

Colture di cellule staminali neurali come modello per lo studio di patologie del sistema nervoso, studi farmacologici e di neurotossicità

Emanuele Cacci, Stefano Biagioni

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Roma

ABSTRACT

Neural stem cell cultures as model to study neurological diseases and evaluate drug neurotoxicity. New effective therapies are required to treat chronic and acute brain pathologies. Clinical intervention strategies aimed to increase mobilization of neural stem cells (NSC) located in the adult mammalian brain and to strengthen neurogenesis have been proposed as possible regenerative therapy in several brain pathologies. Though in vivo studies are mandatory, human and rodents NSC cultures constitute an important complementary model to identify the effects of endogenous (e.g. pro-inflammatory cytokines produced in the lesioned brain) and exogenous molecules (e.g. drugs) on neurogenesis. In this review we illustrate the use of NSC as a cellular model to clarify mechanisms implicated in brain disease and to screen the efficacy of new drugs. We will also present some studies that highlight the rising interest around embryonic inducible pluripotent cells (iPS) as cellular models for studying brain pathologies in vitro.

INTRODUZIONE

Il sistema nervoso umano (SN) ha raggiunto, attraverso un processo evolutivo durato milioni di anni, un elevato grado di complessità organizzativa che ha permesso lo sviluppo di un variegato repertorio comportamentale che include l'uso della parola, degli strumenti, l'apprendimento culturale, l'autoconsapevolezza e, in generale, l'acquisizione di funzioni cognitive altamente specializzate.

Si stima che il cervello umano sia composto da almeno 100×10^9 neuroni e che ciascun neurone possa formare, almeno nella corteccia, un numero di sinapsi compreso tra 5000 e 200.000. Un ulteriore elemento contribuisce in maniera determinante all'arricchimento della complessità cerebrale: l'enorme numero di diversi sottotipi neuronali generati durante lo sviluppo embrionale. Si pensa che almeno 10000 diversi tipi neuronali possano essere prodotti a partire da cellule somatiche multipotenti presenti nelle diverse regioni del SN nelle fasi precoci dello sviluppo. Tali cellule, denominate cellule staminali neurali (NSC), sono capaci di integrare segnali intrinseci ed estrinseci per generare in modo spazialmente e temporalmente regolato i diversi tipi cellulari specializzati del SN, quali le cellule gliali (astrociti e oligodendrociti) e i neuroni (il repertorio completo di sottotipi neuronali specializzati). Altri mammiferi, quali primati non umani e roditori, pur se caratterizzati da un minore grado di complessità cerebrale, presentano comunque elevata eterogeneità cellulare e costituiscono importanti modelli per lo studio dei meccanismi molecolari che regolano le proprietà cellulari delle NSC e che presiedono allo sviluppo del SN.

Per lungo tempo si è ritenuto che la capacità di generare nuovi neuroni si esaurisse nelle prime fasi dello sviluppo e che il cervello adulto mancasse completamente di tipi cellulari specializzati capaci di provvedere all'aggiunta e/o alla sostituzione di cellule neuronali durante il

corso della vita (1). I lavori pionieristici di Altman (2) e numerosi studi successivi hanno invece chiaramente dimostrato la presenza di NSC e la continua generazione di nuovi neuroni nel sistema nervoso centrale (SNC) di mammiferi adulti (3). Nell'ultimo decennio è stata dimostrata la capacità delle NSC di rispondere a determinati stimoli patologici aumentando la produzione di nuovi neuroni; l'attivazione di eventi di neurogenesi endogena sembrerebbe costituire un potenziale meccanismo autoriparativo attraverso il quale il cervello tenterebbe di compensare la perdita di neuroni dalle aree cerebrali interessate dalla patologia con l'aggiunta di nuovi neuroni (4). L'identificazione degli elementi chiave coinvolti nella regolazione delle diverse fasi della neurogenesi (proliferazione, migrazione, sopravvivenza, differenziamento, integrazione) è dunque fondamentale per lo sviluppo di trattamenti terapeutici finalizzati al potenziamento dell'efficacia di questi processi riparativi.

L'identificazione delle NSC sia nel cervello embrionale che adulto attraverso l'utilizzo di appropriati marcatori e lo sviluppo di opportune tecnologie per l'isolamento e la coltivazione di tali cellule hanno portato all'acquisizione di un numero cospicuo di informazioni circa i meccanismi che presiedono alla regolazione delle proprietà delle NSC e allo sviluppo del SN. La propagazione delle NSC in vitro offre un'insostituibile opportunità per la comprensione della biologia di tali cellule e per l'identificazione del ruolo di nuovi fattori genetici ed epigenetici responsabili della formazione di tutti i diversi tipi neurali. Le NSC possono inoltre rappresentare un'importante modello cellulare per lo studio di patologie del SN e per la valutazione di nuovi farmaci.

In questa rassegna mostreremo alcuni possibili impieghi di colture di NSC in studi di neurotossicità in vitro come, ad esempio, l'identificazione degli effetti modulatori di fattori solubili quali le citochine rilasciate durante i processi infiammatori tipicamente associati a

numeroso patologie neurodegenerative sia acute che croniche. Verranno anche brevemente discussi alcuni dati che suggeriscono l'impiego di farmaci anti-infiammatori come possibile strategia farmacologica per il potenziamento della neurogenesi endogena. Infine, saranno discusse le nuove possibilità offerte dalla riprogrammazione di cellule somatiche, ottenute da pazienti, a cellule staminali pluripotenti (iPS) specifiche di una data patologia. Queste cellule potrebbero rappresentare un importante modello per lo studio di numerose patologie umane, per lo sviluppo di nuovi farmaci e la messa a punto di strategie terapeutiche basate sulla combinazione di terapia genica e cellulare.

LE CELLULE STAMINALI NEURALI NEL SISTEMA NERVOSO EMBRIONALE

Le NSC embrionali sono state identificate e isolate a partire da numerose aree del SNC e periferico, tra le quali la corteccia cerebrale, il telencefalo ventrale, il cervelletto, il midollo spinale, le creste neurali (5). Queste cellule sono capaci di automantenersi ("self-renewing") e di generare neuroni e glia.

Le proprietà cellulari dei progenitori neurali embrionali sono state almeno parzialmente caratterizzate nel telencefalo, la regione di maggior complessità del cervello dei vertebrati. Nel cervello del topo i neuroni corticali sono generati principalmente tra il decimo e il diciassettesimo giorno di sviluppo embrionale. L'impiego di modelli cellulari in vitro, unitamente all'uso di modelli in vivo, ha permesso di dimostrare che durante la neurogenesi la glia radiale, in aggiunta al classico ruolo di cellula di supporto per la migrazione di neuroni, è essa stessa in grado di generare neuroni (6-8). Le cellule della glia radiale originano a partire dallo strato di cellule epiteliali del tubo neurale; queste cellule, caratterizzate dall'espressione di numerosi marcatori, tra i quali la proteina citoscheletrica nestina, l'antigene riconosciuto dall'anticorpo RC2, il trasportatore astrocitico del glutammato, i filamenti intermedi di vimentina, vanno precocemente a costituire la zona ventricolare (VZ) che rappresenta la zona neurogenica primaria del telencefalo dorsale. Queste cellule rappresentano la principale popolazione di progenitori neurali allo stadio E13/E14 e sono responsabili della generazione di neuroni, astrociti e oligodendrociti (7, 9, 10). Alcuni recenti studi hanno fornito evidenze sperimentali che suggeriscono che le NSC nel cervello di topi adulti originerebbero dalla glia radiale (10).

CELLULE STAMINALI NEURALI NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE DI MAMMIFERI ADULTI E AREE NEUROGENICHE

La presenza di NSC e la generazione di nuovi neuroni nel cervello di roditori adulti sembrerebbe ristretta a due aree cerebrali, quali la zona subventricolare (SVZ) e la zona sottogranulare (SGZ). L'esistenza di NSC multipotenti e dotate di "self-renewal" in tali aree è stata chiaramente dimostrata in vitro mediante l'uso di saggi di for-

mazione di neurosfere; tuttavia, le evidenze in vivo sono poco numerose. La persistenza della neurogenesi in altre aree cerebrali è, ad oggi, controversa (11).

La SVZ è una regione adiacente alla parete laterale dei ventricoli laterali da cui originano neuroblasti migranti in grado di differenziare ad interneuroni, una volta raggiunto il bulbo olfattivo. L'organizzazione cellulare della SVZ è stata parzialmente chiarita; in quest'area, sono presenti cellule con caratteristiche astrocita-simili, esprimenti la proteina fibrillare acida GFAP (le cellule B), che sono state proposte essere le vere NSC (12). Alcuni studi sembrerebbero tuttavia suggerire che nella SVZ le cellule ependimali, adiacenti al lume del tubo neurale, possano essere le cellule dalle quali originano nuovi neuroni (13). Un recente studio suggerisce che NSC derivate dalla SVZ siano dotate di un certo grado di diversità regione-specifica, che viene conservata anche dopo trapianto eterotopico (14). Tuttavia, questa potrebbe non essere una caratteristica comune a tutte le cellule precursori. Ad esempio, a livello ippocampale le NSC sembrerebbero mantenere un certo grado di plasticità, come indicato dal cambiamento del loro destino, da un differenziamento prevalentemente neuronale ad uno prevalentemente oligodendrocitario, a seguito della espressione del fattore trascrizionale Mash1 (15).

La SGZ è invece localizzata nel giro dentato e da essa originano i neuroni granulari ippocampali (3). Nel giro dentato di topi adulti, cellule proliferanti esprimono nestina e Sox-2 (due marcatori tipicamente espressi da cellule staminali) ma GFAP negative, sono state identificate come possibile sorgente per la generazione sia di cellule gliali che neuronali. La capacità autorigenativa e la multipotenzialità di questi progenitori sono state dimostrate in vitro e, recentemente, anche in vivo a livello di singola cellula, mediante impiego di retrovirus e lentivirus in studi di "fate-tracing" (16).

Nonostante le NSC possano essere isolate da numerose aree del cervello adulto, la neurogenesi sembrerebbe essere confinata alle sole SVZ e SGZ, definite nicchie neurogeniche. La nicchia neurogenica consiste di microaree specializzate a livello delle quali si realizza l'integrazione di segnali di varia natura in grado di modulare l'equilibrio tra proliferazione e differenziamento delle NSC. Numerosi tipi cellulari, inclusi astrociti, microglia, neuroni, cellule endoteliali, contribuiscono alla regolazione delle proprietà delle NSC attraverso il contatto cellula-cellula ed il rilascio di molecole diffusibili quali fattori di crescita, fattori neurotrofici, neurotrasmettitori e citochine (17-26).

FATTORI DI REGOLAZIONE DELLA NEUROGENESI ENDOGENA

Numerosi studi hanno dimostrato la continua produzione di nuovi neuroni nel cervello adulto e la modulazione di questo evento da parte di diversi stimoli di natura fisiologica. La neurogenesi nella SVZ è, ad esempio, regolata da arricchimento ambientale in odori e durante processi di apprendimento olfattivo (27), mentre nell'ippocampo la formazione di nuovi neuroni è modulata dal-

l'esercizio fisico e dall'arricchimento ambientale (28, 29).

È stato dimostrato che anche patologie neurodegenerative croniche e acute possono significativamente modulare l'attività neurogenica (30). Per esempio, studi in vivo condotti in modelli animali di ischemia cerebrale sia focale che globale hanno dimostrato l'induzione di neurogenesi in aree ectopiche, quali la regione ippocampale CA1 e lo striato (31-34). I nuovi neuroni generati nello striato di ratti ischemici assumono alcune proprietà di neuroni spinosi maturi e sopravvivono a distanza di mesi dall'evento ischemico (34). Alcuni studi condotti su cervelli umani, basati sull'impiego di marcatori di progenitori neurali (doublecortin) e marcatori di proliferazione (Ki67, PCNA) suggeriscono, analogamente a quanto osservato nei roditori, un aumento della neurogenesi in risposta a ischemia cerebrale (35,36).

L'induzione terapeutica di eventi autoriparativi nel cervello umano implica la possibilità di sviluppare protocolli basati su farmaco- e/o fisioterapia per il potenziamento della risposta neurogenica e il ripristino funzionale di aree danneggiate. I processi autoriparativi endogeni hanno ridotta efficacia, probabilmente perchè di ampiezza limitata. Si stima che il numero di neuroni rimpiazzati sia ben al disotto del 1% di quelli morti a seguito di un evento ischemico (34).

Numerosi studi in vivo suggeriscono che l'attivazione della risposta infiammatoria, mediata principalmente dalla microglia, possa modulare negativamente i livelli di neurogenesi endogena. La somministrazione di farmaci anti-infiammatori, quali ad esempio il non steroideo indometacina oppure la tetraciclina minociclina, sopprime la risposta infiammatoria ed è in grado di ristabilire livelli di neurogenesi prossimi a quelli osservati in animali di controllo (37, 38). Il ruolo dell'infiammazione nella regolazione della neurogenesi nell'adulto è tuttavia più complesso, come suggerito da recenti studi che hanno evidenziato effetti benefici della microglia attivata sulla neurogenesi e suggerito cautela nell'uso indiscriminato di terapie anti-infiammatorie (39). L'attivazione microgliale costituirebbe dunque un evento il cui esito anti- o pro-neurogenico dipenderebbe, di volta in volta, dall'equilibrio tra molecole pro- e anti-infiammatorie rilasciate (40).

Partendo da questa nuova visione del processo di attivazione microgliale appare evidente la necessità di chiarire l'azione dei mediatori solubili rilasciati dalla microglia e la comprensione dei loro effetti. Alcuni di questi mediatori potrebbero divenire essi stessi bersagli selettivi per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche.

COLTURE DI CELLULE STAMINALI NEURALI PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI DI CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE NELLA REGOLAZIONE DELLA NEUROGENESI

NSC possono essere isolate dal SNC sia embrionale che adulto di differenti specie, uomo incluso (12, 13, 18, 41-46). NSC vengono comunemente espansive in presenza di fattori di crescita, quali il fattore di crescita epiteliale (EGF) e il fattore basico di crescita dei fibroblasti (bFGF). Quando coltivate su substrati non adesivi, in

presenza di EGF e/o bFGF e in assenza di siero, le NSC formano strutture sferoidali tridimensionali note come neurosfere. Negli ultimi anni il saggio di formazione delle neurosfere è stato usato come parametro per definire la staminalità di una cellula o per determinare la presenza di cellule staminali in una data area cerebrale; nonostante l'impiego diffuso di tale saggio, è necessaria una certa cautela nell'estrapolazione e nell'interpretazione dei dati di quantificazione delle neurosfere formate (47).

La coltivazione delle NSC in forma di neurosfere presenta alcune importanti limitazioni. Le NSC cresciute come neurosfere, quando indotte a differenziare, generano astrociti con elevata efficienza, ma mostrano scarsa tendenza a formare neuroni (48). Questo sistema di coltura genera inoltre una certa eterogenità cellulare dovuta ad eventi di indirizzamento e differenziamento spontaneo che si realizzano anche in presenza di fattori di crescita. Per ovviare a tali limitazioni sono state in alternativa sviluppate colture in monostrato in adeguate condizioni di crescita. È stato dimostrato che colture di NSC di roditore, ottenute da aree quali la corteccia, lo striato e la SVZ prelevata da cervello adulto, nonché linee di progenitori neurali derivate da cellule embrionali staminali, possono essere espansive in monostrato utilizzando opportune miscele di fattori di crescita (EGF e bFGF) e specifici substrati di adesione (49-51). È interessante notare che, qualunque sia la loro origine, queste linee neurali assumono in vitro una serie di caratteristiche morfologiche e molecolari tipiche di cellule della glia radiale (49).

Recentemente, anche cellule corticali fetali umane sono state coltivate per numerosi passaggi in adesione senza evidenti modificazioni della loro potenzialità staminale (52). Il mantenimento di colture di NSC di derivazione clonale in adesione sembrerebbe un sistema particolarmente adatto per l'espansione di colture altamente omogenee, indifferenziate e capaci, quando deprivate di fattori di crescita, di differenziare e generare neuroni (oltre che glia) con alta efficienza (49). Tali colture costituiscono un sistema flessibile, adatto per studi di trasferimento di DNA esogeno e per studi di "live imaging".

Considerando i vantaggi legati all'impiego di colture di NSC in adesione, nei nostri laboratori abbiamo generato una serie di linee cellulari isolate da varie aree neurogeniche del SNC di topi sia adulti che embrionali. L'elevata omogeneità del sistema offre la possibilità di testare gli effetti di molecole di varia natura, come citochine, chemochine, fattori neurotrofici, ecc., sulle proprietà di cellule indifferenziate e multipotenti e di studiare, in un modello estremamente semplificato, i possibili meccanismi molecolari attraverso i quali esse agiscono. Abbiamo recentemente isolato, tra le altre, una linea di progenitori neurali corticali dal SN embrionale di topo allo stadio di sviluppo E13 (Figura 1). L'analisi immunocitochimica rivela che tutte le cellule, quando mantenute in presenza di EGF e bFGF, sono immunopositive per la proteina citoscheletrica nestina (un marcatore di cellule staminali; Figura 1C), mentre l'espressione di marcatori di cellule neuronali (β III tubulina e doublecortin) e astrocitarie (GFAP) è virtualmente assente (dato non mostra-

to). A seguito della rimozione dei fattori di crescita EGF e bFGF, la morfologia cellulare cambia drasticamente (Figura 1B); in queste condizioni l'espressione di nestina cala drammaticamente (dato non mostrato), mentre compaiono cellule immunoreattive per β III tubulina e GFAP (Figura 1D), indicando la capacità di queste cellule di generare sia cellule neuronali che gliali. L'analisi dei trascritti di marcatori neuronali e gliali mediante "polimerase chain reaction" conferma la validità di tale modello per lo studio delle proprietà di cellule staminali/progenitrici neurali in coltura. È interessante notare che le NSC corticali mantengono, anche dopo ripetuti passaggi in vitro, l'espressione di fattori trascrizionali importanti nei meccanismi di regionalizzazione del telencefalo dorsale, tra i quali Pax-6 e neurogenina-2. Viceversa, non si osserva l'espressione di fattori implicati nella formazione del telencefalo ventrale, tra i quali DLX-2.

Come accennato in precedenza, il nostro e altri gruppi hanno chiaramente dimostrato che le cellule microgliali sono importanti regolatori delle proprietà delle NSC sia in vivo che in vitro (37, 53, 54). È noto che la microglia attivata mediante una singola esposizione ad un prototipico agente infiammatorio, quale il lipopolisaccaride batterico (LPS), regola negativamente la sopravvivenza nonché il differenziamento delle NSC a neuroni (37,54). Viceversa, la microglia stimolata ripetutamente con LPS acquisisce un fenotipo permissivo per la sopravvivenza

e il differenziamento neuronale, caratterizzato dalla ridotta espressione di citochine pro-infiammatorie e la sostenuta o aumentata produzione di citochine anti-infiammatorie e molecole immunomodulatorie, quali la prostaglandina E2 (54, 55). Il rilascio di specifici fattori solubili, tra i quali citochine pro- e anti-infiammatorie, sembrerebbe differentemente modulato in relazione con il perdurare della stimolazione. In particolare, l'interleuchina-1 α (IL-1 α) è abbondantemente rilasciata dalla microglia stimolata per tempi brevi con LPS, mentre il suo rilascio e la sintesi del messaggero sembrerebbero ridotte dopo prolungata esposizione a LPS. Questo suggerisce che IL-1 α possa essere un'importante mediatore degli effetti anti-neurogenici della microglia acutamente attivata (54).

La complessità dei terreni condizionati da microglia o l'impiego di co-culture di NSC e microglia rendono difficile la valutazione degli effetti di un singolo fattore sul destino cellulare delle NSC. Per ovviare a questo inconveniente si può aggiungere direttamente il fattore di interesse, ad es. una citochina ricombinante pura, a colture di NSC. Dati preliminari suggeriscono che l'aggiunta di IL-1 α influenza in destino differenziativo delle NSC, promuovendone il differenziamento gliale senza modificarne l'indirizzamento neuronale. IL-1 α sembrerebbe inoltre regolare negativamente la sopravvivenza delle NSC. Per la valutazione della tossicità sono stati allestiti test per il dosaggio dell'attività della lattico deidrogenasi (LDH)

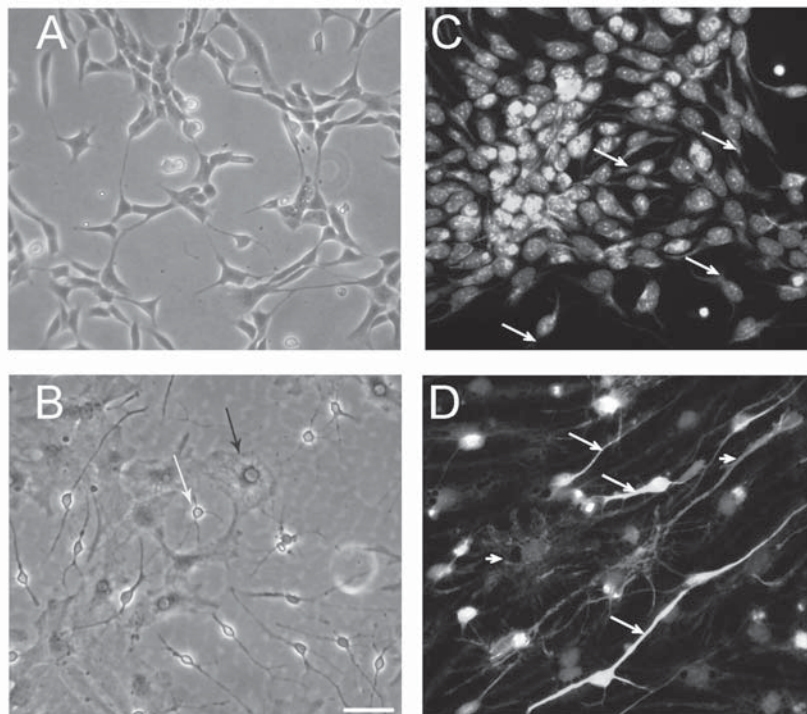


Figura 1

Colture di cellule neurali multipotenti corticali isolate da embrioni di topo dopo 13,5 giorni di sviluppo.

Le microfotografie A e B mostrano, rispettivamente, la morfologia di cellule proliferanti, cresciute in presenza di fattori di crescita e di cellule differenziate mediante rimozione dei fattori di crescita dal terreno di coltura. Nel pannello B sono morfologicamente riconoscibili neuroni (freccia bianca) e cellule astrocitarie (freccia nera). La microfotografia C mostra cellule immunopositive per la proteina citoscheletrica nestina (tutte le cellule sono positive, le frecce ne indicano solo alcune). La microfotografia D mostra neuroni e astrociti esprimenti, rispettivamente, il marcatore neuronale β III tubulina (frecce) e quello astrocitario GFAP (punte di freccia). La colorazione di tutti i nuclei cellulari è dovuta all'aggiunta del colorante nucleare Hoechst.

rilasciata nel terreno di coltura da cellule morte o danneggiate. Il rilascio di LDH (normalizzato rispetto all'attività LDH intracellulare) raggiunge la significatività statistica, rispetto alle colture di controllo, alla dose 3000 ng/L.

Analoghi studi *in vitro*, condotti su colture di progenitori ipocampali, hanno dimostrato che l'aggiunta di "tumor necrosis factor- α " (TNF- α) o di interleuchina-6 (IL-6), citochine pro-infiammatorie abbondantemente prodotte dalla microglia attivata, esercitano entrambe effetti antineurogenici sia pure attraverso meccanismi differenti. Mentre il TNF- α incrementa significativamente la morte cellulare probabilmente attraverso l'attivazione di eventi di apoptosi (56), l'effetto antineurogenico dell'IL-6 sembrerebbe principalmente dovuto all'inibizione dell'indirizzamento dei progenitori neurali a neuroni piuttosto che ad un effetto negativo sulla sopravvivenza (37).

Occorre comunque sottolineare la necessità di valutare gli effetti di queste citochine sia in sistemi di coltura più complessi che *in vivo*. È possibile che una data citochina eserciti un'effetto differente a seconda della complessità del contesto nel quale si trova. È stato, per esempio, osservato che l'aggiunta dell'IL-1 β a progenitori neurali umani fetali in coltura aumenta il loro differenziamento a cellule gliali. Viceversa, la neutralizzazione di questa citochina nel terreno condizionato da macrofagi umani attivati mediante l'uso di un anticorpo inibitore non modifica significativamente gli effetti sul differenziamento dei progenitori neurali del terreno neutralizzato rispetto al terreno in cui l'IL-1 β non era stata inibita (57).

COLTURE DI CELLULE STAMINALI NEURALI PER LO STUDIO DI PATOLOGIE DEL SISTEMA NERVOSO E STUDI FARMACOLOGICI

Numerosi studi clinici, anche in fase avanzata di sperimentazione, hanno dimostrato l'inefficacia di molti trattamenti farmacologici. Questo può essere in parte dovuto alla mancanza di modelli sperimentali predittivi adeguati. Lo sviluppo di adeguati modelli cellulari umani potrebbe quindi rappresentare un nuovo importante strumento per la miglior comprensione dei meccanismi alla base di importanti patologie e per la valutazione di nuovi farmaci.

L'uso delle NSC permette la parziale ricapitolazione *in vitro* degli eventi di sviluppo del SN. Questo sistema cellulare offre la possibilità di studiare gli effetti di specifiche sostanze sul "self-renewal", la proliferazione, l'indirizzamento verso un determinato destino neurale e il differenziamento di cellule multipotenti. Come già detto, colture di NSC possono essere isolate da differenti aree cerebrali; tale opportunità, unitamente al mantenimento in coltura di un certo grado di identità regionale, costituisce un importante sistema per lo studio degli effetti di specifiche molecole su tipi cellulari provenienti da aree specializzate. È importante sottolineare che l'ottenimento di NSC da determinate aree cerebrali [così come la derivazione di linee di NSC a partire da cellule staminali embrionali (ES)] può costituire un'importante strumento per la derivazione di appropriati modelli cellulari per lo

studio dei processi patologici, alternativo all'ingegnerizzazione di linee geneticamente modificate o trasformate (un sistema, quest'ultimo, con una ridotta rilevanza per lo studio della patologia, a causa delle numerose modificazioni introdotte). Numerosi modelli animali per lo studio di patologie neurodegenerative croniche, quali la malattia di Huntington, sono oggi disponibili (58). L'isolamento di cellule fetali dalle aree di interesse (lo striato per l'Huntington) potrebbe rappresentare, nel prossimo futuro, un'utile modello per lo studio *in vitro* dei meccanismi associati ai processi degenerativi, nonché per la generazione di neuroni GABAergici (la principale popolazione di neuroni striatali colpita nell'Huntington è costituita da neuroni spinosi GABAergici) utilizzabili per l'identificazione e la valutazione di nuovi farmaci potenzialmente utilizzabili in clinica.

La possibilità di derivare linee di NSC dal cervello fetale umano presenta il vantaggio di poter studiare eventi cellulari e molecolari direttamente su materiale umano, evitando il problema dell'estrapolazione dei dati ottenuti da altre specie. Essendo possibile mantenere, mediante l'impiego di specifici fattori di crescita, queste cellule in coltura per tempi estremamente lunghi (immortalizzazione epigenetica), sono superate le limitazioni dovute alla scarsa disponibilità di materiale, che si ha quando si lavora con colture primarie. Inoltre, la derivazione di tali linee cellulari permette di superare alcuni dei limiti legati alla mancanza di modelli animali capaci di ricapitolare adeguatamente la patologia umana. Un esempio a tal proposito è rappresentato dai modelli animali di sindrome di Down, associata alla trisomia del cromosoma 21. Topi trisomici per il cromosoma 21 non costituiscono un modello adeguato per lo studio della sindrome di Down, in quanto la maggior parte dei geni che nell'uomo mappano sul cromosoma 21 nel topo si trovano sul cromosoma 16. Topi trisomici per il cromosoma 16 sono comunque non vitali. Conseguentemente, alcuni dei modelli murini di Down sono basati sull'uso di topi con duplicazioni sintetiche del cromosoma 16 o sulla generazione di topi transgenici per uno o più geni (59). Linee di NSC corticali sono state derivate da cervelli fetali normali e da feti affetti da trisomia del 21. La derivazione di NSC dall'area corticale è motivata dal fatto che la corteccia è una delle regioni caratterizzata da importanti difetti neuroanatomici nella sindrome di Down. Studi basati sull'impiego di "microarray" hanno evidenziato una serie di geni coinvolti nello sviluppo corticale che risultano essere repressi in neurosfere da feti trisomici (60); queste colture costituiscono un eccellente sistema per lo studio dello sviluppo del sistema nervoso in presenza di trisomia del cromosoma 21 e possono fornire un approccio complementare all'impiego di modelli animali per la comprensione della sindrome di Down.

Per un più largo ed efficace impiego futuro delle NSC è necessaria l'acquisizione di nuove conoscenze circa i meccanismi di base che presiedono al controllo delle loro proprietà cellulari. Importante sarà l'individuazione di molecole capaci di regolare l'indirizzamento di queste cellule verso un fenotipo neuronale piuttosto che gliale, in modo da ottenere popolazioni virtualmente pure di

neuroni, astrociti o oligodendrociti. A tal fine sono stati avviati alcuni studi di screening su larga scala di farmaci e composti attivi. Uno screening di questo tipo è stato condotto da Saxe et al. su neurosfere primarie preparate a partire da cervello di ratto embrionale per identificare composti che siano in grado di indurre il differenziamento in senso neuronale (61). Analoghi studi, basati sull'impiego di "microarray", sono stati condotti su progenitori neurali umani cresciuti su matrici di diversa natura, sulle quali erano immobilizzati vari tipi di morfogeni (62). In questo modo sono stati identificati composti in grado di indirizzare le cellule verso la linea neuronale piuttosto che gliale.

GENERAZIONE DI LINEE DI CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI OTTENUTE DA PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE

Negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato che cellule somatiche adulte, attraverso la forzata espressione di più fattori di trascrizione (quali SOX-2, octamer 4, kruppel-like factor 4 e c-MYC), possono essere riprogrammate e quindi indotte a iPS (63-66). Recentemente, linee stabili di iPS sono state ottenute da pazienti affetti da diverse patologie genetiche, mediante l'espressione in fibroblasti di fattori di riprogrammazione, ottenuta attraverso infezioni con retrovirus. Queste linee cellulari offrono la possibilità di ricapitolare in vitro eventi associati allo sviluppo della patologia umana. Linee di iPS sono state ottenute da pazienti affetti da Parkinson, patologia di Huntington e sindrome di Down (67). La generazione di linee di iPS da pazienti affetti da sindrome di Down, oltre che di linee di ES derivate da embrioni generati mediante fertilizzazione in vitro e individuati come trisomici al momento della diagnosi pre-impianto, presenta alcuni potenziali vantaggi. È, ad esempio, importante considerare che più del 40% delle trisomie 21 non sono compatibili con la vita intrauterina; cellule derivate direttamente dal paziente presenteranno dunque modificazioni genetiche ed epigenetiche necessariamente compatibili con la vita. La disponibilità di tali linee, unitamente alla storia clinica del paziente, potrebbero essere molto informative per lo sviluppo della ricerca a livello clinico. Dimos et al. (68) hanno recentemente generato iPS da un paziente affetto da una forma familiare di sclerosi amiotrofica laterale (SLA), una patologia neurodegenerativa caratterizzata dalla progressiva perdita di neuroni nel midollo spinale e della corteccia motoria (69). Tali cellule possono essere differenziate in vitro a motoneuroni, come suggerito dalla co-espressione del marcatore β III tubulina e del fattore trascrizionale specifico dei motoneuroni HB9 e dall'espressione di una serie di altri marcatori, tra i quali Islet 1/2 e l'enzima colina acetiltransferasi (68). Queste cellule, oltre a fornire un possibile modello cellulare di patologia, potrebbero rappresentare un eccellente modello per la scoperta di nuovi farmaci capaci, per esempio, di bloccare o rallentare la progressiva perdita di motoneuroni in pazienti affetti da SLA.

Cellule iPS isolate direttamente da pazienti possono

dunque costituire un'importante strumento nella ricerca di base per lo screening di nuovi farmaci e per lo sviluppo di una terapia genica combinata con la terapia cellulare (70). Per esempio, la sostituzione ex vivo di geni mutati in cellule iPS ottenute da un paziente e il successivo reimpianto di queste cellule, una volta che siano state opportunamente indirizzate verso uno specifico destino differenziativo, potrebbe rappresentare in futuro un'utile strategia per il trattamento di diverse patologie su base genica.

CONCLUSIONI

L'interesse crescente verso la produzione e la caratterizzazione di colture di linee neurali staminali sia murine che umane è testimoniato dall'enorme numero di pubblicazioni sull'argomento prodotte negli ultimi anni. Crescente interesse ruota intorno allo studio delle proprietà di queste cellule da molti considerate come possibile sorgente per la produzione in vitro di tipi cellulari specializzati, utilizzabili per lo sviluppo della terapia cellulare basata sulla sostituzione, tramite trapianto, di cellule cerebrali morte a seguito di patologie neurodegenerative (71). La ricerca di base, combinando approcci metodologici in vivo e in vitro, può contribuire all'identificazione di regolatori chiave della neurogenesi. La comprensione dell'interazione delle NSC con cellule specializzate (es., microglia, astrociti o cellule endoteliali), unitamente all'identificazione dei mediatori di queste interazioni, sono di primaria importanza per l'identificazione di nuovi bersagli cellulari e molecolari per lo sviluppo di nuove terapie finalizzate al potenziamento dei meccanismi di neurogenesi endogena.

La generazione di linee neurali staminali, direttamente ottenute dal SNC oppure da cellule ES o possibilmente da iPS, costituisce inoltre un'utile modello cellulare per lo studio dei meccanismi di sviluppo del SN, anche in situazioni patologiche e per la valutazione di nuovi farmaci. Nonostante le enormi potenzialità applicative, molti sforzi sono ancora necessari per lo sviluppo di protocolli adeguati per un'efficace e sicura manipolazione delle proprietà di queste linee cellulari. Per esempio, sebbene la riprogrammazione di cellule somatiche a cellule multipotenti renda disponibili linee isolate da pazienti affetti da diverse patologie geniche, aggirando tra l'altro problematiche di natura etica legata all'impiego di ES, la procedura sperimentale implica il trasferimento di vettori retrovirali e geni potenzialmente oncogeni nel DNA della cellula ospite. Queste modificazioni, per ovvie ragioni di sicurezza, rendono al momento l'impiego di queste cellule impossibile da un punto di vista terapeutico. Rimane ancora in parte da chiarire la rilevanza di un modello cellulare così profondamente alterato per lo studio di meccanismi patologici.

Per un ampio ed efficace impiego futuro sarà cruciale l'individuazione dei meccanismi che regolano l'indirizzamento di queste cellule verso un fenotipo neuronale piuttosto che gliale in modo da ottenere popolazioni virtualmente pure di neuroni, astrociti o oligodendrociti. L'individuazione di segnali (piccole molecole, farmaci,

proteine) capaci di indirizzare linee neurali a popolazioni pure di neuroni dotati di un determinato fenotipo (GABAergico piuttosto che glutammatergico) rappresenta una delle principali sfide verso la comprensione della biologia delle NSC e costituisce uno dei punti di base per lo sviluppo di adeguati protocolli che permettano l'efficace differenziamento di ES o iPS a tipi cellulari specializzati.

BIBLIOGRAFIA

- Cajal S. Estudios sobre la degeneracion y regeneracion del sistema nervioso. Madrid: Imprenta de Hijos de Nicolas Moya, 1913.
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965;124:319-35.
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287:1433-8.
- Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 2003;13:127-32.
- Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001;414:112-7.
- Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 2000;127:5253-63.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, et al. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 2001;409:714-20.
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, et al. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 2004;41:881-90.
- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, et al. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 2003;37:751-64.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, et al. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17528-32.
- Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 2007;8:481-8.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999;97:703-16.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999;96:25-34.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 2007;317:381-4.
- Jessberger S, Toni N, Clemenson GD et al. Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 2008;11:888-93.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, et al. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 2007;1:515-28.
- Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, et al. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 2006;26:9703-12.
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004;427:740-4.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, et al. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2008;3:279-88.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004;304:1338-40.
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, et al. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 2006;54:815-25.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002;417:39-44.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 2000;28:713-26.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 2000;425:479-94.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, et al. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 2008;3:289-300.
- Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 2004;7:726-35.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:179-93.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002;415:1030-4.
- Olson AK, Eadie BD, Ernst C, et al. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* 2006;16:250-60.
- Curtis MA, Faull RL, Eriksson PS. The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:712-23.
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 2006;24:739-47.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 2006;26:6627-36.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110:429-41.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8:963-70.
- Jin K, Wang X, Xie L, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:13198-202.
- Macas J, Nern C, Plate KH, et al. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci* 2006;26:13114-9.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003;302:1760-5.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, et al. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13632-37.
- Ajmone-Cat MA, Cacci E, Minghetti L. Non steroidal anti-inflammatory drugs and neurogenesis in the adult mammalian brain. *Curr Pharm Des* 2008;14:1435-42.
- Minghetti L, Ajmone-Cat MA, De Berardinis MA, et al. Microglial activation in chronic neurodegenerative diseases: roles of apoptotic neurons and chronic stimulation. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48:251-6.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian cen-

- tral nervous system. *Science* 1992;255:1707-10.
42. Englund U, Fricker-Gates RA, Lundberg C, et al. Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections. *Exp Neurol* 2002;173:1-21.
 43. Carpenter MK, Cui X, Hu ZY, et al. In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol* 1999;158:265-78.
 44. Vescovi AL, Parati EA, Gritti A, et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 1999;156:71-83.
 45. Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ, et al. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res* 2003;74:838-51.
 46. Cacci E, Villa A, Parmar M, et al. Generation of human cortical neurons from a new immortal fetal neural stem cell line. *Experimental Cell Research* 2007;313:588-601.
 47. Singec I, Knoth R, Meyer RP, et al. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology *Nat Methods* 2006;3:801-6.
 48. Winkler C, Fricker RA, Gates MA, et al. Incorporation and glial differentiation of mouse EGF-responsive neural progenitor cells after transplantation into the embryonic rat brain. *Mol Cell Neurosci* 1998;11:99-116.
 49. Conti L, Pollard SM, Gorba T, et al. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 2005;1594-606.
 50. Bibel M, Richter J, Schrenk K, et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci* 2004;7:1003-9.
 51. Pollard SM, Conti L, Sun Y, et al. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex* 2006;16:112-20.
 52. Sun Y, Pollard S, Conti L, et al. Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol Cell Neurosci* 2008;38:245-58.
 53. Ajmone-Cat MA, Cacci E, Minghetti L. Brain inflammation and the neuronal fate: from neurogenesis to neurodegeneration. In: Maiese K, ed. *Neurovascular Medicine: Pursuing cellular longevity for healthy aging*. New York: Oxford University Press 2009:319-44.
 54. Cacci E, Ajmone-Cat MA, Anelli T, et al. In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia* 2008;56:412-25.
 55. Ajmone-Cat MA, Nicolini A, Minghetti L. Prolonged exposure of microglia to lipopolysaccharide modifies the intracellular signaling pathways and selectively promotes prostaglandin E2 synthesis. *J Neurochem* 2003;87:1193-203.
 56. Cacci E, Claassen JH, Kokaia Z. Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res* 2005;80:789-97.
 57. Peng H, Whitney N, Wu Y, et al. HIV-1-infected and/or immune-activated macrophage-secreted TNF-alpha affects human fetal cortical neural progenitor cell proliferation and differentiation. *Glia* 2008;56:903-16.
 58. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996;87:493-506.
 59. Bhattacharyya A, Svendsen CN. Human neural stem cells: a new tool for studying cortical development in Down's syndrome. *Genes Brain Behav* 2003;2:179-86.
 60. Bahn S, Mimmack M, Ryan M, et al. Neuronal target genes of the neuron-restrictive silencer factor in neurospheres derived from fetuses with Down's syndrome: a gene expression study. *Lancet* 2002;359:310-5.
 61. Saxe JP, Wu H, Kelly TK, et al. A phenotypic small-molecule screen identifies an orphan ligand-receptor pair that regulates neural stem cell differentiation. *Chem Biol Sep* 2007;14:1019-30.
 62. Soen Y, Mori A, Palmer TD, et al. Exploring the regulation of human neural precursor cell differentiation using arrays of signaling microenvironments. *Mol Syst Biol* 2006;2:37.
 63. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2883-8.
 64. Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008;451:141-6.
 65. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-72.
 66. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-20.
 67. Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008;134:877-86.
 68. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008;321:1218-21.
 69. Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:710-23.
 70. Rubin LL. Stem cells and drug discovery: the beginning of a new era? *Cell* 2008;132:549-52.
 71. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 2006;441:1094-6.