Prog. Neurobiol.* Vol. 83,2007, pp. 37–52.

Hack M.A., Sugimori M., Lundberg C., Nakafuku M., Götz M. "Regionalization and

fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6" *Mol Cell Neurosci.* Vol. 25, 2004, pp. 664-78.

Hack M.A., Saghatelian A., de Chevigny A., Pfeifer A., Ashery-Padan R., Lledo P.M., Götz M. "Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis." *Nat Neurosci.* Vol.8, no. 7, 2005, pp. 865-72.

Hanna J.H., Saha K., Jaenisch R."Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues." *Cell.* Vol. 143, 2010, pp. 508-525.

Hatakeyama J., Tomita K., Inoue T., Kageyama R. "Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type" *Development*, Vol. 128, 2001, pp. 1313-22.

Heinrich C., Blum R., Gascón S., Masserdotti G., Tripathi P., Sánchez R., Tiedt S., Schroeder T., Götz M., Berninger B. "Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons." *PLoS Biol.* Vol. 18, 2010.

Heinrich C., Gascón S., Masserdotti G., Lepier A., Sanchez R., Simon-Ebert T., Schroeder T., Götz M., Berninger B. (2011) "Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex" *Nat Protoc*, Vol. 6, 2011, pp. 214-228.

Heins N., Cremisi F., Malatesta P., Gangemi R.M., Corte G., Price J., Goudreau G., Gruss P., Götz M. "Emx2 promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex" *Mol Cell Neurosci.* Vol. 18, 2001, pp. 485-502.

Heins N., Malatesta P., Cecconi F., Nakafuku M., Tucker K.L., Hack M.A., Chapouton P., Barde Y.A., Götz M. "Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6." *Nature Neurosci.* Vol. 5, 2002, pp. 308-315.

Hirabayashi Y., Suzuki N., Tsuboi M., Endo T.A., Toyoda T., Shinga J., Koseki H., Vidal M., Gotoh Y." Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition." *Neuron* Vol. 63,2009, pp. 600-613.

Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U., Frisén J. "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system" *Cell* , Vol. 96, 1999, pp. 25-34.

Kanda S., Shiroy A., Oujy Y., Birumachi J., Ueda S., Fukui H., Tatsumi K., Ishizaka S., Takahashi Y., Yoshikawa M. "In vitro differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta" *Hepatology Research*, Vol. 26, no. 3, 2003, pp. 225-231.

Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S., Kaneko S., Kuwana Y., Nakanishi S.,

Nishikawa S.I., Sasai Y., "Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity" *Neuron*, Vol. 28, no. 1, 2000, pp. 31-40.

Kawasaki H., Suemori H., Mizuseki K., Watanabe K., Urano F., Ichinose H., Haruta M., Takahashi M., Yoshikawa K., Nishikawa S., Nakatsuji N., Sasai Y. "Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 99, 2002, pp. 1580-1585.

Kempermann G., Jessberger S., Steiner B., Kronenberg, G. "Milestones of neuronal development in the adult hippocampus." *Trends Neurosci.* Vol.27, 2004, pp.447-452.

Kettenmann H., Ransom B.R. *Neuroglia* (Oxford Univ. Press, Oxford, 2005).

Keyoung H.M., Roy N.S., Benraiss A., Louissaint A. Jr, Suzuki A., Hashimoto M., Rashbaum W.K., Okano H., Goldman S.A. "High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain" *Nature Biotechnology*, Vol. 19, no. 9, 2001, pp. 843-850.

Kim H.J., McMillan E., Han F., Svendsen C.N. "Regionally specified human neural progenitor cells derived from the mesencephalon and forebrain undergo increased neurogenesis following overexpression of ASCL1." *Stem Cells*. Vol. 27, 2009pp.390-8.

Kim J.B., Sebastiano V., Wu G., Araúzo-Bravo M.J., Sasse P., Gentile L., Ko K., Ruau D., Ehrich M., van den Boom D., Meyer J., Hübner K., Bernemann C., Ortmeier C., Zenke M., Fleischmann B.K., Zaehres H., Schöler HR. "Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells." *Cell*, Vol. 136, 2009, pp. 411-419.

Kim J.B., Greber B., Araúzo-Bravo M.J., Meyer J., Park K.I., Zaehres H., Schöler H.R. "Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4." *Nature*, Vol. 461, 2009, pp. 649-643.

Kondo T., Raff M. "Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells." *Science* Vol. 289, 2000, pp. 1754-175.

Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. "The glial nature of embryonic and adult neural stem cells" *Annu Rev Neurosci.* Vol. 32, 2009, pp.149-84.

Lamba D.A., Hayes S., Karl M.O., Reh T. "Baf60c is a component of the neural progenitor-specific BAF complex in developing retina." *Dev. Dyn.* Vol., 237, 2008, pp. 3016-3023. (2008).

Lane E.L., Bjorklund A., Dunnett S.B., Winkler C. "Neural grafting in Parkinson's

disease unraveling the mechanisms underlying graft-induced dyskinesia." *Prog. Brain Res.* Vol. 184, 2010, pp. 295–309.

Lee S.H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J.M., McKay R.D. "Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells" *Nature Biotechnology*, Vol. 18, no. 6, 2000, pp. 675–679.

Li X.J., Du Z.W., Zarnowska E.D., Pankratz M., Hansen L.O., Pearce R.A., Zhang S.C. "Specification of motoneurons from human embryonic stem cells" *Nature Biotechnology*, Vol. 23, no. 2, 2005, pp. 215-221.

Li L., Lundkvist A., Andersson D., Wilhelmsson U., Nagai N., Pardo A.C., Nodin C., Ståhlberg A., Aprico K., Larsson K., Yabe T., Moons L., Fotheringham A., Davies I., Carmeliet P., Schwartz J.P., Pekna M., Kubista M., Blomstrand F., Maragakis N., Nilsson M., Pekny M. "Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab.* Vol. 28, 2008, no. 3, pp. 468-81.

Liu Y., Wu Y., Lee J.C., Xue H., Pevny L.H., Kaprielian Z., Rao M.S. "Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: an in situ and immunohistological analysis during embryonic development." *Glia* Vol.40, 2002, pp. 25-43.

Liu Y., Han S.S., Wu Y., Tuohy T.M., Xue H., Cai J., Back S.A., Sherman L.S., Fischer I., Rao M.S. "CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells." *Dev Biol.* Vol. 276, 2004, pp. 31-46.

Liu X., Bolteus A. J, Balkin D. M., Henschel O., Bordey A. "GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes." *Glia* Vol. 54, 2006, pp. 394–410.

Locatelli F., Corti S., Papadimitriou D., Fortunato F., Del Bo R., Donadoni C., Nizzardo M., Nardini M., Salani S., Ghezzi S., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P., "Fas small interfering RNA reduces motoneuron death in amyotrophic lateral sclerosis mice", *Annals of Neurology*, Vol. 62, no. 1, 2007, pp. 81-92.

Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., Vega V.B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K.Y., Sung K.W., Lee C.W., Zhao X.D., Chiu K.P., Lipovich L., Kuznetsov V.A., Robson P., Stanton L.W., Wei C.L., Ruan Y., Lim B., Ng H.H. "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells." *Nat Genet*; Vol.8, 2006, pp. 431-440

Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., Pyle A.D., Tchieu J., Sridharan R., Clark A.T., Plath K. "Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 105, no. 8, 2008, pp. 2883-2888.

Lunn J.S., Sakowski S.A., Hur J., Feldman E.L. "Stem cell technology for

neurodegenerative diseases" *Ann Neurol.* 70. no. 3, 2011, pp.353-61.

Malatesta P., Hartfuss E., Götz, M. "Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage" *Development* Vol. 127,2000, pp. 5253–5263.

Martin G.R. "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 78, no. 12, 1981, pp. 7634-7638.

Minger S.L., Ekonomou A., Carta E.M., Chinoy A., Perry R.H., Ballard C.G. "Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction." *Regen. Med.* Vol.2, 2007, pp. 69–74.

Miyata T., Kawaguchi A., Okano H., Ogawa M "Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical Neurons" *Neuron*, Vol. 31, 2001, pp. 727–741.

Monani U.R., Sendtner M., Coover D.D., Parsons D.W., Andreassi C., Le T.T., Jablonka S., Schrank B., Rossol W., Prior T.W., Morris G.E., Burghes A.H. "The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy", *Human Molecular Genetics*, Vol. 9, no. 3, 2000, pp. 333-339.

Morshead C.M., Craig C.G., van der Kooy D. "In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain" *Development*, Vol. 125, no. 12, 1998, pp. 2251-2261.

Nakayama D., Matsuyama T., Ishibashi-Ueda H., Nakagomi T., Kasahara Y., Hirose H., Kikuchi-Taura A., Stern D.M., Mori H., Taguchi A. "Injury-induced neural stem progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex." *Eur. J. Neurosci.* Vol. 31, 2010, pp. 90–98.

Nichols J., Evans E.P., Smith A.G., "Establishment of germ-line competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity" *Development*, Vol. 110, no. 4, 1990, pp. 1341–1348.

Nishikawa S., Goldstein R.A., Nierras C.R. "The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy" *Nature reviews. Molecular cell biology*, Vol. 9, no. 9, 2008, pp. 725-729.

Ninkovic J., Mori T., Gotz, M. "Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis." *J. Neurosci.* Vol. 27, 2007, pp. 10906–10911.

Nishiyama A., Komitova M., Suzuki R., Zhu X. "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with

lineage plasticity" *Nature Rev. Neurosci.* Vol.10, 2009, pp. 9–22

Nistor G.I., Totoiu M.O., Haque N., Carpenter M.K., Keirstead H.S. "Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation" *Glia*, Vol. 49, 2005, pp. 385–396.

Nizzardo M., Simone C., Falcone M., Locatelli F., Riboldi G., Comi G.P., Corti S. "Human motor neuron generation from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells" *Cell Mol Life Sci.* Vol.67 no.22, 2010, pp. 3837-47.

Noctor S.C., Flint A. C., Weissman T. A., Dammerman R. S., Kriegstein A. R. "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex" *Nature*, Vol. 409, 2001, pp. 714–720.

Nunes M.C., Roy N.S., Keyoung H.M., Goodman R.R., McKhann G., Jiang L., Kang J., Nedergaard M., Goldman S.A." Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain" *Nature Medicine*, Vol. 9, no. 4, 2003, pp. 439-47.

Nunes M.C., Roy N.S., Keyoung H.M., Goodman R.R., McKhann G., Jiang L., Kang J., Nedergaard M., Goldman S.A. "Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain." *Nature Med.* Vol. 9, 2003, pp. 439–447.

Oberheim N.A., Takano T., Han X., He W., Lin J.H., Wang F., Xu Q., Wyatt J.D., Pilcher W., Ojemann J.G., Ransom B.R., Goldman S.A., Nedergaard M. "Uniquely hominid features of adult human astrocytes" *J. Neurosci.* Vol. 29, 2009, pp. 3276–3287.

Ohori Y., Yamamoto S., Nagao M., Sugimori M., Yamamoto N., Nakamura K., Nakafuku M. "Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord." *J. Neurosci.* Vol. 26, 2006, pp.11948–11960.

Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells" *Nature*, Vol. 448, no. 7151, 2007, pp. 313-317.

Pang Z.P., Yang N., Vierbuchen T., Ostermeier A., Fuentes D.R., Yang T.Q. "Induction of human neuronal cells by defined transcription factors." *Nature*; Vol. 476, 2011, pp. 220-223.

Pang Z.P., Yang N., Vierbuchen T., Ostermeier A., Fuentes D.R., Yang T.Q., Citri A., Sebastiano V., Marro S., Südhof T.C., Wernig M. "Induction of human neuronal cells by defined transcription factors." *Nature* Vol. 476, 2011, pp.220-3

Park I.H., Zhao R., West J.A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T.A., Lerou P.H., Lensch M.W., Daley G.Q. "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with

defined factors”, *Nature*, Vol. 451, no. 7175, 2008, pp. 141-146.

Parpura V., Haydon P.G. “Astrocytes in (Patho) Physiology of the Nervous System” (eds. Parpura, V. & Haydon, P. G.) (*Springer*, New York, 2009).

Pattyn A., Guillemot F., Brunet J.F. “Delays in neuronal differentiation in Mash1/Ascl1 mutants.” *Dev Biol*; Vol.295, 2006, pp. 67-75.

Perrier A.L., Tabar V., Barberi T., Rubio M.E., Bruses J., Topf N., Harrison N.L., Studer L., “Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 101, no. 34, 2004, pp. 12543-12548.

Pekny M., Pekna M. “Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration” *J. Pathol.* Vol. 204, 2004, pp. 428–437.

Pfisterer U., Kirkeby A., Torper O., Wood J., Nelander J. “Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 108, 2011, pp. 10343-10348.

Pfisterer U., Kirkeby A., Torper O., Wood J., Nelander J., Dufour A., Björklund A., Lindvall O., Jakobsson J., “Parma conversione diretta delle riserve umane fibroblasti di neuroni dopaminergici.” *Proc Natl Acad Sci US A*. Vol. 108, 2011, pp. 10343-8

Poitras L., Ghanem N., Hatch G., Ekker M. “The proneural determinant MASH1 regulates forebrain Dlx1/2 expression through the I12b intergenic enhancer” *Development*. Vol. 134, 2007, pp. 1755–65.

Roy N.S., Nakano T., Keyoung H.M., Windrem M., Rashbaum W.K., Alonso M.L., Kang J., Peng W., Carpenter M.K., Lin J., Nedergaard M., Goldman S.A. “Telomerase immortalization of neuronally restricted progenitor cells derived from the human fetal spinal cord” *Nature Biotechnology*, Vol. 22, no. 3, 2004, pp. 297-305.

Roy N.S., Cleren C., Singh S.K., Yang L., Beal M.F., Goldman S.A. “Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes” *Nature Medicine*, Vol. 12, no. 11, 2006, pp. 1259–1268.

Ruiz S., Brennand K., Panopoulos AD, Herrerías A, Gage FH, Izpisua-Belmonte JC. “High-efficient generation of induced pluripotent stem cells from human astrocytes” *PLoS One*, Vol. 5, 2010

Scacheri P.C., Crawford G.E., Davis S. “Statistics for ChIP-chip and DNase hypersensitivity experiments on NimbleGen arrays.” *Methods Enzymol* Vol. 411, 2006, pp.270-282.

Schuermans C., Armant O., Nieto M., Stenman J.M., Britz O., Klenin N., Brown C., Langevin L.M., Seibt J., Tang H., Cunningham J.M., Dyck R., Walsh C., Campbell K., Polleux F., Guillemot F. "Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways." *EMBO J.* Vol. 23, 2004, pp.2892–2902.

Seidenfaden R., Desoeuvre A., Bosio A., Virard I., Cremer H. "Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain." *Mol. Cell Neurosci.* Vol.32, 2006, pp. 187–198

Seri B., Garcia-Verdugo J. M., McEwen B. S., Alvarez-Buylla A. "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus" *J. Neurosci.* Vol. 21, 2001, pp. 7153–7160.

Seri B., Garcia-Verdugo J. M., Collado-Morente L., McEwen B. S., Alvarez-Buylla A. "Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus." *J. Comp. Neurol.* Vol. 478, 2004, pp. 359–378.

Sgubin D., Aztiria E., Perin A., Longatti P., Leanza G. "Activation of endogenous neural stem cells in the adult human brain following subarachnoid hemorrhage." *J. Neurosci. Res.* Vol. 85, 2007, pp. 1647–1655.

Sirko S., Neitz A., Mittmann T., Horvat-Bröcker A., von Holst A., Eysel U.T., Faissner A. "Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex." *Brain* Vol.132, 2009, pp. 2252–2264.

Simard M., Nedergaard M. "The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis." *Neuroscience* Vol. 129, 2004, pp. 877–896.

Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., Wong G.G., Moreau J., Stahl M., Rogers D. "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides" *Nature*, Vol. 336, no. 6200, 1988, pp. 688–690.

Sofroniew M.V. "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation" *Trends Neurosci.* Vol. 32, 2009, pp. 638–647.

Sofroniew M.V., Vinters H.V. "Astrocytes: biology and pathology." *Acta Neuropathol.* Vol. 119, 2010, pp. 7–35.

Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G., Hochedlinger K. "Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration", *Science*, Vol. 322, no. 5903, 2008 pp. 945–949

Takahashi K., Yamanaka S. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors" *Cell*, Vol. 126, no. 4,

2006, pp. 663–676.

Szabo E., Rampalli S., Risueño R.M., Schnerch A., Mitchell R., Fiebig-Comyn A., Levadoux-Martin M., Bhatia M. "Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors." *Nature*, Vol. 468, 2010, pp. 521-526.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factor" *Cell*, Vol. 131, no. 4, 2007, pp. 861–872.

Tam W.L., Lim B. "Genome-wide transcription factor localization and function in stem cells." 2008 StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute.

Tang F., Shang K., Wang X., Gu J. "Differentiation of embryonic stem cell to astrocytes visualized by green fluorescent protein" *Cellular and Molecular Neurobiology*, Vol. 22, no. 1, 2002, pp. 95-101.

Thomson J.A., Kalishman J., Golos T.G., Durning M., Harris C.P., Becker R.A., Hearn J.P. "Isolation of a primate embryonic stem cell line" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 92, no. 17, 1995, pp. 7844–7848

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S. and Jones J.M. "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts" *Science*, Vol. 282, 1998, pp. 1145–1147.

Tropepe V., Sibilina M., Ciruna B.G., Rossant J., Wagner E.F., van der Kooy D., "Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon", *Developmental Biology*, Vol. 208, no. 1, 1999, pp. 166-188

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.

Tsuchiya T., Park K.C., Toyonaga S., Yamada S.M., Nakabayashi H., Nakai E., Ikawa N., Furuya M., Tominaga A. & Shimizu K. "Characterization of microglia induced from mouse embryonic stem cells and their migration into the brain parenchyma" *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 160, no. 1-2, 2005, pp. 210–218.

Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M. "Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors." *Nature*, Vol. 463, 2010, pp. 1035-1041.

Warren N., Caric D., Pratt T., Clausen J.A., Asavaritikrai P., Mason J.O., Hill R.E.,

Price D.J. et al. The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex*. Vol. 9, 1999, pp. 627-35.

Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A., Katayama T., Nozaki S., Kawasaki H., Watanabe Y., Mizuseki K., Sasai Y. "Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells" *Nature Neuroscience*, Vol. 8, no. 3, 2005, pp. 288–296.

Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state" *Nature*, Vol. 448, no. 7151, 2007, pp. 318–324.

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 of Neuroscience*, Vol. 16, no. 23, 1996, pp. 7599-7609.

Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A., Jessell T.M. "Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons" *Cell*, Vol. 110, no. 3, 2002, pp. 385-397.

Widestrand A., Fajerson J., Wilhelmsson U., Smith P.L., Li L., Sihlbom C., Eriksson, P.S., Pekny M. "Increased neurogenesis and astrogenesis from neural progenitor cells grafted in the hippocampus of GFAP^{-/-}Vim^{-/-} mice." *Stem Cells* Vol., 25, 2007, pp. 2619–2627.

Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stewart C.L., Gearing D.P., Wagner E.F., Metcalf D., Nicola N.A., Gough N.M. "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells" *Nature*, Vol. 336, no. 6200, 1988, pp. 684–687.

Yamanaka S. "Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation", *Nature*, Vol. 460, no. 7251, 2009, pp. 49-52.

Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir J.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. "Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells" *Science*, Vol. 318, no. 5858, 2007, pp. 1917-1920.

Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin I., Thomson J.A. "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences." *Science*, Vol. 324, 2009, pp. 797-801

Zhao C., Teng E.M., Summers R.G. Jr, Ming G.L., Gage FH. "Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus" *J Neurosci.*, Vol. 26, 2006, pp. 3–11.

Zhou Q., Melton D.A. "Extreme makeover: converting one cell into another." *Cell Stem Cell* Vol. 3, 2008, pp. 382–388.

Zupanc G.K., Hensch K., Gage, F. H. "Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain." *J. Comp. Neurol.* Vol. 488, 2005, pp. 290–319.

Pubblicazioni**Lavori estesi su riviste internazionali:**

Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Rizzo F, Nardini N, Riboldi G, Bresolin N, and Comi G. Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons as a possible tool for repair in CNS diseases. Submitted to Cell Stem Cell.

Stefania Corti, Monica Nizzardo, Chiara Simone, Marianna Falcone, Martina Nardini, Dario Ronchi, Sabrina Salani, Chiara Donadoni, Giulietta Riboldi, Giorgia Menozzi, Clara Bonaglia, Nereo Bresolin, and Giacomo P. Comi. "Native and disease-corrected motor neurons from human spinal muscular atrophy-induced pluripotent stem cells free of vector and transgenic sequences as a model and cell source for transplantation". Submitted to Science Translational Medicine.

Monica Nizzardo, Chiara Simone, Marianna Falcone, Giulietta Riboldi, Federica Rizzo, Francesca Magri, Nereo Bresolin, Giacomo P Comi, Stefania Corti. "Research advances in gene therapy approaches for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis". Submitted to Cellular and Molecular Life Science.

Monica Nizzardo, Chiara Simone, Marianna Falcone, Giulietta Riboldi, Giacomo P Comi, Nereo Bresolin, Stefania Corti. "Direct reprogramming of adult somatic cells into other lineages: past evidence and future perspectives". Submitted to Cell Transplantation.

Riboldi G, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Bresolin N, Comi GP, Corti S. ALS genetic modifiers that increase survival of SOD1 mice and are suitable for therapeutic development. Prog Neurobiol. 2011 Oct;95(2):133-48. Epub 2011 Jul 26.

Nizzardo M*, Nardini M, Ronchi D, Salani S, Donadoni C, Fortunato F, Colciago G, Falcone M, Simone C, Riboldi G, Govoni A, Bresolin N, Giacomo P. Comi, and Corti S. "Beta-lactam antibiotic offer neuroprotection in a spinal muscular atrophy mouse model by multiple mechanisms", Exp Neurol. 2011 Feb 2.

Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Locatelli F, Riboldi G, Comi GP, Corti S. "Human motor neuron generation from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells". Cell Mol Life Sci. 2010 Jul 29.

Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Simone C, Falcone M, Riboldi G, Govoni A, Bresolin N, Comi GP. "Systemic transplantation of c-kit+ cells

exerts a therapeutic effect in a model of amyotrophic lateral sclerosis". Hum Mol Genet. 2010 Jul 28.

Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Sabrina Salani, Ronchi D, Simone S, Falcone M, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N and GP. Comi. "Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice", Brain, 2010 Feb 133(Pt 2):465-81.