

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA
FISIOPATOLOGIA CLINICA
E
MEDICINA SPERIMENTALE
XXIII CICLO

Coordinatore Chiar.mo Prof. G. Marone

RUOLO DELLA DIFFERENZIAZIONE DEGLI
OLIGODENDROCITI NELLA SCLEROSI MULTIPLA

Relatore

Prof. ALFREDO POSTIGLIONE

Dottorando

Dr. MARCELLO ORIO

a mio padre

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 3
<i>1.1 Mielina</i>	Pag. 4
<i>1.2 Proteine della mielina</i>	Pag. 6
<i>1.3 Mielinizzazione</i>	Pag. 8
<i>1.4 Oligodendrociti</i>	Pag. 11
<i>1.5 Sclerosi Multipla</i>	Pag. 13
<i>1.6 Differenziamento cellulare</i>	Pag. 15
<i>1.7 Rimielinizzazione</i>	Pag. 17
2. OBIETTIVI DELLA TESI	Pag. 20
3. MATERIALI E METODI	Pag. 21
<i>3.1 Colture cellulari</i>	Pag. 21
<i>3.2 Western Blot</i>	Pag. 23
<i>3.3 Analisi citofluorimetrica</i>	Pag. 25
<i>3.4 Analisi di Real Time PCR</i>	Pag. 26
<i>3.5 Microscopia ad immunofluorescenza</i>	Pag. 28
<i>3.6 Pazienti</i>	Pag. 29
<i>3.7 Analisi Statistica</i>	Pag. 30
<i>3.8 Protocolli Sperimentali</i>	Pag. 30
4. RISULTATI	Pag. 32
5. DISCUSSIONE	Pag. 38
6. CONCLUSIONE	Pag. 40
7. BIBLIOGRAFIA	Pag. 42
8. FIGURE	Pag. 51
9. RINGRAZIAMENTI	Pag. 65

1. INTRODUZIONE

Il sistema nervoso è costituito da neuroni e da cellule gliali, che hanno funzione nutritiva e di sostegno per i neuroni, assicurano l'isolamento dei tessuti nervosi e la protezione da corpi estranei in caso di lesioni.

Esistono quattro classi principali di cellule gliali nel Sistema Nervoso Centrale (SNC): astrociti, oligodendrociti, cellule ependimali e microglia, ognuna con funzioni differenti. Nel Sistema Nervoso Periferico (SNP), invece, tra le cellule gliali esistono solo le cellule di Schwann, responsabili della mielinizzazione degli assoni e della loro rigenerazione.

Gli oligodendrociti sono cellule piccole e posseggono un numero limitato di processi.

Queste cellule isolano gli assoni circondandoli di una guaina mielinica che aumenta notevolmente la velocità di conduzione dei segnali elettrici. Queste cellule producono la guaina mielinica arrotolando i loro processi membranosi attorno all'assone come una spirale. Gli oligodendrociti sono presenti nel SNC, per lo più essi si avvolgono attorno a numerosi assoni (15, in media)¹.

Le cellule gliali, gli oligodendrociti a livello del SNC e le cellule di Schwann nel SNP, partecipano in maniera differente alla costituzione della guaina mielinica; se, infatti, ciascun oligodendrocita si mette in connessione con più di 15 differenti assoni, la cellula di Schwann partecipa alla costituzione della guaina mielinica di un solo assone.

1.1 Mielina

La mielina presenta un'organizzazione tipicamente segmentale: gli avvolgimenti a mo' di spirale, che le cellule gliali (glia in greco vuol dire colla) inviano intorno alla fibra assonale, formano guaine unitarie di 150-200 μm di lunghezza e fra una guaina mielinica e la successiva si determina uno spazio, nodo di Ranvier, a livello del quale il rivestimento mielinico è assente.

Ampiamente rappresentata sia a livello del Sistema Nervoso Centrale che Periferico, dei quali costituisce oltre il 40-50% in peso secco, la mielina svolge un ruolo di primo piano nel favorire la conduzione degli impulsi nervosi. Alta velocità di conduzione, preservazione delle caratteristiche del messaggio neuronale anche alle lunghe distanze, ed economia spaziale, sono solo alcuni dei vantaggi conferiti dal rivestimento mielinico.

Sebbene nel passato si fosse posto l'accento sulla sola funzione "isolante" della mielina, negli ultimi anni è stato possibile evidenziare come questa non si limiti a svolgere una mera azione meccanico-elettrica, ma partecipi attivamente al metabolismo assonale. L'alterato sviluppo del citoscheletro assonale in assenza di mielina, il ricco contenuto enzimatico della mielina stessa, il plausibile ruolo di tamponante ionico in prossimità della superficie dell'assone, nonché la funzione di trasportatore proteico da e verso la membrana, sono alcuni esempi della sua multifunzionalità.

La sua organizzazione spazio-structurale e la sua peculiare composizione (abbondanza di contenuto lipidico e scarsa componente acquosa) giustificano molte delle esclusive caratteristiche funzionali:

La mielina è costituita, da un 70% di lipidi e da un 30% di proteine. Proprio il rapporto lipidi/proteine, che è caratteristico della mielina, le fornisce le proprietà isolanti. Le proteine costituiscono il 30% in peso secco della mielina e sono per la maggior parte proteine sito-specifiche².

1.2 Proteine della mielina

Le forme maggiormente rappresentate sono la MBP (Myelin basic protein) e la PLP (Proteolipid Protein), che presentano un basso peso molecolare e da sole costituiscono l'80% del contenuto proteico totale. Altre proteine della mielina sono le glicoproteine tra le quali vanno annoverate la MAG (Myelin associated glycoprotein) e la MOG (myelin/oligodendrocyte glycoprotein). Infine, sono presenti nella mielina proteine dotate di attività enzimatica.

- MBP (Myelin Basic Protein): E' la famiglia di proteine maggiormente rappresentata a livello del SNC e comprende diverse isoforme che differiscono per peso molecolare e composizione aminoacidica. Le isoforme di 21.5 e 20.2 kDa, sono maggiormente espresse nel corso della mielinogenesi e ricompaiono nelle lesioni croniche da sclerosi multipla in corso di rimielinizzazione.

La subunità aminoterminale subisce modificazioni post-trascrizionali (acetilazione, fosforilazioni e metilazione). Ci sono evidenze indirette di come la sua mutilazione possa rivestire un ruolo importante nel conferire una forma compatta alle membrane nel corso della maturazione.

La MBP è localizzata sul versante citoplasmatico delle membrane mieliniche e si pensa che sia responsabile della linea elettrondensa visibile alla microscopia elettronica. La proteina riveste un ruolo importante nella stabilizzazione della struttura spiraliforme della mielina interagendo con le cariche negative dei fosfolipidi di membrana.

- MAG (Myelin associated glycoprotein): Rappresenta solo l'1% delle proteine della mielina nel SNC e lo 0,1% nel SNP. Per lungo tempo le MAG sono state considerate un potenziale recettore per l'inizio e la progressione della mielinizzazione; in effetti, le MAG sono espresse tipicamente dalle cellule mielinizzanti e la loro iperespressione porta ad una precoce mielinizzazione, mentre una loro assenza causa ipomielinizzazione. Altre evidenze fanno pensare che le MAG svolgano anche un ruolo nel processo di riconoscimento intercellulare ed in particolare nell'interazione neuroneoligodendrocita, come dimostrato dagli studi con anticorpi anti-MAG.

Da ultimo si è ipotizzato che le MAG fungano da inibitori della formazione delle escrescenze neuritiche e della rigenerazione post-lesionale (una proteasi calcio dipendente taglia la MAG vicino al dominio transmembrana e forma un peptide di 90 kDa solubile

responsabile della demielinizzazione in quanto presente in maggiore concentrazione nella sostanza bianca dei pazienti affetti da sclerosi multipla).

- MOG (myelin/oligodendrocyte glycoprotein) Espressa nei soli mammiferi, compare tardivamente rispetto ad altre proteine della mielina, tanto da far pensare ad un ruolo funzionale selettivo per gli oligodendrociti maturi rimanendo probabilmente inattiva nel corso della mielinizzazione.

1.3 Mielinizzazione

La mielinizzazione inizia durante il quinto mese di vita fetale a partire dai nervi cranici, e continua progressivamente nel corso dello sviluppo. In linea generale la mielinizzazione procede caudo-rostralmente (il tronco encefalico mielinizza prima del cervelletto e dei gangli della base, e il cervelletto e i gangli della base prima degli emisferi cerebrali) ed inoltre le regioni dorsali, a prescindere dai distretti, mielinizzano prima delle regioni anteriori. Mielinizzano prima le strutture che, nel corso della maturazione, comprendono sistemi funzionali utilizzati precocemente, e solo dopo di quelle che sovrintendono a funzioni dell'età più matura.

La mielinizzazione procede rapidamente nei primi due anni di vita e rallenta successivamente, anche se fibre provenienti e dirette alle aree associative continuano a mielinizzare anche nel corso della terza e quarta decade di vita. Il segnale responsabile dell'attivazione degli oligodendrociti e che "indica" qual è l'assone che debba essere mielinizzato, rimane sconosciuto.

Gli studi su modelli animali fanno supporre che si tratti di un complesso di segnali differenti che collaborano all'attivazione funzionale delle cellule gliali.

Esisterebbe una sorta di diametro critico dell'assone superato il quale sarebbe attivato il processo di mielinizzazione. L'interazione fra la proteina Notch, espressa dagli oligodendrociti, ed il corrispondente ligando Jagged sulla superficie della membrana assonale, avrebbe una funzione critica nell'attivazione degli oligodendrociti, come dimostrato dall'effetto della downregulation del Jagged che porta ad un ritardo di maturazione dei precursori oligodendrocitari³.

Anche il sistema microtubulare oligodendrocitario avrebbe funzione di controllo della formazione della mielina, così come dimostrato per le proteine MAP o microtubuleassociated protein⁴.

Infine, anche gli astrociti, oltre a rilasciare fattori di crescita e differenziazione oligodendrocitaria, rivestirebbero un importante ruolo nella formazione della mielina. La dimostrazione sperimentale dell'esistenza di una linea unica di cellule lungo il decorso dell'assone formata da astrociti, interposti a 3-4 oligodendrociti in sequenza, e la presenza di giunzioni intercellulari fra queste cellule, fanno pensare ad un network di interazione. La scoperta di un aumento del livello di GFAP (glial fibrillar acidic protein) nel corso della mielinizzazione, e la maturazione del complesso citoscheletrico GFAP-vimentina proprio all'inizio della mielinizzazione, sembra confermare il ruolo degli astrociti nella formazione del rivestimento mielinico e nella sua maturazione⁵.

Poichè il processo di mielinizzazione è strettamente dipendente dalla maturazione funzionale degli oligodendrociti può essere utile qui menzionare l'insieme di fattori, in parte locali, in parte a carattere sistemico, che influenzano questo processo. Essi sono: fattori di crescita (es. PDGF), Neurotrasmettitori (es. GABA), Ormoni (es. Ormoni Tiroidei,) e Gap junction fra oligodendrociti e astrociti.

1.4 Oligodendrociti

Negli ultimi anni sono aumentate le nostre conoscenze sulla genesi degli oligodendrociti (OLs) durante lo sviluppo⁶⁻⁸.

Nel midollo spinale gli OLs provengono da un pool di cellule progenitrici nella zona ventrale che proliferano e migrano dorsalmente e lateralmente sia attraverso la sostanza bianca che grigia, sebbene una risorsa dorsale di cellule progenitrici potrebbe contribuire alla gliogenesi spinale^{9,10}.

Finchè raggiungono la loro destinazione le cellule progenitrici iniziano a differenziare aumentando il numero e la complessità dei processi e down-regolando alcune proteine come ad esempio il PDGFaR (platelet-derived growth factor- α receptor) e l' NG2 (chondroitin sulfate proteoglycan).

A questo stadio le cellule up-regolano l'espressione delle proteine mieliniche ed iniziano a formare la membrana avvolgendosi attorno all'assone. Con il tempo il numero di nodi aumenta e la maggior parte del citoplasma viene fatta uscire, formando una mielina compatta e gli internodi contengono tutti i lipidi e le proteine della mielina.

Durante questo processo vengono prodotti più OLs del necessario, e le cellule in più vanno incontro ad apoptosi entro 2-3 giorni del termine

del processo di differenziazione, probabilmente a causa della perdita dei fattori necessari per la sopravvivenza da parte dell'assone^{11,12}.

Questa ipotesi è stata verificata da esperimenti condotti in cui il numero di OLs, ma non di assoni, era aumentato artificialmente, ed il risultato è stato un aumento di OLs andati incontro ad apoptosi ed una normalizzazione dei numeri OLs per assone che necessitava di essere mielinizzato^{13,14}.

La consanguenza primaria della morte di OLs è la demielinizzazione assonale, che ritarda o blocca completamente la conduzione assonale nella regione interessata.

Le fibre mieliniche sono state descritte come “una squisita simbiosi di capacità di ottimizzare la performance, ed in alcuni casi, di vera e propria sopravvivenza neuronale”¹⁵.

E' noto che gli OLs sono cellule metabolicamente attive che producono e sostengono un gran numero di membrane che sono di beneficio ad aumentare la conduzione degli assoni.

Gli OLs non solo supportano i segmenti assonali, ma provvedono al supporto trofico per il soma neuronale. Numerosi studi hanno dimostrato che gli OLs sono in grado di sintetizzare fattori di crescita come il CNTF (ciliary neurotrophic factor), l'IGF-1 (insulin-like

growth factor-1) ed altri fattori neurotrofici che rivestono anche un ruolo neuroprotettivo¹⁶⁻²⁰. Alla luce di tutto questo è evidente che sebbene gli OLs sono spesso descritti "semplicemente" come le cellule in grado di mielinizzare il SNC, esse rivestono un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità assonale e della sopravvivenza neuronale.

Quindi, la perdita di OLs e di cellule precursori degli oligodendrociti (OPCs) è un aspetto comune a molte patologie del SNC, e tra queste la Sclerosi Multipla è la più diffusa.

1.5 Sclerosi Multipla

La Sclerosi Multipla (SM) è attualmente considerata una malattia autoimmune, infiammatoria, cronica e demielinizzante del SNC.

Nonostante la quantità di studi sulla malattia ed un approccio multidisciplinare al problema, alcuni meccanismi patogenetici della SM restano oscuri e l'eziologia è sconosciuta.

Nella SM, oltre che distruzione della mielina, si osservano anche perdite di oligodendrociti e fibre nervose²¹⁻²⁴. Il termine SM deriva dalle molteplici aree sclerotiche visibili all'esame macroscopico del cervello. Queste lesioni, chiamate placche, sono aree grigie rosee ben

demarcate, facilmente distinguibili dalla sostanza bianca circostante. Le placche variano in dimensioni da 1-2 mm fino a parecchi centimetri. La lesione acuta della SM, che si riscontra raramente all'autopsia, è caratterizzata da un' infiltrazione di cellule mononucleate (soprattutto linfociti T e macrofagi) e da perdita di mielina (demielinizzazione). Nel corso della malattia la distruzione delle guaine mieliniche causa il blocco o rallentamento degli impulsi nervosi. Gli infiltrati infiammatori sembrano mediare la perdita della guaina mielinica che circonda i cilindri assonali. Con il progredire della lesione, un gran numero di macrofagi e di cellule microgliali (fagociti specializzati nel SNC che provengono dal midollo osseo) digerisce i frammenti mielinici e si verifica una proliferazione astrocitaria (gliosi). Nelle lesioni croniche della SM sono presenti una completa o quasi completa demielinizzazione e gliosi densa²⁵.

Sebbene la rimielinizzazione degli assoni demielinizzati ad opera degli oligodendrociti può essere osservata in una fase iniziale di malattia e può contribuire ad un miglioramento neurologico durante le fasi di remissione, questo processo rigenerativo non si riesce a sostenere per lungo tempo²⁶. Probabilmente un fattore che conduce verso una

perdita della rimielinizzazione nelle fasi successive della patologia è la diminuzione della differenziazione degli OPCs²⁷.

1.6 Differenziamento cellulare

Il processo di differenziamento è l'insieme degli eventi che accompagnano la modificazione morfologica e funzionale di una cellula verso un grado di specializzazione delle sue funzioni. Ad esempio, le cellule neuronali sono molto differenziate, in quanto svolgono delle funzioni peculiari. Prima di diventare delle cellule neuronali vere e proprie erano dei neuroblasti, cellule tonde, simili a molte altre, in grado di riprodursi e senza tutte le funzioni tipiche dei neuroni. La crescita e lo sviluppo delle cellule nervose è controllato da una serie di fattori diversi (NGF, fattore di crescita insulino simile di tipo II, laminina, fibronectina, collagene e molecole di adesione come le N-CAM e le caderine)²⁸. Inoltre, nel cervello adulto il turnover degli oligodendrociti, la sostituzione e la rimielinizzazione sono dei processi continui, per cui il cervello possiede delle riserve di precursori endogeni degli oligodendrociti (OPCs) con la capacità di proliferare e differenziarsi in cellule mature (OL), passando attraverso gli stadi di pro-oligodendroblasti (Pro-OL) ed oligodendrociti

immaturi (OL immaturi), formando così nuova guaina mielinica attorno agli assoni demielinizzati ²⁹⁻³¹. Questo processo è detto differenziamento.

I precursori degli oligodendrociti (OPCs) sono presenti durante la fase di sviluppo del sistema nervoso ma alcuni di essi rimangono anche nel cervello completamente sviluppato. Essi costituiscono il gruppo più numeroso di cellule soggette a mitosi nel cervello dell'adulto.

La formazione di OPCs da cellule staminali neuronali è il risultato di una complicata interazione di fattori di induzione estrinseci presenti nel liquido extracellulare (Shh, FGF2, PDGF, IGF1, neurotrofine) ³²⁻³³ e proteine del macchinario trascrizionale intrinseco del SNC ³⁴. Le neurotrofine (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) sono piccole proteine secrete nel sistema nervoso e sono importanti nella differenziazione, migrazione, proliferazione e attivazione delle cellule del SNC, difatti, BDNF ed NT3 sono necessarie per la sopravvivenza e la mielinizzazione ³⁵. I primi fattori trascrizionali che intervengono nel differenziamento delle cellule progenitrici degli oligodendrociti (utilizzati anche come markers per gli OPCs) sono Olig1 e Olig2, membri della famiglia basic helix-loop-helix (bHLH) ³⁴. Olig2 porta

alla generazione di OPCs, mentre Olig1 sembra essere coinvolto nella sopravvivenza e maturazione di OPCs.

Un secondo gruppo di fattori trascrizionali coinvolti nella differenziazione degli OPCs comprendono i membri della famiglia Sox. In particolare, Sox8, Sox9 e Sox10 sono espressi in OPCs negli stadi precoci del differenziamento mentre Sox5 e Sox6 sembrano essere coinvolti nella progressione del differenziamento degli OPCs attraverso gli stadi più avanzati^{36,37}. Inoltre, tre membri della famiglia homeo-domain: Nkx2.2, Nkx6.1 e Nkx6.2³⁸, insieme a due membri della superfamiglia dei fattori trascrizionali Zinc-finger: Myt1 e YinYang1, sembrano giocare un ruolo nel differenziamento dei progenitori degli oligodendrociti^{39,40}.

1.7 Rimielinizzazione

La perdita di oligodendrociti implica la demielinizzazione, e quindi una notevole perdita di efficienza degli assoni nel condurre gli impulsi²⁰⁻²³. Tuttavia, la demielinizzazione può essere seguita da un processo spontaneo rigenerativo o cicatrizzante attraverso il quale nuovi strati di mielina si formano intorno agli assoni demielinizzati. Il processo è chiamato rimielinizzazione o riparazione mielinica, che

permette agli assoni di ristabilire una conduzione efficiente degli impulsi nervosi. E' ben noto che la rimielinizzazione può avere luogo nel SNC⁴¹.

Nel cervello adulto, come suddetto, il turnover e il rimpiazzo degli oligodendrociti ed il processo di mielinizzazione avvengono in maniera continua.

Nella prima fase della sclerosi multipla, quando la degenerazione assonale non è ancora rilevante, il danno demielinizzante tende a ripararsi spontaneamente, almeno in parte ⁴². Tale riparazione avviene attraverso diversi meccanismi, come la spontanea riduzione e scomparsa dell' infiltrato infiammatorio, la rimielinizzazione, il reclutamento di vie nervose alternative e anche di altre aree di neuroni della corteccia cerebrale chiamate a vicariare la funzione colpita. La rimielinizzazione è mediata da una popolazione di cellule staminali abbondantemente distribuite nel SNC di un adulto, queste cellule sono gli OPCs, e l' infiammazione è indispensabile per stimolare, all' interno della lesione stessa, la produzione di fattori che favoriscono il reclutamento di tali precursori⁴³. In poco tempo l'area di demielinizzazione viene riempita da cellule progenitrici degli oligodendrociti che hanno la capacità di proliferare e differenziare in

cellule mature, formando così nuova guaina mielinica attorno agli assoni demielinizzati^{44,45}. La continua maturazione di queste cellule assicura un processo continuo di formazione di mielina. Questo meccanismo riparativo è tuttavia non perfetto, e comunque limitato alle fasi iniziali della malattia. Non si conosce se nella SM la rimielinizzazione sia rallentata o bloccata oppure la demielinizzazione sia aumentata. La mancata rimielinizzazione nella sclerosi multipla è stata associata a limitata disponibilità, capacità migratoria o di mielinizzazione degli OPC. Sperimentazioni recenti mostrano che nelle lesioni croniche di demielinizzazione in pazienti affetti da sclerosi multipla è stato osservato un ridotto numero di pro-OL ed un aumentato numero di OPC, suggerendo la presenza di un meccanismo di blocco del processo di maturazione degli OPC^{46,47}.

2. OBIETTIVO DELLA TESI

Gli Scopi del nostro lavoro di ricerca sono i seguenti:

- Valutare la presenza di modifiche di espressione o di localizzazione di proteine specifiche coinvolte nel processo di differenziazione degli oligodendrociti. Per fare ciò condurremo esperimenti su oligodendrociti umani MO3-13 che differenziano quando crescono in assenza di siero ed in presenza di PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), che è un attivatore di PKC.
- Vogliamo altresì valutare se in questo modello cellulare tali proteine modifichino la loro espressione o localizzazione dopo incubazione con liquor (CSF) proveniente da pazienti affetti da sclerosi multipla (SM) o da pazienti controllo.
- Vogliamo infine valutare se le variazioni di tali proteine siano specifiche degli oligodendrociti e quindi del loro processo di differenziazione.

Alla luce di queste informazioni potremmo ipotizzare un utilizzo clinico-diagnostico per tali proteine.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

Cellule M03-13

Rappresentano una linea di ibridoma umano con caratteristiche fenotipiche di oligodendrociti, derivata dalla fusione di rhabdomiosarcoma umano con oligodendrociti ottenuti da cervello umano adulto. Sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), contenente 4,5 gr/L di glucosio (GIBCO, Auckland, New Zeland), a cui è stato aggiunto 10% di siero bovino fetali (FBS, GIBCO, Auckland, New Zeland), glutammina 2mmol (GIBCO, Auckland, New Zeland), penicillina 50mU/ml e streptomicina 50µg/ml (GIBCO, Auckland, New Zeland).

Colture primarie di neuroni corticali di topo

Gli animali sono stati trattati seguendo i regolamenti della “American Physiological Society” e dell’Università Federico II di Napoli.

Sono state isolate da embrioni di topo al 14°-15° giorno di gestazione.

Gli embrioni sono stati decapitati; le cortecce sono state isolate e piastrate utilizzando come mezzo “Eagle’ s minimal essential

medium” (MEM, GIBCO, Auckland, New Zealand) con l’ aggiunta di glucosio alla concentrazione di 20mmol (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), glutammina 2mmol (GIBCO, Auckland, New Zealand), siero bovino fetale 5% (GIBCO, Auckland, New Zealand) e siero di cavallo (GIBCO, Auckland, New Zealand).

Il mezzo così preparato viene utilizzato su piastre per colture cellulari a 96 pozzetti che sono state precedentemente incubate per 12 ore con 40µgr/ml di poli-D-lisina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e successivamente sciacquate con acqua distillata.

La replicazione delle cellule gliali contaminanti viene bloccata al 5° giorno trattando i CNs con citosina arabinoside (ARA-C). Le colture vengono mantenute al 5% di CO₂ e al 95% di aria atmosferica alla temperatura di 37° C. Al 7° giorno sulle cellule viene aggiunto un mezzo di coltura identico a quello in cui sono state piastrate ma senza siero bovino fetale. Le colture cellulari sono state utilizzate per gli esperimenti al 13° giorno – 14° giorno.

Tutte le cellule sono state cresciute in un incubatore ad atmosfera umidificata e concentrazione fissa di CO₂ (5%) ad una temperatura di incubazione di 37°C.

3.2 Western Blot

I lisati cellulari sono stati ottenuti con il buffer RIPA (50mM Tris-HCl, pH 7.5, NaCl 150mM, 1%NP40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS) contenente 2.5 mM di Na-pirofosfato, 1mM β -glicerofosfato, 1mM NaVO₄, 1mM NaF, 0.5mM PMSF, ed una miscela di inibitori di proteasi (Roche, USA). Le cellule sono state conservate 15 min a 4°C e distrutte attraverso ripetute aspirazioni per mezzo di un ago da siringa da insulina. I lisati cellulari così ottenuti sono stati centrifugati per 10 min at 11,600xg ed i pellets sono stati buttati.

Cinquanta microgrammi di estratti di proteine totali sono stati caricati su un gel di elettroforesi SDS-PAGE. Col termine SDS PAGE si indica l' elettroforesi su gel di poliacrilammide condotta in condizioni denaturanti. Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato gel pre-cast a gradiente 4-12% (Invitrogen). Il gel di poliacrilammide è costituito da due parti, una superiore, detta Stacking gel con la funzione di impacchettare le proteine contenute nel campione in una sottile banda, prima che le proteine entrino nel gel di separazione, il Running gel. La separazione delle proteine avviene in base all' effetto di setaccio molecolare, dovuto alle dimensioni dei pori del gel, sotto la spinta

della corrente. L' elettroforesi è condotta in un tampone appropriato, il Run buffer, che è essenziale per mantenere costante lo stato di ionizzazione delle molecole che devono essere separate. I campioni prima di essere caricati sul gel sono bolliti a 70°C in un tampone, che contribuisce alla denaturazione del campione grazie al β -mercaptoetanololo, che riduce i ponti disolfuro, e all' SDS (Sodio-dodecil-Solfato), che denatura e carica negativamente le proteine; questo buffer ci permette inoltre di seguire la corsa elettroforetica grazie alla presenza di un colorante tracciante ionizzabile, il blu di bromofenolo.

La corsa elettroforetica è stata condotta ad amperaggio costante, con le proteine che essendo cariche negativamente migrano dal polo negativo a quello positivo, in base esclusivamente al peso molecolare. Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite su una membrana di PVDF (Amersham) per mezzo di un Transfer Buffer (Invitrogen). Il trasferimento è stato effettuato a freddo per 2 ore a 170-110mAmp.

Successivamente la membrana di PVDF è stata incubata in Blocking buffer (Invitrogen) per 1 ora in agitazione a 4°C, al termine di tale incubazione il filtro è stato lavato con H₂O distillata due volte per 5 minuti ed in seguito incubato overnight con l' anticorpo primario

specifico. Successivamente il filtro è stato lavato con wash buffer 3 volte per 5 minuti ed incubato per 1 ora con l' anticorpo secondario specifico (Invitrogen), quindi lavato nuovamente con wash buffer. La membrana è stata infine incubata per 2 minuti con i reagenti per la chemiluminescenza (ECL, Invitrogen), asciugata ed esposta su lastra fotografica. Il tempo di esposizione è variato in base alla sensibilità dell' anticorpo.

I filtri sono stati successivamente probati con un anticorpo anti α -tubulin (Sigma, USA). Le bande proteiche sono state rivelate tramite l'ECL e, quando specifiche, quantizzate attraverso un sistema densitometrico utilizzando il software ScionImage. I valori densitometrici sono stati normalizzati con α -tubulin.

3.3 Analisi citofluorimetrica della Proteina 4

Le cellule sono state fatte crescere su piastre da 60-mm fino a semiconfluenza. Dopo essere state tripsinizzate, $5 \cdot 10^5$ cellule sono state sospese in 1 mL di phosphate buffered saline (PBS) e fissate overnight con 1% di formaldeide a temperatura ambiente. In seguito le cellule sono state permeabilizzate con 0.1% Triton X-100 per 40 min a

4°C, lavate 4 volte con PBS con aggiunta di 2% FBS, 0.01% NaN₃, 0.1% Triton X-100 (buffer A). Dopo di ciò sono state incubate per 45 min a 4°C con una diluizione di 1:50 di anticorpo policlonale specifico contro la proteina 4.

Successivamente le cellule sono state lavate altre due volte con lo stesso buffer ed incubate per 45 min a 4°C coniugate con l'anticorpo fluorescente Cy3 diluito 1 : 50. Cellule di controllo sono state incubate solo con l'anticorpo fluorescente Cy3 Dopo due lavaggi con il buffer A le cellule sono state risospese in PBS e si è proceduto con l'analisi citofluorimetrica utilizzando un FACSCAN (BD, Heidelberg, Germany) che permette di riconoscere la proteina di interesse e determinarne la quantità, in base al segnale luminoso ed infine analizzate per mezzo del software WINMDI.

3.4 Analisi di Real Time PCR

L'estrazione del RNA ed il saggio di real-time PCR è stato eseguito nel seguente modo:

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit TRI-reagent secondo il protocollo fornito dalla ditta di produzione (Sigma, USA). L'RNA

totale (4 µg) è stato trascritto utilizzando Omniscript Reverse Transcriptase (Quiagen, USA) per mezzo di oligo-dT primers per 60 min a 37 °C in un volume di reazione pari a 40 µl. Real-time PCR è stata eseguita con un ABI 5700 or ABI PRISM-7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems Inc., USA).

La reazione è stata condotta utilizzando piaster multiwell da 96 pozzetti in un volume finale di 50 µl contenendo 25 µl di SYBR-Green (Applied Biosystems Inc., USA) PCR master mix, 1,25 µl di ogni primer gene-specifico, 40 ng of cDNA di campione. I primers gene-specifici sono stati disegnati per amplificare selettivamente la proteina 4 ed i valori di espressione relativa sono stati normalizzati utilizzando glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD).

Il saggio di Real-time PCR è stato condotto in triplicato per ogni campione ed è stata calcolata la media dei valori.

I primers for la proteina 4 e la G6PD usati sono stati i seguenti:

Proteina 4 F: GGG TCT TCC TGG AGA TTT GGT;

Proteina 4 R: GCT GTG GTT TGG AAA CGA GGT T;

G6PD F: ACA GAG TGA GCCC TTC TTC AA;

G6PD R: ATA GGA GTT GCG GGC AAA G

3.5 Microscopia confocale ad immunofluorescenza

Le cellule M03-13 sono state fatte crescere su una piastra-vefrino alle condizioni descritte precedentemente. In seguito il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state immediatamente fissate con paraformaldeide al 3.7% in PBS con 2% di zucchero per 5 min a 22°C, e dopo due lavaggi in PBS sono state permeabilizzate per 5 min a 4°C con 0.1% Triton X-100 in 20mM HEPES, 300mM sucrose, 50mM NaCl, 3 mM MgCl₂.

Le cellule, dopo essere state bloccate con siero di goat al 20% in PBS per 45 min a 4°C, sono state ricoperte con anticorpo primario policlonale di rabbit specifico contro la proteina 5. Le cellule sono state lavate e ricoperte con un anticorpo secondario fluorescente coniugato-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, USA). I controlli sono stati incubati soltanto con l'anticorpo secondario. Dopo immunocolorazione, il vetrino è stato rapidamente lavato prima con PBS e poi con acqua distillata ed infine è stato montato sul vetrino per l'esaminazione al microscopio. Le cellule sono state analizzate con un microscopio confocale Zeiss LSM 510 Meta laser scanning.

3.6 Pazienti

Nello studio sono stati inclusi uomini e donne tra i 15 ed i 50 anni di età che rispondono ai seguenti criteri:

- diagnosi di sclerosi multipla recidivante/ ricorrente in accordo con i criteri di McDonald ;
- un punteggio alla scala EDSS compreso tra 0 e 5;
- lesioni evidenziabili con la Risonanza Magnetica compatibili con la diagnosi di SM;
- almeno un episodio acuto negli ultimi 12 mesi.

Come controllo sono stati utilizzati soggetti con malattie neurologiche che richiedono una diagnosi differenziale con la SM (neoplasie cerebrali, ictus, vasculiti, etc.) selezionati per sesso ed età simili ai pazienti con SM. Tutti i pazienti in oggetto sono stati sottoposti a prelievo del liquor, dopo consenso informato, mediante rachicentesi per lo svolgimento delle classiche analisi di laboratorio all' interno dell' ospedale in cui sono stati ricoverati. Una quantità pari a 1-2 ml è stata inviata ai nostri laboratori per effettuare le indagini di nostro interesse. Gli ospedali che hanno collaborato per il nostro progetto sono:

Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale A. Cardarelli di Napoli:

reparto di Neurologia: Dott. C. Florio;

reparto di Neurofisiopatologia: Dott. F. Habetswallner;

Azienda Universitaria Policlinico “Federico II” di Napoli:

reparto di Neurologia: Prof. Orefice.

3.7 Analisi Statistica

I risultati sono stati espressi come media \pm SEM. Le differenze tra i gruppi sono stati comparati con il test di Student. I valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

3.8 Protocolli Sperimentali

Per la differenziazione degli oligodendrociti M03-13 abbiamo utilizzato differenti tempi di trattamento con 100nM PMA per valutare l'espressione o la localizzazione di specifiche proteine coinvolte nel processo di differenziazione degli oligodendrociti.

In tutti i gruppi di esperimenti le cellule M03-13 sono state preincubate per 16 ore in mezzo contenente 0.2% FBS (starvation).

In un primo gruppo di esperimenti abbiamo differenziato gli oligodendrociti M03-13 eseguendo un' incubazione con 100nM PMA per 30 minuti.

In un altro gruppo di esperimenti abbiamo incubato gli oligodendrociti M03-13 per 24 ore con 100nM PMA in assenza di siero.

In un ultimo gruppo di esperimenti gli oligodendrociti M03-13 sono stati trattati, sempre dopo starvation, con 100nM PMA fino a 4 giorni sempre in assenza di siero.

Questi differenti tempi sono stati utilizzati per valutare le variazioni delle proteine studiate nel processo di differenziazione.

In un altro gruppo di esperimenti gli oligodendrociti M03-13 sono stati differenziati per 24 ore con 100nM PMA in assenza di siero ed in presenza di 30% di CSF proveniente da pazienti MS o Controllo.

4. RISULTATI

In un primo gruppo di esperimenti abbiamo valutato se vi fosse variazione di espressione da parte di alcune proteine coinvolte nel processo di differenziazione. Tali proteine sono molecole di segnale già note per essere coinvolte nella differenziazione ed altre sono coinvolte nei meccanismi di motilità cellulare. Poiché i nostri dati sono in via di brevettazione, ometterò il nome specifico di tali molecole, ma le illustrerò di seguito presentandole come proteina 1,2 3,4 e 5.

Alcune di tali proteine, in particolare la 4 sono già note in letteratura per essere coinvolte nel processo di differenziazione degli oligodendrociti, ma è la prima volta che si indaga sull'andamento della sua espressione in seguito a trattamento con CSF.

In aggiunta la proteina 4 non viene rilasciata dalle membrane per cui per poterne studiare le modifiche quantitative, non si è potuto procedere, come per le altre proteine, con la misurazione dell'espressione tramite Western-Blot, ma ci si è avvalso di un saggio citofluorimetrico.

Inoltre abbiamo studiato gli effetti del PMA sulla traslocazione per mezzo di un microscopio confocale di un marcatore specifico della differenziazione degli oligodendrociti, la proteina 5, che è localizzata nel nucleo durante la fase iniziale del processo di maturazione degli oligodendrociti e successivamente con il differenziamento migra dal nucleo al citoplasma, divenendo inattiva.

In un primo esperimento si è valutata l'espressione proteica delle proteine 1, 2 e 3 dopo aver incubato le cellule M03-13 per 24 ore con 100 nM PMA in assenza di siero (condizioni pro-differenziative) (Fig. 1).

Come mostrato in figura 1 i livelli di espressione proteica per le proteine 1 e 2 erano aumentati in seguito al processo di differenziazione in modo statisticamente significativo. Al contrario l'espressione proteica della proteina 3 era diminuita dopo stimolo differenziativo.

Per quanto riguarda la modulazione della proteina 4 (Fig.2) si è valutato con un saggio citofluorimetrico come l'incubazione delle cellule nelle stesse condizioni pro-differenziative causasse un aumento dei livelli di proteina 4 a distanza di 24 ore.

Nella figura 3 si mostra un'immagine di microscopia confocale di oligodendrociti MO3-13 colorate con anticorpi contro la proteina 5: in cellule non differenziate il segnale è principalmente localizzato nel nucleo mentre dopo 24 ore di trattamento con 100 nM PMA in mezzo senza siero la colorazione diviene evidente anche a livello citoplasmatico.

Questi esperimenti ci hanno consentito di caratterizzare le modifiche dell'espressione proteica di alcune proteine in seguito ad uno stimolo pro-differenziativo nel nostro modello di colture cellulari M03-13. In particolare abbiamo osservato come i livelli delle proteine 1,2 e 4 aumentavano in seguito a differenziazione; quelli della proteina 3 diminuivano e come la proteina 5 subisse una traslocazione dal nucleo al citosol dopo stimolo differenziativo.

A questo punto abbiamo condotto una serie di esperimenti allo scopo di valutare se nel liquor di pazienti affetti da sclerosi multipla ci siano sostanze in grado di aumentare o diminuire l'espressione di queste proteine coinvolte nel processo di differenziamento degli oligodendrociti.

Gli oligodendrociti M03-13 sono stati incubati per 24 ore con 100nM PMA in mezzo in assenza di siero (Gruppo Diff.), in presenza di

liquido cefalorachidiano (CSF) di soggetti controllo (Gruppo Diff. + CSF Ctr), e in presenza di CSF di soggetti affetti da sclerosi multipla (MS) (Gruppo Diff. + CSF MS).

In seguito nel gruppo di esperimenti per valutare la modifica dell'espressione delle proteine 2 e 3 si è proceduti con un saggio di Western Blot. Per valutare l'andamento della proteina 4 si è proceduti con un'analisi citofluorimetrica e successivamente si sono andati a studiare i livelli di mRNA della proteina 4 attraverso una PCR.

Come possiamo notare dalla figura 4, l'espressione della proteina 2 aumenta non solo con il differenziamento ma anche quando si utilizza il liquor di soggetti controllo e diminuisce in maniera statisticamente significativa quando le cellule vengono incubate con liquor di pazienti SM (Fig. 4).

Al contrario nella figura 5 osserviamo come l'espressione della proteina 3 diminuisca non solo con il differenziamento ma anche quando si utilizza il liquor di soggetti controllo ed aumenta in maniera statisticamente significativa, tornando quasi ai livelli delle cellule non differenziate quando le cellule vengono incubate con liquor di pazienti SM (Fig. 5).

Nella figura 6 osserviamo per la proteina 4 un andamento del tutto analogo a quello della proteina 2 (Fig. 6). Dato che i valori della proteina 4 sono stati valutati attraverso un'analisi citofluorimetrica, e che quindi non davano informazioni dirette sulla reale espressione quantitativa proteica, si è voluto analizzare questa stessa per mezzo di PCR andando a misurare l'andamento dei livelli di mRNA della proteina 4. Come si osserva nella figura 7 anche l'andamento dei livelli di mRNA seguono lo stesso andamento dell'espressione proteica della proteina 2. Infatti notiamo come i livelli di mRNA della proteina 4 aumentano non solo con il differenziamento ma anche quando si utilizza il liquor di soggetti controllo rispetto al non differenziato e diminuiscono in maniera statisticamente significativa quando le cellule vengono incubate con liquor di pazienti SM (Fig. 7). In un altro esperimento (Fig. 8) utilizzando l'immunofluorescenza abbiamo visto come il CSF di pazienti MS è in grado di inibire completamente la traslocazione dal nucleo al citosol della proteina 5 negli oligodendrociti differenziati per 24 ore.

Infine per accertare se l'effetto del CSF di pazienti affetti da MS fosse specifico per gli oligodendrociti, abbiamo condotto degli esperimenti su colture primarie di neuroni di topo. Le cellule neuronali sono state

incubate per 30 minuti con CSF proveniente da pazienti MS e controllo e sono stati analizzati i livelli di espressione della proteina 1. Non abbiamo ritrovato alcuna variazione statisticamente significativa nell'espressione della proteina 1 (Fig.9).

5. DISCUSSIONE

Colture cellulari di oligodendrociti umani MO3-13 si differenziano quando crescono in assenza di siero e in presenza di PMA.

L'espressione o la localizzazione di proteine specifiche coinvolte nel processo di differenziazione è stata valutata in diversi periodi attraverso esperimenti di western blot, di citofluorimetria, rt-PCR e per mezzo di microscopia confocale ad immunofluorescenza.

Utilizzando i saggi sopra descritti abbiamo scoperto che la l'espressione delle proteine 1,2 e 4 aumentavano in seguito a differenziazione; l'espressione della proteina 3 diminuiva e la localizzazione della proteina 5 subiva una traslocazione dal nucleo al citosol dopo stimolo differenziativo.

Successivamente abbiamo indagato nel nostro modello di oligodendrociti umani (MO3-13) differenziati con lo stimolo del PMA, l'andamento di queste proteine coinvolte nel processo di differenziazione in seguito a stimolo con CSF proveniente da pazienti affetti da MS o da pazienti controllo.

Negli oligodendrociti umani MO3-13 incubati con CSF di pazienti affetti da MS abbiamo scoperto una inibizione della differenziazione

indotta dal PMA in seguito ad i risultati ottenuti nella variazione dell'espressione di tutte le proteine coinvolte nella differenziazione, esaminate nei nostri esperimenti.

Viceversa, l'incubazione degli oligodendrociti con il CSF di pazienti controllo non apportava significative variazioni al processo di differenziazione.

Inoltre poiché l'incubazione di oligodendrociti umani MO3-13 con CSF di pazienti affetti da MS bloccava la traslocazione dal nucleo al citosol della proteina 5, dobbiamo ipotizzare che nel liquor di pazienti affetti da SM ci sia qualche sostanza in grado di fare ciò oltre che di bloccare la normale differenziazione degli oligodendrociti

Abbiamo infine verificato che in colture primarie di neuroni l'incubazione con CSF provenienti dal siero di pazienti affetti da MS non produceva alcuna variazione significativa sulle proteine coinvolte nel processo di differenziazione.

Tutti questi risultati ci inducono ad ipotizzare che il CSF di pazienti SM abbia come target specifico nello sviluppo patogenetico della malattia gli oligodendrociti ed il loro processo di differenziazione.

6. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio ci consentono di ipotizzare la presenza di una o più molecole (anticorpo?) all'interno del liquor dei pazienti che sviluppano (anche in una fase precoce) la malattia SM che siano in grado di bloccare il processo di differenziazione degli oligodendrociti.

Dobbiamo ricordare come sia stato dimostrato come in una fase iniziale della SM avvenga il processo di ri-mielinizzazione delle fibre colpite grazie anche alla maturazione e alla differenziazione di oligodendrociti immaturi.

La nostra scoperta riteniamo possa essere importante sia perché consente di aggiungere un tassello, seppur piccolo, ma innovativo, al grande puzzle ancora irrisolto della patogenesi della SM.

Inoltre ipotizziamo che tale scoperta possa avere una utilità diagnostica applicabile quasi nell'immediato, in quanto può essere utilizzata come strumento per verificare la diagnosi in una fase anche precoce di SM.

Notiamo, inoltre, che è la prima volta che in letteratura si evidenzia una modulazione proteica con uno stimolo proveniente da liquor di

pazienti SM. Questa prima ed importante scoperta, ovvero, l'osservazione che il liquor SM sia in grado di revertire la naturale differenziazione degli oligodendrociti, ipotizziamo possa essere utile per mettere a punto un'arma diagnostica in più e forse più precoce che aiuti a porre una diagnosi specifica di sclerosi multipla.

7. BIBLIOGRAFIA

1. *Kandel E.R, Schwartz J.H, Jessell T.M.* Principi di Neuroscienze Casa editrice Ambrosiana 1994
2. *Bradl M, Lassmann H.* Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):37-53.
3. *Lubetzki C, Stankoff B.* Role of axonal signals in myelination of the central nervous system. *Pathol Biol (Paris).* 2000 Feb;48(1):63-9.
4. *Bauer NG, Richter-Landsberg C, Ffrench-Constant C.* Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia.* 2009 Dec;57(16):1691-705.
5. *Baumann N, Pham-Dinh D :* Biology of oligodendrocyte and myelin in the central nervous system. *Physiol. Rev.* 2001 ; 81, 871-927)
6. *Miller RH.* Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol.* 2002 Aug;67: 451-67.
Nicolay et al. 2007.

7. Wegner M. A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci*. 2008 May;35(1):3-12.
8. Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M, Qiu M. Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron*. 2005 Jan 6;45(1):41-53.
9. Vallstedt A, Klos JM, Ericson J. Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron*. 2005 Jan 6;45(1):55-67.
10. Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. 1992 Jul 10;70(1):31-46.
11. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*. 1993 Oct 29;262(5134):695-700.
12. Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD. Oligodendrocyte population dynamics

- and the role of PDGF in vivo. *Neuron*. 1998 May;20(5):869-82.
13. Barres BA, Raff MC. Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol*. 1999 Dec 13;147(6):1123-8.
 14. Rosenbluth J, Schiff R, Liang WL, Dou WK, Moon D. Antibody-mediated CNS demyelination: focal spinal cord lesions induced by implantation of an IgM anti-galactocerebroside-secreting hybridoma. *J Neurocytol*. 1999 Apr-May;28(4-5):397-416.
 15. Dai X, Qu P, Dreyfus CF. Neuronal signals regulate neurotrophin expression in oligodendrocytes of the basal forebrain. *Glia*. 2001 May;34(3):234-9.
 16. Wilkins A, Chandran S, Compston A. A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. *Glia*. 2001 Oct;36(1):48-57.
 17. Wilkins A, Majed H, Layfield R, Compston A, Chandran S. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 2003 Jun 15;23(12):4967-74.

18. *Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB.* Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2000 Dec;7:574-85.
19. *Du Y, Dreyfus CF.* Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J Neurosci Res.* 2002 Jun 15;68(6):647-54.
20. *Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG.* Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:938-52.
21. *Raine CS.* Multiple sclerosis: immune system molecule expression in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:328-37.
22. *Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH.* Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997;120:393-9.
23. *Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L.* Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338: 278-85.
24. *Elliot M, Frohman et al.* Multiple Sclerosis: The plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006

25. Jeffery ND, Blakemore WF. Locomotor deficits induced by experimental spinal cord demyelination are abolished by spontaneous remyelination. *Brain*. 1997 Jan;120 (Pt 1):27-37.
26. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain*. 2006 Dec;129(Pt 12):3165-72.
27. Franklin RJ, Ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Nov;9(11):839-55.
28. Hagg T. From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist*. 2009 Feb;15(1):20-7.
29. Armstrong RC, Dorn HH, Kufta CV, Friedman E, Dubois-Dalcq ME. Pre-oligodendrocytes from adult human CNS. *J Neurosci*. 1992 Apr;12(4):1538-47.
30. Armstrong RC, Kim JG, Hudson LD. Expression of myelin transcription factor I (MyTI), a "zinc-finger" DNA-binding

- protein, in developing oligodendrocytes. *Glia*. 1995 Aug;14(4):303-21.
31. *Amstrong RC*. Isolation and characterization of immature oligodendrocyte lineage cells. *Methods* 1998 Nov;16(3):282-292.
32. *Kessarlis N, Jamen F, Rubin LL, Richardson WD*. Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development* 2004;131:1289-1298.
33. *Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Nait-Oumesmar B, Baron-Van Evercooren A*. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and platelet-derived growth factor AB (PDGF AB) promote adult SVZ-derived oligodendrogenesis in vivo. *Mol Cell Neurosci* 2002;20:390-403.
34. *Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH*. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol* 2004; 164:111–122.
35. *Nicolay DJ, Doucette JR, Nazarali AJ*. Transcriptional control of oligodendrogenesis. *Glia* 2007; 55:1287–1299.

36. De Groot DM, Coenen AJ, Verhofstad A, van Herp F, Martens GJ. In vivo induction of glial cell proliferation and axonal outgrowth and myelination by brain-derived neurotrophic factor. *Mol Endocrinol.* 2006 Nov;20(11):2987-98.
37. Wegner M, Stolt CC. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci* 2005; 28:583–588.
38. Stolt CC, Schlierf A, Lommes P, Hillgärtner S, Werner T, Kosian T, Sock E, Kessar N, Richardson WD, Lefebvre V, Wegner M. SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Dev Cell* 2006; 11:697–709.
39. He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, Shi Y, Nave KA, Casaccia-Bonnett P. The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* 2007; 55:217–230.
40. Nielsen JA, Berndt JA, Hudson LD, Armstrong RC. Myelin transcription factor 1 (Myt1) modulates the proliferation and

- differentiation of oligodendrocyte lineage cells. *Mol Cell Neurosci* 2004; 25:111–123.
41. Bunge MB, Bunge RP, Ris H. Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961 May;10:67-94.
 42. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 1993;33:137-51.
 43. Setzu A, Lathia JD, Zhao C, Wells K, Rao MS, Ffrench-Constant C, Franklin RJ. Inflammation stimulates myelination by transplanted oligodendrocyte precursor cells. *Glia* 2006;54:297-303.
 44. Scolding N, Franklin R, Stevens S, Heldin CH, Compston A, Newcombe J. Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain* 1998;121:2221-8.
 45. Wolswijk G. Oligodendrocyte survival, loss and birth in lesions of chronic-stage multiple sclerosis. *Brain* 2000;123:105-15.

46. Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD
Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of
multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2002 Jan 17;346(3):165-
73.
47. Wolswijk G. Chronic stage multiple sclerosis lesions contain
a relatively quiescent population of oligodendrocyte
precursor cells. *J Neurosci.* 1998 Jan 15;18(2):601-9.

8. FIGURE

FIG. 1

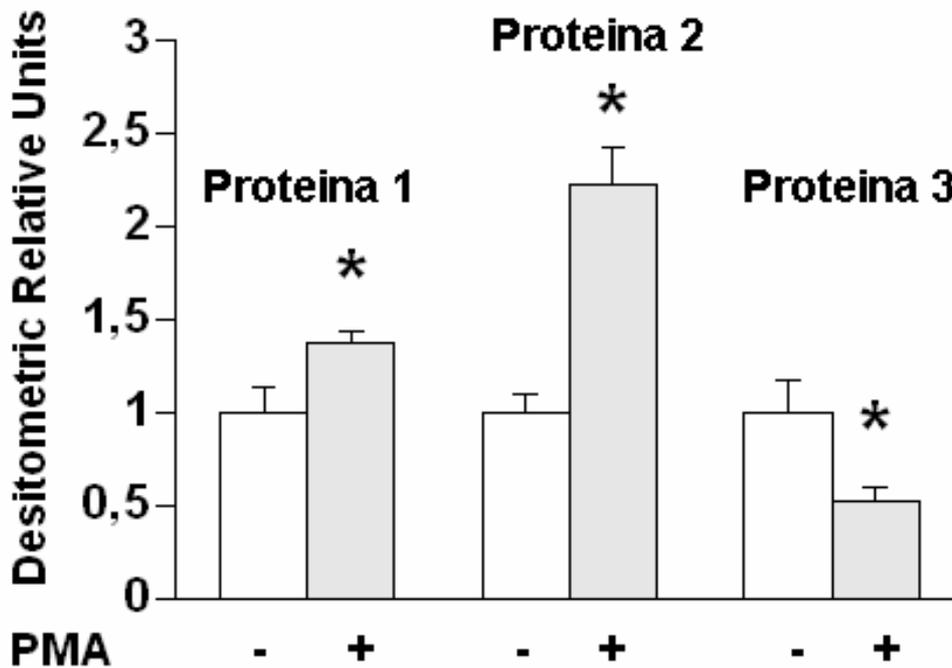


FIGURA 1: Analisi di Western blot dei livelli delle proteine 1, 2 e 3 in cellule M03-13 differenziate con 100nM di PMA in mezzo senza siero per 24 ore. Gli istogrammi mostrano i valori (medie \pm SEM) rispetto ai controlli ottenuti per mezzo di analisi densitometrica di bande normalizzate per α -tubulin di tre esperimenti indipendenti.

FIG. 2

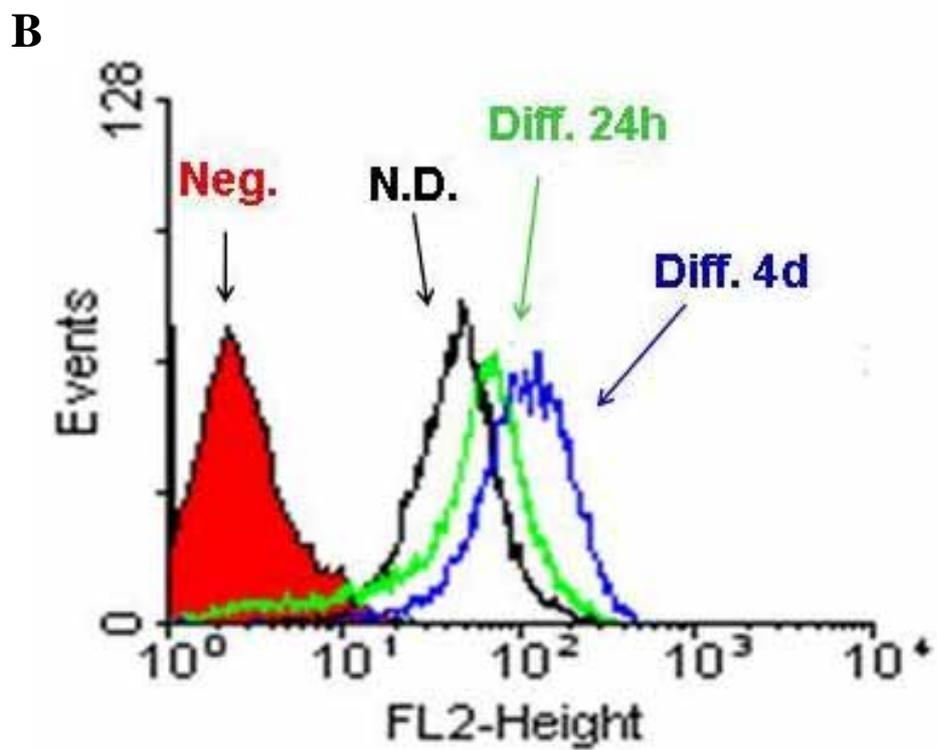
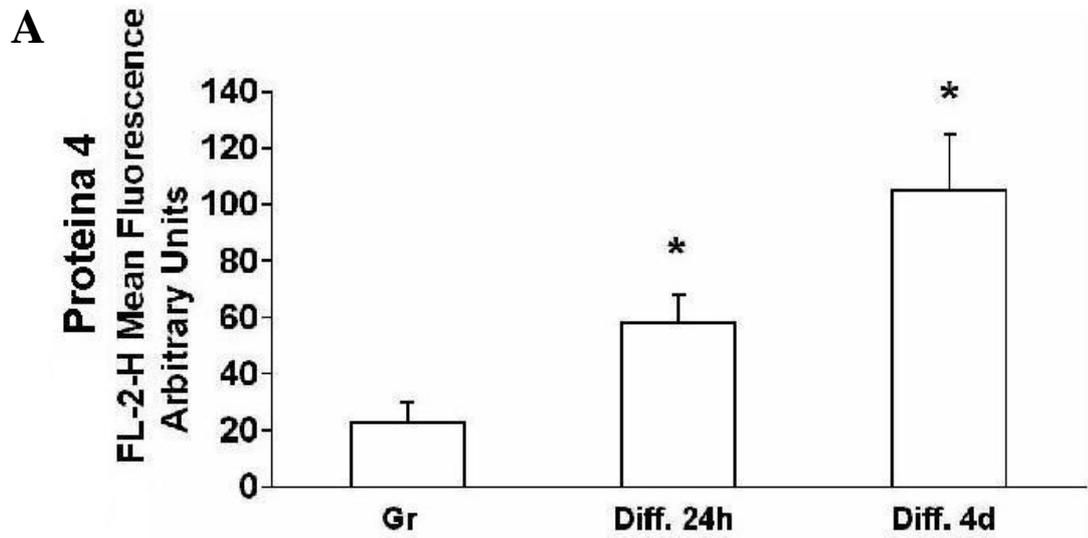


FIGURA 2 : Analisi citofluorimetrica dei livelli di proteina 4 in cellule M03-13 differenziate con PMA 100nM in mezzo senza siero per 24 ore e 4 giorni.

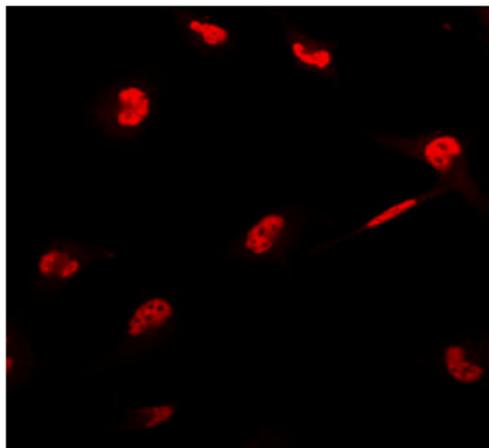
Nel pannello A sono rappresentati gli istogrammi riportati con le medie +/- SEM di tre esperimenti indipendenti.

Nel pannello B sono rappresentati i picchi di fluorescenza FL2-H di un campione rappresentativo.

FIG. 3

Proteina 5

Non Diff.



Diff.

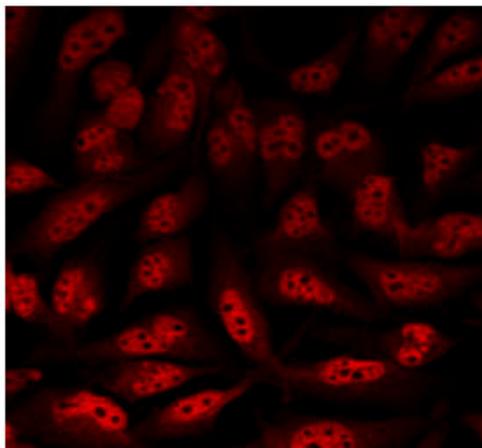
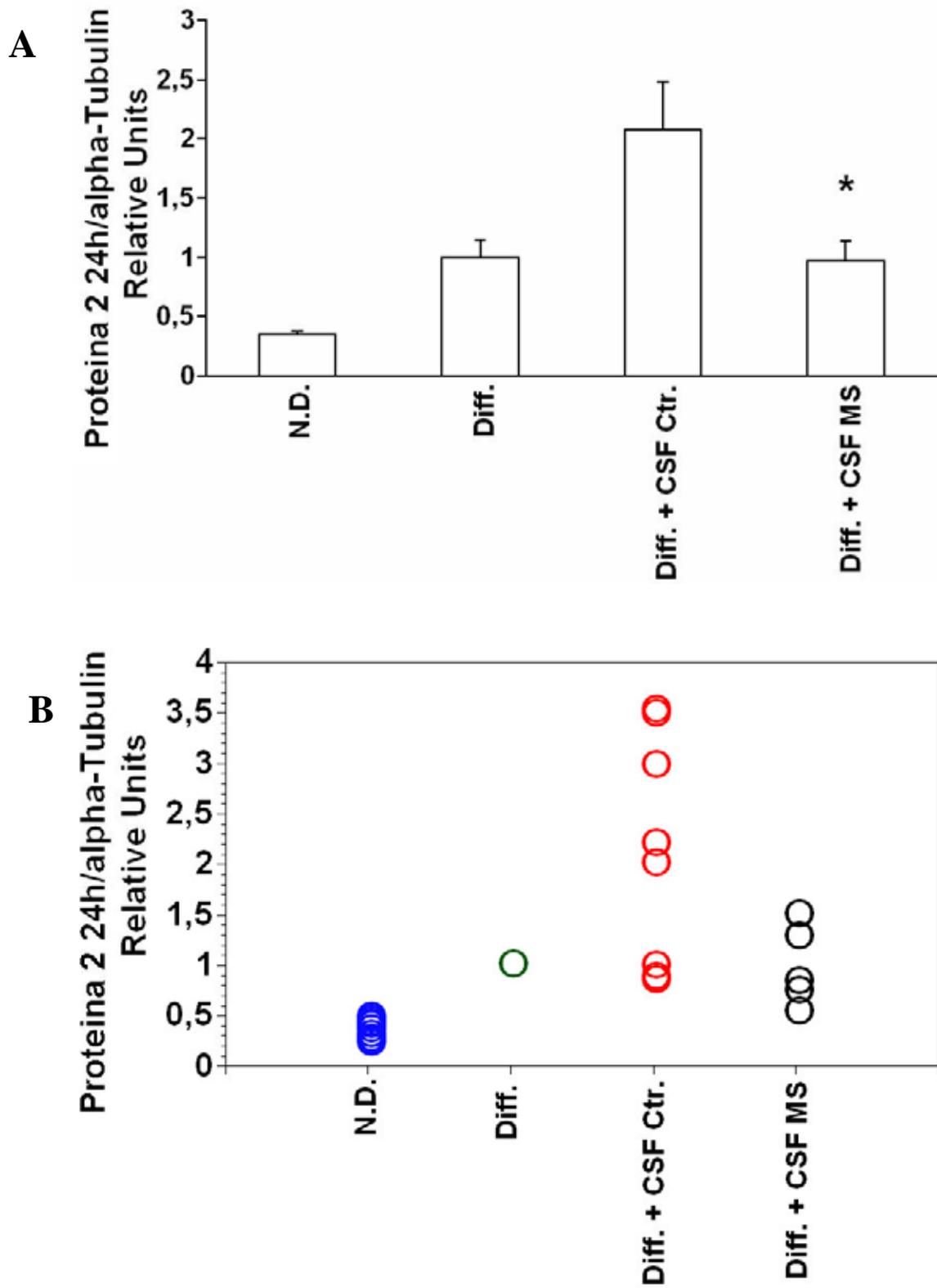


FIGURA 3: Traslocazione della proteina 5 dal nucleo al citosol dopo 24 ore di differenziazione delle cellule M03-13 con 100nM di PMA in mezzo senza siero.

Le cellule sono state colorate con un anticorpo specifico per la proteina 5 coniugato con CY3 ed analizzato per mezzo di un microscopio confocale.

FIG. 4



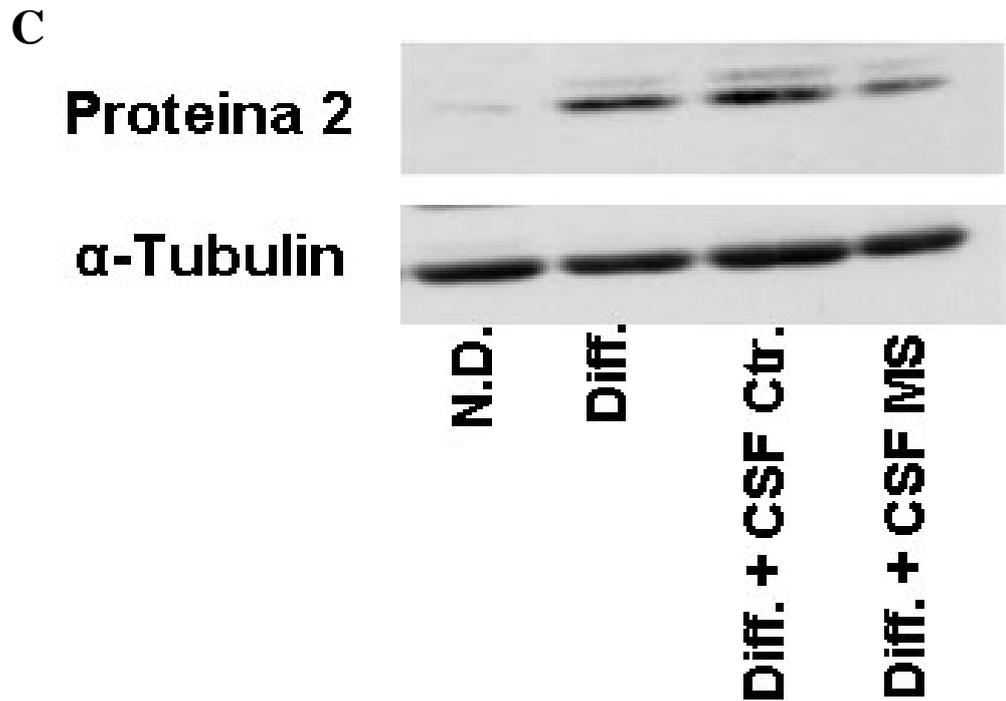
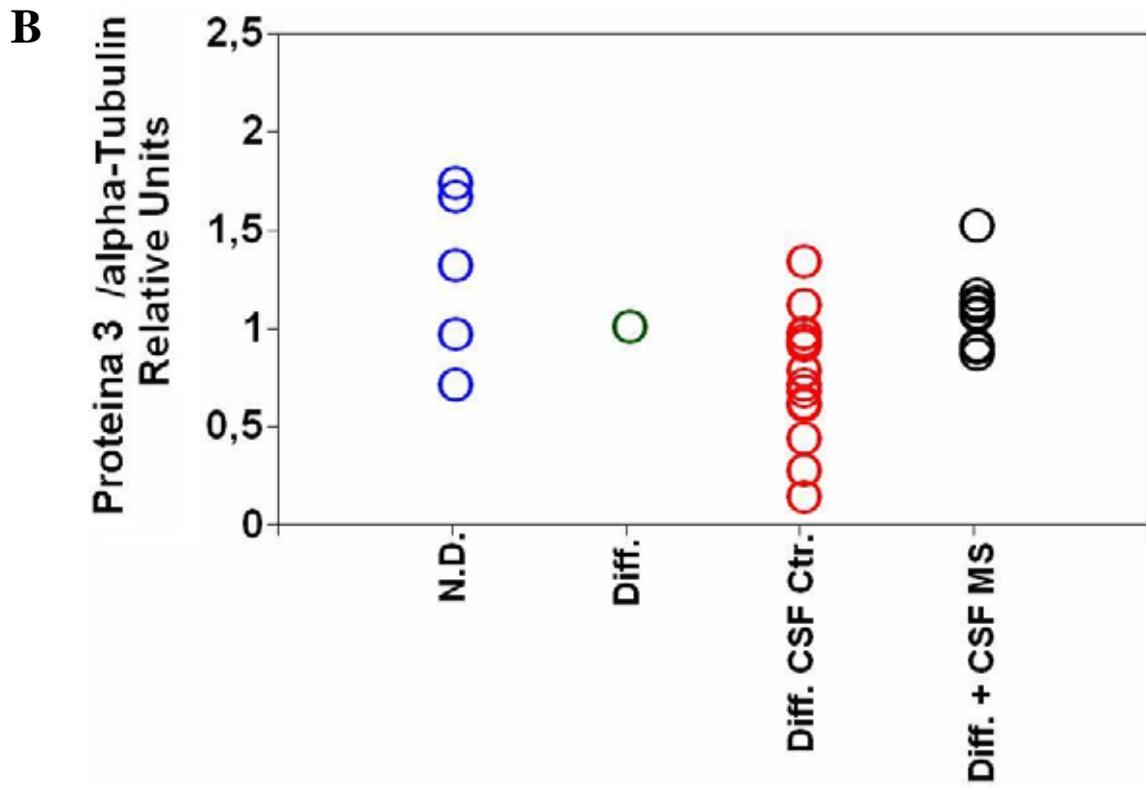
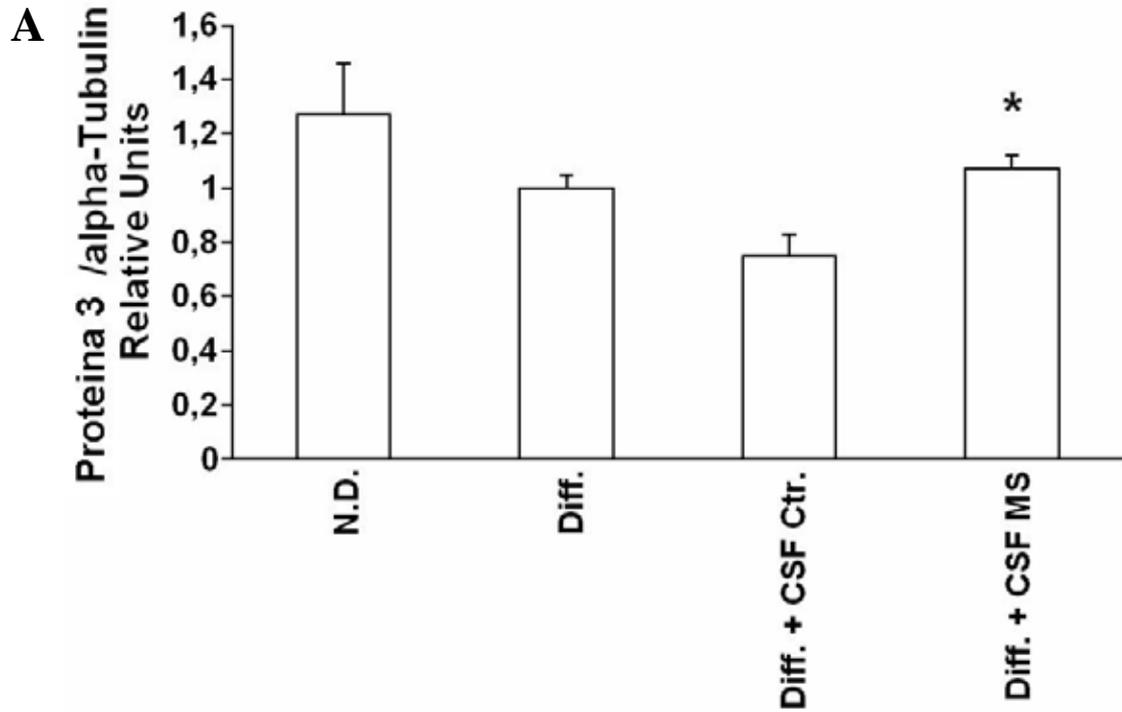


FIGURA 4: Le cellule MO3-13 sono state trattate con 100nM di PMA in mezzo senza siero per 24 ore (Diff.) ed in presenza di 30% di CSF proveniente da pazienti controllo (Diff + CSF Ctr) o da pazienti affetti da Sclerosi Multipla (Diff + CSF MS) ed in seguito raccolte per effettuare saggio di Western Blot per valutare i livelli di espressione di proteina 2. Il pannello A mostra in istogrammi le medie \pm SEM dei valori di proteina 2 rispetto ai campioni differenziati ottenuti per mezzo di un'analisi densitometrica delle bande normalizzate per α -tubulin. Il pannello B mostra lo scatter dei singoli valori per ogni paziente. Il pannello C mostra un esperimento di Western Blot.

* $p < 0.05$ vs CSF Ctr.

FIG. 5



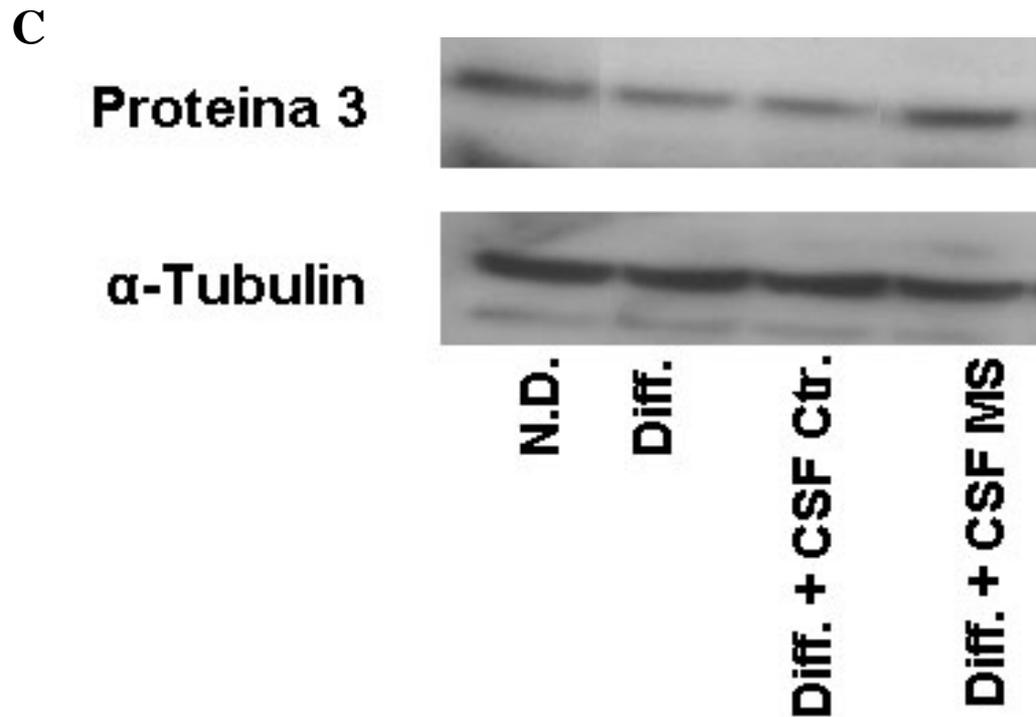


FIGURA 5. Le cellule MO3-13 sono state trattate con 100nM di PMA in mezzo senza siero per 24 ore (Diff.) ed in presenza di 30% di CSF proveniente da pazienti controllo (Diff + CSF Ctr) o da pazienti affetti da Sclerosi Multipla (Diff + CSF MS) ed in seguito raccolte per effettuare saggio di Western Blot per valutare i livelli di espressione di proteina 3. Il pannello A mostra in istogrammi le medie \pm SEM dei valori di proteina 3 rispetto ai campioni differenziati ottenuti per mezzo di un'analisi densitometrica delle bande normalizzate per α -tubulin. Il pannello B mostra lo scatter dei singoli valori per ogni paziente. Il pannello C mostra un esperimento di Western Blot.

* $p < 0.05$ vs CSF Ctr.

FIG. 6

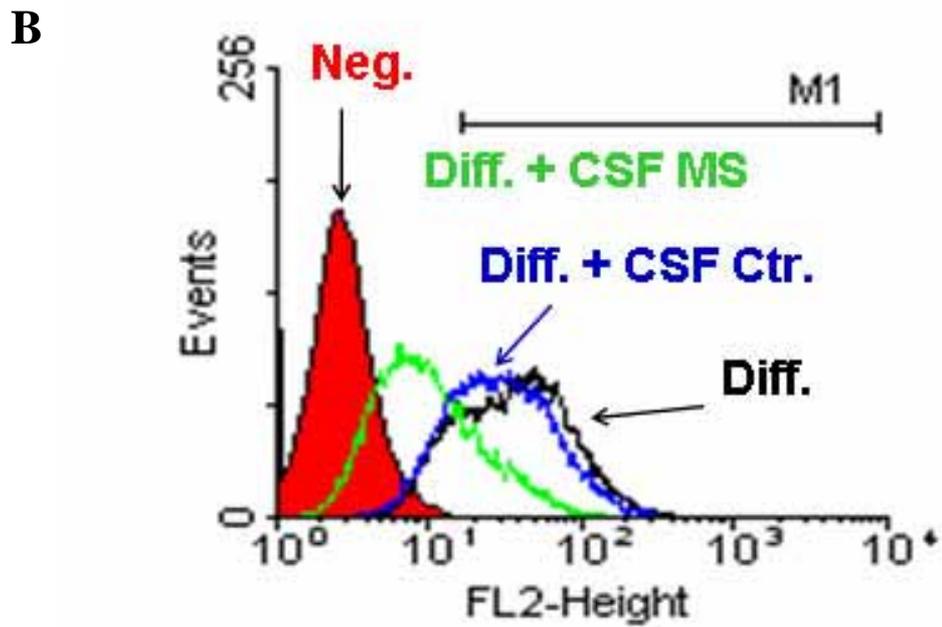
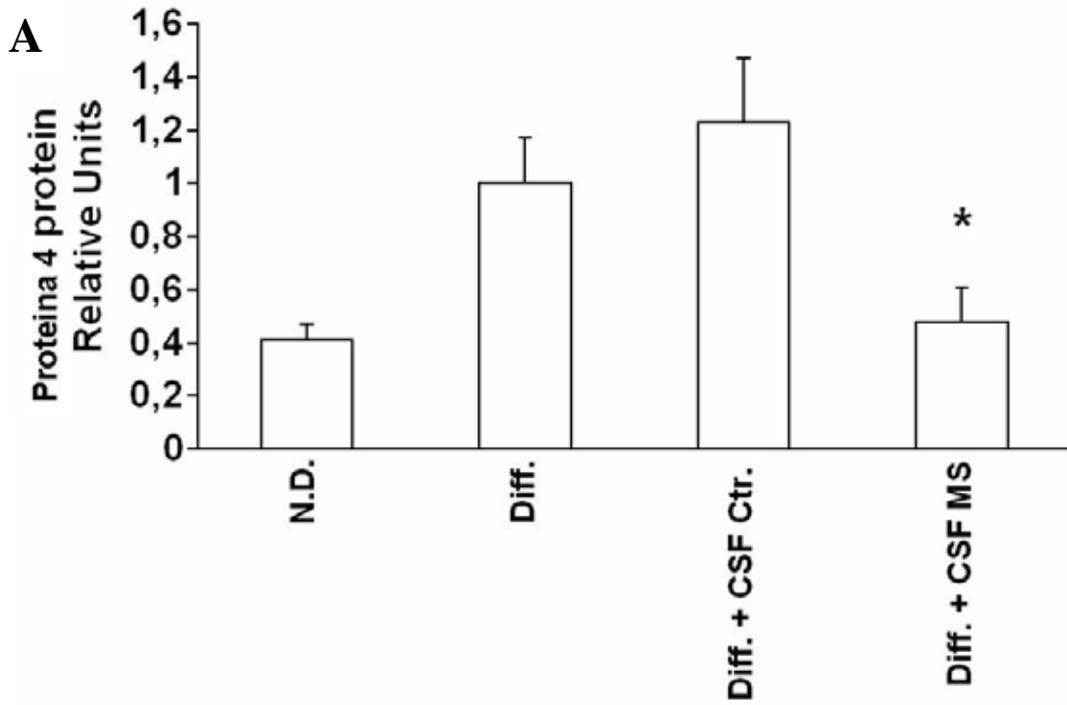


FIGURA 6. Le cellule MO3-13 sono state trattate con 100nM di PMA in mezzo senza siero per 24 ore (Diff.) ed in presenza di 30% di CSF proveniente da pazienti controllo (Diff + CSF Ctr) o da pazienti affetti da Sclerosi Multipla (Diff + CSF MS) ed in seguito raccolte per effettuare saggio di citofluorimetria ad immunofluorescenza indiretta per valutare i livelli di proteina 4.

La frazione Neg è stata trattata solo con l'anticorpo secondario.

Diecimila cellule sono state analizzate per ogni campione.

Il pannello A mostra in istogrammi le medie \pm SEM dei valori di fluorescenza in rapporto ai campioni non stimolati.

Il pannello B mostra la citofluorimetria di un campione rappresentativo. * $p < 0.05$ vs CSF Ctr.

FIG. 7

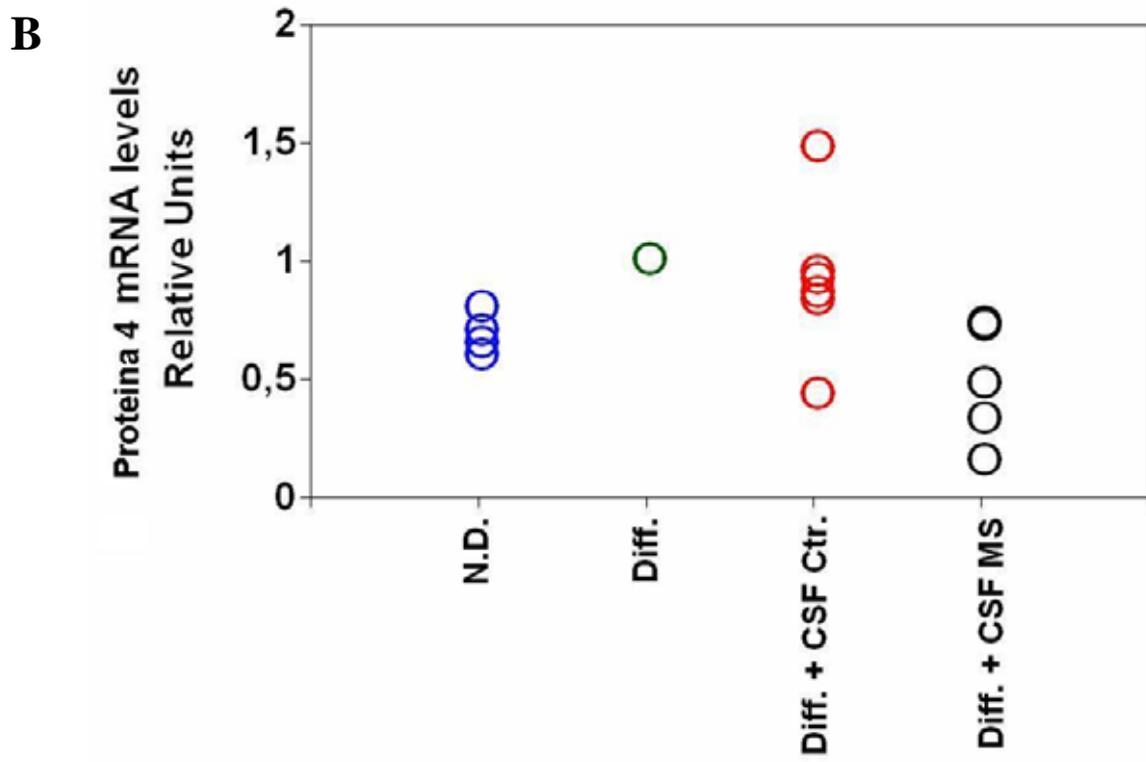
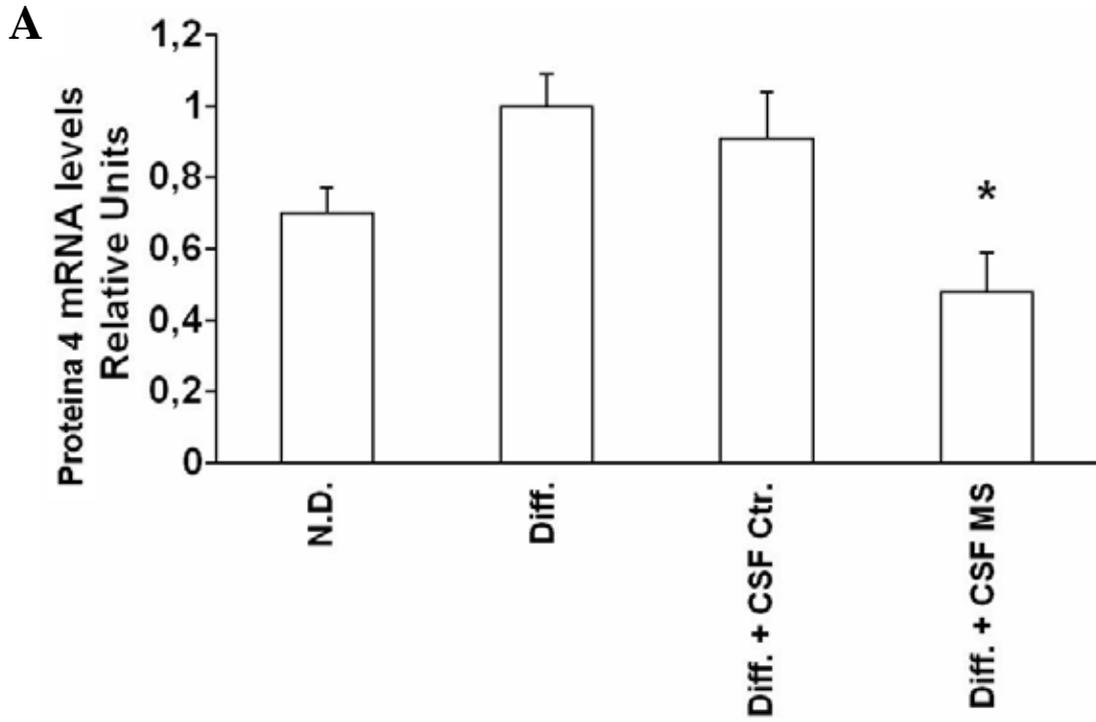


FIGURA 7. Le cellule MO3-13 sono state trattate con 100nM di PMA in mezzo senza siero per 24 ore (Diff.) ed in presenza di 30% di CSF proveniente da pazienti controllo (Diff + CSF Ctr) o da pazienti affetti da Sclerosi Multipla (Diff + CSF MS) ed in seguito raccolte per effettuare saggio di RT- PCR per valutare i livelli di mRNA della proteina 4.

Il pannello A mostra in istogrammi le medie \pm DS dei valori rispetto ai campioni differenziati

Il pannello B mostra lo scatter dei singoli valori per ogni paziente.

* $p < 0.05$ vs CSF Ctr.

FIG. 8

Proteina 5

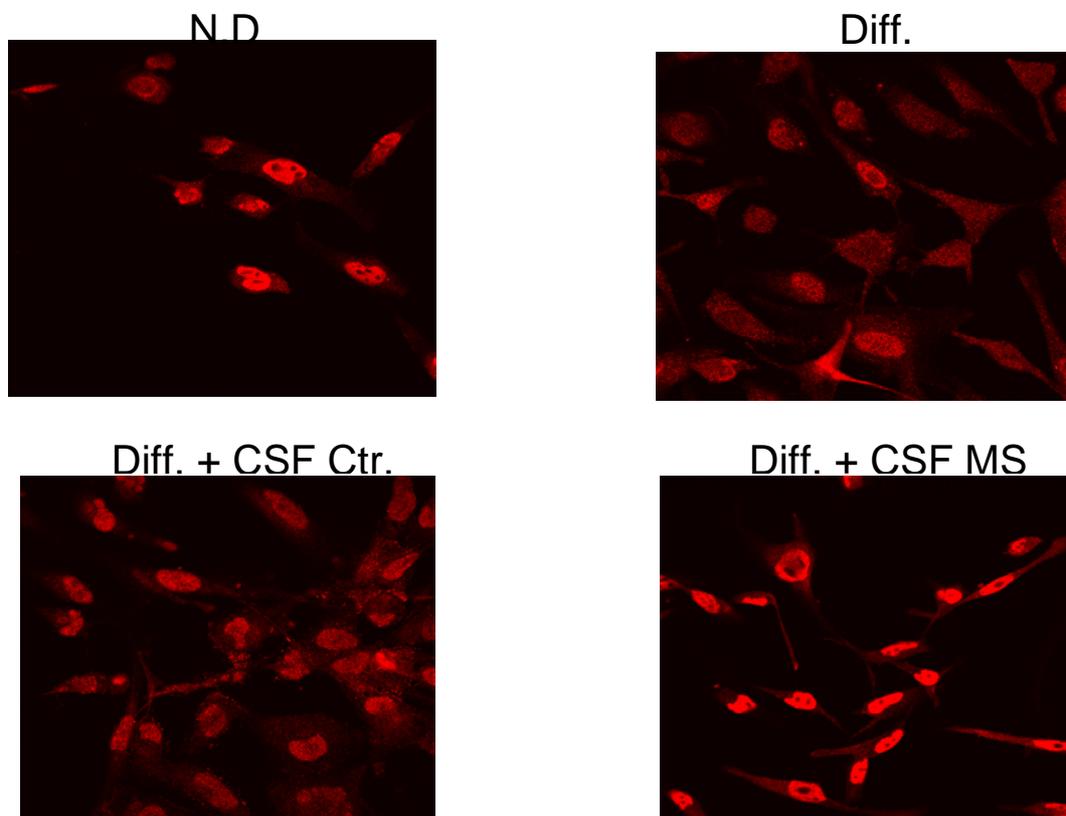


FIGURA 8: Le cellule MO3-13 (ND) sono state trattate con 100nM di PMA in mezzo senza siero per 24 ore (Diff.) ed in presenza di 30% di CSF proveniente da pazienti controllo (Diff + CSF Ctr) o da pazienti affetti da Sclerosi Multipla (Diff + CSF MS) e successivamente colorate con anticorpo contro la proteina 5 ed analizzate per mezzo di un microscopio confocale.

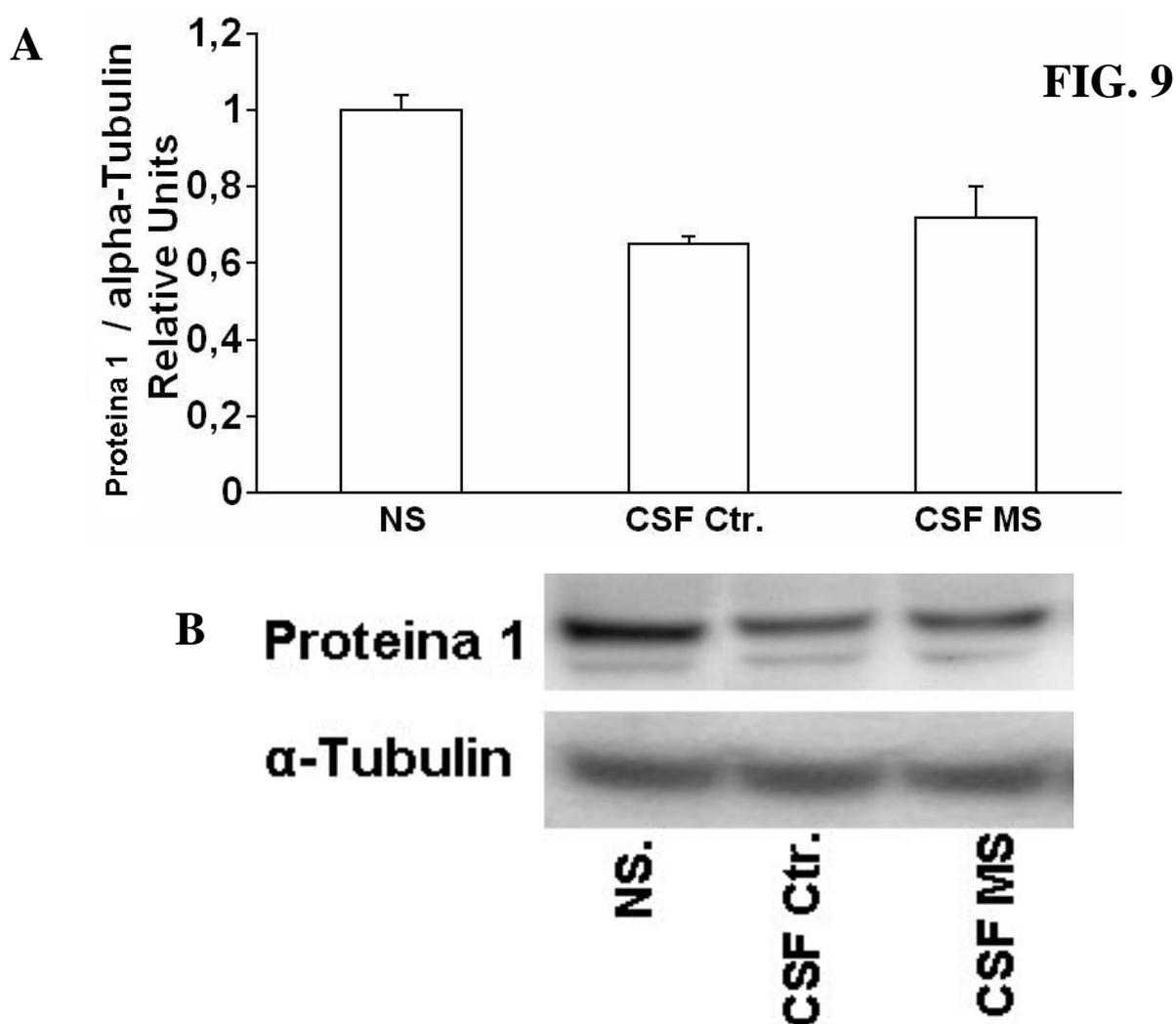


FIG. 9

FIGURA 9: Colture primarie di neuroni sono state trattate con 30% di CSF proveniente da pazienti controllo (Diff + CSF Ctr) o da pazienti affetti da Sclerosi Multipla (Diff + CSF MS) ed in seguito raccolte per effettuare saggio di Western Blot per valutare i livelli di espressione di proteina 1. Il pannello A mostra in istogrammi le medie \pm SEM dei valori di proteina 1 rispetto ai campioni non stimolati (NS) ottenuti per mezzo di un'analisi densitometrica delle bande normalizzate per α -tubulin. Il pannello C mostra un esperimento di Western Blot.

9. RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo percorso non posso non ringraziare le tante persone che mi hanno guidato ed aiutato ad arrivare fin qui.

In primo luogo, il mio tutore, prof. Postiglione, per avermi supportato e “sopportato” in questi tre anni che sono coincisi con un momento non facile della mia sfera personale.

Ringrazio il prof. Avvedimento per avermi incoraggiato e sempre stimolato scientificamente.

Ringrazio la dott.ssa Santillo e tutto lo staff del suo laboratorio, in particolare, per le immagini degli esperimenti con la microscopia ad immunofluorescenza.

Ringrazio la dott.ssa Santarpia, Tina, per la sua passione nella ricerca, per la sua tenacia e soprattutto per essere stata il motore del laboratorio.

Ed infine l'ultimo ed il più sentito GRAZIE: al dott. Roberto Paternò, mia guida per otto anni, con alti e bassi, con momenti belli e brutti, con periodi miei più di slancio ed altri paludosi, che mi ha condotto in questi anni così formativi non solo ad una crescita professionale e scientifica ma soprattutto umana.

A lui che mi ha guidato fin qui, e gettato le basi per un ponte nel tempo, la mia affettuosa e sentita riconoscenza.