



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
TECNOLOGIE AVANZATE IN BIOMEDICINA**

CICLO

XXI

**“Investigazione del ruolo biologico di reelin, proteina extracellulare
cerebrale, nelle cellule staminali neurali murine dell’adulto”**

Simone Massalini

A.A. 2008/2009

**Tutor: Prof.sa Maria Giulia Farace
Prof.sa Silvia Anna Ciafré**

Coordinatore: Prof. Luigi Spagnoli

INTRODUZIONE

- **Cellule staminali adulte.....4**
- **Cellule staminali neurali.....9**
- **Migrazione neurale nello sviluppo.....14**
- **Mutante neurologico Reeler.....17**
- **Reelin: struttura genica e proteica.....20**
- **Meccanismi molecolari di azione di Reelin.....23**
- **Possibile legame con le malattie neurologiche.....29**

SCOPO DEL LAVORO.....30

MATERIALI E METODI

- **Estrazione delle cellule staminali neurali murine.....31**
- **Genotipizzazione.....33**
- **Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e PCR.....35**
- **Saggi di formazione e crescita delle neurosfere.....36**
- **Saggio della migrazione a catena.....37**
- **Saggio della migrazione con le camere di boyden.....38**
- **Differenziamento.....39**

• Immunofluorescenza.....	40
• Produzione di Reelin ricombinante	41
• Ingegnerizzazione delle cellule staminali neurali.....	44
• Raccolta dei sovranatanti e western blot.....	45
• Soluzioni utilizzate e terreni di crescita batterici	46
• Analisi statistica.....	47

RISULTATI

• Estrazione e caratterizzazione delle cellule staminali neurali murine da topi wild-type e da topi reeler.....	48
• Le cellule staminali neurali reeler mostrano alterazioni nella formazione delle neurosfere e della crescita cellulare.....	52
• Le cellule staminali neurali in assenza di Reelin sono incapaci di aggregarsi tra loro per formare distinte catene migratorie.....	53
• Le cellule staminali neurali reeler mostrano una ridotta neurogenesi rispetto alle wild-type, mentre la gliogenesi permane invariata.....	58
• L'aggiunta di Reelin ricombinante al mezzo di coltura determina un ripristino delle proprietà migratorie a catena delle cellule staminali neurali reeler.....	61

• L'aggiunta di Reelin ricombinante ripristina il normale tasso di neurogenesi nelle cellule staminali neurali reeler.....	63
• Le cellule staminali neurali murine sono trasducibili ed esprimono efficacemente la proteina ricombinante indotta.....	65
• Le cellule staminali neurali reeler, ingegnerizzate per esprimere la proteina Reelin, mostrano un ritorno alla condizione wild-type dei livelli di neurogenesi e una maggiore tendenza alla migrazione a catena.....	66
DISCUSSIONE.....	68
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....	76
BIBLIOGRAFIA.....	78

Abbreviazioni utilizzate nella descrizione della tesi:

NSC cellule staminali neurali (neural stem cells)

SVZ zona sottoventricolare (*subventricular zone*)

VLDLR very low density lipoprotein receptor

EGF epidermal growth factor

bFGF basic fibroblastic growth factor

INTRODUZIONE

Cellule staminali adulte

Le cellule staminali rappresentano sicuramente uno degli argomenti più affascinanti e studiati della biologia moderna. Grandi speranze si fondano sulla conoscenza di queste particolari cellule dalle proprietà uniche che, in linea di principio, potrebbero contenere al loro interno il potenziale per curare ogni tipo di malattia generata da perdita di tessuto. Una nuova branca della medicina, definita rigenerativa, vuole arrivare proprio a questo risultato ricreando *in vitro* organi funzionanti.

Le cellule staminali, per essere definite tali, devono possedere due importanti caratteristiche che ne permettono l'attività biologica. La prima è senza dubbio la capacità differenziativa, ovvero di trasformarsi in cellule mature specializzate in particolari funzioni biologiche, che la cellula staminale originaria non era in grado di esprimere. La seconda e ugualmente importante caratteristica, propria anch'essa di tutte le staminali conosciute, è la proliferazione con lo scopo del mantenimento nel tempo del gruppo di cellule originario (spesso indicato con il termine inglese *self-renewal*). Grazie a questa proprietà, l'organismo può rigenerare tessuti,

qualora esso sia previsto, nel corso dell'intera esistenza, non andando però a diminuire la quantità totale di cellule staminali residenti.

Il primo e più intuitivo processo nel quale le cellule staminali intervengono è lo sviluppo embrionale, che è portato avanti proprio da un susseguirsi di proliferazione e differenziamento, a partire da cellule che hanno una potenzialità generativa pressoché totale. Per questo motivo sono definite cellule staminali totipotenti e sono rappresentate dalle prime derivazioni dell'uovo fecondato. Prendono il nome di staminali embrionali (ES, embryonic stem) e sono presenti unicamente durante lo sviluppo embrionale. Dopo la completa formazione dell'organismo si mantengono, unicamente in certe aree dove hanno un significato biologico, cellule staminali che hanno perso la totipotenza essendo già indirizzate verso un particolare tipo cellulare, che dipende dal distretto nel quale sono ospitate. Questa più ristretta potenzialità differenziativa si definisce multipotenza e le cellule implicate sono definite genericamente "staminali adulte". Il loro compito è quello di sostituire particolari tipi cellulari che devono essere rinnovati frequentemente (come ad esempio i globuli rossi) o che hanno subito un danneggiamento in seguito a traumi o malattie (Laird DJ *et al* 2008).

Le cellule staminali adulte differiscono profondamente dalle embrionali, non solo per la capacità differenziativa ma anche per numerose altre caratteristiche. Per esempio a livello molecolare sono facilmente separabili e riconoscibili, grazie all'espressione differenziale di numerosi geni, spesso fattori di trascrizione o proteine strutturali legate al citoscheletro. Alcuni sono associati alla totipotenza e quindi unicamente espressi nelle embrionali, come Nanog e Oct4 (Boiani M & Scholer HR, 2005). Nel caso delle cellule ematopoietiche ci sono addirittura delle

differenze tra staminali adulte e staminali fetali, ovvero le cellule residenti nel feto che si occupano delle fasi finali dell'organogenesi, quando ormai le cellule ES sono completamente scomparse. In questi casi è importante il ruolo del fattore di trascrizione Sox17, che scompare invece nelle staminali adulte per lasciare il posto ad altri fattori, come Gfi1 ed Etv6 (Kim *et al* 2007, Hock *et al* 2004).

Un processo altamente conosciuto e caratterizzato, dove intervengono le staminali adulte, è ovviamente l'ematopoiesi, nel quale le HSC (*hematopoietic stem cells*) oltre a rigenerare continuamente sia le cellule della linea rossa che quelle della linea bianca, si occupano anche della sorveglianza e della risposta immunitaria contro i patogeni (Massberg *et al*, 2007). Parimenti, ben nota è la rigenerazione muscolare che avviene in seguito a lesioni di vario tipo. In questo caso intervengono le cellule satelliti, residenti nel muscolo stesso, che si attivano, proliferano e differenziano in nuove fibre muscolari (Hawke and Garry, 2001).

Alla base della rigenerazione, qualunque sia l'evento scatenante, c'è la capacità migratoria che permette alle cellule staminali adulte di raggiungere il sito bersaglio. Per coprire grandi distanze le cellule ricorrono al sistema sanguigno, così da poter avere un rapido e capillare accesso a tutto l'organismo. Gli organi bersaglio le catturano grazie ad interazioni con particolari cellule endoteliali che permettono la fuoriuscita dal circolo sanguigno e la finale rigenerazione del tessuto. Altre volte invece, le staminali si muovono direttamente per movimenti di tipo ameboide, attraverso gli spazi interstiziali del parenchima. (Laird DJ *et al*, 2008). I processi molecolari che stanno alla base di questa migrazione sono molteplici e probabilmente dipendenti dal contesto extracellulare, ma è noto almeno un processo condiviso da diversi sistemi, ovvero quello dell'SDF1 α . Questa

citochina funziona da attrattante della cellula staminale, legandosi al suo recettore CXCR4, essendo prodotta e secreta nelle regioni che devono essere rigenerate. E' stata dimostrata sperimentalmente l'implicazione di questa via nella rigenerazione di numerosi organi come fegato, muscolo e cervello (Broxmeyer *et al* 2005, De Paepe *et al* 2004, Imitola *et al* 2004).

Il differenziamento implica una serie di sconvolgimenti cellulari che partono dall'espressione genica e arrivano alla morfologia cellulare, con conseguente acquisizione di nuove funzioni. Vista la grande quantità di possibili prodotti cellulari, le vie di differenziamento sono numerosissime e intensamente studiate. Molto utile a tale scopo è la conoscenza di efficaci marcatori molecolari, ovvero determinate proteine che vengono espresse unicamente in uno stadio differenziativo ben preciso e che possono quindi fornire importanti informazioni riguardo alla cellula che si sta osservando. Purtroppo non si dispone ancora di una grande varietà di marcatori univoci e di conseguenza di una piena conoscenza dei processi differenziativi in dettaglio. La regolazione genica del differenziamento implica praticamente tutti i sistemi regolativi conosciuti, dai semplici fattori di trascrizione, come i già citati Nanog e Oct4, ai più complessi circuiti post-trascrizionali, come i microRNA e le RNA binding protein (Sinkkonen *et al*, 2008), o all'epigenetica (Yoshida *et al*, 2008).

Nome	Sede	Potenziale Differenziativo	Referenza
Neurali	cervello	tessuto nervoso	Gage 2000
Ematopoietiche	midollo osseo	cellule sanguigne	Huang 2007
Mesenchimali	midollo osseo	tessuto adiposo e connettivo	Porada 2006
Satelliti	tessuto muscolare	fibre muscolari	Cao 2004
Mesangioblasti	vasi sanguigni	fibre muscolari	Cossu 2003
Epidermiche	follicolo pilifero	tessuto epidermico e nervoso	Hoffman 2006
Epatiche	fegato	cellule epatiche	Alison 2005

Tabella 1: principali classi di cellule staminali adulte dei mammiferi. Sono indicati l'organo dove risiedono e i principali prodotti del loro differenziamento.

Cellule staminali neurali

Per moltissimo tempo il cervello dei vertebrati è stato considerato l'organo post-mitotico per eccellenza, a causa delle severe e apparentemente irreversibili conseguenze delle lesioni cerebrali. Destò molto clamore, quindi, la scoperta di cellule con proprietà staminali residenti non solo nel cervello embrionale, ma anche in quello adulto. (Gage 2000, Zhao *et al* 2008) Queste cellule, chiamate NSC (*neural stem cells*), mostrano capacità proliferativa e ovviamente multipotenza, potendo differenziarsi fondamentalmente in tutti i tipi di cellula facente parte del sistema nervoso centrale, ovvero neuroni (e tutte le numerose sottoclassi), astrociti e oligodendrociti. Le due maggiori aree di neurogenesi dell'adulto sono la zona sottoventricolare (SVZ, *subventricular zone*) del ventricolo laterale e la zona sottogranulare (SGZ, *subgranular zone*) del giro dentato dell'ippocampo. Si ritiene che tutte le cellule staminali neurali, eventualmente presenti in altre aree, siano in realtà originate in queste due zone.

Nella SGZ è presente una popolazione eterogenea di cellule, principalmente suddivisa in tipo 1, esprimenti sia il marcatore staminale nestina che il marcatore gliale GFAP (*glial fibrillary acid protein*), e tipo 2, esprimenti solo i marcatori staminali. Entrambi i tipi cellulari possiedono caratteristiche staminali e sono a stretto contatto con la fitta rete neurale del giro dentato. Probabilmente i neurotrasmettitori presenti hanno un ruolo regolativo, così come i numerosi astrociti presenti che, rilasciando le BMP (*bone morphogenic proteins*), promuovono la proliferazione delle staminali (Suh *et al*, 2007). Anche la SVZ è composta da un insieme molto vario di tipi cellulari, come mostrato in figura 1.

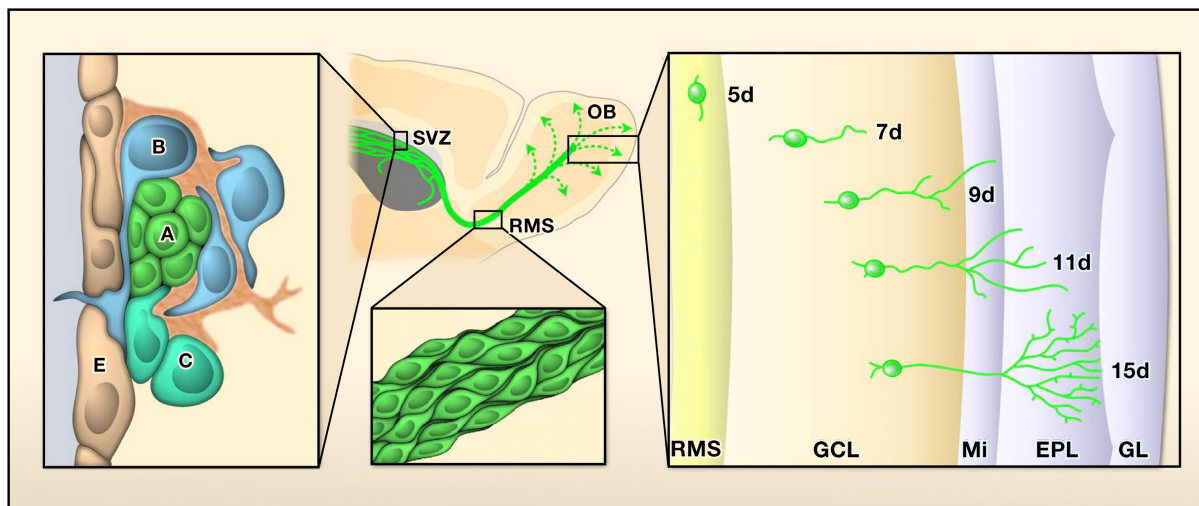


Fig. 1 Organizzazione della zona sottoventricolare del cervello dei mammiferi. Si notano i tre sottotipi cellulari di staminali neurali (A,B e C) a stretto contatto con le cellule ependimali (E). Inoltre è rappresentata la migrazione lungo la via di migrazione rostrale (RMS), in catene compatte che giungono fino al bulbo olfattorio (OB), dove si distaccano dalla catena centrale, maturano in neuroni e si integrano nel circuito neurale preesistente. GCL= strato cellule granulari, Mi= strato mitrale, EPL= strato esterno plexiforme, GL= strato glomerulare. (Zhao *et al* 2008)

Le cellule indicate con A corrispondono ai neuroblasti migranti, ovvero cellule già indirizzate verso il destino neurale e dotate di un'attiva capacità migratoria. Le cellule B esprimono la GFAP e sono relativamente quiescenti, mentre le cellule C mostrano una marcata proliferazione. A stretto contatto con queste staminali sono sia il sottile strato ependimale del ventricolo che le cellule endoteliali dei vasi sanguigni, i quali sembrano creare il microambiente adatto al sostentamento, rilasciando vari fattori di crescita. (Cao *et al*, 2004) Quest'ultimi sono di vitale importanza per quanto riguarda il mantenimento dello stato indifferenziato delle cellule staminali neurali, come ampiamente dimostrato da molti studi sia *in vivo* che *in vitro*. In particolare l'EGF (*epidermal growth factor*) blocca il

differenziamento delle cellule C mentre l'FGF2 (*fibroblast growth factor*) promuove genericamente la proliferazione nella zona sottoventricolare (Doetsch, 2002).

I neuroblasti della zona sottoventricolare migrano dal loro sito di genesi verso la regione frontale del cervello, il bulbo olfattorio, formando una regione piuttosto estesa chiamata "via di migrazione rostrale" o *rostral migratory stream* (RMS). Il tipo di migrazione è peculiare, infatti differisce notevolmente dal noto meccanismo della glia radiale (Nadarajah 2003). Viene definita migrazione a catena, in quanto le cellule si dispongono in lunghi cordoni, aderendo le une alle altre e formando lunghe catene che giungono fino al bulbo olfattorio. Il processo implica interazioni cellula/cellula e cellula/matrice e può essere descritto come uno slittamento reciproco, dove nessun altro tipo cellulare partecipa strutturalmente alla catena. Le basi molecolari non sono conosciute, ad eccezione di un meccanismo che coinvolge il recettore ErbB4 e il sistema SDF1 α /CXCL4R (Anton *et al* 2004, Imitola *et al* 2004). Una volta raggiunto il bulbo olfattorio, i neuroblasti continuano a migrare assumendo però un tipo di migrazione più conforme alla radiale e parallelamente iniziano il differenziamento verso neurone maturo. Nella zona sottogranulare invece troviamo una migrazione di minore entità, dove le cellule si addentrano nello strato di cellule granulari a breve distanza dal loro sito d'origine. Anche in questo caso abbiamo il differenziamento in neuroni che si integrano nel circuito preesistente. (Zhao C *et al*, 2008)

Malgrado la presenza delle cellule staminali neurali, il cervello rimane un organo impossibile da rigenerare a livello fisiologico e la perdita di materiale cerebrale non può essere recuperata. Il motivo di questa apparente discrepanza risiede nel fatto che le staminali si occupano per la maggior parte di neurogenesi "di piccola entità"

che interviene in processi quali l'apprendimento e la memoria, dove si vanno a modificare dei circuiti neurali e l'effettiva aggiunta di nuove cellule nervose è modesta. Molti lavori sperimentali sui topi dimostrano come l'apprendimento, attraverso l'esposizione agli odori, causa una forte stimolazione della proliferazione nella zona sottoventricolare ed una conseguente neurogenesi nel bulbo olfattorio (Alonso *et al* 2006). Simili effetti si hanno nell'ippocampo, dove gioca un ruolo molto importante la memoria (Kempermann *et al* 2002). L'attività fisica intensa, infine, stimola ugualmente la neurogenesi, attraverso il rilascio di VEGF da parte delle cellule endoteliali strettamente associate alle staminali neurali (Olson *et al* 2006). Al contrario lo stress induce una forte riduzione della proliferazione e della neurogenesi di queste cellule. Interessantemente, la somministrazione di molti farmaci antidepressivi ripristina il normale livello fisiologico di attività delle staminali, fornendo un'indicazione sulla possibile implicazione nei disturbi comportamentali (Warner-Schmidt *et al* 2006). Il rapporto invece con le malattie neurodegenerative, come il morbo di Alzheimer o il morbo di Parkinson, non è stato ancora chiarito, così come l'eventuale rigenerazione dopo l'ictus o infiammazione.

Nel corso di questi ultimi anni sono stati sviluppati numerosi protocolli di isolamento e coltivazione delle cellule staminali neurali, tutti fondati sulla capacità proliferativa di queste cellule, caratteristica praticamente esclusiva all'interno del cervello adulto dei vertebrati. Nelle coltivazioni *in vitro* le cellule staminali neurali crescono sotto forma di aggregati sferici in sospensione, le neurosfere, formate da una popolazione eterogenea di cellule che si trovano in una condizione di "fluidità differenziativa", nella quale è difficile isolare le staminali autentiche dai progenitori,

piuttosto che dalle cellule che già sono in via di maturazione. Grazie ad una vitalità pressoché illimitata, le staminali neurali possono essere coltivate per molti passaggi e quindi accumulate in quantità notevoli, tali da poter essere utilizzate in trapianti terapeutici contro lesioni cerebrali di varia origine (nuerodegenerazione, ictus, traumi meccanici). Infatti, grazie probabilmente al rilascio di chemioattraenti da parte della lesione stessa, le cellule sono attratte *in loco* e, se il microambiente lo permette, si differenziano per dare origine a nuova materia cerebrale (Guzman *et al* 2007). Infine la possibilità di ingegnerizzarle rende possibile l'uso delle staminali neurali come veicolo di chemioterapici per la terapia dei tumori cerebrali, i quali agiscono similmente alle lesioni cerebrali, attraendole in maniera specifica (Benedetti 2000).

Marcatore	Tipo cellulare
Nestina	Staminale
Sox2	Staminale
PSA-NCAM	Staminale/Precursore
Dlx2	Staminale/Precursore
GFAP	Astrocita
TuJ	Neurone
Map2	Neurone
Neurofilamento (NF)	Neurone

Tabella 2 Principali marcatori molecolari utili nello studio delle staminali neurali.

Migrazione Neurale nello Sviluppo

La migrazione neurale è un processo caratteristico dell'ontogenesi del sistema nervoso centrale dei vertebrati, mediante il quale i neuroni migrano dalla zona germinale verso la loro destinazione finale. In realtà il termine racchiude una varietà di processi, profondamente diversi fra loro, che riguardano differenti classi di neuroni e differenti momenti dello sviluppo ma anche della vita adulta. Per esempio, gli interneuroni corticali che si spostano dal telencefalo ventrale verso la corteccia in sviluppo, compiono movimenti paralleli alla superficie del cervello, in una migrazione definita tangenziale (Marin e Rubenstein, 2001). Profondamente diversa è la migrazione dei neuroni generati nella zona ventricolare che, con movimenti ortogonali alla superficie cerebrale, raggiungono la corteccia attraverso le fibre gliali (Hatten, 1999). Il processo, piuttosto complesso, è ben caratterizzato nel topo *Mus musculus* come rappresentato in figura 2: nel giorno embrionale E12.5 una prima coorte di neuroni migra radialmente verso la superficie del cervello, a formare uno strato pluricellulare che sarà suddiviso in due strati, nel giorno E14.5, dall'arrivo di una seconda coorte di neuroni. Quest'ultimi quindi hanno la capacità di scavalcare parte dei neuroni precedentemente migrati. Successivamente il fenomeno si ripete più volte così che, nella corteccia ormai formata, andando dall'interno verso l'esterno si incontreranno neuroni di sempre più recente formazione (Nadarajah e Parnavelas, 2002).

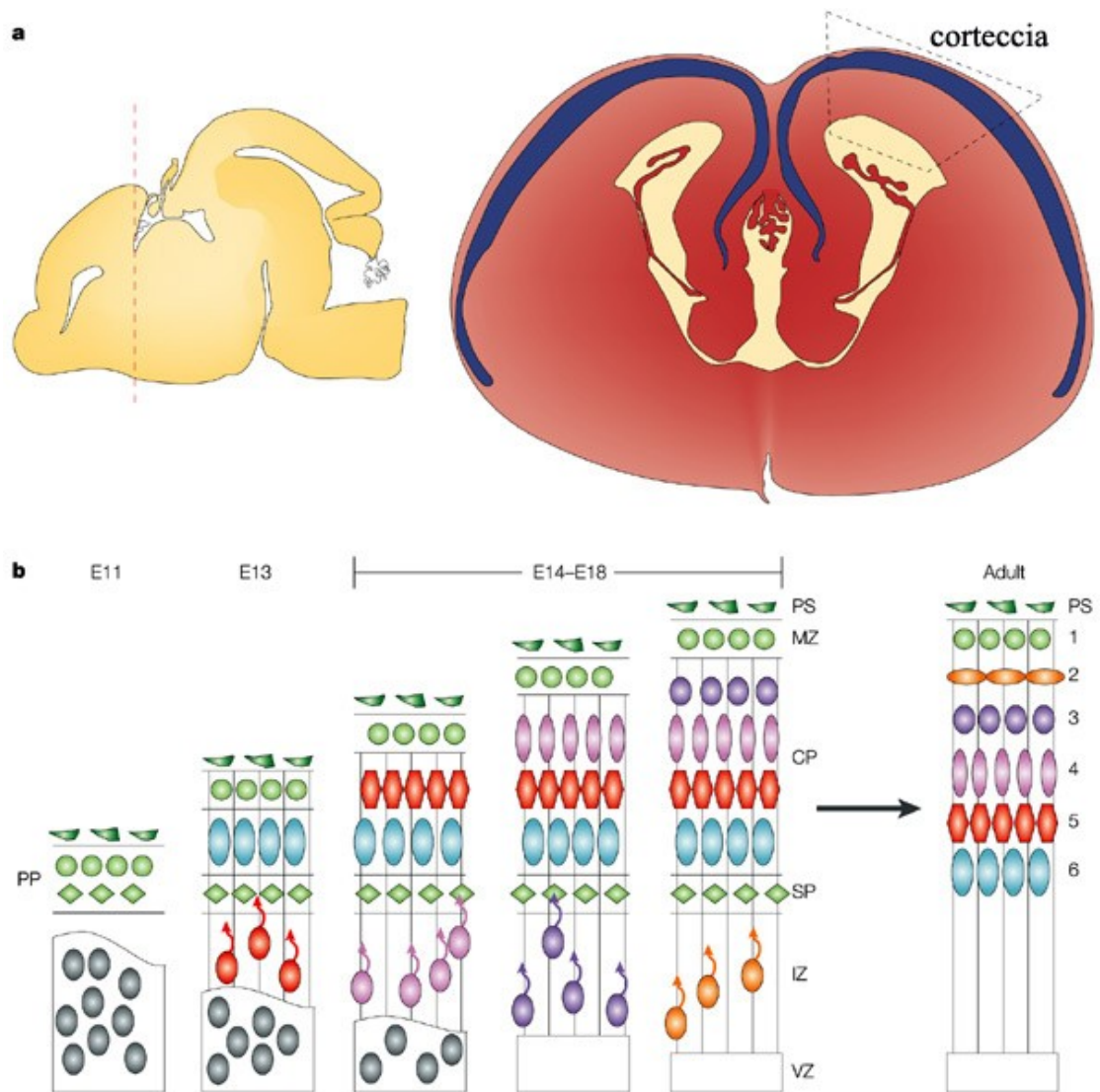


Figura 2. Modello schematico delle prime fasi della corticogenesi. a) E' mostrata la localizzazione anatomica della corteccia in formazione b) formazione della prepiastra (PP) ad opera dei primi neuroni migranti in verde, i quali vengono divisi da una seconda coorte di neuroni (rappresentati in blu) dando origine alla piastra corticale (CP), alla zona marginale (MZ) e alla sottopiastra (SP). Il processo si ripete diverse volte e genera una piastra corticale pluristratificata. Le linee grigie rappresentano le cellule gliali radiali. Altre abbreviazioni: VZ= zona ventricolare, IZ= zona intermedia, PS=zona piale.

Gupta et al, 2002. Modificato.

Le cellule gliali radiali sono cellule nervose bipolari che estroflettono un corto processo nella zona ventricolare ed un lungo processo ascendente verso la superficie piaie, ponendosi quindi perpendicolarmente alla superficie e al ventricolo. Rappresentano elementi chiave della migrazione neurale embrionale, fungendo da binari e interagendo fisicamente con i neuroni migranti attraverso le integrine $\beta 1$ e $\beta 2$ (Anton *et al*, 1999). Al termine dello sviluppo la glia radiale scompare, così come la migrazione ad essa associata. Fino a pochi anni fa, si riteneva che il principale destino di questo gruppo di cellule fosse il differenziamento verso astrociti maturi, che effettivamente si trovano in grandi quantità in quelle regioni (Hatten 1999). Attualmente però sta diffondendosi la convinzione che tali cellule abbiano un destino più elaborato ed un ruolo molto attivo nel cervello adulto. In particolare si ritiene che originino le cellule staminali neurali della zona sottoventricolare (Bonfanti e Peretto, 2007). La natura gliale delle NSC è suggerita da numerose evidenze sperimentali (Doetsch *et al* 1999, Alvarez-Buylla *et al* 2001) e il diretto coinvolgimento della glia radiale da topi transgenici esprimenti la GFP (green fluorescent protein) in una ristretta popolazione di cellule gliali radiali. Da questi topi si possono ricavare neurosfere positive per la GFP e capaci di generare tutte le classi di cellule nervose (Merkle *et al*, 2004).

Mutante Neurologico *Reeler*

La mutazione Reeler è insorta spontaneamente nella linea di topi "snowy-bellied" stabulati nel "Institute of animal genetics" di Edinburgo, Scozia (Falconer, 1951). Le prime descrizioni riguardavano anomalie comportamentali, tanto da essere giudicati un modello di ritardo mentale, e severe disfunzioni motorie, soprattutto atassia negli arti inferiori e forti tremori. Inoltre fu subito evidente l'associazione con una malformazione del cervelletto, nel quale le cellule del Purkinje mostrano un'errata disposizione (Hamburgh, 1960). Dall'analisi del genoma è stata individuata la mutazione responsabile, identificata come una delezione di 150 kb al 3' di una sequenza codificante del cromosoma 5 nel topo e 7q22 nell'uomo (D'Arcangelo *et al*, 1996). Tale sequenza codificante fu chiamata *Reelin* (RELN) e il fenotipo neurologico ad essa associato, *reeler*, termine inglese con il significato di tremolante. Nell'uomo l'inattivazione del gene è associata alla lissencefalia autosomica recessiva, grave patologia caratterizzata da severi deficit psichici e motori (Hong *et al*, 2000). A livello anatomico la corteccia cerebrale di questi pazienti appare liscia, senza le caratteristiche creste, indicando uno sviluppo cerebrale errato.

Analizzando la corteccia cerebrale dei topi reeler in sviluppo, non si osservano particolari anomalie fino al giorno embrionale 12.5, quando cioè il primo gruppo di neuroni ha migrato, attraverso la glia radiale, verso la superficie (Rice e Curran, 2001). Le anomalie iniziano al giorno 14.5, ovvero quando il secondo gruppo di neuroni dovrebbe scavalcare il primo per posizionarsi più esternamente. Come mostrato in figura 3, tali neuroni sono invece incapaci di effettuare il salto e di conseguenza si vanno a posizionare più internamente rispetto ai precedenti (Tissir

e Goffinet, 2003). La stessa incapacità è mantenuta da tutti gli altri gruppi di neuroni in migrazione, generando quindi una corteccia con orientamento inverso rispetto al *wild-type*.

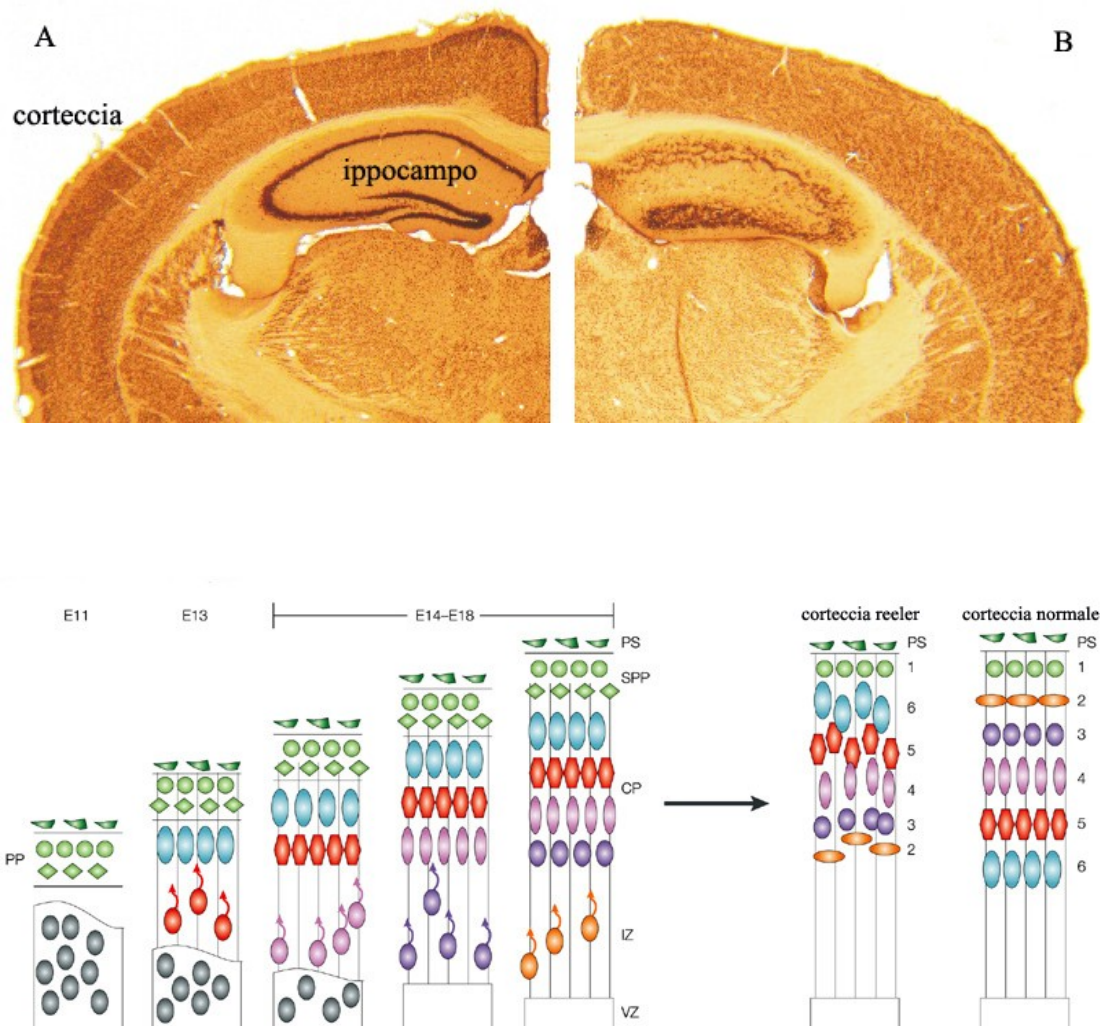


Figura 3. Fenotipo reeler. E' messa in relazione l'anatomia di un cervello murino normale (A) con quello di un topo reeler (B). Particolarmente evidenti sono le malformazioni dell'ippocampo e della corteccia. Nella sezione in basso è rappresentata la corticogenesi. Ogni gruppo di neuroni in migrazione è incapace di scavalcare i neuroni precedentemente migrati, arrestandosi al di sotto di essi. E' messa in relazione la disposizione finale dei neuroni della corteccia reeler con la corteccia wild-type, osservando i colori è evidente che l'orientamento risultante è opposto.
Gupta et al 2002, modificato.

Oltre alla corteccia cerebrale, i topi reeler mostrano anomalie strutturali anche nel cervelletto, come precedentemente citato, nell'ippocampo, nel talamo, nel bulbo olfattorio, nella retina e nel midollo spinale (Yip et al 2000, Rice et al 2001).

Reelin: struttura genica e proteica

La regione genomica responsabile del fenotipo reeler, come già discusso, corrisponde al gene Reelin, lungo 450 kb (Bar et al 1995, De Silva et al 1997). Il promotore non contiene TATA box ed è estremamente ricco in GC (75%), condizione caratteristica di molti geni housekeeping ma anche di alcuni tessuto-specifici (Royaux et al, 1997). Lo stato di metilazione del promotore è oggetto di numerose ricerche, specialmente per quanto riguarda il presunto legame tra Reelin e malattie neurologiche (Zhang et al 2002, Fatemi et al 2001, Tamura et al 2007). Numerose evidenze sperimentali dimostrano un forte legame tra stato di metilazione delle isole CpG ed espressione del gene, dove la condizione ipometilata determina attivazione del gene, mentre la metilazione silenzia l'espressione (Chen et al 2002, Dong et al 2008). Inoltre sono stati individuati possibili regolatori dello stato di metilazione come il fattore Sp1, la cui azione medierebbe l'effetto di molti altri regolatori, come per esempio l'acido retinoico che in vitro ne induce l'espressione (Chen et al, 2007) , e il fattore Tbr1, la cui inattivazione in topo determina una migrazione neurale Reeler-like (Hevner et al, 2001). Indipendenti dalla metilazione sembrano invece essere i fattori di trascrizione Cux1 e Cux2, coinvolti nello sviluppo neurale e probabilmente nella regolazione del gene (Cubelos et al, 2008).

Il gene Reelin è composto da 65 esoni la cui lunghezza va dalle sole sei basi del 64° alle 1104 del 65° e da introni molto estesi (il primo sfiora le 100 kb), forse a causa della presenza di elementi enhancer o silencer, e viene trascritto in un messaggero lungo 12 kb che può contenere o meno il piccolo esone 64, per via di splicing alternativi. Inoltre l'utilizzo di un sito di poliadenilazione contenuto nell'

esone 63 porta all'esclusione dell'ultimo grande esone che specifica per la regione C-terminale della proteina (Royaux et al, 1997).

Il prodotto proteico è composto da 3461 amminoacidi e pesa 427 kDa, il che la rende la seconda proteina più grande conosciuta, dopo la distrofina. Inoltre il suo peso molecolare è maggiore di circa quaranta kDa rispetto al previsto, probabilmente a causa di notevoli glicosilazioni. Inizia con una sequenza di secrezione (signal peptide) seguita da una regione con un'omologia del 28% con la F-spondina, proteina extracellulare che dirige la migrazione delle cellule della cresta neurale; segue una regione di 300 amminoacidi priva di omologie conosciute, chiamata regione unica. Il resto della proteina è formato da otto ripetizioni di circa 350 amminoacidi, ognuna delle quali è composta da due sottoripetizioni A e B simili fra loro e separate da un motivo EGF (epidermal growth factor) ricco in cisteine (D'Arcangelo et al, 1995; Tissir and Goffinet, 2003). La regione C-terminale è composta da 33 amminoacidi, molti dei quali basici, ed è fondamentale per la secrezione (D'Arcangelo et al, 1997) (Figura 4).

Reelin è secreta da pochi tipi neurali nel cervello adulto, in particolare dalle cellule Cajal-Retzius nella zona marginale della corteccia, dalle cellule granulose nel cervelletto e dalle cellule staminali neurali sia della SVZ che della SGZ (Kim *et al*, 2002). Negli estratti cerebrali è sempre presente in diverse isoforme, specialmente quelle di 250 kDa e 180 kDa, prodotte da tagli post traduzionali ad opera di metalloproteasi non ancora identificate (Lambert de Rouvroit et al, 1999). Sono stati trovati due siti di taglio, uno tra la seconda e la terza ripetizione e l'altro tra la sesta e la settima, che originano così tre frammenti (Tissir and Goffinet, 2003). Infine la proteina è presente nel liquido cerebrospinale e nel sangue, in

quest'ultimo caso processata dall'attivatore del plasminogeno e dalla plasmina (Lugli et al, 2003).

La regione N-terminale è necessaria per l'attività di Reelin, come dimostrato dalla somministrazione dell'anticorpo bloccante CR-50, diretto contro di essa, a colture primarie di neuroni. Essi normalmente si dispongono con orientamento radiale, mentre in presenza dell'anticorpo non assumono un orientamento ordinato (Ogawa et al, 1995; Utsunomiya Tate et al, 2000).

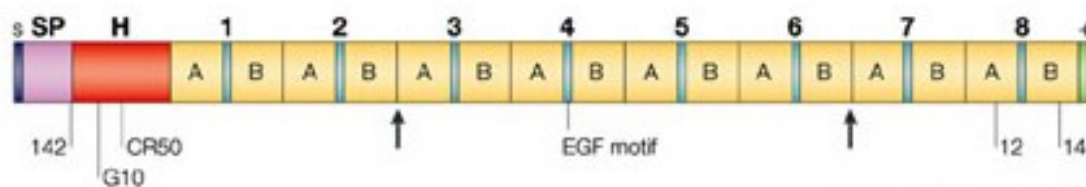


Figura 4. Struttura proteica. La sequenza inizia con la regione di riconoscimento per la secrezione (S) seguita da una regione omologa alla F-spondina (SP) e da un'altra priva di omologie (H). Comincia quindi una serie di otto ripetizioni formate ciascuna da due sottoripetizioni (A e B) separate da un motivo EGF. La sequenza termina con una regione ricca di amminoacidi basici (+). Sono inoltre indicati i siti di riconoscimento degli anticorpi conosciuti (CR50, G10, 142, 12 e 14) e con due frecce i siti di taglio proteolitico *in vivo*.

Tissir and Goffinet, 2003.

Nel topo sono note quattro diverse varianti alleliche responsabili del fenotipo Reeler. Oltre alla già citata mutazione Edinburgh, frequente è l'allele Orleans, generato dall'inserzione di un elemento L1 nell'ultimo esone (Takahara et al, 1996). Quindi ci sono le varianti Albany1 e Albany2, la prima non ancora caratterizzata e la seconda causata dall'inserzione di uno IAP (intracisternal-A particle) in un esone iniziale (Royaux et al, 1997). Nell'uomo invece sono note solamente due mutazioni in Reelin che, in omozigosi, causano entrambe

lissencefalia o sindrome di Norman-Roberts: una puntiforme in un sito accettore di splicing e l'altra è la delezione dell'intero esone 42 (Hong et al, 2000).

Meccanismi molecolari di azione di Reelin

Il fenotipo Reeler precedentemente descritto indica che l'espressione di Reelin è importante solo nelle fasi avanzate della migrazione neurale. I neuroni di Cajal-Retzius rilasciano questa proteina nella prepiastra, dove i neuroni della futura piastra corticale devono dissociarsi dalla glia radiale ed arrestare l'avanzamento. Queste osservazioni attribuirebbero a Reelin una funzione di segnale di stop e di dissociazione (Alcantara et al, 1998) mentre altre inducono a considerarla una molecola attraente per le coorti di neuroni in migrazione che li renderebbe capaci di scavalcare gli strati precedenti. Infine una terza ipotesi individua in Reelin il segnale repellente che manterrebbe i neuroni della sottopiastra in una posizione inferiore rispetto a quelli della piastra corticale (D'Arcangelo and Curran, 1998). Questa discrepanza è probabilmente dovuta ad un'estrema variabilità di azione della proteina, la quale potrebbe svolgere ruoli diversi in ambienti diversi e in momenti differenti dello sviluppo e della vita adulta.

I movimenti neuronali implicano riarrangiamenti del citoscheletro, di conseguenza Reelin deve agire a livello intracellulare. Data la sua localizzazione extracellulare, tale azione deve essere mediata da recettori di membrana. Due componenti della famiglia ubiquitaria LDLR (low density lipoprotein receptor), VLDLR e ApoER2, se inattivati in topo causano un fenotipo del tutto simile al reeler. Topi knock-out per

entrambi questi recettori sviluppano una superpiastra durante la corticogenesi e mostrano tutte le altre anomalie caratteristiche, quali atassia, riduzione del cervelletto e disposizione erranea delle cellule granulose nell'ippocampo (Trommsdorff et al, 1999). L'inattivazione di uno solo dei due recettori invece determina modificazioni di minore entità, non assimilabili ad un fenotipo Reeler. Infatti topi mancanti in ApoER2 hanno un parziale malposizionamento dei neuroni corticali e dell'ippocampo, mentre topi knock-out per VLDLR mostrano posizionamenti inappropriati soprattutto nel cervelletto. Questi studi comparativi dimostrano l'importanza di entrambi i recettori durante la migrazione neurale e la possibilità di un'azione sinergica o distinta a seconda delle regioni cerebrali (Rice and Curran, 2001). In dettaglio VLDLR sembra generalmente agire soprattutto nelle prime migrazioni, dove il ruolo di stop è più evidente, mentre ApoER2 nelle migrazioni più tardive (Hack et al, 2007).

Saggi di legame hanno confermato l'interazione fisica tra Reelin ed una regione extracellulare comune ai due recettori formata da otto ripetizioni LA (leucina-arginina) ognuna contenente tre ponti disolfuro ed uno ione Ca^{2+} coordinato, mentre hanno confutato il legame con LDLR, terzo componente della stessa famiglia con un'organizzazione strutturale molto simile (Tissir and Goffinet, 2003).

Il dominio di legame in Reelin è localizzato all'interno del frammento centrale generato dai tagli proteolitici in vivo, formato dalle ripetizioni terza, quarta, quinta e sesta. Affinché avvenga il legame è importante che siano presenti tutte queste quattro ripetizioni, indicando la partecipazione dell'intera regione (Jossin et al, 2004).

Nella regione citoplasmatica dei recettori lipoproteici è presente la sequenza NPXY (dove X rappresenta un amminoacido qualsiasi), sito di legame per la proteina disabled-1 (Dab1) (Howell et al, 1999). Dab1 è una proteina citoplasmatica nota per generare, se inattivata, il fenotipo scrambler in topo, del tutto sovrapponibile al reeler (Sheldon et al, 1997). Nella sua regione N-terminale si trova il dominio PI/PTB (protein interaction/phosphotyrosine binding domain), il responsabile dell'interazione (Rice and Curran, 2001).

In risposta al legame tra Reelin ed i recettori lipoproteici, Dab1 viene fosforilata a livello della tirosine Y198 e Y220 (Keshvara et al, 2001), condizione necessaria per una corretta migrazione neurale, come dimostrato da topi nei quali la sostituzione di tali tirosine con fenilalanine determina un fenotipo Reeler-like (Tissir and Goffinet, 2003).

L'identità delle chinasi coinvolte è ancora oggetto di discussione e solo recentemente è stata proposta la famiglia SRC come più probabile candidata, in particolare Fyn, Yes e Src. Obbiezioni sul loro coinvolgimento nascono dal fatto che topi knockout per Fyn, Src o per entrambe non mostrano fenotipo Reeler-like (Bock and Hertz, 2003) ma forse la causa è la presenza di numerose altre chinasi che possono intercambiarsi (Tissir and Goffinet, 2003).

Fyn prende contatti con la porzione citoplasmatica della proteina transmembrana CNR1, la quale veicolerebbe tali chinasi verso il complesso Reelin-recettori lipoproteici-Dab1 (Jossin et al, 2004).

La fosforilazione di Dab1 crea un sito di legame per gli adattatori Crk (Crk-I, Crk-II e Crk-L) i quali sembrano necessari per il mantenimento dello stato fosforilato,

probabilmente agendo come inibitori delle fosfatasi (Huang et al, 2004). In particolare Crk-L richiede la fosforilazione della tirosina Y232 oltre che la Y220 e questo suggerisce una dimerizzazione di tale proteina, così che ogni monomero si leghi ad un singolo residuo fosforilato (Ballif et al, 2004).

Tra i vari polipeptidi che possono legarsi a Crk-L c'è C3G, un fattore di regolazione della GTPasi Rap1, coinvolta nell'adesione cellulare mediata dalle integrine e nella migrazione di fibroblasti, linfociti e cellule mieloidi (Caron, 2003). C3G viene fosforilato a livello della tirosina Y504 in risposta all'azione di Reelin, e solo dopo tale modificazione acquisisce la capacità di scambiare il GDP normalmente legato a Rap1 inattiva con un GTP (Ballif et al, 2004).

Le conoscenze riguardo i componenti a valle della via di trasduzione del segnale intracellulare di Reelin sono ancora molto scarse e uno dei più accreditati è la CDK5 (cyclin dependent kinase 5), dato il fenotipo Reeler-like dei mutanti (Ohshima et al, 1996) e Lis1 (dal gene Pafah1b1) altro gene responsabile della Lissencefalia nell'uomo (Reiner et al, 1993).

Secondo un modello piuttosto seguito, Dab1 fosforilato viene trasportato dal cono di crescita neuronale alla regione perinucleare attraverso la dineina, per andarsi a legare a Lis1. Quest'ultimo interagisce con Nudel, proteina associata al trasporto lungo i microtubuli e presumibilmente alla nucleochinesi, la quale è anche substrato della Cdk5. Sarebbe quindi l'azione sinergica tra Reelin e Cdk5 a dirigere la migrazione neurale (Beffert et al, 2004). (Figura 5).

Un altro possibile punto di convergenza tra il pathway di Reelin e la Cdk5 è la proteina tau. Questa è una proteina associata ai microtubuli che dipende da

entrambe per quanto riguarda il suo stato di fosforilazione, dal momento che viene fosforilata dalla Cdk5 mentre Reelin inibisce la GSK-3 β , chinasi principale di tau (Beffert et al, 2002).

Infine Reelin sembra partecipare all'autoregolazione di Dab1, mediandone l'ubiquitinazione. Infatti nei neuroni reeler si osservano tipicamente grandi quantità accumulate di Dab1, le quali potrebbero essere responsabili dei difetti migratori (Feng *et al* 2007, Kerjan e Gleeson 2007).

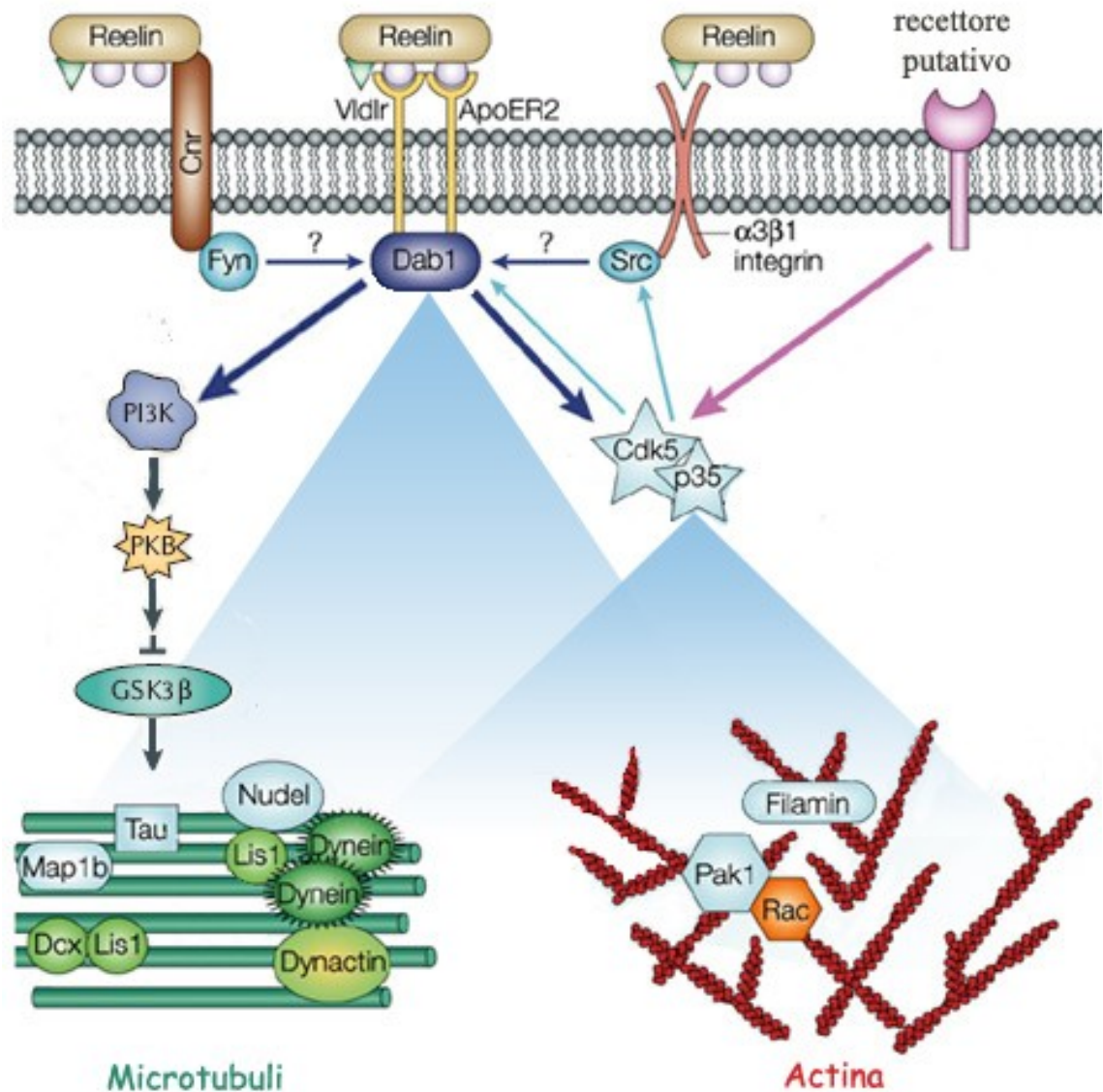


Figura 5. Principali componenti del pathway intracellulare di Reelin.

Dopo il legame con i recettori lipoproteici, con CNR, con le integrine e forse con qualche altro recettore sconosciuto, il segnale di Reelin viene trasdotto con la fosforilazione di Dab1 e l'attivazione della Cdk5. L'effetto finale è un'azione sinergica sui microtubuli e sui microfilamenti di actina del neurone in migrazione, determinando il riarrangiamento del citoscheletro.

Gupta et al, 2002. Modificato.

Possibile legame tra Reelin e le malattie neurologiche

Dato l'importante ruolo svolto da Reelin nello sviluppo della corteccia cerebrale, si è suggerito più volte un suo coinvolgimento nelle neuropatologie. Uno dei legami più forti sembra essere quello con la sindrome di Alzheimer, principale causa di demenza in età avanzata. A livello neuronale si riscontrano due alterazioni tipiche della malattia, l'iperfosforilazione della proteina tau che si traduce in una dissociazione dei microtubuli e la formazione di placche amiloidi extracellulari composte dal peptide amiloide A4, prodotto del processamento dell' APP (*amyloid precursor protein*).

La forma ereditaria del morbo è associata proprio al gene APP, mentre quella non ereditaria soprattutto al gene ApoE, il cui prodotto proteico si lega ai recettori lipoproteici regolando così l'azione di Reelin (Chin *et al* 2007, Koch *et al* 2002). Oltre a questa, numerose altre osservazioni correlano la sindrome con Reelin, come per esempio l'interazione fra Dab1 fosforilato e la coda citoplasmatica di APP (Pramatarova *et al*, 2008). Comunque l'associazione maggiore sembra essere a livello della proteina tau, al cui stato fosforilato parteciperebbero diverse proteine tra le quali spicca Reelin, dal momento che in topi *reeler* è molto frequente una sua iperfosforilazione (Heisberger *et al*, 1999). Il legame tra le due è la GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*), principale chinasi di tau, che viene inibita da Reelin attraverso l'attivazione della protein-chinasi B. Tale attivazione consiste in una fosforilazione della chinasi mediata da Dab1 (Ohkubo *et al*, 2003). Un'altra importante chinasi di tau è la Cdk5, già menzionata come possibile componente a valle dell'azione intracellulare di Reelin e per questo ulteriore legame con la malattia. Importante sottolineare che nei pazienti di Alzheimer si riscontra molto spesso un'isoforma troncata della p35, subunità regolatoria della

Cdk5, che in questa forma la attiva costitutivamente portando nuovamente all'iperfosforilazione di tau (Segupta *et al*, 2006).

Il legame con malattie mentali quali la schizofrenia e il disturbo bipolare è stato suggerito dall'analisi di campioni autoptici cerebrali di pazienti, nelle quali si evidenzia una diminuzione del 50% del messaggero di Reelin (Fatemi *et al*, 2000). Molto probabilmente la riduzione dell' mRNA di Reelin osservata nei pazienti è dovuta all' ipermetilazione del promotore, unico vero sistema di regolazione conosciuto per questo gene, come dimostrato da somministrazione di L-metionina a topi, agente conosciuto per la sua capacità di aggravare i sintomi della schizofrenia (Wyatt *et al*, 1971). Tale amminoacido è il precursore della biosintesi dell' S-adenosilmetionina (SAM), agente metilante del DNA, e il suo effetto è di incrementare la riduzione del messaggero (Tremolizzo *et al* 2002, Tamura *et al* 2007).

Molto più controverso e di difficile interpretazione è il legame tra Reelin e autismo, visto il complesso quadro genetico della malattia. Un polimorfismo del gene Reelin chiamato "allele lungo" e caratterizzato da undici GGC repeats nel 5' UTR, è stato associato all'autismo come fattore che aumenta il rischio di manifestare la malattia (Serajee *et al*, 2006). Inoltre pazienti autistici mostrano una significativa riduzione del livello proteico di Reelin nel plasma, sia della forma *full-length* che delle isoforme derivate dalla frammentazione (Fatemi *et al*, 2005).

Recentemente, è stata inclusa anche la sindrome di Creutzfeldt-Jakob tra le possibili malattie associate. Infatti la proteina prionica attivata interagisce con Dab1, influenzandone negativamente i livelli (Gavin *et al*, 2008).

SCOPO DEL LAVORO

Il progetto del mio lavoro di dottorato ha come soggetto principale lo studio delle cellule staminali neurali adulte ed in particolare l'approfondimento del ruolo biologico di Reelin nelle stesse, con lo scopo di valutarne un'eventuale applicazione terapeutica in ambiente neurale.

La prima fase del progetto, mirata all'estrazione e alla coltivazione delle cellule staminali neurali murine, mi ha permesso di prendere dimestichezza con questo particolare tipo cellulare. La messa a punto delle condizioni di cultura e dei successivi saggi ha impiegato diverso tempo, data la relativa difficoltà di maneggiamento. Una volta ottenute le condizioni ideali, sono passato allo studio dell'attività di Reelin nella migrazione delle cellule staminali su matrici artificiali *in vitro*, con lo scopo di ricreare, sia pur artificialmente, un ambiente cerebrale. L'idea di partenza prevedeva un possibile ruolo della proteina in tale processo, data la documentata azione nello sviluppo neurale. Avendo ottenuto risultati incoraggianti, ho saggiato anche gli altri aspetti tipici delle staminali neurali, ovvero il differenziamento e la proliferazione, con l'idea che i tre processi non siano indipendenti, bensì facenti parte di un grande meccanismo comune. I risultati che vado a riportare in seguito e che discuterò al termine di questa tesi, mi hanno portato ad ipotizzare che effettivamente Reelin sia all'apice di tale meccanismo comune che regola la "staminalità" delle cellule staminali neurali.

Tutti i miei dati spiegherebbero in parte la permanenza di Reelin nel cervello adulto e potrebbero aiutare alla comprensione dei meccanismi di rigenerazione tessutale, con l'evidente possibilità di applicazione nella terapia delle malattie neurodegenerative e delle lesioni prodotte dai tumori cerebrali.

MATERIALI E METODI

Estrazione delle cellule staminali neurali murine

Le NSC sono state estratte a partire da topi neonati P0-P3 (gentilmente messi a disposizione dal Professor Gaetano Finocchiaro, Istituto neurologico Besta, Milano), sacrificati per decapitazione. Il cervello, estratto dalla scatola cranica intatto, è stato privato del cervelletto e della parte frontale contenente il bulbo olfattorio. Quindi è stato triturato con una lama sterile fino ad una pressoché completa dissoluzione del tessuto. Sono seguiti una serie di tre lavaggi con EBSS (Gibco) addizionato di EDTA 5M (Sigma-Aldrich) e cisteina 1,4 mM (Fluka BioChemica) , mediante centrifugazione ed eliminazione del sovrnatante, così da eliminare tutta la materia non cellulare.

Dopo un'ulteriore dissociazione meccanica con la pipetta, le cellule sono state piastrate in un terreno altamente selettivo, il quale permette la crescita solo delle cellule staminali neurali. Tale terreno, piuttosto elaborato, è basato sull' NS-A medium (Celbio) addizionato di 0,1X Dmem-F12 (Invitrogen), 2 mM L-Glutammina (Invitrogen), penicillina e streptomicina (Invitrogen), 20 ng/μl EGF (Prepotech), 10 ng/μl bFGF (Prepotech), 0,5 mM hepes (Sigma-Aldrich), 0,06% glucosio, 12,5 μM apotrasferrina (Sigma-Aldrich), 43 μM insulina (Sigma-Aldrich), 60 μM putrescina (Sigma-Aldrich), 0,03 μM selenio (Sigma-Aldrich), 0,02 μM progesterone (Sigma-Aldrich).

La coltura è stata mantenuta in un incubatore a 37°C, 5% di CO₂ e 85% di umidità. Dopo circa una settimana, si osservano in sospensione neurosfere mature (vedi risultati) che possono essere agevolmente centrifugate (350 rpm, 15 minuti)

per eliminare il terreno vecchio, contenente cellule cerebrali non proliferate, e dissociate meccanicamente con la pipetta per ripiastrarne 1/5, così da effettuare il primo passaggio. Il procedimento può essere ripetuto a distanza di circa 7 giorni, per numerosissime volte ed i saggi da me condotti sono stati fatti tutti entro il 30esimo passaggio.

Quando necessario, le cellule sono state indotte all'adesione mediante pretrattamento della piastra con matrigel (BD Biociences), fissate e sottoposte all'immunofluorescenza.

Genotipizzazione

Durante l'estrazione del cervello dei topi sono state prelevate le code degli stessi, e successivamente poste in 600 µl della soluzione di lisi (10 mM Tris pH 7,5, 400mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,6% SDS), addizionata di 350 µg di proteinasi K. L'incubazione, overnight a 55°C in agitazione, ha permesso la completa dissociazione del tessuto, il quale è stato aggiunto di 166 µl di NaCl 6M per far precipitare le proteine e centrifugato per 5 minuti a 14000 xg. Il sovranatante è stato posto in una nuova provetta contenente un volume di etanolo 95%. Il DNA contenuto è stato così fatto precipitare e diventare visibile, sotto forma di una massa traslucida, la quale aderisce spontaneamente alla punta di un capillare di vetro, con il quale si può quindi prelevare e immergere in una seconda provetta contenente etanolo 70%, così da eliminare i sali. Infine la punta del capillare, dopo alcuni minuti di essiccamento all'aria, è stata immersa in 500 µl di acqua bidistillata, scaldata a 65°C per 10 minuti.

Il DNA così purificato è stato amplificato per PCR seguendo il seguente protocollo:

DNA	1 µl			
Primer up 20 µM	1 µl			
Primer dw WT 20 µM	1 µl			
Primer dw RL 20 µM	1 µl	5' 94°C +	1' 94°C	+ 10' 72°C
Buffer 10x	5 µl		2' 55°C	30 cicli
dNTPs 10 mM	2 µl		3' 72°C	
Taq polimerasi (Biolabs)	0,5 µl			
H2Odd	38,5 µl			

up: **TAATCTGTCCTCACTCTGCC**

dw WT: **ACAGTTGACATACCTTAACC**

dw RL: **TGCATTAATGTGCAGTGTTG**

In queste condizioni il DNA wild-type viene amplificato in una banda di 280 bp, il reeler di 380 bp ed infine l'eterozigote le genera entrambe. Come controllo negativo è stata utilizzata H₂O bidistillata al posto del DNA.

Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e PCR

Neurosfele mature sono state lisate in Trizol® (Invitrogen) e sottoposte ad estrazione dell'RNA totale, seguendo le specifiche della casa. L' RNA totale ottenuto è stato risospeso in H₂O DEPC (0,1% dietilpirocarbonato), quantificato allo spettrofotometro e controllato su gel d'agarosio 0,8% tramite colorazione con bromuro d'etidio ed esposizione ai raggi UV.

La retrotrascrizione è stata eseguita su 2 µg di RNA estratto utilizzando la trascrittasi inversa M-MLV (Promega), 100 pmoli di random primers (pdN6 dell'Invitrogen) in un volume totale di 25 µl, in un'ora di reazione a 37°C. Quindi 12.5 µl di reazione di retrotrascrizione sono stati amplificati per PCR (Polimerase Chain Reaction) tramite 2,5 U di Taq polimerasi (Amersham Pharmacia Biotech) in un volume finale di 50 µl. Come controllo negativo è stata utilizzata un'analogia quantità di reazione di retrotrascrizione eseguita senza RNA di partenza. Per osservare l'espressione dei messaggeri di interesse sono state utilizzate le seguenti coppie di primers:

Dab1 up TTTAACCATCTCCTTTGGAGGA

Dab1 down ACGAATAGCCATTACTTACAGG amplificato di 370 paia di basi

VLDLR up GGCTATCAAATGGATCTTGCT

VLDLR down TTGCAGTACTTTGACAGTCTC amplificato di 990 paia di basi

Il programma utilizzato per la PCR prevede un ciclo di 3' a 94°C, 35 cicli comprendenti 30" a 94°C, 30" a 56°C e 1' (1'30" per VLDLR) a 72°C, e infine 10' a 72°C.

Gli amplificati ottenuti sono stati controllati su gel d'agarosio all' 1%.

Saggi di formazione e di crescita delle neurosfere

Neurosfere in attiva fase di crescita sono state raccolte, centrifugate e dissociate meccanicamente a singola cellula. Quindi sono state piastrate in numero controllato ed osservate nel procedimento di formazione delle neurosfere. In particolare, partendo dal piastramento di 60000 cellule in multiwell da 6 (Iwaki), dopo 10 giorni di crescita sono state acquisite 10 foto digitali per pozzetto. Quindi è stato misurato il diametro di ogni neurosfera presente utilizzando il software photoshop. Sono state escluse dalla misurazione le neurosfere localizzate nei margini estremi delle fotografie, per probabili distorsioni dovute alla lente, ed anche le neurosfere più piccole di 200 μm di diametro.

Inoltre, parallelamente, sono state prelevate le neurosfere in formazione ai giorni 5, 9 e 11 dal piastramento, centrifugate, dissociate meccanicamente e contate con il trypan blue, per ottenere una stima finale della crescita cellulare.

Infine sono state piastrate concentrazioni crescenti di cellule (250, 500, 1000 e 2000), ottenute attraverso il metodo delle diluizioni seriali, in multiwell da 24 (Iwaki) e dopo 11 giorni è stato contato al microscopio il numero di neurosfere formate. Nuovamente non sono state considerati gli aggregati minori di 200 μm di diametro.

Saggio della migrazione a catena

Multiwell da 6 (Iwaki) sono state trattate con varie matrici. In particolare,

coating con fibronectina (Promega): 2 µg/ml in PBS, 24h 4°C, lavaggio in PBS

coating con poli L-ornitina/fibronectina: 15 µg/ml poli L-ornitina in PBS, 12h 37°C

(Promega) lavaggio overnight con PBS a 37°C

1 µg/ml fibronectina in PBS, 12h 37°C

lavaggio in PBS

coating con gelatina (Invitrogen): 0,5% in H₂O, overnight a 37°C, lavaggio in PBS

coating con polilisina (Invitrogen): 0,001% in tampone borato 0,1 M, 24h RT

lavaggio in PBS

Le neurosfere mature (circa una settimana dopo il passaggio) sono state prelevate delicatamente con la pipetta e piastrate nelle multiwell trattate, in terreno di crescita. In alcuni esperimenti sono stati aggiunti 0,1 volumi di mezzo condizionato contenente Reelin (vedi più avanti) al momento del piastramento e successivamente un richiamo a 24 ore.

Sono state acquisite immagini delle neurosfere con una fotocamera digitale collegata al microscopio ottico (Nikon) con un ingrandimento di 4x e 10x, a distanza di 24, 48, 72 e 96 ore.

Quando necessario, le cellule sono state permeabilizzate delicatamente con 0,2% triton X-100 (10 minuti a temperatura ambiente) e poi fissate con paraformaldeide al 4% (10 minuti a temperatura ambiente) per poi essere sottoposte all'immunofluorescenza.

Saggio della migrazione con le camere di Boyden

Sono state scelte le Transwell® (Corning, Costar) di 24 mm di diametro, provviste di membrana di policarbonato con fori di 8 µm. Tale membrana è stata trattata con fibronectina 2,5 µg/ml per 24 ore, in modo da favorire l'adesione cellulare. Quindi neurosfere in fase di crescita sono state dissociate e sottoposte a conta vitale con il trypan blue. Nella camera superiore della Transwell® sono state piastrate 400000 cellule in un volume finale di 3 ml, mentre la camera inferiore è stata riempita con mezzo condizionato delle U87MG, linea di glioblastoma multiforme nota per rilasciare grandi quantità di chemioattrattori (Aboody *et al*, 2000).

Dopo 22 ore di migrazione le cellule sono state fissate con il metodo del metanolo/acetone (rapporto di 3/7, 5' a -20°C), quindi sono state raschiate via con uno scraper quelle rimaste nella parte superiore della membrana, ovvero le cellule non migrate. La membrana è stata trattata con DAPI (1 µg/ml, 5' temperatura ambiente) e visualizzata con il microscopio a fluorescenza, obbiettivo 40x (Nikon eclipse E600). Sono stati contati 6 campi per ogni membrana, considerando come migrate le cellule che si ritrovavano sulla faccia inferiore della membrana.

Differenziamento

Vetrini multiwell da 4 (BD Falcon) sono stati sottoposti al trattamento con il matrigel low factor (BD Biosciences) per minimizzare l'eventuale stimolazione alla proliferazione cellulare, diluendolo 1/50 nel terreno differenziativo, 1 ora a temperatura ambiente.

Neurosfele in piena fase di crescita ma non ancora mature (3-4 giorni dal piastramento) sono state raccolte, centrifugate (350 rpm, 15'), dissociate meccanicamente e contate con l'emocitometro, dopo colorazione con il trypan blue allo 0,04% (Gibco). Le preparazioni con un numero di cellule morte superiore al 10% non sono state utilizzate per l'esperimento.

In ogni pozzetto trattato sono state piastrate 100000 cellule in terreno differenziativo, composto da NS-A medium (Celbio) addizionato di 0,1X Dmem-F12 (Invitrogen), 2 mM L-Glutammina (Invitrogen), 100 µg/ml penicillina e streptomicina (Invitrogen), 1,5% siero bovino fetale (FBS, Lonza), 0,5 mM hepes (Gibco), 0,06% glucosio, 12,5 µM apotrasferrina (Sigma-Aldrich), 43 µM insulina (Sigma-Aldrich), 60 µM putrescina (Sigma-Aldrich), 0,03 µM selenio (Sigma-Aldrich), 0,02 µM progesterone (Sigma-Aldrich). In alcuni esperimenti sono stati aggiunti 0,1 volumi di mezzo condizionato contenente Reelin al momento del piastramento e un successivo richiamo a 24 ore.

Dopo 4 giorni di differenziamento nell'incubatore, le cellule sono state fissate con il metodo del metanolo/acetone (rapporto di 3/7, 5' a -20°C) e sottoposte alla marcatura per fluorescenza.

Immunofluorescenza

Le cellule fissate sono state reidratate con PBS, 10' temperatura ambiente. Quindi è stato aggiunta la BSA (Sigma) 3% in PBS e si fatto incubare 1 ora a temperatura ambiente per bloccare i siti aspecifici del vetrino. Quindi si è proceduto all'aggiunta dell'anticorpo primario desiderato, diluito nel rapporto specificato dalla ditta in PBS-BSA 0,1%, incubando per 1 ora a temperatura ambiente. A volte sono stati utilizzati contemporaneamente due anticorpi diretti contro due antigeni differenti, avendo l'accortezza che avessero la regione costante diversa, essendo quindi discriminabili. Dopo 3 lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno, per eliminare tutto l'anticorpo non legato, si è aggiunto l'anticorpo secondario diretto contro la regione costante del primario utilizzato e coniugato con un fluorocromo. Nel caso precedentemente citato, i due anticorpi secondari utilizzati erano coniugati con due fluorocromi eccitabili a due lunghezze d'onda diverse. Dopo l'incubazione di 1 ora ed i successivi tre lavaggi in PBS (5', temperatura ambiente), l'ultima fase prevede la marcatura dei nuclei con il DAPI, 1 µg/ml in PBS, 5 minuti a temperatura ambiente.

Quindi il vetrino è stato coperto con il coprioggetto, dopo aver inumidito con mowiol (calbiochem), e visualizzato con il microscopio a fluorescenza con l'obiettivo a 40x (Nikon eclipse E600). Per ogni pozzetto sono stati contati 1000 nuclei, i quali sono stati assegnati al tipo neurale o gliale a seconda della morfologia e della marcatura.

Gli anticorpi utilizzati, con la loro diluizione, sono stati:

mouse anti-nestin	(Chemicon)	1:100
mouse anti-TuJ (tubulina β III)	(Covance)	1:500
rabbit anti-GFAP	(DakoCytomation)	1:300

mouse anti-MAP-2ab	(Immunological Sciences)	1:500
mouse anti-NFH	(Immunological Sciences)	1:500
mouse anti-NFM	(Immunological Sciences)	1:500
goat anti-rabbit IGG Alexa Fluor®	(Molecular Probes)	1:400
goat anti-mouse IGG Cy3	(Chemicon)	1:600

Produzione di Reelin ricombinante

Per la produzione di Reelin ricombinante è stata utilizzata la tecnica dell'ingegnerizzazione per far produrre una notevole quantità della proteina a delle linee cellulari eucariotiche. In particolare sono state utilizzate le HEK293, cellule di rene embrionale immortalizzate, e le HeLa, cellule di carcinoma mammario.

Trasformazione batterica. Il plasmide pCRL (D'Arcangelo *et al* 2007) contiene l'intera sequenza codificante di Reelin murino, clonata all'interno di pCDNA3 (Invitrogen), il quale conferisce la resistenza alla neomicina. Tale plasmide è stato amplificato in *E. coli* grazie alla sua origine di replicazione batterica. Per la trasformazione con il metodo dello shock termico, aliquote da 100 µl di cellule competenti (*E. Coli* DH5α) sono state incubate con 1 ng di plasmide per 10' in ghiaccio. Successivamente i batteri sono stati trasferiti 2' a 37°C, seguiti da 2' in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 1 ml di LB, le cellule sono state incubate per un'ora a 37°C e allo scadere del tempo centrifugate 10' a 200 x g in una minicentrifuga da banco. Una volta rispeso il pellet in un volume totale di 100 µl di LB, le cellule sono state piastrate su terreno solido contenente Ampicillina (50 µg/ml) e incubate over-night a 37°C, così da permetterne la crescita in colonie distinte.

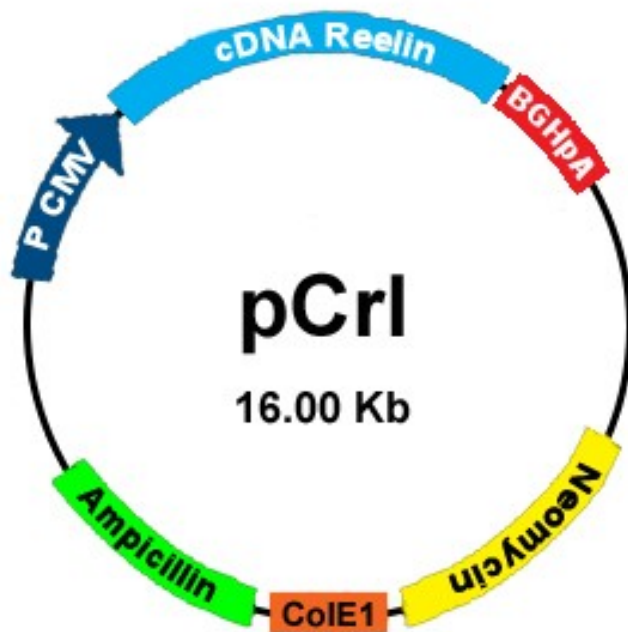


Figura 6. Schema del plasmide di espressione eucariotico pCRL. Permette la produzione della proteina intera e la secrezione mediante la propria sequenza segnale endogena. Inoltre la resistenza all'ampicillina e l'origine di replicazione batterica (ColE1) ne permettono la crescita in *E. Coli*. Infine la resistenza alla neomicina permette di ottenere linee eucariotiche stabilmente esprimenti Reelin ricombinante. P CMV= promotore ed enhancer forte del citomegalovirus; BGHpA= sequenza di poliadenilazione del gene del fattore di crescita bovino.

Preparazione del DNA plasmidico. Una singola colonia è stata prelevata dalla piastra e posta in 250 ml di terreno liquido LB contenente Ampicillina 50 µg/ml e lasciata proliferare a 37°C in agitazione costante per circa 16 h.

Per purificare il DNA plasmidico dalla grande quantità di batteri così ottenuti, è stato utilizzato il kit "plasmid purification" della Qiagen®. In breve, dopo aver centrifugato per 15' a 6000 x g a 4°C, il pellet è stato risospeso in 10 ml di una soluzione 50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA e 100 µg/ml di RNasi A. Incubando il tutto

per 5' in un tampone di lisi (200 mM NaOH, 1% SDS), ed aggiungendo 10 ml di acetato di potassio 3M pH 5.5, il lisato ottenuto è stato passato in una colonna con filtro (QIAGEN-tip 500) dove il DNA plasmidico di interesse rimane legato alla resina. Successivamente viene lavato con 50 ml di una soluzione NaCl 1 M, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanolo ed eluito con 15 ml di NaCl 1.25 M, 50 mM Tris HCl, 15% isopropanolo, in una provetta in cui viene aggiunto un volume di isopropanolo pari al 70 % del volume totale. Dopo centrifugazione a 15000 x g per 30', il pellet di DNA plasmidico è stato lavato in 5 ml di etanolo 70%, centrifugato, asciugato ed infine risospeso in 200-300 µl di TE. La concentrazione e la purezza del DNA plasmidico così ottenuto è stata infine valutata allo spettrofotometro leggendo a 260nm e 280nm.

Trasfezione nelle linee cellulari eucariotiche. Le Hela e le HEK293, entrambe coltivate in DMEM addizionato di FBS al 10%, sono state piastrate nel numero di $1,8 \times 10^6$ in piastre da 90 mm. Dopo 24 ore di crescita sono state trasfettate con il mezzo di trasfezione trans-it® (Mirus) seguendo il protocollo consigliato dalla ditta. Brevemente, le vescicole di trasfezione sono state formate con 15 µg di DNA e 45 µl di trans-it® e l'incubazione con le cellule è durata 24 ore, superate le quali il terreno è stato cambiato con terreno di crescita staminale. Dopo altre 24 ore, tale terreno contenente Reelin ricombinante, è stato raccolto per i trattamenti e centrifugato 10' a 2000 rpm per eliminare gli eventuali residui cellulari.

Ingegnerizzazione delle cellule staminali neurali

Lipofezione: Neurosfere in attiva fase di crescita sono state centrifugate, dissociate e sottoposte alla conta vitale. Quindi 500000 cellule sono state incubate con le vescicole di lipofectamine (Invitrogen), formate a loro volta con 2 µg di DNA plasmidico per trasfezione. L'incubazione tra cellule e vescicole è durata 6 ore a 37°C nell'incubatore, passate le quali è stato cambiato il mezzo con terreno fresco e fattori di crescita, per mezzo della centrifugazione. Le prime neurosfere si sono riformate dopo circa 12 ore.

Elettroporazione: E' stato utilizzato l'elettroporatore (Amaxa) con il relativo kit di soluzioni specifico per le cellule staminali neurali murine. Dopo la conta vitale delle cellule staminali dissociate, 5 milioni di cellule sono state risospese nella soluzione fornita dal kit e poste nella cuvetta sterile dell'elettroporatore, insieme a 10 µg di DNA plasmidico. Le impostazioni automatiche dello strumento corrispondono al programma predefinito A-33. Dopo l'elettroporazione, le cellule sono state poste in terreno fresco contenente i fattori di crescita. Le prime neurosfere si sono riformate già nelle prime ore, a causa dell'elevato numero di cellule utilizzate.

In entrambi i casi, dopo 48 ore dalla trasduzione è stato aggiunto al terreno l'antibiotico selettivo Neomicina o G418 (Invitrogen) alla concentrazione di 0,15 mg/ml. Dopo un'altissima mortalità cellulare iniziale, soprattutto in seguito alla prima dissociazione delle neurosfere dopo l'aggiunta della selezione, si sono consolidate linee stabili in circa 5 settimane.

Raccolta dei sovranatanti e Western Blot

Per ottenere una concentrazione di Reelin maggiore, il mezzo condizionato è stato concentrato con le colonne centricon, le quali hanno un cut-off di 100000 Dalton, trattenendo quindi solo le proteine di peso molecolare maggiore (Reelin= 427 KDa). Mediante centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti, 10 ml di terreno vengono ridotti a 100 µl, essendosi quindi concentrati di 100 volte.

Per verificare la presenza della proteina, 10 µl di sovranatante concentrato di ciascun campione sono stati denaturati in 2 volumi di sample buffer a 95°C per 5 minuti. Quindi sono stati caricati su un gel denaturante di acrilammide 5-8%. Dopo due ore di corsa elettroforetica a 100 V costanti nel tampone di corsa, è stato eseguito l'elettroblotting su membrana PVDF Hybond-P (Amersham Pharmacia Biotech) a 250 mA costanti per 2h 30' in tampone di trasferimento.

Dopo un lavaggio di 15' in Tris-HCl 30 mM pH 7.6, la membrana è stata saturata con latte in polvere (Bio-Rad) disciolto al 5% in TPBS per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione costante. Si è quindi proceduto all'incubazione con l'anticorpo primario E142 (Chemicon), diretto contro la regione C-terminale di Reelin, ad una diluizione 1:1000 in TPBS-milk 5% overnight a 4°C. Quindi il filtro è stato lavato 3 volte in TPBS (15 minuti a lavaggio) e incubato 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (anti/mouse horseradish peroxidase, Chemicon), diluito 1:2000 in TPBS-milk 5%.

Dopo altri tre lavaggi, la membrana è stata fatta reagire con la soluzione di rilevamento ECL (Amersham Bioscience) attraverso cui si è potuto procedere allo sviluppo su lastra fotografica.

Soluzioni utilizzate e terreni di crescita batterica

PBS:	137 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	4.3 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
	1.4 mM KH ₂ PO ₄
Tampone di corsa:	25 mM Tris
	192 mM glicina
	0.1% SDS
Tampone di Trasferimento:	25 mM Tris
	192 mM glicina
	20% metanolo
	70% H ₂ O
TPBS:	137 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	4.3 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
	1.4 mM KH ₂ PO ₄
	0.5% Tween 20

Sample Buffer:	50 mM Tris HCl pH 6.8
	5% β -mercaptoetanol
	10% glicerolo
	1% SDS

Brodo Luria Bertani (LB):	Bactotriptide	10 g
	Estratto di lievito	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	portare a 1 L

(Il terreno è stato solidificato, quando necessario, aggiungendo agar al 1.5%).

Tampone Borato	Acido Borico	5.1 g
	NaOH	2.1 g
	H ₂ O	portare a 1 L

Analisi statistica

Tutti i valori sono stati analizzati mediante il test T-Student, con un livello di significatività del 95%. Quando la differenza tra le medie è risultata significativa, è stato posto, nel grafico corrispondente, un asterisco per i valori di $p < 0,05$ e due asterischi per i valori di $p < 0,01$.

Estrazione e caratterizzazione delle cellule staminali neurali murine da topi *wild-type* e da topi *reeler*

Il ceppo di topi da me utilizzato è il C57BL6J, il quale porta in eterozigosi l'allele $Reln^{nmf413}$, mutante recessivo negativo. Alla nascita i topi *reeler* sono indistinguibili dai *wild-type*, sia per dimensione che per locomozione ed i primi sintomi evidenti della malattia, ovvero tremori ed instabilità nella deambulazione, si osservano solo alla terza settimana di vita. Dal momento che le prime ore dopo la nascita rappresentano lo stadio di maggior presenza di cellule staminali neurali adulte nel topo (Maslov *et al*, 2004), ho effettuato l'estrazione delle NSC dall'intera figliata, per poi effettuare in un secondo momento la genotipizzazione. Quest'ultima sfrutta dei primer disegnati in modo tale da generare due diverse bande a seconda del tipo di allele presente, in virtù della diversa organizzazione genica. Infatti l'allele *reeler* porta una lunga delezione di 150 Kb, avvicinando quindi regioni genomiche che nel *wild-type* non sono amplificabili contemporaneamente (figura 7).

In linea generale il processo è stato piuttosto lungo, vista la relativa scarsità del numero dei nascituri *reeler*, decisamente inferiore rispetto alle previsioni mendeliane, probabilmente dovuto ad una mortalità *in utero* indotta dal genotipo. Comunque l'alta efficienza del processo di estrazione, tale che quasi tutte le preparazioni portano ad una linea stabile, ha permesso di ottenere cellule staminali da ogni topo *reeler* che veniva partorito.

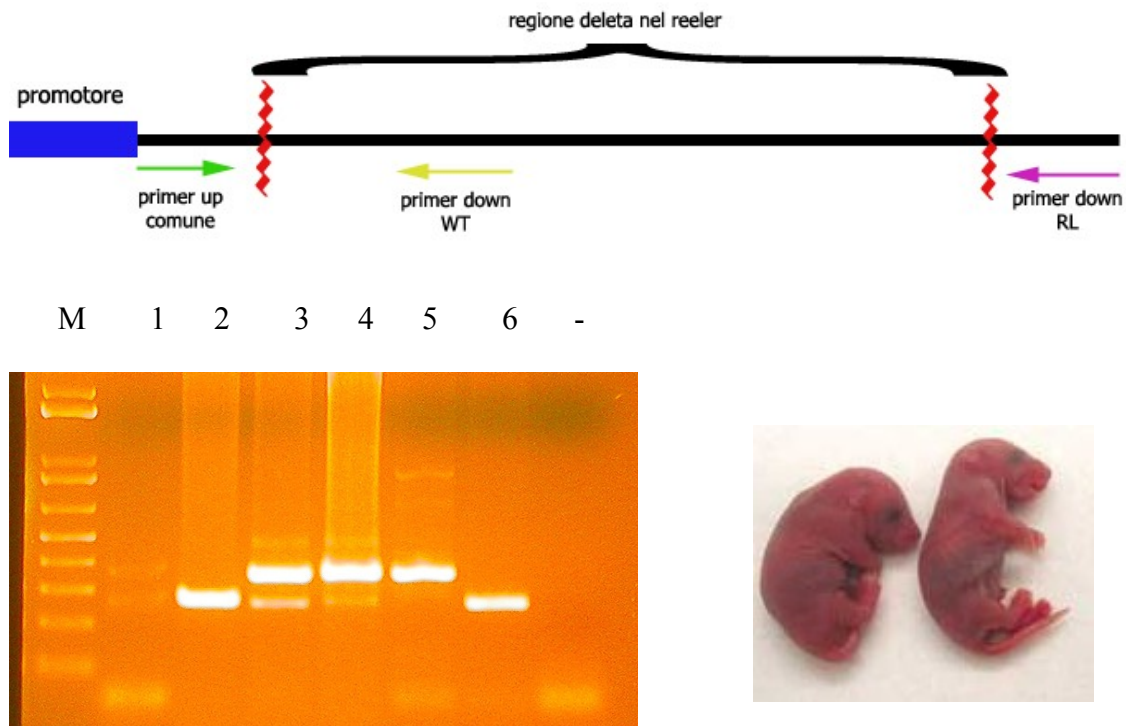


Figura 7. Genotipizzazione dei topi PO-P2 utilizzati per l'estrazione delle cellule staminali neurali. E' rappresentato uno schema dell'organizzazione del locus wild-type e *reeler* con i relativi primer. Nell'esempio riportato i topi 1, 3 e 4 sono risultati essere eterozigoti, i topi 2 e 6 wild-type e infine il topo 5 *reeler*. M= marcatore di peso molecolare; - = controllo negativo

In seguito all'estrazione e alla messa in coltura, si sono formati abbastanza precocemente dei piccoli aggregati cellulari in sospensione composti dalle cellule staminali neurali presenti, che hanno la tendenza ad aggregarsi. Nel giro di pochi giorni questi aggregati sono aumentati notevolmente di dimensioni, assumendo una forma sferica ben distinta, rimanendo in sospensione e prendendo il nome di neurosfere. La crescita delle neurosfere in diametro avviene a causa della proliferazione delle cellule di cui sono composte, la quale può portare, nelle

neurosferi mature, ad un diametro che supera i due millimetri. Tale proliferazione è stimolata costantemente dai fattori di crescita presenti nel terreno, in particolare l'EGF e il bFGF, essenziali al mantenimento della linea. Nelle prime fasi di crescita la neurosfera appariva traslucida, indice di buona salute cellulare, mentre nelle ultime fasi assumeva un aspetto molto più opaco, soprattutto nel centro della sfera. A questo livello i nutrienti non riescono ad arrivare fino a quella regione, data la notevole dimensione della neurosfera (figura 8A). È stato quindi necessario effettuare il passaggio cellulare, dissociandole in modo da liberare le cellule più interne che possono così riformare nuove neurosfere. Andando avanti con i passaggi, ho conservato il mezzo di coltura, che poi ho concentrato e caricato su gel denaturante per osservare l'effettiva produzione e secrezione della proteina. Come atteso ho osservato la banda del peso molecolare corretto solo nelle neurosfere wild-type. Inoltre ho verificato l'espressione del messaggero di due principali componenti del pathway di Reelin, ovvero il suo recettore VLDLR e il suo effettore citoplasmatico Dab1. In questo caso ho osservato l'espressione sia nelle neurosfere wild-type che nelle reeler. (figura 8B)

Infine, come ultima verifica e caratterizzazione cellulare, ho controllato l'espressione dei principali marcatori molecolari, con il fine di dimostrare l'effettiva natura staminale delle cellule estratte. Le cellule sono risultate essere tutte positive per la nestina, principale marcatore staminale, mentre il numero di cellule positive per la β III tubulina (TuJ) o per la GFAP, rispettivamente un marcatore neurale e un marcatore gliale, è risultato essere trascurabile (figura 8C).

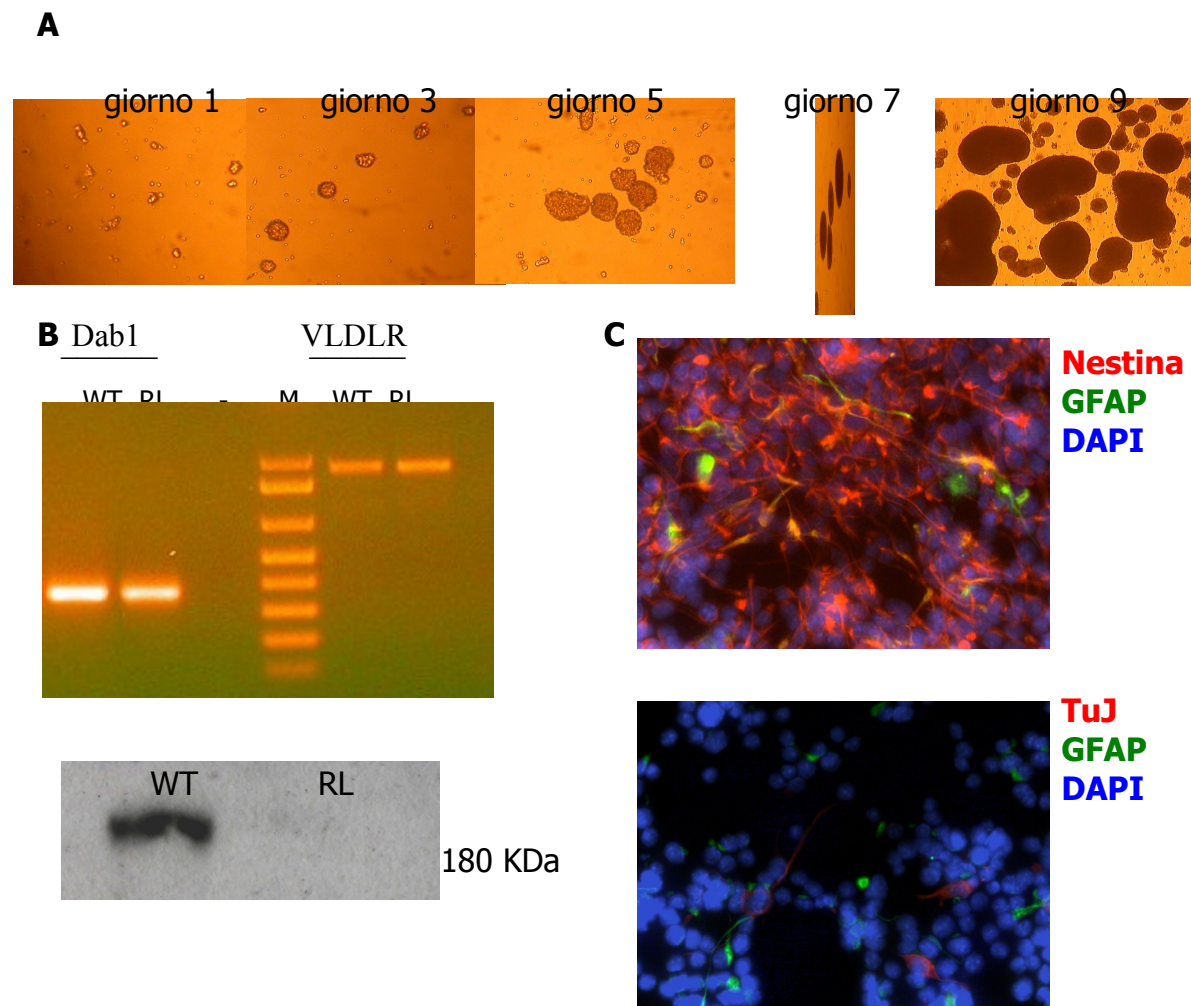


Figura 8. Caratterizzazione delle cellule staminali neurali. Nel pannello **A** sono rappresentate le fasi di formazione delle neurosfere (ingrandimento 4x), a partire dal primo stadio di aggregazione cellulare fino ad arrivare alla neurosfera matura. Nel pannello **B** è rappresentata la caratterizzazione molecolare ed in particolare l'espressione dei messaggeri di Dab1 e di VLDLR (RT-PCR) e l'espressione proteica di Reelin (Western blot), in basso a destra, presente solo nelle staminali wild-type, come atteso. Nel pannello C infine è rappresentata la marcatura che prova l'effettiva natura staminale neurale delle cellule estratte (ingrandimento 40x).

Le cellule staminali neurali reeler mostrano alterazioni nella formazione delle neurosfere e della crescita cellulare.

Fin dai primi passaggi è apparsa evidente una crescita cellulare ridotta delle cellule staminali estratte dai topi reeler. Il fenomeno è stato controllato a livello della formazione delle neurosfere, indice contemporaneamente sia della crescita che dell'aggregazione cellulare.

In particolare, partendo da un ugual numero di cellule dissociate, piastrate allo stesso momento e nelle stesse condizioni, si sono ottenute sempre neurosfere con un diametro mediamente minore nelle reeler, rispetto alle wild-type (figura 9A e 9B), all'incirca della metà. Visto che il diametro è indice del numero di cellule di cui è composta la neurosfera, anche andando a dissociare gli aggregati, agli stessi tempi dal piastramento le cellule wild-type sono in numero significativamente maggiore rispetto alle reeler (figura 9C).

Infine le cellule wild-type sono anche maggiormente "sferogeniche", infatti a partire dallo stesso numero di cellule piastrate, si formano molte più neurosfere nelle cellule normali piuttosto che nelle reeler (figura 9D).

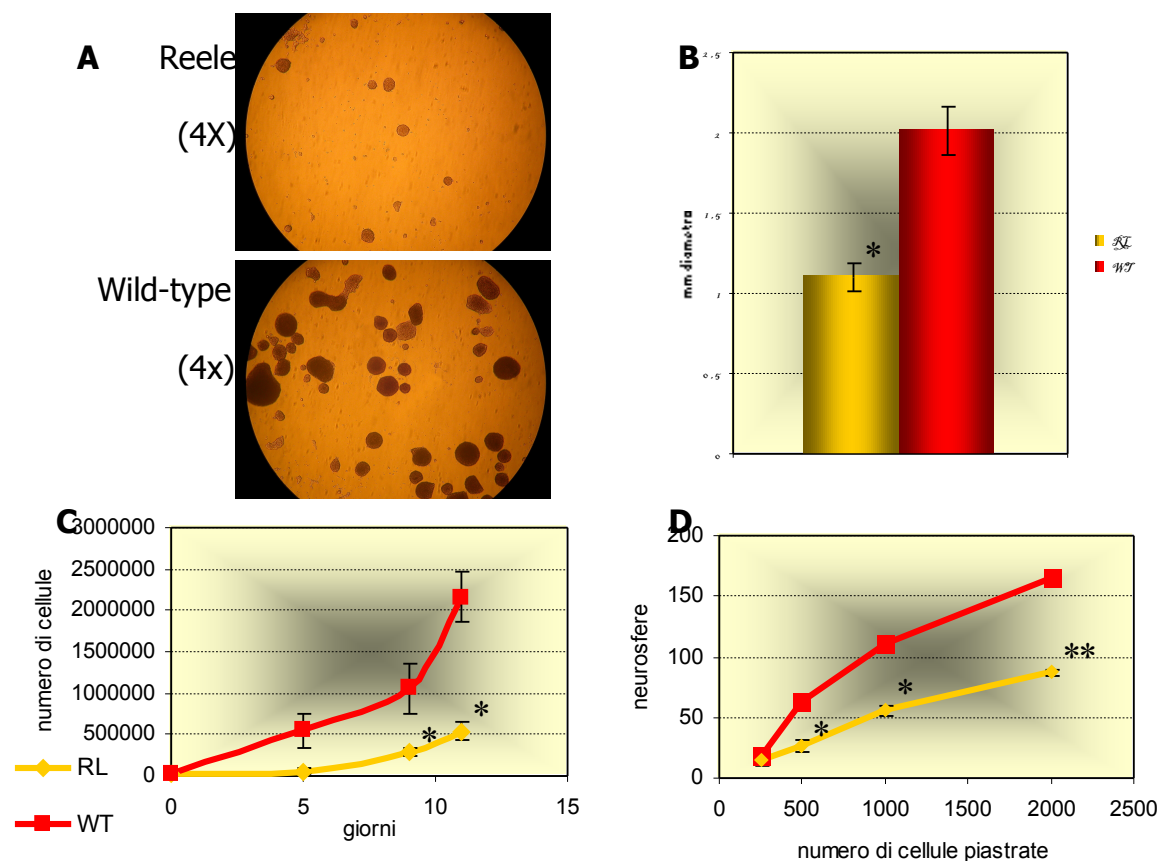


Figura 9. Differenze nella crescita delle neurosfere reeler confrontate con le neurosfere wild-type. Coltivando le due linee cellulari appare evidente, all'osservazione al microscopio, una crescita minore delle neurosfere reeler (A). Difatti, il diametro medio di tali neurosfere risulta essere quasi la metà della controparte wild-type (B). Inoltre la crescita assoluta delle cellule appare ridotta, sia come numero totale di cellule (C) che come numero di neurosfere totali (D).

Le cellule staminali neurali in assenza di Reelin sono incapaci di aggregarsi tra loro per formare distinte catene migratorie.

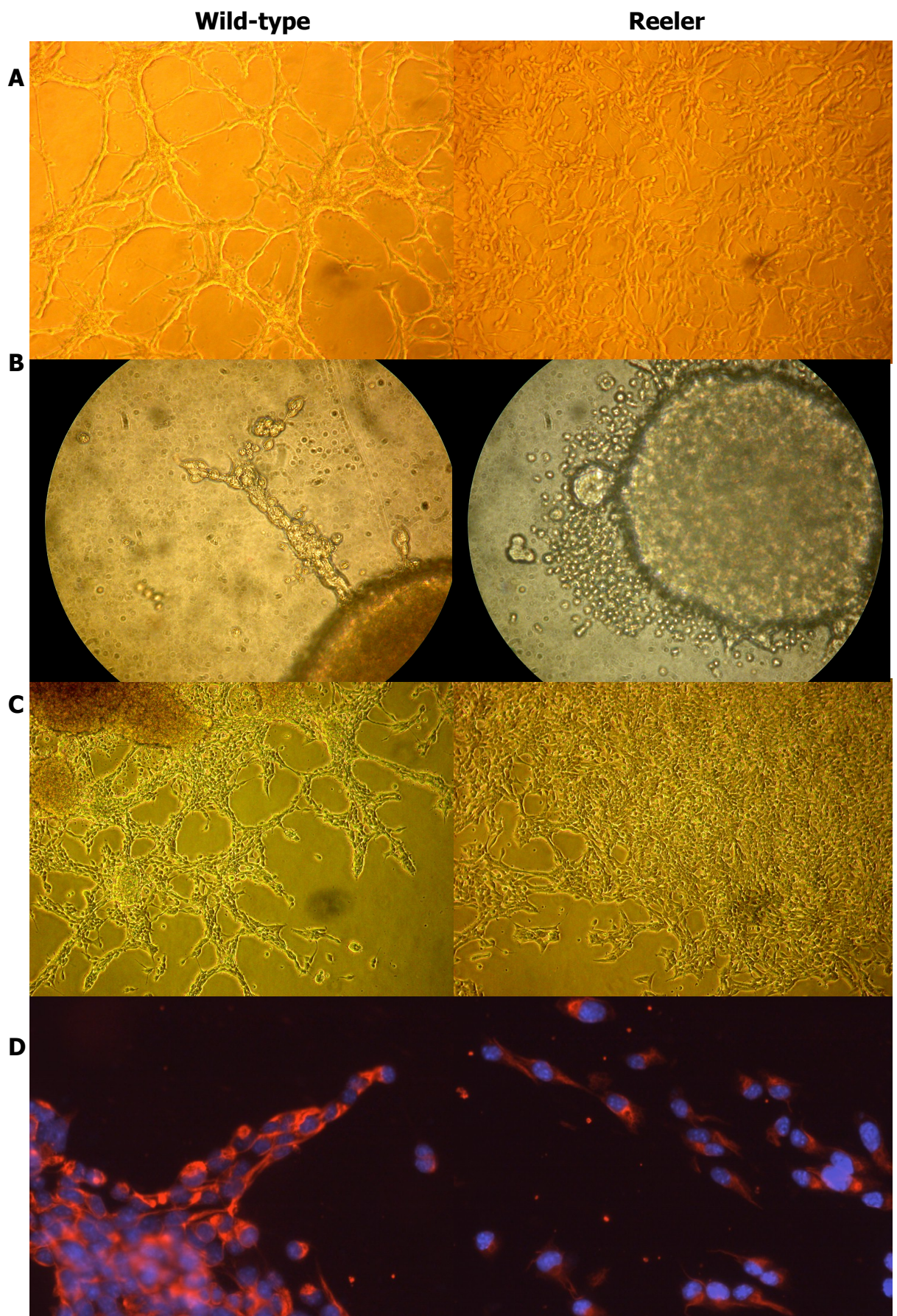
Le neurosfere *in vitro*, come già discusso, crescono in sospensione nel mezzo di coltura descritto. Quando invece vengono seminate su di una matrice artificiale, vengono indotte all'adesione e successivamente alla migrazione, che porta le singole cellule ad uscire dalla neurosfera. Normalmente questo tipo di migrazione è definita "a catena", viste le particolari strutture che le cellule formano nella loro avanzata sulla matrice. Come è ben evidente nel pannello di sinistra della figura 10, queste catene si sviluppano enormemente nelle cellule staminali neurali, ramificandosi numerose volte, mentre la percentuale di cellule che migrano distaccate dalle altre è trascurabile. L'architettura della catena varia a seconda del tipo di matrice utilizzato, indicando un ruolo attivo di essa nell'aggregazione cellulare. In dettaglio, su fibronectina e su matrigel (figura 10 A, C, D ed E) la migrazione a catena è sembrata essere maggiormente favorita rispetto a quella su gelatina (figura 10 B). Le neurosfere reeler invece hanno mostrato un comportamento del tutto differente, infatti hanno intrapreso ugualmente la migrazione al di fuori della neurosfera, ma hanno mostrato essere quasi del tutto incapaci di formare catene migratorie (pannello destro della figura 10). Indipendentemente dalla matrice utilizzata, tali cellule si sono disperse, intorno alla neurosfera, mantenendo un tipo di migrazione a singola cellula che ha portato alla formazione di un tappeto cellulare. Effettivamente sono state osservate delle piccole formazioni a catena, che comunque non sono paragonabili a quelle prodotte dalle wild-type.

La migrazione (a catena e non) è stimolata dall'adesione cellulare alla matrice, ma anche dai fattori EGF e bFGF presenti nel terreno, come dimostrato dal fatto che

neurosfele piastrate in terreno privo di essi sono rimaste ancorate, senza formazione di catene evidenti, anche dopo 5 giorni (figura 10 F). Inoltre il fatto che nemmeno la sostituzione dei fattori con il siero al 15% ha determinato la ricomparsa della migrazione a catena, significa che il processo è specificamente indotto dall'EGF e dal bFGF (figura 10 G).

Dal punto di vista dello stato differenziato delle cellule migranti, esse sono risultate essere staminali neurali positive per la nestina (figura 10 D) e non per la TuJ (figura 10 I). Marcando per la nestina, inoltre, si può apprezzare maggiormente in dettaglio l'aggregazione cellulare delle staminali neurali wild-type e la non associazione delle staminali reeler (figura 10 D).

Il tappeto cellulare, che si forma intorno alle neurosfere reeler, significa che tali cellule mantengono la capacità di migrare, sebbene lo facciano in maniera anomala rispetto alle wild-type. Andando a misurare la migrazione totale, ovvero il numero di cellule che passano attraverso una membrana porosa in un'unità di tempo, non sono state osservate differenze significative (figura 10 H).



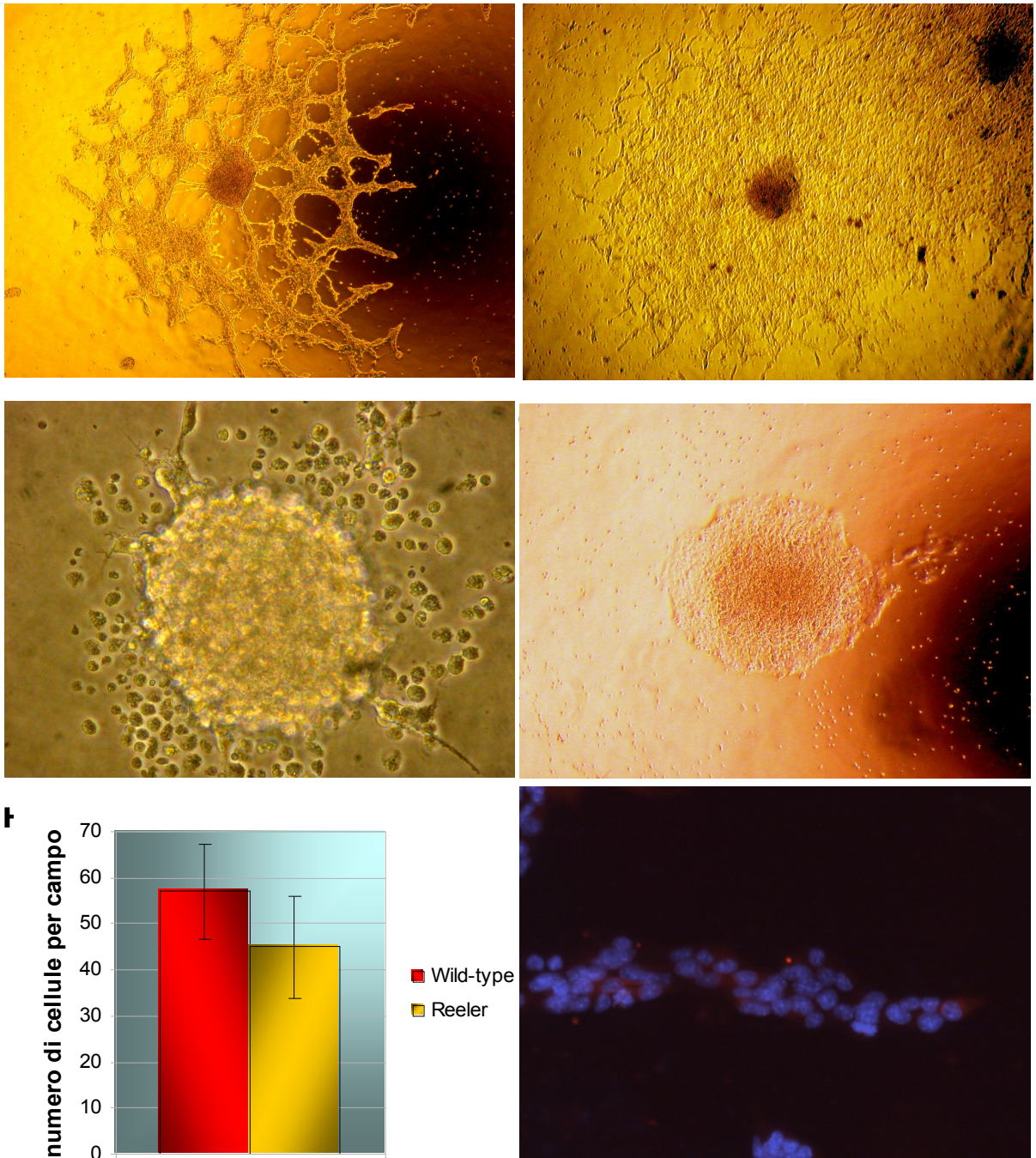


Figura 10. Saggio della migrazione a catena delle cellule staminali neurali. Le staminali wild-type migrano a catena sul matrigel (A), formando le tipiche strutture a cordone, mentre le reeler migrano in maniera più dispersa. Lo stesso risultato è ripetuto con la gelatina (B) e la fibronectina (C ed E con un ingrandimento minore). In "F" e "G" è mostrata l'assenza di migrazione rispettivamente in terreno senza fattori e in terreno con il siero al 15%. In "D" è rappresentato come tutte le cellule siano positive alla nestina ed in "I" negative alla TuJ. In "H" la misurazione della migrazione con la camera di Boyden.

Le cellule staminali neurali reeler mostrano una ridotta neurogenesi rispetto alle wild-type, mentre la gliogenesi permane invariata.

La presenza dell' EGF e del bFGF nel mezzo di coltura stimola la proliferazione continua delle cellule staminali neurali. Eliminando tali fattori *in vitro* le cellule prontamente escono dal ciclo, fermandosi in G0 e iniziando gli sconvolgimenti molecolari che portano al differenziamento.

La maggioranza delle cellule intraprende la gliogenesi, generando quindi componenti della glia. Il principale marcatore molecolare che ne permette l'identificazione è la GFAP, proteina del citoscheletro fortemente espressa negli astrociti. Oltre che per la positività a questo marcatore, gli astrociti sono riconoscibili anche per la morfologia cellulare caratteristica, che va dal tondeggianti allo stellato (figura 11 A).

Una parte delle cellule staminali in differenziamento invece intraprende un'altra strada, completamente differente, che porta alla formazione di cellule neuronali, per questo chiamata neurogenesi. I prodotti finali in questo caso sono molteplici, vista la grande varietà di neuroni esistenti, comunque esistono dei marcatori comuni che posso essere utilizzati per il riconoscimento, il più comune dei quali è la TuJ (β III tubulina) tipico dei neuroni immaturi e quindi delle prime fasi della neurogenesi. Come gli astrociti, anche i neuroni sono facilmente riconoscibili per la morfologia cellulare, composta da un corpo centrale con numerosi prolungamenti citoplasmatici, ovvero gli assoni in formazione (figura 11 A).

La percentuale delle cellule che intraprendono la neurogenesi ha cambiato significativamente in presenza o in assenza di Reelin, suggerendone quindi un ruolo nel processo di differenziamento. In particolare, il numero delle cellule positive per la TuJ è risultato essere sempre minore nelle cellule reeler, in

opposizione invece al numero di cellule positive per la GFAP, che è rimasto pressappoco costante. Lo stesso risultato si è ripetuto con altri marcatori neurali più tardivi, ovvero caratteristici di fasi differenziative più avanzate. Nel dettaglio, ho contato nelle cellule reeler la metà di neuroni positivi per la TuJ e per il neurofilamento (NF-H), rispetto alle cellule wild-type, ed un numero ben cinque volte minore di neuroni positivi per Map2 (figura 11 B).

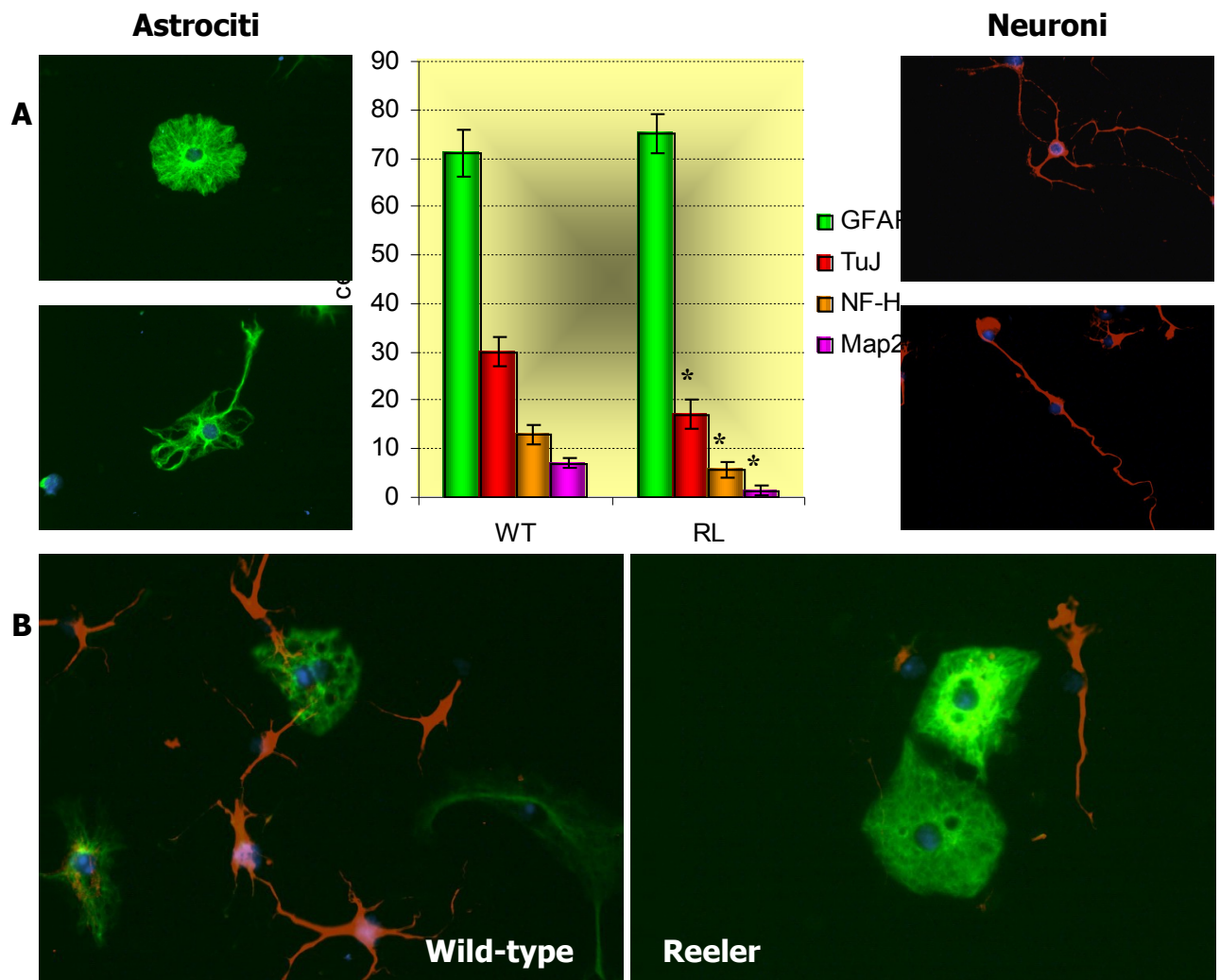


Figura 11. Differenziamento delle cellule staminali neurali wild-type e reeler. A) Nel pannello di sinistra sono riportati due astrociti tipici, dalla morfologia tonda e stellata. Nel pannello di destra invece due neuroni, un multiasssonico e un bipolare. Nel grafico a blocchi sono riportate le conte del differenziamento, espresse in percentuale di cellule rispetto ai nuclei.

Nella sezione B sono raffigurati due campi della conta, dove è visibile la differente quantità di neuroni generati dalle cellule wild-type rispetto alle cellule reeler. Tutte le fotografie hanno un ingrandimento di 40x.

In verde: cellule positive per la GFAP, astrociti

In rosso: cellule positive per la TuJ, neuroni.

In blu: colorazione DAPI per evidenziare i nuclei.

L'aggiunta di Reelin ricombinante al mezzo di coltura determina un ripristino delle proprietà migratorie a catena delle cellule staminali neurali reeler.

Reelin purificata attualmente non è disponibile. L'unico modo di ottenere una quantità considerevole della proteina è quello di trasfettare linee cellulari con un plasmide contenente il cDNA e di raccogliere il sovrantante, dove Reelin ricombinante sarà rilasciata. Allo scopo ho utilizzato due linee cellulari, le HEK293 e le HeLa, entrambe caratterizzate da una buona efficienza di trasfezione e soprattutto dall'assenza di espressione di Reelin endogena (Western blot in figura 12). Ho così accumulato una buona quantità della proteina, che ho potuto aggiungere al mezzo di coltura durante il saggio di migrazione a catena. In presenza di Reelin esogena non ho osservato differenze significative nella formazione delle catene delle cellule wild-type. Al contrario, le cellule reeler hanno mostrato una maggiore tendenza all'aggregazione per formare delle strutture molto simili a vere e proprie catene (figura 12). Il risultato è confermato a maggior dettaglio andando ad effettuare la marcatura fluorescente dei citoplasmi con la nestina, con la quale è possibile apprezzare l'organizzazione nettamente più ordinata e tendente all'associazione cellulare delle staminali reeler addizionate con Reelin ricombinante (figura 12).

Sebbene sia difficile poter quantificare l'aggregazione cellulare in un saggio del genere, bisogna dire che il ripristino della migrazione a catena non è mai stato assoluto. Infatti in seguito all'aggiunta di Reelin esogena, ho ottenuto una tendenza alla formazione delle catene migratorie che si avvicina a quella delle cellule wild-type, ma non la uguaglia.

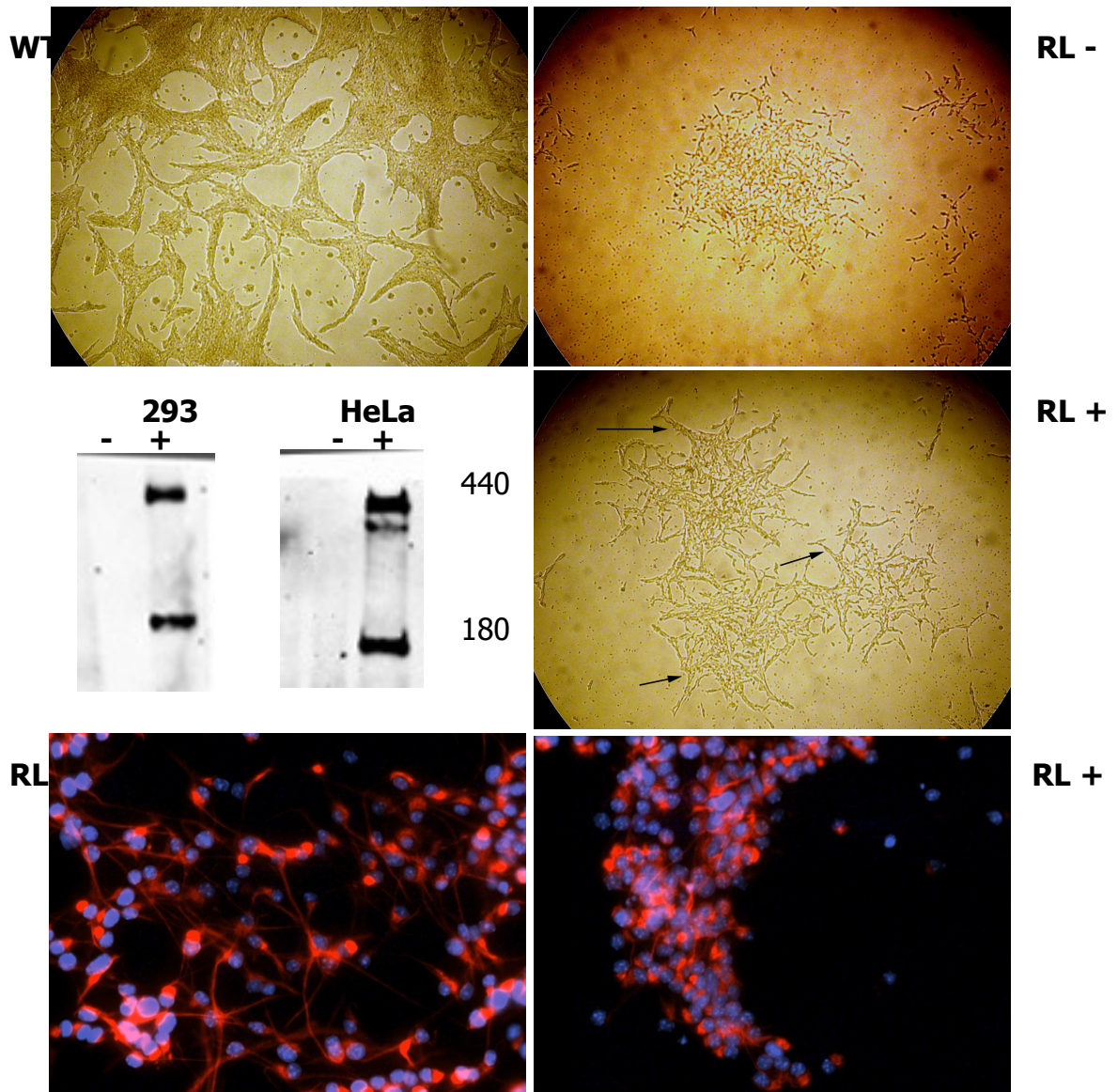


Figura 12. Ripristino della formazione delle catene in seguito all'aggiunta di Reelin ricombinante. E' rappresentato (ingrandimento 4x) il saggio di migrazione a catena effettuato su poliornitina/fibronectina. In condizioni normali le cellule reeler (RL-) migrano in maniera disorganizzata, visibile anche a maggior dettaglio (40x) con la marcatura fluorescente per la nestina. Aggiungendo Reelin al mezzo di coltura, le cellule reeler (RL+) si aggregano maggiormente tra loro, a formare delle catene più ordinate.

E' mostrato il Western blot di controllo dell'avvenuta trasfezione sia delle HEK293 che delle HeLa.

In rosso: nestina

In blu: DAPI (nuclei)

L'aggiunta di Reelin ricombinante ripristina il normale tasso di neurogenesi nelle cellule staminali neurali reeler.

Ho utilizzato lo stesso approccio del precedente esperimento per saggiare l'eventuale effetto di Reelin anche sul processo del differenziamento. Infatti ho addizionato gli stessi sovranatanti, prelevati dalle trasfezioni delle 293 e delle Hela, alle cellule staminali neurali in differenziamento. Come atteso ho riscontrato un aumento della neurogenesi, misurato con la percentuale di cellule positive per la β III tubulina o TuJ. Con entrambe le linee cellulari utilizzate, tale aumento di neurogenesi è stato modesto, aggirandosi infatti intorno al 5%. Inoltre un aumento paragonabile si è riscontrato anche nelle cellule wild-type addizionate di Reelin esogena (figura 13 A e B).

Lo stato generale delle cellule in differenziamento, durante questi saggi, era piuttosto sofferente. La mortalità osservata aumentava sensibilmente a causa, probabilmente, di componenti tossici presenti nei sovranatanti utilizzati. Per questo motivo sono ricorso anche ad un terzo tipo di mezzo condizionato, ovvero quello delle cellule staminali stesse. In particolare ho utilizzato il mezzo delle staminali reeler come controllo negativo e il mezzo delle staminali wild-type concentrato, come controllo positivo contenente Reelin. In questo caso la mortalità cellulare indotta dal sovranatante è risultata essere trascurabile e l'induzione della neurogenesi delle reeler molto più accentuata, raggiungendo quasi il 15% di aumento. Nuovamente ho constatato un'induzione anche nelle cellule wild-type, statisticamente significativa (figura 13 C).

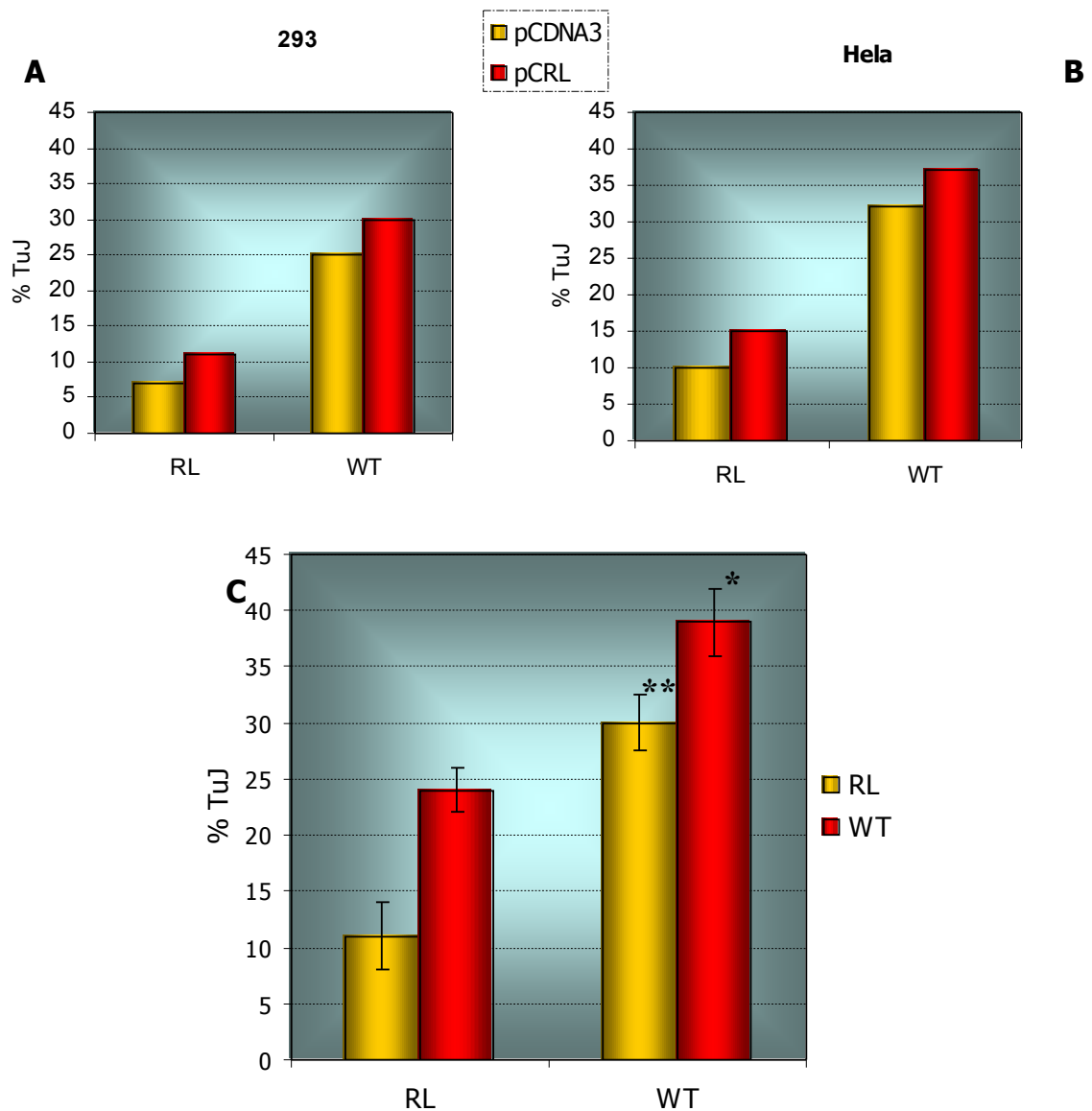


Figura 13. Aumento del livello di neurogenesi in seguito all'aggiunta di Reelin esogena. Saggio di differenziamento cellulare e conta delle cellule positive per la TuJ (o β III tubulina). A) aggiunta di mezzo condizionato delle HEK293 trasfettate B) aggiunta del mezzo condizionato delle HeLa trasfettate C) aggiunta del mezzo condizionato delle cellule staminali neurali stesse.

Giallo= aggiunta del mezzo di controllo (vettore vuoto o mezzo nsc reeler)

Rosso= aggiunta del mezzo contenente Reelin (pCRI o mezzo nsc wild-type)

Le cellule staminali neurali murine sono trasducibili ed esprimono efficacemente la proteina ricombinante indotta.

Gli approcci da me utilizzati per ingegnerizzare le cellule staminali neurali hanno coinvolto sia la lipofezione che l'elettroporazione. Le cellule staminali neurali sono molto più delicate delle linee cellulari tumorali normalmente utilizzate per le trasfezioni, caratteristica che le rende meno agevolmente maneggiabili. Le trasfezioni di prova con il plasmide pEGFP (Clontech), che porta la sequenza codificante della *green fluorescent protein*, hanno dimostrato l'avvenuta ingegnerizzazione con entrambi i metodi utilizzati, come evidenziato dalla presenza di cellule verdi all'interno della neurosfera, visualizzata al microscopio a fluorescenza (figura 14). In ogni modo, sia la lipofezione che l'elettroporazione sono risultate essere particolarmente traumatiche per le cellule staminali neurali, le quali hanno mostrato un incremento dell'adesione spontanea alla piastra in assenza di matrice ed una mortalità cellulare piuttosto elevata. Visto l'ugual livello di tossicità ma la maggiore efficienza dell'elettroporazione, ho proseguito gli esperimenti con quest' ultimo approccio.

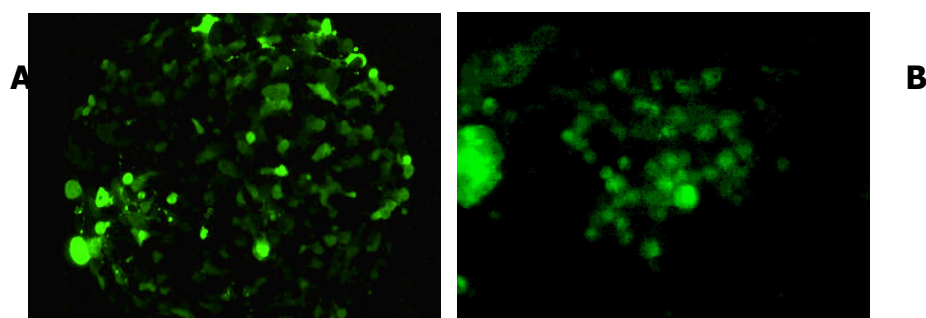


Figura 14. Espressione della GFP in seguito ad ingegnerizzazione cellulare delle neurosfere. E' mostrata una neurosfera a 48 h dall'elettroporazione (A) ed un'altra a 48 h dalla lipofezione ad ingrandimento 10x (B).

Le cellule staminali neurali reeler, ingegnerizzate per esprimere la proteina Reelin, mostrano un ritorno alla condizione wild-type dei livelli di neurogenesi e una maggiore tendenza alla migrazione a catena.

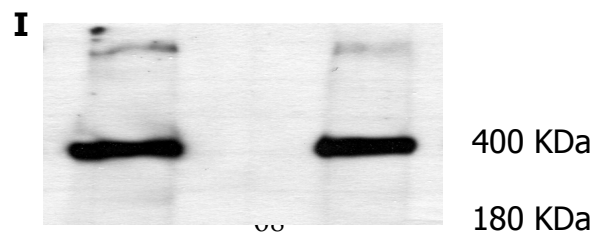
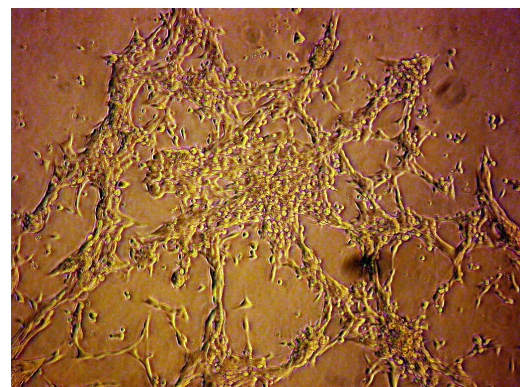
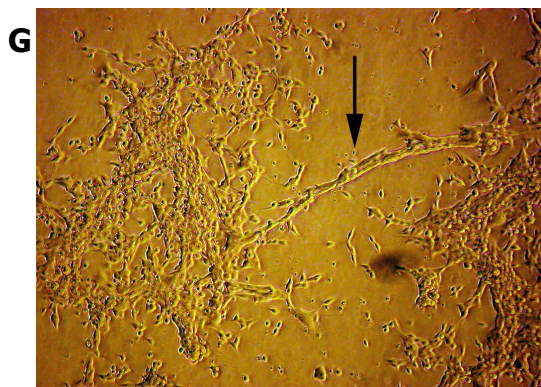
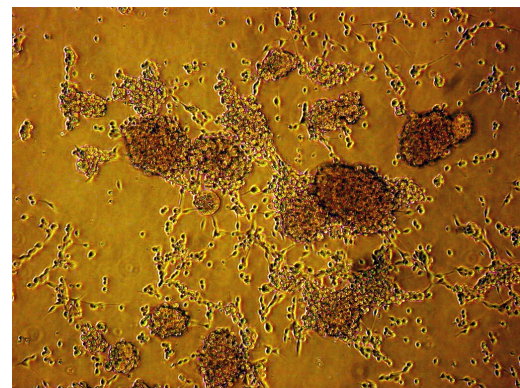
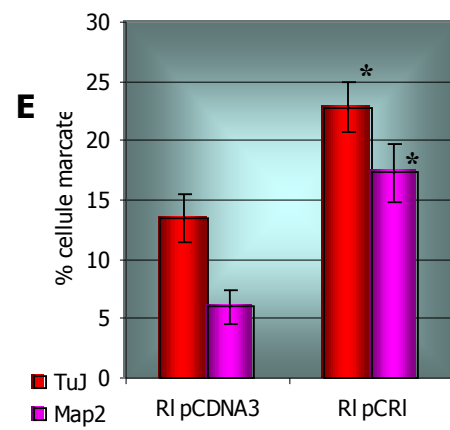
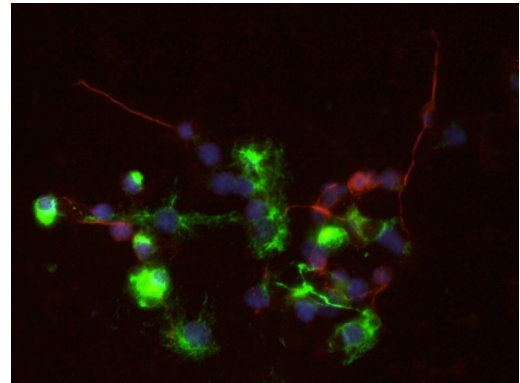
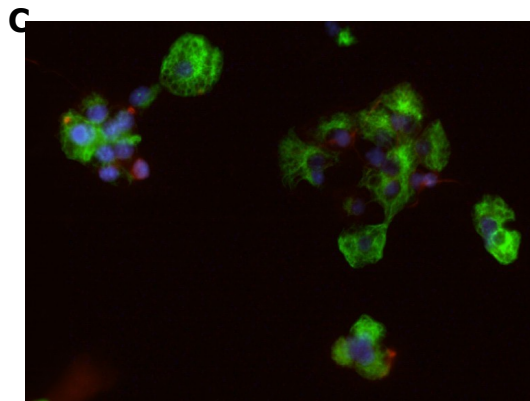
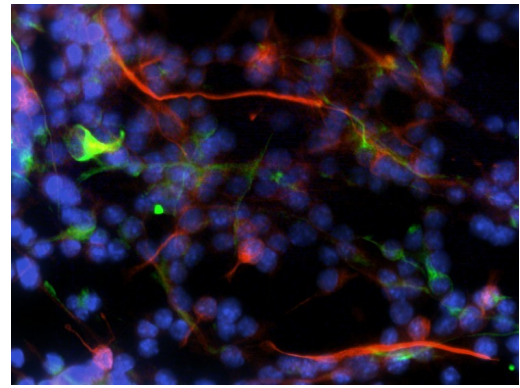
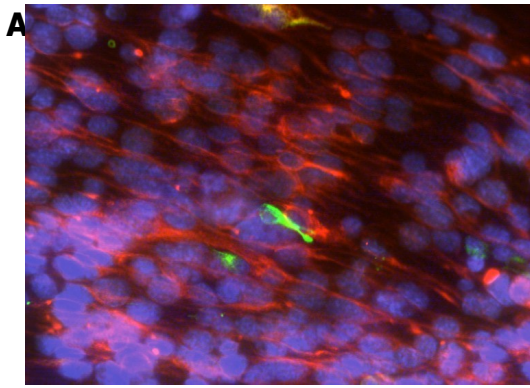
Con lo scopo di ottenere un ritorno maggiore delle cellule staminali reeler alle caratteristiche wild-type, rispetto alla semplice aggiunta di terreni condizionati, ho elettroporato le cellule reeler con il plasmide pCRI (D'Arcangelo *et al*, 1997) precedentemente utilizzato nelle altre trasfezioni. Anche in questo caso ho osservato un'elevata mortalità ed una sofferenza cellulare notevole. I sopravvissuti raccolti a 48 h e concentrati, hanno dimostrato un'ottima espressione e secrezione della proteina nel mezzo di coltura (figura 15 I).

Per verificare lo stato delle cellule staminali neurali, una volta avvenuta la selezione, ho effettuato una marcatura delle cellule, fatte aderire su matrigel, in fase di proliferazione. L'espressione della nestina permane elevata (figura 15 A), a dimostrazione del fatto che le cellule si mantengono staminali malgrado il trauma, però il livello di espressione della GFAP ma soprattutto della β III tubulina, è risultato essere sensibilmente maggiore del livello basale (figura 15 B), indice probabilmente di induzione al differenziamento spontaneo. Malgrado questo ho proseguito con gli esperimenti, andando a differenziare le cellule per verificare il livello di neurogenesi. Effettivamente ho constatato un notevole aumento delle cellule positive alla TuJ e a Map2 nelle cellule reeler trasfettate con pCRI (figura 15 D e grafico E) se confrontate con le reeler trasfettate con il vettore vuoto pCDNA3 (figura 15 C).

Per avvalorare il ripristino della condizione wild-type inoltre, ho saggiato anche la migrazione a catena su matrice di fibronectina. In questo caso l'aspetto sofferente delle cellule non ha permesso di ottenere un bel risultato, comunque si può notare

l'assenza di formazioni a catena nelle reeler trasfettate con il vettore vuoto (figura 15 F), mentre la loro comparsa nelle cellule trasfettate con il vettore pieno (figura 15 G e H), anche se non ai livelli precedentemente ottenuti con i sovranatanti delle cellule trasfettate.

Figura 15. Trasfezione stabile delle cellule staminali neurali e caratterizzazione dell'effetto della sovraespressione di Reelin. A e B) Marcatura delle cellule trasfettate in fase proliferativa, in verde la GFAP e in rosso la nestina (A) e la TuJ (B). C e D) Marcatura dopo differenziamento, in verde la GFAP e in rosso Map2, nelle cellule reeler trasfettate con il vettore vuoto (C) e con il vettore pieno pCRL (D). E) Stima della neurogenesi nelle cellule trasfettate, contando il numero di cellule positive per la TuJ e per la Map2. F, G e H) Saggio delle catene delle cellule trasfettate, in F con il vettore vuoto, in G ed in H con il vettore pieno. E' evidenziata con la freccia una catena ben sviluppata. I) Western blot di controllo dei sovranatanti prelevati dalle cellule reeler trasfettate con il vettore pieno (pCRL), con il vettore vuoto (pCDNA3), e dalle cellule wild-type come controllo positivo (WT).



DISCUSSIONE

Benché le principali conoscenze dell'azione di Reelin riguardino l'embriogenesi, tale proteina permane nella matrice cerebrale per tutta la vita, indicando quindi un'azione anche nella migrazione neurale nell'adulto. Nel cervello dell'adulto la migrazione è soprattutto a carico delle cellule staminali neurali, nella *rostral migratory stream* ed in pochi altri distretti, come già discusso nell'introduzione. Tali cellule esprimono sia Reelin che gli altri principali componenti del suo pathway (Kim et al, 2001), rendendo quindi facilmente ipotizzabile un suo diretto coinvolgimento nel processo. Questo mi ha portato ad indagare in maggior dettaglio questo aspetto della proteina, per certi versi scarsamente conosciuto.

La natura postmitotica della maggior parte dei componenti cerebrali nell'adulto, rende possibile l'isolamento delle cellule staminali neurali, le quali infatti, grazie alla stimolazione di alcuni fattori di crescita, sono le uniche cellule che riescono a proliferare in determinate condizioni di coltura. Le linee così ottenute si possono quindi considerare una mescolanza di cellule staminali e di cellule progenitrici, difficilmente separabili per via della relativa scarsità di nozioni circa le differenze principali tra i due tipi. In ogni modo, vista la relativa dinamicità dello stato differenziativo e la probabile origine comune dei due gruppi, è lecito parlare genericamente di cellule staminali, raggruppandoli quindi in un'unica entità cellulare.

La buona espressione di Reelin che ho verificato nelle neurosfere ottenute è un dato interessante, dal momento che tale proteina ha un'espressione piuttosto ristretta a pochi tipi cellulari (D'Arcangelo 2006). Tutto questo lascia supporre un

effettivo ruolo funzionale, avvalorato dalla contemporanea espressione sia dei recettori che dell'effettore citoplasmatico Dab1.

La prima osservazione sulla differente crescita delle neurosfere che esprimano o no Reelin, già richiama l'attenzione. Infatti il particolare tipo di crescita in sospensione implica una serie di processi strettamente concatenati, i quali potrebbero tutti essere influenzati dalla proteina o solo parte di essi. Nella formazione degli aggregati sferici entra in gioco sia il ciclo cellulare che il contatto e la giunzione extracellulare. Non è quindi sorprendente un'azione di Reelin in tal senso, vista il suo comprovato effetto sul citoscheletro, ma si potrebbe anche ipotizzare un effetto secondario a livello della membrana. In dettaglio Reelin riconosce e lega stabilmente numerosi recettori di membrana, come i già citati VLDLR e ApoER2 ma anche le integrine e le CNR caderine (Yagi, 2001). Con questo legame la proteina potrebbe agire da ponte, unendo fra loro le cellule, le quali instaurerebbero poi legami più saldi. Parallelamente si avrebbe anche una stimolazione del ciclo cellulare, osservazione questa ancora mai ipotizzata in letteratura. Infatti nel pathway intracellulare di Reelin sono presenti alcuni fattori riconducibili alla proliferazione e/o alla sopravvivenza (processi ovviamente strettamente legati tra loro nelle cellule neurali), come per esempio la GSK3 β che, agendo a sua volta sulla β catenina, regola l'apoptosi ma anche l'adesione cellulare (Sokolova *et al*, 2008) o la Cdk5/p35 che, agendo sul fattore di trascrizione STAT3, regola l'espressione genica di molti effettori del ciclo cellulare (Lin *et al*, 2007). In aggiunta, bisogna ricordare che in vitro la proliferazione delle NSC è portata avanti dai fattori di crescita EGF e bFGF, i quali sono ben caratterizzati dal punto di vista molecolare per quanto riguarda i pathway intracellulari. In entrambe le intricatissime reti molecolari, che si attivano in seguito al legame tra questi

fattori ed i loro recettori, è presente la chinasi pi3k (inositolo-3-fosfato chinasi), comune anche alla via intracellulare di Reelin (Sakata *et al* 2002, Bock *et al* 2003). Infine, l'effetto potrebbe essere indiretto, correlato alla maggiore aggregazione cellulare, la quale da sola sembra essere capace di stimolare la proliferazione delle cellule staminali neurali (Mori *et al*, 2006).

La migrazione a catena delle cellule staminali neurali è l'evento fisiologico che le conduce dal sito di origine nella SVZ verso il bulbo olfattorio. Essendo questa la migrazione principale a carico di tali cellule, si può considerare come la modalità prioritaria di spostamento. La forte tendenza delle cellule *in vitro* a migrare formando aggregati, che ho riscontrato in tutti gli esperimenti condotti, indica quanto il meccanismo sia radicato nella biologia di questo particolare tipo cellulare. Inoltre il diverso aspetto morfologico delle catene in base al tipo di matrice utilizzato, rende evidente come le interazioni cellula-matrice siano essenziali nella corretta migrazione a catena. Le matrici da me utilizzate sono per la maggior parte importanti costituenti della matrice extracellulare cerebrale, come la fibronectina e il collagene, con lo scopo di andare a ricreare un ambiente prossimo a quello fisiologico. L'assenza di Reelin determina la quasi completa impossibilità di formazione delle catene ma non l'impossibilità alla migrazione. Questo è un dato importante perché chiarifica maggiormente il ruolo di questa proteina, la quale evidentemente non è necessaria nelle prime fasi del processo migratorio, bensì ad uno stadio più avanzato. Quello che succede è infatti che le cellule iniziano a migrare singolarmente, uscendo dalla neurosfera e aderendo alla matrice. Successivamente, in presenza di Reelin, le cellule si aggregano a formare le catene, mentre in assenza di Reelin proseguono nella migrazione a singola cellula. Il fatto che la somministrazione della proteina esogena ripristini la capacità, delle

cellule reeler, di abbandonare la migrazione a singola cellula, è la prova del diretto coinvolgimento di Reelin in tale aggregazione. La base molecolare potrebbe essere la stessa che governa la formazione della neurosfera, trattandosi comunque di aggregazione cellulare, ma potrebbero intervenire anche altri fattori. In particolare, la migrazione a catena nei saggi condotti è stimolata dall'EGF presente nel terreno, noto effettore del processo (Gambarotta *et al*, 2004). Il già discusso contatto tra l'EGFR e Reelin attraverso la pi3k, potrebbe quindi spiegare, anche in questo caso, l'effetto osservato nelle cellule reeler. Altro noto sistema implicato, nella migrazione a catena delle cellule staminali neurali, è quello della citochina SDF1 α e del suo recettore CXCR-4 (Imitola *et al*, 2004). In tale sistema entra in gioco nuovamente la pi3k (Zheng *et al*, 2007), che quindi potrebbe essere l'effettore di Reelin in tutti i processi di formazione delle catene.

Gli esperimenti da me condotti indicano che la presenza della proteina è sufficiente per la corretta aggregazione a catena, che essa sia prodotta dalle cellule in migrazione stesse, o che sia presente in grandi quantità nel mezzo. E' probabile che *in vivo* le cellule staminali in migrazione rilascino continuamente la proteina in modo da formare un microambiente, lungo la strada percorsa, favorevole alla migrazione a catena, che influenza quindi sia loro stesse che le cellule che le circondano.

Il lavoro sperimentale di Kim (Kim *et al*, 2001), ripreso in seguito anche da Andrade (Andrade *et al*, 2007), sembra affermare l'esatto contrario, ipotizzando per Reelin un ruolo di mediatore del distacco delle cellule staminali dalla catena. Alcune considerazioni, che possono spiegare la notevole discrepanza tra questi dati e quelli da me ottenuti, riguardano l'approccio sperimentale. Infatti entrambi i gruppi utilizzano espianti della SVZ, anziché cellule staminali neurali isolate e

caratterizzate. In questo modo non si ha la certezza che la migrazione osservata riguardi effettivamente le staminali e non piuttosto un insieme eterogeneo di componenti cellulari di quella parte del cervello. Inoltre non considerano l'espressione endogena di Reelin da parte delle staminali stesse, ma solo quella del bulbo olfattorio. Infine Andrade osserva, nei topi reeler, la completa assenza della *rostral migratory stream* ed un massivo accumulo di staminali neurali non migrate nella SVZ. Questo è in accordo con i miei risultati, provando che le cellule reeler sono incapaci di migrare sottoforma di struttura a catena. Infatti la modalità di migrazione a catena rende le cellule staminali invasive nel tessuto cerebrale, come provato da trapianti di cellule effettuate nel tessuto cerebrale. Le cellule reeler, in questo caso, permangono nel sito di inoculo mentre le cellule wild-type raggiungono il sito bersaglio (comunicazione personale del prof. Gaetano Finocchiaro, Istituto Neurologico Besta, Milano).

Una volta compiuta la migrazione e raggiunta la destinazione finale, le cellule staminali neurali hanno il compito di differenziarsi per generare nuovo materiale cerebrale. E' quindi di estrema rilevanza il fatto che Reelin agisca anche a questo livello, influenzando la neurogenesì. I miei dati infatti suggeriscono che la presenza di Reelin favorisca notevolmente la genesi di nuovi neuroni e che, nuovamente, essa possa essere endogena delle cellule stesse in differenziamento o esogena, prodotta quindi da altre cellule e presente nel sito dove c'è bisogno di nuovi neuroni. La riduzione della neurogenesì in assenza di Reelin si manifesta a diversi stadi del processo, come dimostrato dalla minore quantità di cellule positive per i marcatori neurali, sia precoci che tardivi.

Il ripristino di più alti livelli di neurogenesì, ottenuto mediante l'aggiunta di Reelin esogena o anche attraverso l'induzione dell'espressione di Reelin da parte delle

cellule ingegnerizzate, dimostra maggiormente il ruolo diretto di questa proteina nel processo. Tale ruolo, sebbene si discosti abbastanza rispetto all'azione sulla migrazione, trova riscontro in alcuni lavori sperimentali, come quello di Won (Won *et al*, 2006) che riscontra un numero inferiore di cellule positive contemporaneamente per DCX (marcatore neurale precoce) e per l'incorporazione della BrdU, nei cervelli dei topi reeler confrontati con quelli wild-type. Questo comporta che i topi reeler siano molto più sensibili alle ischemie cerebrali ed in generale agli eventi traumatici che implicano una riparazione del tessuto danneggiato. Alle stesse conclusioni giunge il lavoro di Zhao (Zhao *et al*, 2007) che inoltre osserva una variazione solamente nella neurogenesi e non nella gliogenesi, concordando perfettamente con i dati da me ottenuti.

Reelin potrebbe agire nel differenziamento a livello della sopravvivenza neurale, ovvero quel processo che porta alla stabilità dei neuroni in via di maturazione. Infatti la GSK3 β , agendo sulla proteina tau, stabilizza il citoscheletro del neurone e ne inibisce la degenerazione (Ohkubo *et al*, 2003). Inoltre la pi3k sembra essere, anche in questo caso, un importante effettore del ruolo di Reelin, andando a fosforilare, inattivandola, la proteina BAD. Quest'ultima è un membro pro-apoptotico della famiglia di Bcl-2 e fosforilata è incapace di formare eterodimeri apoptotici con Bcl-XL (Ohkubo *et al*, 2007).

I tre effetti biologici di Reelin, osservati nelle cellule staminali neurali, potrebbero essere indipendenti l'uno dall'altro, espressione quindi della multivalenza di questa proteina, o invece essere semplicemente tre manifestazioni distinte di un'unica funzione. Difatti, proliferazione, differenziamento e migrazione sono le principali proprietà delle NSC, quelle che ne stabiliscono la natura staminale. Non sorprende quindi che i tre processi siano strettamente collegati e che Reelin possa agire su

tutti e tre contemporaneamente. In dettaglio, la migrazione a catena, nella *rostral migratory stream*, è spesso associata più ai neuroblasti o comunque ai precursori neurali, piuttosto che alle cellule staminali neurali vere e proprie (Murase e Horwitz, 2004). Dal momento che la presenza di Reelin induce la neurogenesi fin dalle sue fasi più precoci, è lecito ipotizzare che determini un maggior numero di precursori neurali e neuroblasti, nelle coltivazioni miste di cellule da me utilizzate. Questo spiegherebbe l'ingente quantità di catene migratorie osservate nelle cellule wild-type e la quasi totale assenza osservata nelle reeler, così come la maggiore proliferazione, notoriamente attuata ad alti livelli nei precursori neurali.

La scarsa conoscenza di buoni marcatori, che discriminino tra cellula staminale e cellula precursore, rende questa ipotesi difficilmente verificabile. Le cellule componenti la catena infatti, sono risultate essere positive alla nestina e non alla β III tubulina, indicando comunque uno stato differenziativo molto precoce.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Le cellule staminali neurali adulte sono oggetto di numerosi studi, per via del loro altissimo potenziale nella medicina rigenerativa cerebrale. Numerose lesioni cerebrali potrebbero essere completamente riparate con impianti locali di tali cellule, coltivate *in vitro* e possibilmente ingegnerizzate con lo scopo di aumentarne l'efficienza rigenerativa. Reelin è fortemente implicata in questo processo, stimolando le tre caratteristiche principali che portano le cellule a riparare il tessuto danneggiato. L'incapacità delle cellule reeler di essere invasive nel tessuto, dimostra come prima dell'impianto bisognerebbe verificare l'espressione della proteina nelle cellule. Se questa dovesse risultare non soddisfacente, si dovrebbe agire sul DNA, per esempio ponendo il gene sotto un promotore forte, così da garantire una grande produzione e rilascio della proteina. Inoltre, qualora fosse disponibile la proteina purificata, si potrebbe agire con inoculi contemporanei di cellule e prodotto proteico, così da aumentarne ulteriormente il potere migratorio e differenziativo.

Da non sottovalutare è anche il potenziale nella terapia di alcune malattie neurodegenerative, come l'Alzheimer, che sono state associate alla proteina. In questo caso infatti un trapianto di cellule staminali avrebbe il duplice vantaggio di riparare le piccole lesioni indotte dalla malattia e di somministrare *in loco* un'ingente quantità del prodotto proteico che attenuerebbe la degenerazione.

Studi sulla regolazione genica di Reelin, ancora molto poco diffusi, sono necessari alla luce dei miei risultati. Infatti indagando, nel particolare, cosa accende il gene direttamente in questo modello cellulare, si può pensare ad un approccio di

stimolazione delle cellule staminali endogene del paziente, tale che diventerebbe addirittura superfluo l'inoculo, con il notevole vantaggio di risparmiare l'operazione chirurgica necessaria ed i numerosi problemi legati all'incompatibilità ed al rigetto. Tirando le somme, ci sono buone premesse per continuare questo tipo di studi, i quali un giorno potrebbero portare ad una completezza delle conoscenze riguardo le cellule staminali neurali, tali da poter rappresentare la cura definitiva per la maggior parte delle infermità cerebrali più diffuse e dannose dei nostri tempi.

BIBLIOGRAFIA

Aboudy KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY. "Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas". **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(23): 12846-12851, 2000.

Alcantara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecca L. "Regional and cellular patterns of Reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse". **J Neurosci** 18: 7779-7799, 1998.

Alison MR. "Liver stem cells: implications for hepatocarcinogenesis". **Stem Cell Rev** 1(3):253-60, 2005.

Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM. "Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb". **J Neurosci** 26: 10508–10513, 2006.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. "A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells". **Nat Rev Neurosci** 2: 287–293. 2001

Andrade N, Komnenovic V, Blake SM, Jossin Y, Howell B, Goffinet A, Schneider WJ and Nimpf J. "ApoER2/VLDL receptor and Dab1 in the rostral migratory stream function in postnatal neuronal migration independently of Reelin" **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(20): 8508-8513, 2007.

Anton ES, Kreidberg JA, Rakic P. "Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of cerebral cortex". **Neuron** 22:277-289, 1999.

Anton ES, Ghashghaei HT, Weber JL, McCann C, Fischer TM, Cheung ID, Gassmann M, Messing A, Klein R, Schwab MH, Lloyd KC, Lai C. "Receptor tyrosine

kinase ErbB4 modulates neuroblasts migration and placement in the adult forebrain". **Nat Neurosci** 7: 1319–1328, 2004.

Ballif BA, Arnaud L, Arthur WT, Guris D, Imamoto A, Cooper JA. "Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons". **Curr Biol** 14: 606-610, 2004.

Bar I, Lambert De Rouvroit C, Royaux I, Kritzman DB, Dernoncourt C, Ruelle D, Beckers MC, Goffinet AM. "A YAC contig containing the reeler locus with preliminary characterization of candidate gene fragments" **Genomics** 3: 543-549, 1995.

Beffert U, Morfini G, Bock HH, Reyna H, Brady ST, Hertz J. "Reelin mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta". **J Biol Chem** 277: 49958-49964, 2002.

Beffert U, Weeber EJ, Morfini G, Ko Jane, Brady ST, Tsai LH, Sweatt JD, Hertz J. "Reelin and cyclin-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission". **J Neurosci** 24: 1897-1906, 2004.

Benedetti S, Pirola B, Pollo B, Magrassi L, Bruzzone MG, Rigamonti D, Galli R, Selleri S, Di Meco F, De Fraja C, Vescovi A, Cattaneo E, Finocchiaro G. Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. **Nat Med** 6: 447–450, 2000.

Bock HH, Hertz J. "Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons". **Curr Biol** 13: 18-26, 2003.

Bock HH, Jossin Y, Liu P, Förster E, May P, Goffinet AM, Herz J. "Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the adaptor protein Dab1 in response to Reelin signaling and is required for normal cortical lamination". **J Biol Chem** 278(40): 38772-38779, 2003.

Boiani MH, Scholer HR. "Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells". **Nat Rev Mol Cell Biol** 6(11): 872-84, Nov 2005.

Bonfanti L, Peretto P. "Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone". **Prog Neurobiol** 83(1): 24-36, 2007.

Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB. "Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist". **J Exp Med** 201: 1307–1318, 2005.

Cao B, Huard J. "Muscle-derived stem cells" **Cell Cycle** 3(2):104-107, 2004.

Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. **Nat Genet** 36: 827–835, 2004.

Caron E. "Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges". **J Cell Sci.** 116: 435-440, 2003.

Chen Y, Sharma RP, Costa RH, Costa E, Grayson DR. "On the epigenetic regulation of the human Reelin promoter". **Nucleic Acid Res** 30: 2930-2939, 2002.

Chen Y, Kundakovic M, Agis-Balboa RC, Pinna G, Grayson DR. "Induction of the Reelin promoter by retinoic acid is mediated by Sp1". **J Neurochem** 103(2): 650-665, 2007.

Chin J, Massaro CM, Palop JJ, Thwin MT, Yu GQ, Bien-Ly N, Bender A, Mucke L. "Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease". **J Neurosci** 27(11): 2727-33, 2007.

Cossu G, Bianco P. "Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues". **Curr Opin Genet Dev** 13(5): 537-542, 2003.

Cubelos B, Sebastián-Serrano A, Kim S, Redondo JM, Walsh C, Nieto M. "Cux-1 and Cux-2 control the development of Reelin expressing cortical interneurons". **Dev Neurobiol** 68(7): 917-925, 2008.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. "A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler". **Nature** 374: 719-723, 1995.

D'Arcangelo G, Miao G, Curran T. "Detection of the Reelin breakpoint in Reeler mice". **Mol Brain Res** 39: 234-236, 1996.

D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T. "Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody". **J Neurosci** 17: 23-31, 1997.

D'Arcangelo G, Curran T. "Reeler: new tales on an old mutant mouse". **BioEssays**. 20: 235-244, 1998.

D'Arcangelo G. "Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders". **Epilepsy Behav** 8(1): 81-90, 2006.

De Paepe B, Schroder JM, Martin JJ, Racz GZ, De Bleecker JL. "Localization of the alpha-chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in idiopathic inflammatory myopathies". **Neuromuscul Dis** 14: 265-273, 2004.

De Silva U, D'Arcangelo G, Braden VV, Chen J, Miao GG, Curran T, Green ED. "The human Reelin gene: isolation, sequencing and mapping on chromosome 7". **Genome Res** 2:157-164, 1997.

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain" **Cell** 97: 703–716, 1999

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. "EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells". **Neuron** 36: 1021–1034, 2002.

Dong E, Nelson M, Grayson DR, Costa E, Guidotti A. "Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation". **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(36): 13614-13619, 2008.

Falconer DS. "Two new mutants trembler and reeler, with neurological actions in the house mouse" **J Genet** 50: 192-201, 1951

Fatemi SH, Earle JA, McMenomy T. "Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression". **Mol Psychiatry** 5: 654-663, 2000.

Fatemi SH, Snow AV, Stary JM, Araghi-Niknam M, Reutiman TJ, Lee S, Brooks AI, Pearce DA. "Reelin signaling is impaired in autism". **Biol Psychiatry** 57(7):777-87, 2005.

Feng L, Allen NS, Simo S, Cooper JA. "Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development". **Genes Dev** 21(21): 2717-2730, 2007.

Gage, FH "Mammalian neural stem cells". **Science** 287: 1433–1438, 2000

Gambarotta G, Garzotto D, Destro E, Mautino B, Giampietro C, Cutrupi S, Dati C, Cattaneo E, Fasolo A, Perroteau I. "ErbB4 expression in neural progenitor cells (ST14A) is necessary to mediate neuregulin-1beta1-induced migration". **J Biol Chem** 279(47):48808-48816, 2004.

Gavín R, Ureña J, Rangel A, Pastrana MA, Requena JR, Soriano E, Aguzzi A, Del Río JA. "Fibrillar prion peptide PrP(106-126) treatment induces Dab1 phosphorylation and impairs APP processing and A beta production in cortical neurons". **Neurobiol Dis** 30(2):243-254, 2008.

Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A. "Life is a journey: a genetic look at neocortical development". **Nature Rev Gen** 3: 342 -355, 2002.

Guzman R, Uchida N, Bliss T, He D, Christopherson KK, Stellwagen D, Capela A, Greve J, Malenka RC, Moseley ME, Palmer TD, Steinberg GK. "Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI". **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(24):10211–10216, 2007.

Hack I, Hellwig S, Junghans D, Brunne B, Bock HH, Zhao S, Frotscher M. "Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons". **Development** 134(21): 3883-3891, 2007.

Hamburgh M. "Observation on the neuropathology of Reeler, a neurological mutation in mice" **Experientia** 16: 460-461, 1960

Hatten, ME. "Central nervous system neural migration". **Annu Rev Neurosci**. 22: 511-539. 1999

Hawke TJ and Garry DJ. "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology". **J Appl Physiol** 91: 534–551, 2001.

Heisberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. "Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation". **Neuron** 24: 481-489, 1999.

Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh YP, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JLR. "Tbr1 regulated differentiation of the preplate and layer 6". **Neuron** 29: 353-366, 2001.

Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH. "Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells". **Nature** 431:1002–1007, 2004.

Hock H, Meade E, Medeiros S, Schindler JW, Valk PJ, Fujiwara Y, Orkin SH. "Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival". **Genes Dev.** 18:2336–2341, 2004.

Hoffman RM. "The pluripotency of hair follicle stem cells". **Cell Cycle** 5(3):232-3, 2006.

Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE. "Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations". **Nat Genet** 26: 93-96, 2000.

Howell BW, Lanier LM, Frank R, Gertler FB, Cooper JA. "The disabled 1 phosphotyrosine binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoprotein and to phospholipids". **Mol Cell Biol** 19: 5179-5188, 1999.

Huang T, Magdaleno S, Hopkins R, Slaughter C, Curran T, Keshvara L. "Tyrosine phosphorylated Disabled 1 recruits Crk family adapter proteins". **Biochem Biophys Res Commun** 318: 204-212, 2004.

Huang X, Cho S, Spangrude GJ. "Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal". **Cell Death Differ** 14(11):1851-1859, 2007.

Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Khoury SJ. "Directed migration of neural stem

cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway". **Proc Natl Acad Sci U S A**. 101(52):18117-22, 2004.

Jossin Y, Ignatova N, Hiesberger T, Herz J, Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM. "The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development". **J Neurosci** 24: 514-521, 2004.

Kempermann G, Gage FH. "Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task". **Eur J Neurosci** 16: 129–136, 2002.

Kerjan G, Gleeson JG. "A missed exit: Reelin sets in motion Dab1 polyubiquitination to put the break on neuronal migration." **Genes Dev** 21(22): 2850-2854, 2007.

Keshvara L, Benhayon D, Magdaleno S, Curran T. "Identification of Reelin-induced sites of tyrosyl phosphorylation on disabled1". **J Biol Chem**. 276: 16008-16014, 2001.

Kim HM, Qu T, Kriho V, Lacor P, Smalheiser N, Pappas GD, Guidotti A, Costa E, Sugaya K. "Reelin function in neural stem cell biology". **Proc Natl Acad Sci U S A** 99: 4020-4025, 2002.

Kim I, Saunders TL, Morrison SJ. (2007). "Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells". **Cell** 130: 470–48, 2007.

Koch S, Strasser V, Hauser C, Fashing D, Brandes C, Schneider WJ, Nimpf J. "A secreted soluble form of ApoE receptor 2 acts as a dominant negative receptor and inhibits Reelin signaling". **EMBO J** 21: 5996-6004, 2002.

Laird DJ, von Andrian UH, Wagers AJ. "Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease". **Cell** 132: 612-630, 2008.

Lambert de Rouvroit C, de Bergcyck V, Cortvrindt C, Bar I, Eeckhout Y, Goffinet AM. "Reelin, the extracellular matrix protein deficient in mutant mice, is processed by a metalloproteinase". **Exp Neurol** 156: 214-217. 1999.

Lin H, Chen MC, Chiu CY, Song YM, Lin SY. "Cdk5 regulates STAT3 activation and cell proliferation in medullary thyroid carcinoma cells". **J Biol Chem** 282(5): 2776-2784, 2007.

Lugli G, Krueger JM, Davis JM, Persico AM, Keller F, Smalheiser NR. "Methodological factors influencing measurement and processing of plasma Reelin in humans". **BMC bioch** 4: 9, 2003.

Marin O, Rubenstein J. "A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon". **Nature Rev Neurosci** 2: 780-790, 2001.

Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC. "Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice". **J Neurosci** 24: 1726–1733, 2004.

Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Kollnberger M, Tubo N, Moseman A, Huff IV, Junt T, Wagers AJ, Mazo IB, von Andrian UH. "Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues". **Cell** 131: 994–1008, 2007.

Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. "Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone". **Proc Natl Acad Sci USA** 101: 17528–17532, 2004.

Mori H, Ninomiya K, Kino-oka M, Shofuda T, Islam MO, Yamasaki M, Okano H, Taya M, Kanemura Y. "Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells". **J Neurosci Res** 84(8): 1682-1691, 2006.

Murase S, Horwitz AF. "Directions in cell migration along the rostral migratory stream: the pathway for migration in the brain". **Curr Top Dev Biol** 61: 135-152, 2004.

Nadarajah B, Parnavelas JG. "Modes of neural migration in the developing cerebral cortex" **Nature Rev Neurosci** 3: 423-432, 2002.

Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG. "Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging.". **Cereb Cortex** 13(6): 607-611, 2003.

Ohkubo N, Lee YD, Morishima A, Terashima T, Kikkawa S, Tohyama M, Sakanaka M, Tanaka J, Maeda N, Vitek MP, Mitsuda N. "Apolipoprotein E and Reelin ligands modulate tau phosphorylation through an apolipoprotein E receptor/disabled-1/glycogen synthase kinase-3 β cascade". **FASEB J** 17(2): 295-297, 2003.

Ohkubo N, Vitek MP, Morishima A, Suzuki Y, Miki T, Maeda N, Mitsuda N. "Reelin signals survival through Src-family kinases that inactivate BAD activity". **J Neurochem** 103(2): 820-30, 2007.

Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K. "The Reeler gene associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons". **Neuron** 14: 899-912, 1995.

Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. "Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways". **Hippocampus** 16: 250–260, 2006.

Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Ishiguro K, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarny AB. "Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene result in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death". **Proc Natl Acad Sci USA**. 93: 11173-11178, 1996.

Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porad G. "Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications". **Curr Stem Cell Res Ther** 1(3):365-369, 2006.

Pramatarova A, Chen K, Howell BW. "A genetic interaction between the APP and Dab1 genes influences brain development". **Mol Cell Neurosci** 37(1): 178-86, 2008.

Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH. "Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein β -subunit-like repeats". **Nature** 364: 717-721, 1993.

Rice DS, Nusinowitz S, Azimi AM, Martinez A, Soriano E, Curran T. "The Reelin pathway modulates the structure and function of retinal synaptic circuitry". **Neuron** 31: 929-941, 2001.

Rice SR, Curran T. "Role of Reelin signaling pathway in central nervous system development". **Annu Rev Neurosci** 24: 1005-1039, 2001.

Royaux I, Lambert de Rouvroit C, D'Arcangelo G, Demirov D, Goffinet AM. "Genomic organization of the mouse Reelin gene". **Genomics** 46: 240-250, 1997.

Sakata K, Kato S, Fox JC, Shigemori M, Morimatsu M. "Autocrine signaling through Ras regulates cell survival activity in human glioma cells: potential cross-talk between Ras and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway". **J Neuropathol Exp Neurol** 61(11): 975-983, 2002.

Serajee FJ, Zhong H, Mahbubul Huq AH. "Association of Reelin gene polymorphisms with autism". **Genomics** 87(1): 75-83, 2006.

Sengupta A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. "Regulation of phosphorylation of tau by cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase-3 at substrate level". **FEBS Lett** 580(25): 5925-5933, 2006.

Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, Gaidatzis D, Mohn F, Artus-Revel CG, Zavolan M, Svoboda P, Filipowicz W. "MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells". **Nat Struct Mol Biol** 15(3):259-67, 2008.

Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T. "Scrambler and yotari disrupt the disabled 1 gene and produce a Reeler-like phenotype in mice". **Nature** 389: 730-733, 1997.

Sokolova O, Bozko PM, Naumann M. "Helicobacter pylori suppresses GSK3beta to promote beta-catenin activity". **J Biol Chem** 283(43): 29367-74, 2008.

Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. "In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus". **Cell Stem Cell** 1: 515–528, 2007.

Takahara T, Ohsumi T, Kuromitsu J, Shibata K, Sasaki N, Okazaki Y, Shibata H, Sato S, Yoshiki S, Kusakabe M, Muramatsu M, Ueki M, Okuda K, Hayashizaki Y. "Dysfunction of the Orleans Reeler gene arising from exon skipping due to transposition of a full length copy of an active L1 sequence into the skipping exon." **Hum Mol Genet** 5: 989-993, 1996.

Tamura Y, Kunugi H, Ohashi J, Hohjoh H. "Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders". **Mol Psychiatry** 12(6): 593-600, 2007.

Tissir F, Goffinet A. "Reelin and brain development" **Nature Rev Neurosci** 4: 496-505, 2003.

Tremolizzo L, Carboni G, Ruzicka WB, Mitchell CP, Sugaya I, Tueting P, Sharma R, Grayson DR, Costa E, Guidotti A. "An epigenic mouse model for molecular and behavioural neuropathologies related to schizophrenia vulnerability". **PNAS** 99: 17095-17100, 2002.

Trommsdorff M, Borg J, Borg P, Margolis B, Hertz J. "Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal ApoE receptors and the amyloid precursor proteins". **J Biol Chem** 273: 33556-33565, 1999.

Utsunomiya Tate, N, Kubo, K, Tate, S, Kainosho, M, Katayama, E, Nakajima, K, Mikoshiba, K. "Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody". **Proc Natl Acad Sci USA** 97: 9729-9734, 2000.

Warner-Schmidt JL, Duman RS. "Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment". **Hippocampus** 16: 239-249, 2006.

Won SJ, Kim SH, Xie L, Wang Y, Mao XO, Jin K, Greenberg DA. "Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size". **Exp Neurol** 198(1): 250-259, 2006.

Wyatt RJ, Benedict A, Davis J. "Biochemical and sleep studies of schizophrenia: a review of the literature 1960-1970". **Schizophr Bull** 4: 10-44, 1971.

Yagi T. "Signalling cascade of CNR cadherins (Reelin receptors) in the mammalian brain". **Symp Soc Exp Biol.** 53: 51-57, 2001.

Yip JW, Yip YP, Nakajima K, Capriotti C. "Reelin controls position of autosomic neurons in the spinal cord". **Proc Natl Acad Sci USA** 97: 8612-8616, 2000.

Yoshida T, Hazan I, Zhang J, Ng SY, Naito T, Snippert HJ, Heller EJ, Qi X, Lawton LN, Williams CJ, Georgopoulos K. "The role of the chromatin remodeler Mi-2{beta} in hematopoietic stem cell self-renewal and multilineage differentiation". **Genes Dev** 22(9):1174-89, 2008.

Zhao S, Chai X, Frotscher M. "Balance between neurogenesis and gliogenesis in the adult hippocampus: role for Reelin". **Dev Neurosci** 29(1-2): 84-90, 2007.

Zhao C, Wei D, Gage FH. "Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis" **Cell** 132: 645–660, 2008.

Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. "Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway". **J Cardiovasc Pharmacol** 50(3): 274-280, 2007.