

Omnia summa consecutus es, virtute duce, comite fortuna

Marcus Tullius Cicero



SAPIENZA

UNIVERSITA' DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE

XXXII CICLO

**"Meccanismi molecolari e cellulari che coinvolgono i rafts lipidici e la proteina prionica
cellulare nel processo di differenziamento neuronale"**

DOTTORANDO

Dott. Stefano Martellucci

DOCENTE GUIDA

Prof. Maurizio Sorice

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof. Maurizio Sorice

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Cellule staminali: cronistoria.....	1
1.1.1. Definizione e proprietà	
1.1.2. Sorgenti di derivazione	
1.1.3. Cenni bioetici e legislativi	
1.2. Rafts lipidici: generalità.....	21
1.2.1. Organizzazione e ruolo	
1.3. Proteina prionica cellulare: natura biologica e struttura.....	28
1.3.1. Funzioni	
2. Scopo della ricerca	36
3. Materiali e metodi	37
3.1. Etica della ricerca.....	37
3.2. Estrazione della polpa dentaria e separazione delle cellule.....	37
3.3. Caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali.....	40
3.4. Stimolo neuroinduttivo.....	41
3.5. Immunofluorescenza.....	43

3.6. Immunoblot.....	44
3.7. Citofluorimetria a flusso.....	45
3.8. Frazionamento in gradiente di saccarosio.....	46
3.9. Estrazione ed analisi dei gangliosidi.....	47
3.10. Immunoprecipitazione.....	48
3.11. Dot Blot.....	48
3.12. Knockdown della proteina prionica.....	49
3.13. Analisi statistica.....	49
4. Risultati.....	50
4.1. Caratterizzazione morfologica e proteica delle hDPSCs.....	50
4.2. Differenziamento neuronale delle hDPSCs.....	52
4.3. Caratterizzazione lipidica delle hDPSCs.....	54
4.4. Analisi dei rafts lipidici nelle hDPSCs.....	56
4.5. Ruolo funzionale dei rafts lipidici durante la neuroinduzione delle hDPSCs.....	58
4.6. Ruolo dei rafts lipidici nella fosforilazione di Erk 1/2 ed AKT indotta da EGF.....	60
4.7. Espressione della PrP ^C nelle hDPSCs di controllo e neuroindotte.....	62
4.8. Associazione di gangliosidi ed EGF-R con la PrP ^C nelle hDPSCs	

di controllo e neuroindotte.....	64
4.9.Effetto del silenziamento della PrP ^C sulla fosforilazione di Erk ed Akt indotta da EGF.....	66
4.10.Ruolo della PrP ^C nel processo di differenziamento neuronale delle hDPSCs.....	68
5. Discussione.....	70
6. Bibliografia.....	77

Ringraziamenti

1. Introduzione

1.1 Cellule staminali: cronistoria

La cronologia degli eventi, che ha portato alle conoscenze scientifiche sulle cellule staminali di cui oggi disponiamo, ricopre un arco di tempo piuttosto breve, se paragonata a quella di altri domini della scienza. La letteratura medica, a cui oggi si fa riferimento, è costituita da poco più di un secolo di scoperte, la maggior parte e più importante delle quali concentrate lungo il corso degli ultimi cinquant'anni.

Nel 1909 Alexander A. Maximow pubblicò lo studio "Il linfocita come cellula staminale comune a differenti elementi del sangue nello sviluppo embrionale e durante la vita post-natale dei mammiferi" (Maximow A., 1909). Ancora oggi, questa ricerca rappresenta uno dei primi e più importanti lavori in cui è utilizzato il termine "staminale", dall'inglese *stem*, la cui forma verbale significa "dare origine", "derivare". L'etimologia della parola resta comunque non del tutto chiara. Questo studio, però, rimase isolato per decenni poiché allora imperava il dogma biologico secondo cui la specializzazione della cellula fosse un processo irreversibile.

Le prime significative ricerche vennero condotte dopo la II guerra mondiale, con lo studio degli effetti provocati dall'irradiazione sui residenti di Hiroshima e Nagasaki: venne osservato, allora, che quella parte di cittadini non deceduta all'istante moriva lentamente per l'insorgenza di infezioni e disturbi coagulativi provocati da insufficienza midollare.

Partendo da tale constatazione, nel 1956 si effettuò il primo trapianto di midollo osseo in un topo irradiato e si dimostrò, così, che in questo tessuto molle erano

contenute cellule staminali (Thomas et al., 1957). Una vera e propria pietra miliare fu posta nel 1958, quando John B. Gurdon inserì il nucleo di una cellula intestinale matura di rana del genere *Xenopus* in ovocellule immature; la cellula così modificata diede poi origine ad un girino (Gurdon et al., 1958). La discussione, generata dal risultato di questo lavoro, portò al primo utilizzo noto del termine "clone". I ricercatori speculavano sull'esistenza di cellule staminali sin dall'inizio del XX secolo, ma l'ipotesi non fu confermata fino al 1961, anno in cui Ernest McCulloch e James E. Till isolarono ed identificarono le cellule staminali auto-rinnovanti a seguito di un trapianto di midollo osseo in topi sottoposti a dosi massicce di radiazioni. La ricerca pose le basi per stabilire le proprietà fondamentali delle staminali, definendo come "clonogeniche" le cellule capaci di proliferare estensivamente prima dell'inesco del differenziamento (Till et al., 1963). Nei decenni successivi, Kleinsmith dimostrò l'esistenza di cellule staminali nel carcinoma embrionale, capaci di rimanere indifferenziate in coltura e di specializzarsi, in presenza di terreni particolari, in cellule di diversi istotipi (Kleinsmith et al., 1964). Joseph Altman e Gopal Das presentarono prove di neurogenesi adulta e di attività da parte di cellule staminali nel cervello (Altman et al., 1967), mentre nel 1978 Prindull scoprì cellule staminali ematopoietiche nel cordone ombelicale umano (Prindull et al., 1978). Nel 1981 altri due ricercatori isolarono cellule embrionali staminali di topo dalla massa cellulare interna (Evans et al., 1981). E' nell'ultimo ventennio che sono stati raggiunti i maggiori progressi scientifici nel campo delle staminali, sia per l'isolamento sia per la caratterizzazione di tali cellule. Nel 1992 è stata completata la prima procedura medica al mondo finalizzata alla terapia genica delle malattie ereditarie mediante l'impiego di cellule staminali come vettori per il materiale genetico (Ferrari et al., 1992); nel 1997 e 1998 sono stati pubblicati diversi lavori con cui si è dimostrato che la

leucemia origina da cellule staminali ematopoietiche, fatto questo che ha costituito la prima prova diretta dell'esistenza di un nesso tra cellule staminali e cancro (McCulloch E.A., 1997; Verfaillie et al., 1998). Nel 2000 sono stati pubblicati diversi studi sulla plasticità delle cellule staminali adulte (Mertelsmann R., 2000; Orkin S.H., 2000) e nel 2003 Miura ha scoperto una nuova fonte di cellule staminali adulte nei denti da latte dei bambini (Miura et al., 2003). Nel 2006 Takahashi e colleghi, del gruppo del Prof. Yamanaka, hanno creato cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs), partendo da colture di fibroblasti murini e, con lo stesso principio applicato ai ratti, nel 2007 fibroblasti umani sono stati trasformati, per mezzo di infezione retrovirale, in cellule staminali pluripotenti attraverso gli stessi geni: Oct 3/4, Sox2, Klf4, e c-Myc (Takahashi et al., 2007). Nello stesso anno l'italiano De Coppi ha annunciato di aver scoperto cellule staminali nel liquido amniotico (De Coppi et al., 2007) e Yu e Thomson, che già avevano isolato nel 1998 staminali embrionali umane (Thomson et al., 1998), hanno pubblicato sulla rivista *Science* il lavoro dal titolo "Linee di cellule staminali pluripotenti indotte derivate da cellule somatiche umane" (Yu et al., 2007). Nel 2012, "per la scoperta che le cellule mature possono essere riprogrammate per diventare pluripotenti", l'Accademia di Stoccolma ha conferito a John B. Gurdon e Shinya Yamanaka il Premio Nobel per la Medicina.

Ad oggi si possono inoltre documentare terapie cellulari applicate con estrema efficacia a differenti tipologie di pazienti (Watt et al., 2010): ricostruzione di vene e vasi sanguigni ostruiti (Olausson et al., 2012), rigenerazione del tessuto cicatriziale dopo infarto del miocardio mediante cellule staminali cardiache (Makkar et al., 2012), riparazione del tessuto epatico a seguito di cirrosi con l'utilizzo di cellule staminali biliari (Semeraro et al., 2012).

1.1.1 Definizione e proprietà

Si definisce “staminale” una cellula primitiva, non specializzata, dotata della capacità di trasformarsi in diversi citotipi mediante un processo denominato “differenziamento cellulare” (Alberts et al., 2002 4°ed.).

Questo tipo di cellula può dividersi continuamente generando cellule figlie indifferenziate (*self-renewing*) o cellule specializzate (*multilineage differentiation*).

La cellula staminale possiede, infatti, la proprietà di entrare ed uscire dalla fase G0 del ciclo cellulare, fatto questo che le consente di permanere in uno stato di quiescenza a tempo indeterminato durante il quale resta indifferenziata (Gilbert S.F., 2005, 3°ed.).

A seconda dei segnali ambientali che la cellula riceve, essa può andare incontro a replicazione simmetrica, tipica della fase embrionale, durante la quale da una staminale si generano due staminali figlie identiche, oppure a replicazione asimmetrica, tipica della fase adulta, dalla quale si originano una cellula staminale identica alla madre ed una destinata a differenziarsi (Bluteau et al., 2008).

Questo tipo di divisione asimmetrica gioca un ruolo omeostatico essenziale: garantisce, infatti, la permanenza di un numero di cellule non differenziate, che mantiene costante la popolazione staminale e, contestualmente, genera cellule progenitrici di transito da cui originano cellule mature, che vanno a rimpiazzare quelle morte o distrutte a causa di traumi o malattie (Galli et al., 2003 3°ed.).

Alla luce di quanto appena affermato, le staminali sono così definite:

- labili, quando non operano più nella costruzione di nuove cellule;

- stabili, quando operano nella costruzione di nuove cellule in maniera ridotta;
- perenni, quando non cessano mai la loro attività di sostituzione o creazione di cellule.

(Pollard et al., 2008, 3°ed.).

Le cellule staminali risiedono, assieme a fattori solubili, in diversi organi e tessuti all'interno di uno specifico microambiente perivascolare fisiologicamente limitato, dove rimangono quiescenti e mantengono le loro caratteristiche di staminalità (Shi et al., 2002). Questo specifico microambiente, chiamato "nicchia staminale" (Bianco et al., 2001; Doherty et al., 1998; Fuchs et al., 2004; Moore et al., 2006), è in grado di mantenere, sinergicamente ai fattori ivi presenti (Alvarez et al., 2012), il potenziale differenziativo di tali cellule che, però, tende ad essere perso nel momento in cui le cellule sono coltivate *in vitro*.

Il primo carattere distintivo comune a tutti i tipi di staminali è il loro stato altamente indifferenziato, poiché non possiedono le caratteristiche morfologiche, strutturali, molecolari o antigeniche che si ritrovano nelle cellule differenziate del tessuto cui appartengono (Alvarez-Buylla et al., 2002).

Per poter essere definita staminale, una cellula deve soddisfare due proprietà: l'autorinnovamento e la potenza (Pavlović et al., 2017, 1°ed.).

L'**Autorinnovamento** è la capacità che tali cellule hanno di compiere un numero illimitato di cicli replicativi, mantenendo il medesimo stadio differenziativo. Ciascuna cellula staminale realizza l'autorinnovamento mediante due distinte modalità. La prima avviene tramite divisione asimmetrica obbligata, da cui originano

una staminale ed una cellula destinata a differenziarsi; la seconda mediante divisione simmetrica o stocastica, procedimento che determina la formazione di due cellule figlie identiche tra loro, che possono essere due staminali o due cellule che iniziano il processo differenziativo (Pavlović et al., 2017, 1°ed.).

Se il numero di questi due tipi di divisione simmetrica è uguale, la quantità di staminali resta costante, a prescindere dal numero di divisioni totali.

Il meccanismo di divisione simmetrica, rispetto a quello dell'asimmetrica, è vantaggioso perché flessibile: se delle cellule staminali vengono distrutte, infatti, si innesca un aumento delle divisioni che genera solo staminali e, raggiunto l'equilibrio, le cellule tornano nella condizione di omeostasi (Pavlović et al., 2017, 1°ed.).

Lo spostamento dell'equilibrio tra staminalità e differenziamento è influenzato da fattori intrinseci ed estrinseci in grado di innescare processi di replicazione, induzione al differenziamento e mantenimento della staminalità (Morrison et al., 2006).

La **Potenza**, invece, è la capacità di dare origine ad una o più linee o tipi cellulari tramite differenziamento, specializzazione in una linea cellulare, o trans-differenziamento, capacità della cellula staminale in fase differenziativa di modificare il proprio programma di sviluppo (Pavlović et al., 2017, 1°ed.).

Le cellule staminali possiedono un'organizzazione gerarchica: dalla totipotenza dello zigote, alla pluripotenza delle cellule staminali embrionali, alla multipotenza delle cellule staminali mesenchimali (Schöler H.R., 2007).

Totipotenza

E' la capacità di una singola cellula di dividersi e dare origine a tutte le cellule differenziate in un organismo, compresi i tessuti extraembrionali.

Cellule staminali totipotenti sono gli zigoti, oltre che, per citare ad esempio altri regni, le spore nei funghi. In alcuni organismi le cellule già differenziate possono ritrovare la totipotenza, come nelle coltivazioni *in vitro* di tessuti vegetali.

La possibilità di dare origine ad un organismo completo permane nell'uomo per tre divisioni cellulari, ovvero finché l'embrione non raggiunge lo stadio di otto cellule, a partire dal quale i singoli blastomeri riducono il proprio potenziale differenziativo (Mitalipov et al., 2009).

Negli stadi embrionali successivi, morula, blastula e gastrula, le cellule sono altamente plastiche e mantengono la capacità di formare vari sottotipi cellulari.

In particolare, la blastula è fatta dalla *Inner Cell Mass* (ICM), costituita dagli embrioblasti pluripotenti, che hanno il compito di differenziarsi in uno qualsiasi dei tre strati germinali e dalla *Outer Cell Mass* (OCM), costituita dai trofoblasti che portano alla formazione dei tessuti extraembrionali.

Pluripotenza

Capacità di una singola cellula di dividersi e differenziarsi in uno qualsiasi dei tre strati germinali: l'ectoderma, da cui deriveranno tessuti epidermici e del sistema nervoso; il mesoderma, da cui si svilupperanno il tessuto muscolare, le ossa, il sangue e l'apparato urogenitale; l'endoderma, da cui origineranno cellule del rivestimento interno dello stomaco, del tratto gastrointestinale e dei polmoni.

Tali cellule non possono, pertanto, dare origine ad un organismo adulto, poiché non possiedono il potenziale per contribuire ai tessuti extraembrionali.

Nei mammiferi placentati, ad esempio, tali cellule non possono dare origine al tessuto extraembrionale placentale (Mitalipov et al., 2009).

Multipotenza

Cellule che hanno il potenziale di differenziarsi in un numero limitato di lignaggi cellulari. Un esempio di staminale multipotente è rappresentato dalla cellula ematopoietica, in grado di differenziarsi in diversi citotipi ma solo ed esclusivamente caratteristici del tessuto sanguigno.

Le multipotenti sono cellule considerate permanentemente impegnate ad una funzione tissutale specifica (Schöler H.R., 2007).

Unipotenza

Le cellule unipotenti o precursori hanno la capacità di differenziarsi in un singolo citotipo e la cellula matura che ne deriva è definita *Nullipotente* (Weissman I.L., 2000).

Gli epatociti, ad esempio, sono unipotenti e costituiscono la maggior parte delle cellule del fegato, la cui capacità di rigenerarsi da un minimo del 25% della sua massa originaria è attribuita all'unipotenza. Altri esempi sono dati dalle cellule staminali unipotenti cubiche o cilindriche, presenti a livello dello strato germinativo dell'epidermide (Young et al., 2004; Schöler H.R., 2007).

Partendo dalla cellula staminale totipotente fino ad arrivare alle cellule mature si osservano un aumento del grado di differenziazione e una diminuzione della plasticità, cioè la capacità di autorinnovamento (Jiang et al., 2002).

1.1.2 Sorgenti di derivazione

Le cellule staminali vengono classificate anche in base alla loro sorgente di derivazione.

Cellule staminali amniotiche (AFSCs)

Le cellule staminali amniotiche provengono dal liquido amniotico e possono essere ottenute tramite amniocentesi.

Queste cellule hanno caratteristiche biologiche molto simili a quelle delle cellule staminali embrionali, ma non presentano le complicazioni di tipo etico legate alla distruzione dell'embrione (De Coppi et al., 2007).

Cellule staminali da villo coriale (PDMPCs)

Le cellule staminali da villi coriali, prelevate da strutture placentari dette appunto villi coriali, sono staminali mesenchimali, che conservano le proprie capacità riproduttive tipiche delle staminali embrionali unite alla stabilità genomica delle adulte e all'assenza di complicazioni etiche (Igura et al., 2004).

Cellule staminali da sangue del cordone ombelicale (CBSCs)

Il sangue residuo della placenta e del cordone ombelicale costituisce una fonte di cellule staminali emopoietiche adulte, che danno origine a tutte le cellule del sangue, il quale viene raccolto dal cordone ombelicale sia in caso di parto spontaneo sia di taglio cesareo, mediante un prelievo in circuito chiuso e sterile dalla vena ombelicale (Kern et al., 2004).

Sono calcolati il volume e la quantità di globuli bianchi presenti nel campione che non devono essere inferiori rispettivamente a 60 ml e a 800 milioni (Muller-Sieburg et al., 2002,2004).

Le CBSCs sono una sorgente accessibile di cellule staminali multipotenti apparentemente non immunogeniche e non tumorigeniche che, una volta isolate, possono espandersi e differenziarsi *in vitro* generando diversi tipi di progenie funzionali terapeuticamente utili.

Cellule staminali embrionali (ESCs)

Le staminali embrionali sono cellule pluripotenti ricavate dalla ICM della blastocisti. Queste cellule, una volta estratte, possono essere messe in coltura e fatte proliferare quali linee indifferenziate, oppure possono essere differenziate nella linea cellulare voluta (Thomson et al., 1998; Ying et al., 2003).

Cellule staminali adulte (ASCs)

Dette anche cellule staminali post-natali o somatiche, sono cellule non specializzate che si riproducono giornalmente per fornire alcuni specifici citotipi.

Ad esempio (Hern et al., 2006) sono ASCs le staminali adulte dello stroma nel midollo osseo, che possono trasformarsi in cellule epatiche, neurali, muscolari, renali e follicolari, le cellule staminali contenute nel tessuto adiposo, presenti in abbondanza e facilmente prelevabili con una semplice lipoaspirazione (Zannettino et al., 2008; Ditadi et al., 2009) e le staminali della pelle (Jensen et al., 1999), della mucosa gastro-intestinale (Young et al., 2004) e del fegato (Sell S., 2001).

Le ASCs possono essere identificate sulla base di proprietà indirette come l'espressione di uno specifico *pool* di marcatori di superficie.

Cellule staminali mesenchimali (MSCs)

Le Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs) sono ASCs non-ematopoietiche di origine mesodermica e neuro-ectodermica, scoperte e caratterizzate per la prima volta nello stroma del midollo osseo e, pertanto, denominate "Cellule Staminali derivate da Midollo Osseo" (BMMSCs) (Friedenstein et al., 1970). Sono individuabili in molti tessuti come midollo osseo, tessuto adiposo, cordone ombelicale e polpa dentale. Si differenziano in cellule di origine mesodermica come adipociti, condrociti e osteociti, ma anche in cellule appartenenti ad altri foglietti embrionali (Fig. 1) (Gronthos et al., 1994,1996,2003). E' noto infatti che le MSCs possiedano un grado di plasticità maggiore rispetto ad altre popolazioni di ASCs e che siano in grado di differenziarsi *in vitro* anche in linee cellulari non-mesodermiche come neuroni e astrociti; per tale motivo, esse sono considerate promettenti in medicina rigenerativa-riparativa, in terapia cellulare ed in ingegneria dei tessuti (Pittenger et al., 1999; Robey et al., 2014; Marrell et al., 2016; Rohban et al., 2017).

Le MSCs diffondono e migrano durante lo sviluppo embrionale precoce tra ectoderma ed endoderma.

Il destino di queste cellule può essere influenzato da segnali di diversa natura: in caso di traumi, fratture, infiammazioni, necrosi, tumori, segnali chemotattici provenienti dal tessuto inducono le MSCs a proliferare e differenziare (Caplan A.I., 1991; Pountos et al., 2005). Sono proprio le MSCs, inoltre, a gestire il microambiente della nicchia staminale, stimolando la proliferazione e la formazione di una riserva di

cellule, mantenute in uno stato di quiescenza, e la regolazione dei meccanismi che governano il processo differenziativo.

La capacità trans-differenziativa permette alle MSCs di differenziarsi in cellule molto specifiche, saltando da un cammino differenziativo ad un altro. Se il normale processo differenziativo permette alle MSCs di differenziarsi in fibroblasti, condroblasti, adipoblasti e osteoblasti (ossia cellule di tipo mesodermico), infatti, la trans-differenziazione consente alle stesse di differenziarsi anche in neuroni, cellule epiteliali, miociti, enterociti e pneumociti (Chun et al., 2016; Ullah et al., 2016; Young et al., 2016). Le MSCs possiedono altre importanti peculiarità, tra cui quella di poter essere amplificate facilmente in laboratorio in condizioni standard di coltura senza incorrere in problematiche bioetiche. L'ampia capacità proliferativa, la multipotenza, l'elevato potenziale differenziativo, la capacità di riparare tessuti adulti danneggiati in risposta a stimoli locali, il trofismo e il potere antinfiammatorio rendono le MSCs cellule ideali per la rigenerazione-riparazione tissutale (Scintu et al., 2006).

Cellule staminali adulte multipotenti da polpa dentaria (DPSCs)

La corona del dente umano è costituita da smalto, dentina e polpa dentale, tessuto connettivo lasso di origine mesenchimale intrappolato all'interno della cavità pulpare della corona del dente. Nella polpa è possibile distinguere quattro strati: uno strato più esterno costituito da odontoblasti generanti dentina; un secondo strato, chiamato *Cell free zone*, povero in cellule ma ricco di fibre di collagene; un terzo strato, chiamato *Cell rich zone*, costituito da cellule progenitrici e cellule indifferenziate, alcune delle quali staminali (Gronthos et al., 2002). Le cellule appartenenti a quest'ultima zona possono migrare verso i vari distretti, in cui, sotto la spinta di

diversi stimoli, possono dare origine a nuove cellule differenziate e tessuti specializzati. La plasticità e la multipotenza di tali cellule possono essere correlate alle origini della polpa dentale, che è costituita sia da componenti ectodermiche e mesodermiche sia da cellule derivanti dalla cresta neurale (D'Aquino et al., 2009). La polpa dentale di terzi molari, nonostante sia spesso scartata, rappresenta una fonte di MSCs facilmente accessibile. Solo nel 2000 sono state identificate e isolate per la prima volta le Cellule Staminali da Polpa Dentaria Umana (hDPSCs) in base alle loro capacità clonogeniche e alla loro elevata velocità proliferativa (Gronthos et al., 2000). Successivamente sono state identificati più di quattro tipi cellulari di MSCs derivanti da polpa dentale: Cellule Staminali da Denti Decidui Esfoliati (SHEDs) (Miura et al., 2003), Cellule Staminali del Legamento Periodontale (PDLSCs) (Seo et al., 2004), Cellule Staminali della Papilla Apicale (SCAPs) (Huang et al., 2006) e Cellule Precursori del Follicolo Dentale (DFPCs) (Morsczech et al., 2005). Tutti i citotipi elencati dimostrano multipotenza e capacità di rigenerare diversi tessuti dentali e periodontali *in vitro* e *in vivo* (Suchanek et al., 2009; Huang G.T., 2009). Le hDPSCs non derivano da una fonte ematopietica ma sono di origine mesenchimale (D'Aquino et al., 2009) e, come tutte le MSCs, costituiscono una popolazione eterogenea contraddistinta dall'espressione di specifici marcatori (Huang G.T., 2009). Esse possono sopravvivere in coltura per lunghi periodi non presentando chiari segni di senescenza fino a più di 40 passaggi (Ksiazek K.A., 2009). Possono inoltre essere crio-conservate per lunghi periodi senza perdere la loro multipotenza (Laino et al., 2005). Durante la crescita e lo sviluppo del dente, gli ameloblasti formano lo smalto e gli odontoblasti generano la dentina primaria.

Dopo la fuoriuscita del dente, gli ameloblasti scompaiono dalla superficie dello smalto; conseguentemente, la formazione dello smalto cessa, *in vivo*, in modo naturale. Al contrario, gli odontoblasti, lungo la superficie più interna della dentina all'interno dell'incavo della polpa, continuano a depositare la matrice della dentina per formare la dentina secondaria lungo tutto il corso della vita (Baume L.J., 1980; Smith et al., 1995). Gli odontoblasti, in aggiunta alla dentina secondaria, possono formare la dentina terziaria reattiva-riparativa in risposta a stimoli meccanici, chimici o a infezioni batteriche (Smith et al., 1994). Anche quando gli odontoblasti vengono danneggiati, la dentina riparativa può formarsi nella polpa dentaria: la dentinogenesi riparativa si ritiene, infatti, essere mediata da odontoblasti di nuova generazione derivanti dalla polpa dentaria (Sveen et al., 1968; Ruch J.V., 1998).

Negli anni '90 diversi studi hanno dimostrato che la polpa contiene cellule proliferative simil odontoblasti in grado di formare *in vitro* noduli mineralizzati (Kuo et al., 1992; Tsukamoto et al., 1992; Shiba et al., 1995; Buurma et al., 1999; Couble et al., 2000) e che le cellule isolate hanno apparentemente una limitata capacità di differenziare in cellule simil odontoblasti e una incapacità di differenziare in altri tipi cellulari come adipociti o neuroni. Tecles e colleghi hanno confermato che le cellule proliferative precursori odontogenici sembrano essere mobilitate dai vasi sanguigni al sito di danno della polpa o del tessuto della dentina (Tecles et al., 2005).

Ad oggi la polpa dentaria estratta da terzi molari è considerata un'ottima sorgente di cellule staminali (Koyama et al., 2009; Atari et al., 2012; Pisciotta et al., 2015).

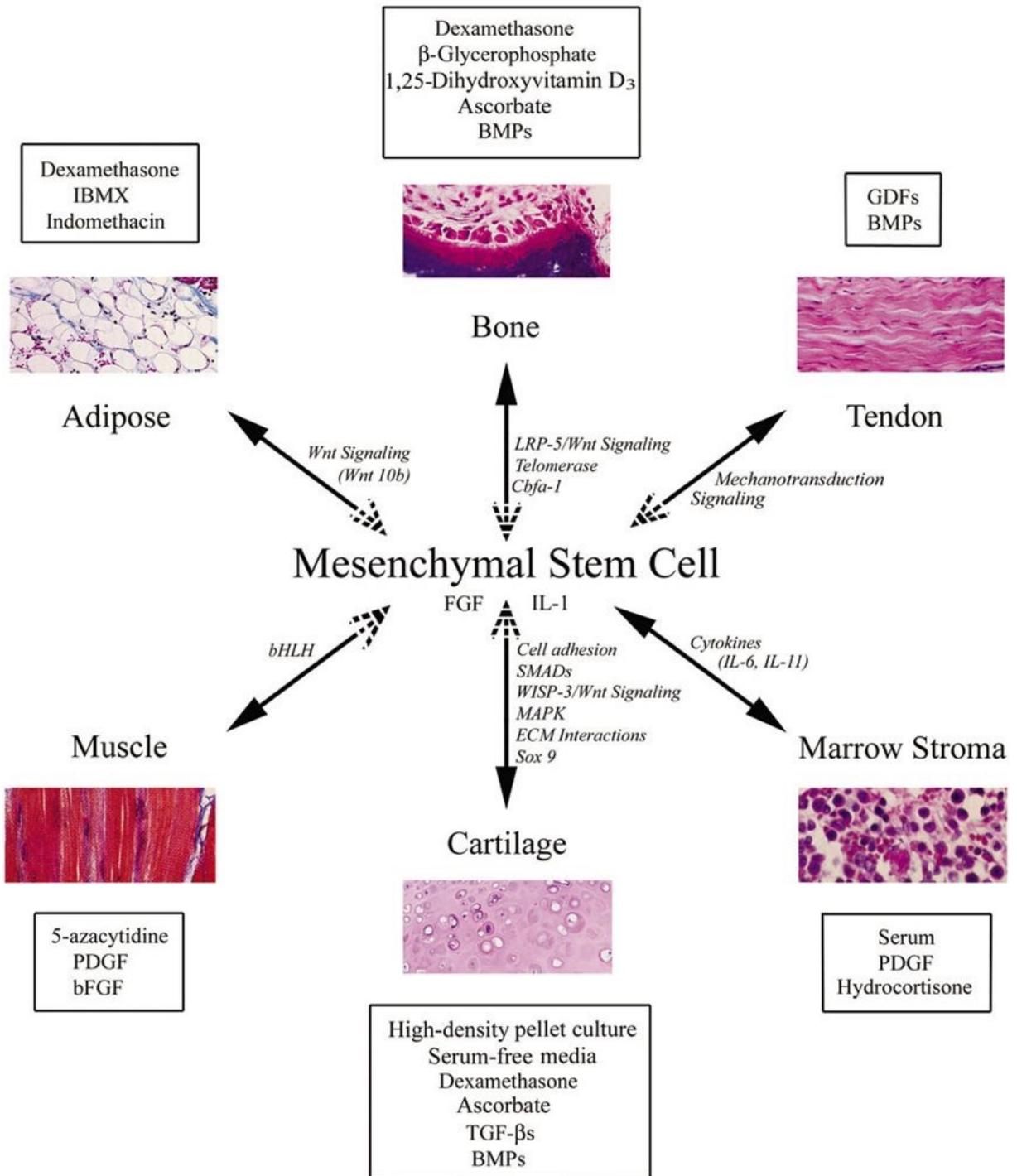


Figura 1. Alcuni processi differenziativi delle MSCs (Tuan et al., 2003).

1.1.3 Cenni bioetici e legislativi

Le implicazioni etiche che le discipline scientifiche moderne comportano, in particolare nell'ambito delle cellule staminali, sono rilevanti e suscitano questioni non sempre facili da dirimere. Per questo motivo, la letteratura medica non può prescindere da alcune tappe fondamentali della bioetica, che nasce e si sviluppa quasi parallelamente a molte delle moderne conoscenze. Quanto sancito dal Codice di Norimberga e sentenziato dal Tribunale Militare Internazionale dopo i fatti del Nazismo porta, nel 1971, alla fondazione del primo e più famoso istituto di ricerca etica americano e mondiale, il *Kennedy Institute of Ethics*, con lo scopo di dettare, a tutela dell'essere umano, regole e codici comportamentali da seguire nelle sperimentazioni e nei *trial clinici*, (Angeletti et al., 2008, 3°ed.). Nei decenni successivi comitati e fondazioni etiche si moltiplicano in tutto il mondo a tal punto da rappresentare oggi una voce molto influente sia per l'opinione pubblica sia per la comunità scientifica. L'etica collettiva, l'individualità personale, la religione, la scienza, la tradizione, la politica, sfere che indubbiamente coinvolgono in larga misura l'uomo moderno, offrono risposte diverse riguardo la distruzione dell'embrione per l'approvvigionamento di cellule staminali. Nel 1995 il Presidente degli Stati Uniti Bill Clinton firma una legge, che rende illegali i fondi federali per la ricerca su cellule staminali ottenute con la distruzione dell'embrione. Nel 2006 George W. Bush ribadisce tale posizione, che permane fino al 9 Marzo 2009, anno in cui il Barack Obama rimuove i limiti imposti al finanziamento pubblico per la ricerca sulle staminali embrionali. In Italia, invece, il 28 Marzo del 1990, con decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri, nasce il Comitato Nazionale per la Bioetica (CNB) cui sono attribuite funzioni sia di consulenza presso il Governo, il Parlamento

ed altre istituzioni sia di informazione nei confronti dell'opinione pubblica. Gli anni successivi vedono la nascita dell'Unione Europea come entità politica a carattere sovranazionale e intergovernativo, fatto questo che sposta la questione bioetica da nazionale ad europea e che culmina, il 31 Marzo 2004, nell'emanazione della Direttiva 2004/23/CE sulla "definizione di norme di qualità e sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umane". Nel 2006, in attuazione di quanto sancito due anni prima, seguono altre due direttive: la 2006/17/CE e 2006/86/CE. Il Governo Italiano, con Decreto Legislativo n°16 del 25 Gennaio 2010, recepisce le direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE in materia di "prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umane, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umane" (10G0030) (G.U. Serie Generale n. 40 del 18 febbraio 2010). Nel Marzo 2012, in attuazione del Decreto Legislativo n°16 del 25 Gennaio 2010, arriva sul tavolo della Conferenza Stato Regioni lo schema di accordo tra Governo e Regioni sui requisiti minimi per "la qualità e la sicurezza nella donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di:

- a) tessuti e cellule umane;
- b) prodotti fabbricati, derivati da tessuti e cellule umane, destinati ad applicazioni sull'uomo, qualora tali prodotti non siano disciplinati da altre direttive".

Il testo indica puntigliosamente i requisiti organizzativi, strutturali e tecnologici che le strutture dovranno garantire per poter esercitare la loro attività in Italia, tenendo conto sia dell'evoluzione della normativa nazionale ed europea, sia del parere del Consiglio Superiore di Sanità. Il documento sarà, inoltre, sottoposto a revisione periodica e subirà eventuali modifiche legislative in caso di nuove conoscenze mediche e scientifiche.

Nello specifico il decreto legislativo utilizza la seguente terminologia:

- a) cellule riproduttive: tutti i tessuti e le cellule destinati ad essere utilizzati ai fini della riproduzione assistita, nel rispetto delle disposizioni vigenti in materia di procreazione medicalmente assistita;
- b) donazione da parte di un partner: la donazione di cellule riproduttive tra un uomo e una donna che rispettino i requisiti soggettivi di cui all'articolo 5 della legge 19 febbraio 2004, n. 40;
- c) impiego diretto: qualsiasi procedura in base alla quale le cellule donate vengono utilizzate senza essere conservate;
- d) sistema di qualità: la struttura organizzativa, le responsabilità, le procedure, i processi e le risorse destinati ad attuare la gestione della qualità, comprese tutte le attività che direttamente o indirettamente contribuiscono alla qualità;
- e) gestione della qualità: le attività coordinate per dirigere e controllare un'organizzazione sul piano della qualità;

f) procedure operative standard (POS): istruzioni scritte che descrivono le fasi di un determinato processo nonché i materiali e i metodi da utilizzare e il prodotto finale previsto;

g) convalida o qualifica in caso di attrezzature o ambienti: la produzione di prove documentate, in grado di garantire con un elevato livello di certezza che determinati procedimenti, attrezzature o ambienti diano luogo a un prodotto conforme alle specifiche e alle caratteristiche qualitative prestabilite; un procedimento è convalidato al fine di valutare se il sistema funziona efficacemente in rapporto all'impiego previsto;

h) rintracciabilità: la possibilità di ricostruire il percorso di tessuti o cellule in ogni fase dell'approvvigionamento, della lavorazione, del controllo e dello stoccaggio fino alla distribuzione al ricevente o allo smaltimento, compresa la possibilità di risalire all'identificazione del donatore, dell'istituto dei tessuti o del centro di produzione che ricevono o lavorano o stoccano i tessuti o le cellule, nonché, a livello delle strutture sanitarie, la possibilità di individuare i responsabili che applicano i tessuti o le cellule sui riceventi. Tale rintracciabilità riguarda anche la possibilità di reperire e identificare tutti i dati pertinenti relativi ai prodotti e ai materiali che vengono a contatto con detti tessuti o cellule;

i) critico: che ha potenzialmente effetto sulla qualità e o la sicurezza di tessuti e cellule o è a contatto con i predetti;

l) organizzazione per l'approvvigionamento: una struttura sanitaria o una unità ospedaliera in cui si effettuano prelievi di tessuti e cellule umane, che può non essere autorizzata e accreditata come Istituto dei tessuti, fatto salvo quanto previsto dalla

legge 12 Agosto 1993, n. 301, recante norme in materia di prelievo ed innesti di cornea;

m) organizzazione responsabile dell'applicazione sull'uomo: una struttura sanitaria o una unità ospedaliera che esegue applicazioni sull'uomo di tessuti e cellule”.

Nel decreto viene altresì specificato che “il prelievo di tessuti e cellule umane deve essere effettuato esclusivamente da personale qualificato e adeguatamente formato, ai sensi della normativa vigente, a svolgere tali attività. Inoltre, materiali e attrezzature utilizzati per l'approvvigionamento vanno gestiti tenendo debitamente conto delle regolamentazioni, normative e linee guida nazionali ed internazionali, relative alla sterilizzazione di dispositivi e strumenti medici”. E' interessante sottolineare che quanto previsto dal decreto legislativo si applichi solo per ciò che concerne le cellule staminali adulte. In Italia, infatti, lo studio sulle staminali è autorizzato e finanziato dallo Stato esclusivamente quando le ricerche svolte non implicano la distruzione di embrioni. Nello Stato italiano vige una normativa quantomeno ambigua: infatti, se da un lato non è possibile prelevare cellule staminali embrionali poiché ciò comporterebbe l'illegitima distruzione del feto, dall'altro è consentito acquistare suddette cellule fuori dai confini nazionali ed importarle nel nostro paese. La ricerca e l'utilizzo in ambito clinico delle cellule staminali è, quindi, soggetta e disciplinata da un rigido regolamento che, in molti casi, rappresenta un ulteriore ostacolo al progredire della conoscenza; le restrizioni maggiori nell'utilizzo delle cellule staminali riguardano tuttavia quelle derivanti dall'embrione. Per questo motivo, impiegare cellule staminali adulte, nello specifico da polpa dentaria, significa offrire un valido modello sperimentale svincolato dalle molteplici problematiche bioetiche.

1.2 Rafts lipidici: generalità

Le membrane cellulari mostrano una straordinaria complessità di lipidi e proteine deputati a svolgere diverse funzioni per la coordinazione delle quali la membrana scinde i propri costituenti. La maggior parte delle molecole lipidiche nelle membrane cellulari è disposta in modo casuale nel monostrato lipidico in cui risiede: le forze di attrazione di Van Der Waals fra le code di acidi grassi vicini non sono sufficientemente selettive da tenere insieme gruppi di molecole di questo tipo (McNaught et al., 1997, 2°ed.). Per alcune molecole lipidiche come gli sfingolipidi, tuttavia, che tendono ad avere catene di acidi grassi lunghe e sature, le forze di attrazione possono essere sufficientemente forti da trattenere transitoriamente molecole adiacenti, formando piccoli microdomini detti rafts lipidici, che possono essere considerati come fasi di separazione transitorie del doppio strato lipidico in cui si concentrano gli sfingolipidi. I rafts lipidici, o rafts di membrana, sono microdomini di membrana planari, non invaginati e fortemente dinamici, composti da glicosfingolipidi, sfingomieline, colesterolo e proteine specifiche. Tutti questi elementi costituiscono zattere o isole con funzioni specifiche (Fig. 2). In alcune cellule, i rafts possono essere così abbondanti da occupare fino al 30% dell'intera superficie cellulare. Dato che le catene di idrocarburi dei lipidi ivi concentrati sono più lunghe e più dritte delle catene di acidi grassi della maggior parte dei lipidi di membrana, i rafts lipidici presentano un diametro pari a circa 70 nm, più spessi quindi delle altre zone del doppio strato lipidico; sono, inoltre, in grado di ospitare più efficientemente alcune proteine di membrana che tendono quindi ad accumularsi in quelle regioni. E' questo il modo in cui si ritiene che i rafts lipidici organizzino tali proteine, sia concentrandole per il trasporto in piccole vescicole, sia permettendo alle

proteine di funzionare in modo integrato. Nella maggioranza dei casi, le molecole lipidiche in un monostrato si muovono indipendentemente da quelle dell'altro; nei rafts, tuttavia, le lunghe catene idrocarburiche degli sfingolipidi di un monostrato interagiscono con quelle dell'altro mediante le loro code lipidiche (Thomas et al., 1997).

1.2.1 Organizzazione e ruolo

L'ipotesi dell'esistenza di microdomini nella membrana cellulare venne avanzata nel 1988 sulla base di studi condotti su epitelii polarizzati, nei quali esistono domini funzionali apicali e basolaterali (Simons et al., 1988).

In seguito, i microdomini vengono identificati tramite l'esposizione delle membrane plasmatiche all'azione di detergenti non ionici (es. Triton X-100) a bassa temperatura (4-8 °C) e alla centrifugazione del lisato; tutto ciò ha permesso di separare i microdomini dalle altre strutture cellulari (Garner A.E., 2008).

In base al modello ipotetico dell'organizzazione lipidica nei rafts, gli sfingolipidi e il colesterolo intercalato formano un microdominio altamente impacchettato in un ambiente ricco di fosfatidilcolina (PC).

Le regioni ricche di PC sono impacchettate meno strettamente e risultano più fluide dei domini ricchi in sfingolipidi e colesterolo.

I rafts lipidici potrebbero mediare lo smistamento (*sorting*) di glicosfingolipidi e proteine ancorate mediante glicosilfosfatidilinositolo (GPI) alla membrana plasmatica apicale delle cellule (Alberts et al., 2002, 4°ed.). Si ritiene che le proteine con ancora di

GPI siano dirette alla membrana apicale, perchè sono associate ai glicosfingolipidi nei rafts lipidici che si formano nella membrana della rete trans del Golgi.

Anche le proteine di membrana con domini trans-membrana insolitamente lunghi si accumulano nei rafts, i quali contengono preferenzialmente proteine GPI-ancorate e alcune proteine che legano i carboidrati (lectine) atti ad aiutare a stabilizzare le membrane.

Una volta selezionato il *pattern* molecolare, i rafts gemmano dalla rete trans del Golgi in vescicole di trasporto destinate alla membrana plasmatica apicale (Alberts et al. 2002, 4°ed.). Gli sfingolipidi dei rafts sono costituenti ubiquitari delle membrane cellulari, ma il *pattern* di espressione di gangliosidi dipende dal tipo di cellula (Sorice et al., 2009).

I gangliosidi sono glicosfingolipidi acidi appartenenti alla classe dei glicolipidi, formati dall'unione di una molecola di sfingosina con una di acido sialico e presenti in abbondanza soprattutto nel sistema nervoso.

Possiedono, inoltre, una parte idrofila (oligosaccaridica) rivolta alla superficie esterna della membrana cellulare e una porzione lipofila (ceramide) intimamente associata alla matrice della membrana stessa (Voet et al., 2013, 3°ed.; Yu et al., 2010).

Sono stati identificati 188 gangliosidi nei vertebrati con differenti strutture molecolari (Yu et al. 2009). E' interessante notare che i livelli di espressione e il tipo di gangliosidi subiscono importanti cambiamenti durante lo sviluppo del sistema nervoso (Ngamukote et al., 2007): nel cervello embrionale umano e murino i gangliosidi GM3 e GD3 sono predominanti, mentre nel cervello dell'individuo

adulto, la loro espressione è sotto-regolata con concomitante *up*-regolazione di GM1, GD1a, GD1b e GT1b (Bieberich et. al., 2012).

Tale modificazione è attribuita alla variazione dei livelli di espressione degli enzimi glicosiltrasferasi implicati nella loro biosintesi (Ishii et al., 2007; Yu et al., 2011).

La dinamicità dei microdomini di membrana è legata al fatto che, a seconda delle necessità funzionali della cellula, le proteine specifiche possono essere rapidamente reclutate, aggregate o allontanate (Simons et al., 1997).

Sperimentalmente si è visto che, quando si verifica il legame tra antigene e corrispondente recettore T (TCR) localizzato nei microdomini di membrana, quest'ultimo promuove il reclutamento di proteine coinvolte nella generazione di messaggi intracellulari (Bini et al., 2003).

Le principali funzioni dei rafts lipidici comprendono la generazione di segnali intracellulari, il rimodellamento del citoscheletro, l'adesione cellulare, il traffico dei componenti della membrana (es. eso- ed endocitosi) (Brown D.A., 1998).

Alcuni microrganismi patogeni, inoltre, interagiscono preferenzialmente con i rafts, come accade per la tossina colerica che si lega al ganglioside GM1 dei microdomini sulla membrana degli enterociti (Lafont F., 2005).

I gangliosidi presenti nei rafts, principalmente sfingolipidi come il ganglioside GM3, la sfingomielinina, il colesterolo e le proteine di segnalazione, hanno un importante ruolo nell'apoptosi o morte cellulare programmata (Mattei et al., 2011; Sorice et al., 2012a; Garofalo et al., 2015).

E' stato anche dimostrato il coinvolgimento dei gangliosidi nel rimodellamento di organelli, nell'assunzione di proteine dai mitocondri e nella fosforilazione ossidativa e produzione di ATP (Sorice et al., 2012b). Hakomori *et al.* hanno dimostrato che l'aggregazione dinamica dei glicosfingolipidi (GSLs) nell'ambito dei microdomini di membrana è implicata nella modulazione della trasduzione del segnale: i GSLs concentrano recettori ed effettori su entrambi i lati della membrana e di conseguenza accelerano il legame durante il segnale (Hakomori S., 2004).

I rafts lipidici, contenenti un determinato insieme di proteine, possono cambiare la loro dimensione e composizione in risposta a stimoli intra o extracellulari, favorendo così specifiche interazioni proteina-proteina e causando l'attivazione di cascate di segnalazione nella trasduzione del segnale (Simons et al., 2000).

Le specificità funzionali dei rafts lipidici sono dovute alla presenza di proteine specifiche, che si localizzano nei microdomini grazie alla presenza di ancore lipidiche rappresentate da molecole di acido palmitico, miristico o di fosfatidilinositolo, che permettono il legame con gli sfingolipidi (Fig. 2).

Le proteine dei rafts possono essere studiate con le tecniche di fluorescenza, di co-immunoprecipitazione, mentre con la microscopia elettronica auto-radiografica è possibile studiare gli sfingolipidi di membrana (Dolo et al., 2000).

Un altro modo per studiare la funzionalità dei rafts consiste nel prevenirne la formazione, impoverendo la membrana di colesterolo mediante metil- β -ciclodestrina (Quinn P.J., 2010).

E' stato dimostrato che le vie di attivazione di *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) ed *Protein kinase B* (Akt) sono di particolare interesse, perché la loro attivazione è

coinvolta nella sopravvivenza cellulare, la differenziazione e la crescita durante lo sviluppo neuronale (Lim et al., 2008; Delcroix et al., 2010; Alomari et al., 2019).

In particolare, Zegui e colleghi (Zegui et al., 2006), hanno dimostrato che la proteina *extracellular signal-regulated kinase Erk 1/2* è necessaria per la differenziazione neuronale di cellule staminali embrionali *in vitro*.

Altri autori riportano che i gangliosidi, glicosfingolipidi contenenti acido sialico, sono coinvolti nelle prime fasi di differenziazione neuronale di hDPSCs e che il *knockdown* di *UDP-glucose ceramide glycosyltransferase (Ugcg)*, enzima che blocca la biosintesi dello sfingolipide, impedisce la differenziazione in cellule neuronali (Ryu et al., 2009).

Sono stati inoltre osservati cambiamenti nel *pattern* gangliosidico durante la differenziazione cellulare in diversi citotipi, tra cui hDPSCs (Moussavou et al., 2013).

I gangliosidi, infatti, sono componenti ubiquitari dei rafts lipidici, che sono strutture altamente dinamiche, arricchite in glicosfingolipidi e colesterolo, ritenute essere come annessi laterali di lipidi e proteine nelle membrane cellulari, che possono svolgere un ruolo in processi, come trasporto di membrana, la trasduzione del segnale, adesione cellulare, la migrazione o l'apoptosi (Simons et al., 2000; Ciarlo et al., 2010).

E' stata rilevata una grande varietà di proteine in questi microdomini, tra cui i recettori tirosin-chinasi (Epidermal Growth Factor Receptor, EGF-R), mono- (Ras, RAP) o proteine G eterotrimeriche, tirosin chinasi Src-like (lck, lyn , fyn), isoenzimi protein chinasi C, proteine GPI-ancorate e molecole di adesione, incluse le integrine (Garofalo et al., 2002; Mattei et al., 2004).

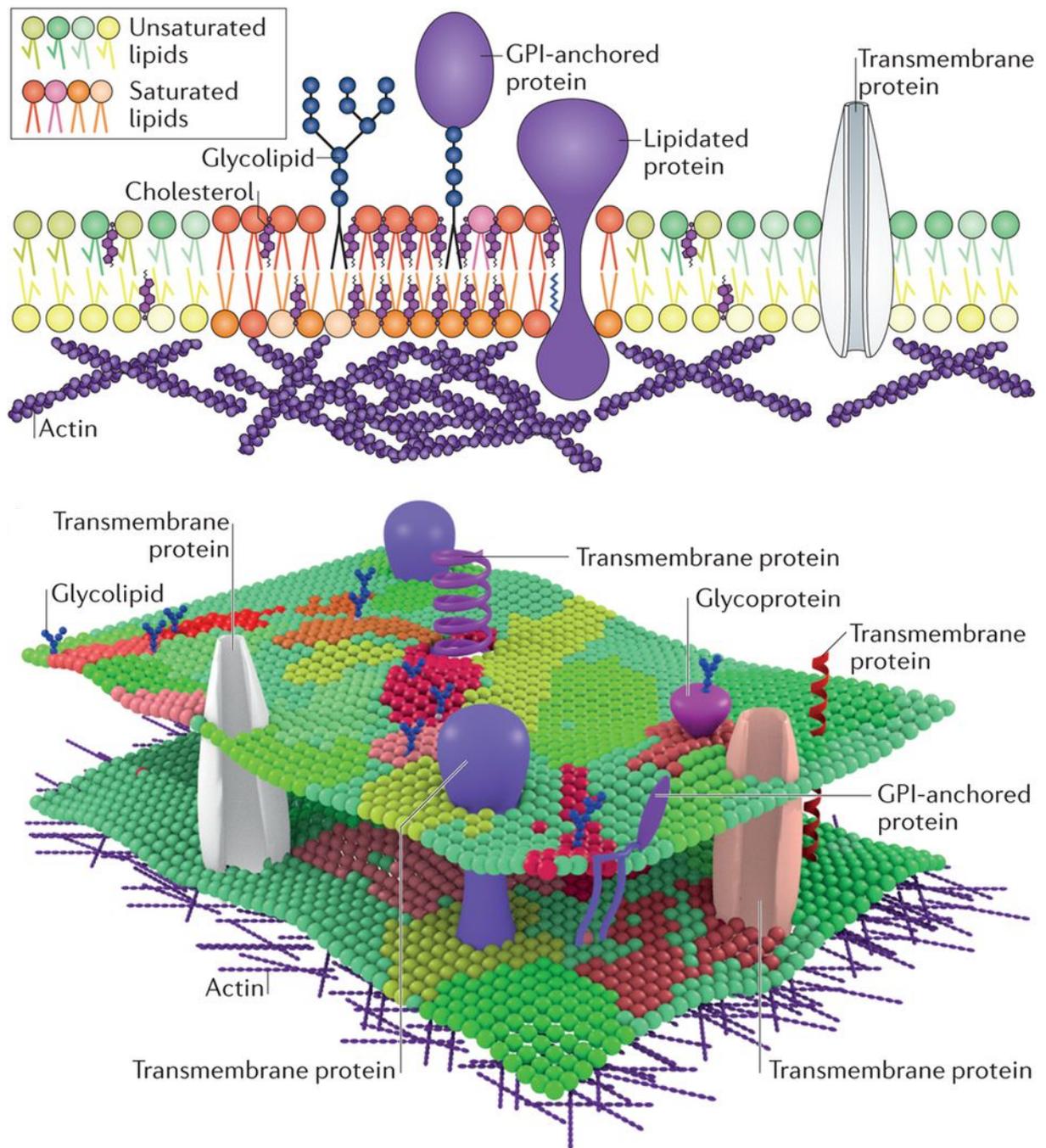


Figura 2. *Composizione, regolazione e ruolo dei rafts lipidici (Sezgin et al., 2017).*

1.3 Proteina prionica cellulare: natura biologica e struttura

Il gene che codifica per la PrP^C è presente in tutti i mammiferi e, nell'uomo, è definito PRNP, localizzato sul braccio corto del cromosoma 20, mentre, nel topo, è definito Prn-p, localizzato sul cromosoma 2 (Prusiner S.B., 1995). È stato dimostrato che esiste un alto grado di conservazione del gene a livello filogenetico e questo fenomeno potrebbe spiegare il suo ruolo essenziale nel metabolismo cellulare. In realtà, la sua presenza non sembra essere necessaria per la crescita e lo sviluppo delle cellule normali, dal momento che i topi, con l'inattivazione del gene Prn-p, si sviluppano normalmente e rimangono sani. Infatti i dati sperimentali mettono in evidenza che le malattie da prioni non derivano da un silenziamento della funzione della proteina prionica cellulare, ma piuttosto dall'accumulo della sua forma patologica PrP^{Sc} (Prusiner S.B., 1982). La PrP^C, costitutivamente espressa in tutte le cellule nucleate dei mammiferi, è presente nei soggetti sani a livello della membrana plasmatica di vari tessuti, anche se le più alte concentrazioni sono associate alle cellule nervose. La proteina prionica cellulare è formata da 209 aminoacidi e presenta due siti N-glicosilati in prossimità dell'Asparagina 181 e dell'Asparagina 197 (Fig. 3). I gruppi oligosaccaridici sono localizzati in una particolare regione della proteina in cui si forma un legame covalente intramolecolare, ovvero un ponte disolfuro tra la Cisteina 179 e la Cisteina 214. La glicosilazione, modificazione post-traduzionale realizzata nell'apparato del Golgi, ha diverse funzioni: stabilizzazione della proteina, coinvolgimento nel riconoscimento molecolare e azione protettiva verso le proteasi. Gli oligosaccaridi in esame proteggono una vasta regione della superficie della proteina prionica, dal momento che impediscono stericamente sia le interazioni intermolecolari (proteina-proteina) che le interazioni intramolecolari (residui

aminoacidici da 1 a 90) (Rudd et al., 2001). La PrP^C è attaccata alla superficie cellulare mediante un'ancora costituita da glicosilfosfatidilinositolo (GPI) (Stahl et al., 1987). Tale ancora è legata all'estremità carbossiterminale della proteina prionica in prossimità della Serina 231 e serve da giunzione flessibile, che permette alla proteina di interagire con molecole all'esterno della cellula. L'intera proteina, senza l'ancora glicolipidica, è localizzata nello spazio extracellulare (Fig. 3).

Il cuore della struttura del glicosilfosfatidilinositolo è costituito da un'unità di fosfoetanolamina, a cui è legata l'estremità carbossi-terminale della proteina. Segue un'unità oligosaccaridica rappresentata da tre residui di mannosio, un residuo di glucosamina e da un residuo di inositolo. Il tutto è legato, mediante una molecola di glicerofosfato, a due catene di acido grasso per ancorare la proteina alla membrana. Attraverso la risonanza magnetica nucleare (NMR) è stata chiarita la struttura tridimensionale della PrP^C di topo.

La superficie della PrP^C è caratterizzata da una distribuzione irregolare di cariche positive e negative (Riek et al., 1996). Poiché la PrP^C nell'uomo è codificata da un gene che contiene un solo esone, la PrP^{Sc} non si forma da un taglio alternativo dell'mRNA che codifica per tale proteina. Le due forme proteiche, infatti, hanno lo stesso peso molecolare, la stessa sequenza aminoacidica, gruppi oligosaccaridici simili ed un'ancora glicolipidica. E' possibile, tuttavia, distinguerle per alcune caratteristiche: la PrP^{Sc} è associata con l'infettività, mentre la PrP^C viene completamente digerita tramite proteolisi con la proteasi K; la PrP^{Sc} viene digerita parzialmente, dando origine alla PrP 27-30. Il peptide PrP 27-30 è in grado di polimerizzare dando luogo a fibrille simili a quelle amiloidi, che a loro volta sono in grado di organizzarsi in placche, presenti a livello cerebrale in numerose

Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) tra cui l'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) (Mediano et al., 2014). La resistenza all'azione della proteasi K della PrP^{Sc} è alla base del test attualmente in uso per la diagnosi della BSE, unitamente ad indagini di biologia molecolare ed immunocistochemica su sezioni di tessuto nervoso. Dal punto di vista strutturale, la differenza tra la proteina prionica cellulare e quella patologica risiede esclusivamente nelle loro conformazioni tridimensionali; il ripiegamento di una proteina, infatti, è in genere determinato da diversi ordini di fattori, quali la struttura primaria che insieme ad uno specifico ambiente chimico-fisico (pH, forza ionica, temperatura), influenzano le conformazioni della struttura secondaria (α -elica e β -foglietto) del polipeptide. Anche l'interazione con altre proteine (foldasi, chaperonine) determina specifici ripiegamenti del polipeptide primario, inclusa la formazione di ponti disolfuro (Kumar et al., 2008). Il ripiegamento della PrP^C può essere alterato da una mutazione che sostituisce uno o più aminoacidi presenti in posizioni cruciali per la struttura della proteina, tanto da determinarne modificazioni conformazionali.

Si ha, così, il passaggio dalla struttura ad α -elica a quella β -foglietto, resistente all'azione degradativa delle proteasi. Attraverso studi spettroscopici si può rilevare che la PrP^{Sc} è per il 43% formata da β -foglietti e per il 30% da α -elica, mentre la PrP^C è per il 3% in β -foglietti e per il 42% da α -elica (Fig. 1). La PrP 27-30 possiede, infatti, lo stesso alto contenuto in β -foglietti della proteina da cui deriva (PrP^{Sc}) (Riek et al., 1996).

Tali differenze strutturali sono alla base della differente sensibilità all'azione delle proteasi, poiché la ricchezza in strutture β rende la proteina prionica resistente all'azione proteolitica, tranne che nel tratto aminoterminale.

1.3.1 Funzioni

Si ipotizza che la proteina prionica cellulare possa agire da interruttore molecolare, regolando diverse funzioni, tra cui la comunicazione cellulare, il riconoscimento e la trasduzione del segnale (Lasmezas C.I., 2003; Mattei et al., 2017; Wulf et al., 2017).

Il gruppo di Charles Weismann (Bueler et al., 1993) dell'Università di Zurigo ha dimostrato che i topi transgenici, che non esprimono la PrP^C (topi Knock-out), si sviluppano normalmente e non mostrano deficit comportamentali significativi ma solo lievi alterazioni di funzionamento del sistema immunitario (Zamosa-Signoret et al., 2008); in questi topi transgenici è stato osservato che l'introduzione esogena di particelle infettive di PrP^{Sc} non era in grado di indurre la malattia. La presenza della PrP^C, pertanto, è essenziale per lo sviluppo delle patologie neurodegenerative associate.

Nel topo è presente un gene che codifica per una proteina (doppel o Dpl) ad elevato grado di omologia con la proteina prionica. È stato ipotizzato che il prodotto di tale gene possa in qualche modo supplire l'assenza della PrP^C nei topi transgenici knock-out, sebbene in proposito vi siano pareri discordi (Mo et al., 2001), soprattutto considerando che i topi knock-out per questo gene risultano essere perfettamente normali. Il Dpl, inoltre, non causa la replicazione dei prioni e la sovraespressione di questa proteina nel sistema nervoso centrale induce segni di neurodegenerazione assolutamente differenti da quelli presenti nelle malattie da prioni.

Studi di elettrofisiologia su ippocampi di topi transgenici, che non esprimono la proteina prionica cellulare, hanno mostrato che essi presentano un deficit nella trasmissione sinaptica mediato da recettori per il neurotrasmettitore GABA (Acido γ -

aminobutirrico) (Malucci et al., 2002).

La PrP^C sembrerebbe infatti implicata nel preservare la normale struttura e funzione sinaptica regolando la trasmissione e la plasticità sinaptica (Hu et al., 2008). A sostegno di questa ipotesi, è stato evidenziato che la disfunzione sinaptica e la perdita sinaptica sono un evento preminente e precoce nelle malattie da prioni (Jeffrey et al., 2008; Šišková et al., 2013). Gabison e collaboratori hanno rilevato che la PrP^C può legare una famiglia di proteine correlate all'eparina (Gabison et al., 1993) e, in tal modo, inibire la conversione della PrP^C in PrP^{Sc}.

L'eparina è un polianione solfato, strettamente correlato ai glicosaminoglicani cellulari, a loro volta associati alla PrP^{Sc} nelle placche amiloidi.

Tutti questi dati forniscono ad oggi un quadro decisamente incompleto sulla funzione fisiologica della PrP^C, anche se una nutrita serie di evidenze sperimentali testimonia una forte implicazione della PrP^C nel metabolismo e nell'omeostasi del rame, dello zinco e del manganese (Prince et al., 1998; Kramer et al., 2001; Martins et al., 2001; Quaglio et al., 2001; Wong et al., 2001a; Wong et al., 2001b; Harris et al., 2003; Lasmezas C. I., 2003; Rachidi et al., 2003; Brazier et al., 2008).

Diversi studi hanno dimostrato che la PrP^C può legare il rame in prossimità del suo dominio N-terminale, in una particolare regione costituita da una sequenza di 8 aa ripetuta in tandem (PHGGGWGQ) (Fig. 3) (Bennion et al., 2002).

Probabilmente tale legame avviene attraverso l'effetto chelante della Glicina/Istidina (PHGGGWGQ) (Stockel et al., 1998).

Il rame potrebbe essere indispensabile per la stabilità conformazionale della proteina,

oppure rendere la proteina prionica capace di rispondere allo stress ossidativo della cellula, regolando l'attività della superossido dismutasi (Cu/Zn SOD) (Klmat et al., 2001; Watt et al., 2005).

In numerosi lavori Brown e collaboratori hanno dimostrato una diminuzione dell'attività della SOD in colture di cellule cerebellari isolate da topi transgenici in cui il gene che codifica per la proteina prionica cellulare è stato inattivato.

Questo risultato suggerisce che la Pr^{PC} potrebbe regolare l'internalizzazione e l'incorporazione del rame nella SOD (Brown et al., 1997,1998).

Altri risultati che sostengono tale teoria sono stati ottenuti utilizzando diversi tessuti (fegato, cuore, varie regioni del sistema nervoso centrale) isolati da topi normali e knockout per il gene che codifica per la proteina prionica.

In assenza della Pr^{PC} si è rilevata, non solo una diminuzione dell'attività della SOD, ma anche dell'attività della catalasi e della ornitina decarbossilasi (Klamt et al., 2001).

Il rame è fondamentale nelle risposte immunitarie; è stato dimostrato, infatti, che l'interleuchina 2 (IL-2) diminuisce in topi che hanno una dieta priva di rame (Lukasewycz et al., 1990).

Molti studi hanno rilevato, inoltre, un ritardo nell'espressione del gene che codifica per l'IL-2 nei linfociti T di topi transgenici con il gene per la Pr^{PC} silenziato.

Questo risultato assegna alla Pr^{PC} un ruolo fisiologico, che consiste nel trasferire rapidamente gli ioni rame nei linfociti T di topo (Kubosaki et al., 2003).

Negli ultimi anni si è accumulata una serie di evidenze sperimentali, che chiamano in causa la Pr^{PC} come fattore implicato nella regolazione del processo apoptotico.

In un recente lavoro (Hachiya et al. 2005a), è stato messo in evidenza che l'aumentata espressione della PrP^C, in topi transgenici che sviluppano spontaneamente disfunzioni neurologiche in maniera dipendente dall'età, determinava un accumulo anomalo della proteina prionica cellulare a livello mitocondriale.

Questa aberrante localizzazione era accompagnata dalla diminuzione dell'attività della manganese superossido-dismutasi (Mn-SOD), dal rilascio del citocromo c nel citoplasma, dall'attivazione della caspasi-3 e dalla frammentazione del DNA, principalmente a livello dell'ippocampo.

Altri studi, condotti mediante "real-time imaging" (Hachiya et al. 2005b) su cellule vive utilizzando un costrutto GFP-PrP, che conteneva una mutazione al codone 145 simile alla Malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (MGSS), metteva in evidenza una aberrante localizzazione a livello mitocondriale in cellule di neuroblastoma murino N2a e HpL3-4. Si poteva osservare, inoltre, un cambiamento nel potenziale di membrana mitocondriale, il rilascio del citocromo c nel citoplasma e frammentazione del DNA.

Studi recenti hanno dimostrato che la PrP^C è un elemento importante della matrice di pluripotenza e di auto-rinnovamento delle staminali, con una quantità crescente di prove che puntano in questa direzione (Miranda et al., 2011; Mohanty et al., 2012). E' stato anche dimostrato che la PrP^C ha un ruolo anche nella regolazione trascrizionale della pluripotenza, nella differenziazione delle cellule staminali in diversi lignaggi (ad esempio muscoli e neuroni), nello sviluppo embrionale e nel suo coinvolgimento nelle cellule riproduttive, poiché la PrP^C esercita un'importante regolazione del principale gene della pluripotenza Nanog (Miranda et al., 2013).

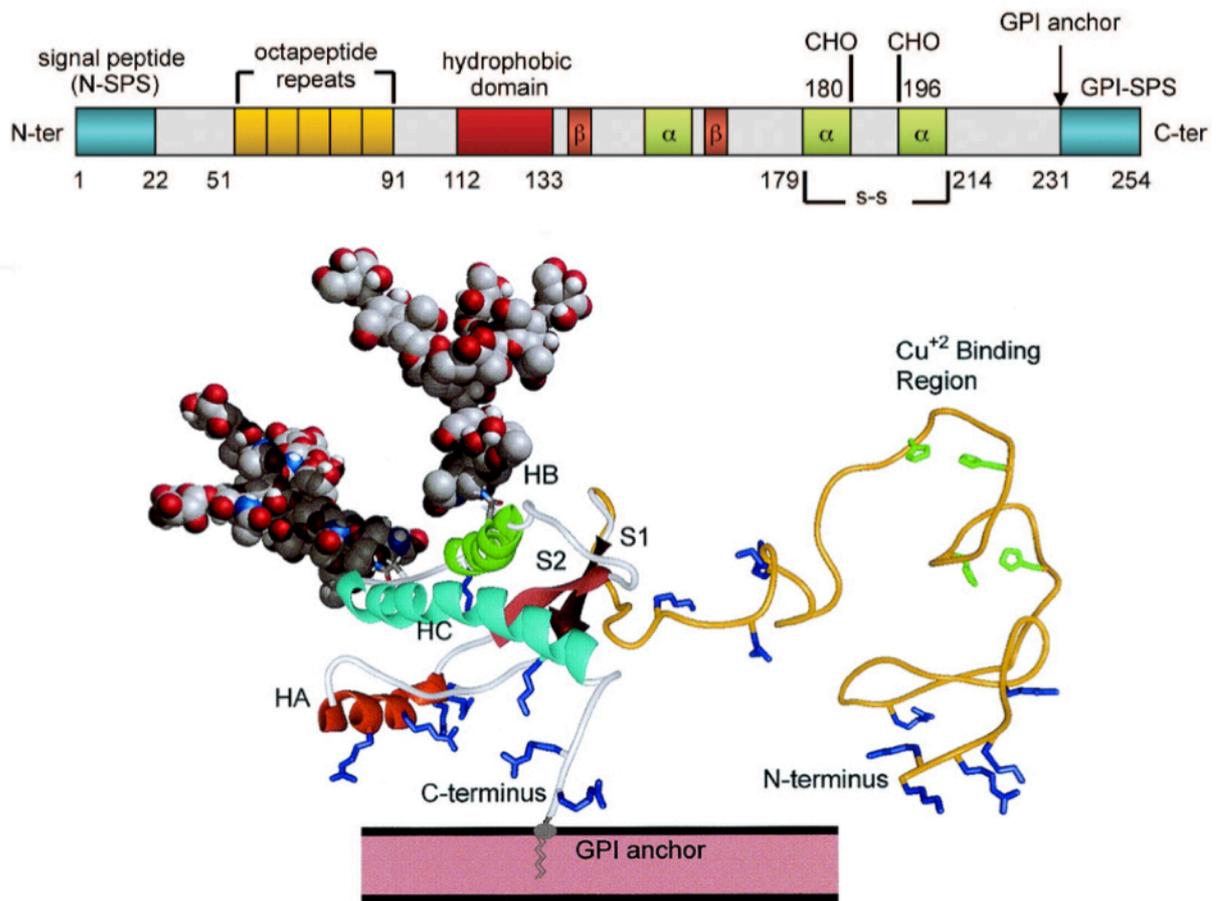


Figura 3. *La Proteina Prionica Cellulare (PrP^C)* (Bennion et al., 2002).

2. Scopo della ricerca

Obiettivo del presente lavoro è quello di condurre studi osservazionali *in vitro* sul signaling molecolare che sottende il processo differenziativo neuronale, utilizzando come modello sperimentale cellule staminali mesenchimali derivanti da polpa dentaria umana (hDPSCs). Infatti, ancora oggi non sono stati completamente chiariti i meccanismi di attivazione delle vie che portano la cellula staminale a differenziare, così come poco conosciuto risulta essere il ruolo di particolari strutture chiamate rafts lipidici. Risulta inoltre interessante il ruolo svolto da un particolare componente dei rafts lipidici, la Proteina Prionica Cellulare (PrP^C), la cui espressione viene modulata a seconda del grado di differenziamento della cellula staminale e che sembra essere coinvolta nel signaling molecolare del processo di differenziamento neuronale.

La procedura sperimentale è stata articolata nelle seguenti fasi:

1. Studio del ruolo dei rafts lipidici, nel processo di differenziamento neuronale, mediante l'utilizzo di sostanze che alterano il microdominio quali D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol ([D]-PDMP), inibitore competitivo della glucosilceramide sintetasi che blocca la sintesi dei gangliosidi arrestando la formazione dei rafts lipidici e Methyl-beta-cyclodextrin (M β CD), induttore di efflusso di colesterolo dalla membrana con conseguente scompaginamento dei microdomini;
2. Valutazione delle vie di segnalazione che si attivano o inattivano in risposta a stimoli neuroinduttivi;
3. Studio del ruolo della PrP^C nel processo di differenziamento neuronale.

3. Materiali e metodi

3.1 Etica della ricerca

Terzi molari inclusi sono stati estratti da soggetti di età compresa tra i 13 ed i 19 con problemi correlati all'arcata dentaria (e.g. Disodontiasi) e alla postura, per i quali il terzo molare incluso rappresentava materiale di scarto e, quindi, di facile reperibilità ai fini della ricerca.

Tutti i soggetti hanno sottoscritto il modulo di consenso informato prima della loro partecipazione allo studio, condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki.

Il protocollo sperimentale è stato approvato in data 26 gennaio 2017 dal Comitato Etico dell'Azienda Policlinico Umberto I (Codice identificativo del progetto CE: 4336).

3.2 Estrazione della polpa dentaria e separazione delle cellule

Il dente è stato sezionato, utilizzando una fresa, mediante taglio coronale passante parallelo al tetto della camera pulpare (Martellucci et al., 2019b).

La polpa è stata delicatamente rimossa in condizioni sterili con un piccolo escavatore, posta in una provetta con Dulbecco a bassa concentrazione di glucosio (DMEM-L) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) con L-Glutamina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) più penicillina/streptomina 1% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e anfotericina 0,1% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e trasferito in laboratorio in meno di 60 minuti.

In seguito, la polpa è stata lavata tre volte in tampone fosfato isotonic (PBS) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e centrifugata per 10 minuti a 2500 x g.

Il surnatante è stato rimosso e la polpa, dopo essere stata risospesa in Hank's solution (Invitrogen, Monza, Italia), locata in una piastra petri e divisa in piccoli pezzi con bisturi sterile, è stata incubata per due ore a 37 °C al 5% di CO₂.

Successivamente, il mezzo di coltura è stato rimosso mediante centrifugazione per 10 minuti a 2500 × g, il pellet risospeso con collagenasi di tipo IV (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) allo 0,1%, in DMEM, e incubato per 15 minuti a 37 °C in CO₂ al 5%.

Trascorso il tempo, il campione è stato centrifugato per 10 minuti a 2500 × g, il surnatante rimosso, il pellet risospeso e messo in fiasche di coltura (Sarstedt, Monza, Italia) da 25 cm³ contenente mezzo di crescita DMEM-L (Fig. 4A).

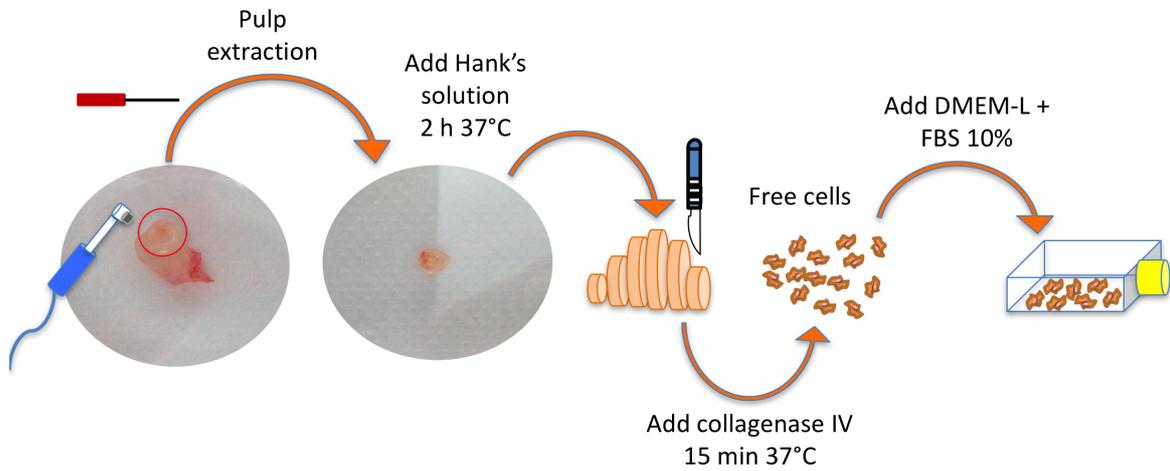
Dopo 1 giorno (gg) di crescita, è stato possibile osservare diversi cloni di cellule aderenti all'interno della fiasca (Fig 4B).

Approssimativamente, tra 5 gg e 7 gg, le cellule aderenti hanno raggiunto la confluenza e sono state rimosse con tripsina-EDTA 0,01M (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (Fig. 4C,D).

La sospensione cellulare è stata centrifugata per 6 minuti a 259 × g, il surnatante rimosso e le cellule collocate in nuove fiasche, da 25 cm³, con mezzo di coltura e poste in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Dopo circa una settimana, le cellule aderenti hanno mostrato una significativa attività proliferativa: ogni 3 gg le cellule raggiungevano la confluenza e quindi venivano propagate.

A



B

C

D

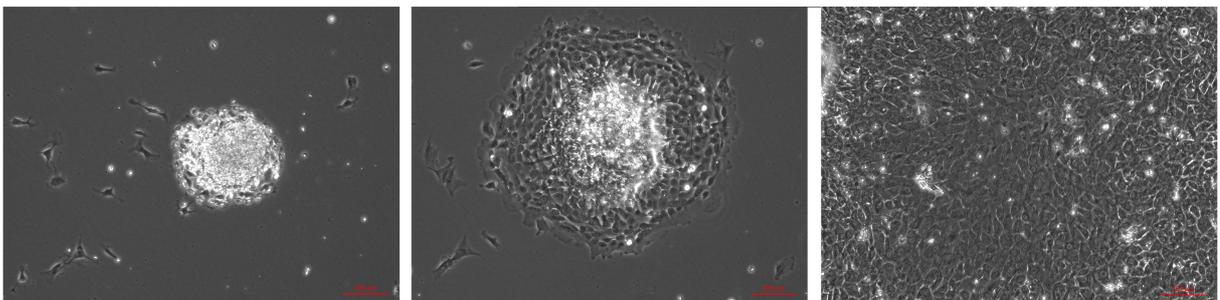


Figura 4. Estrazione della polpa dentaria e separazione delle cellule staminali. Dalla fresatura del terzo molare incluso alla messa in coltura (A). hDPSCs coltivate a 1 gg (B), 5 gg (C) e 7 gg (D) dalla separazione della polpa. Scale bar 100 μ M.

3.3 Caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali

Recenti studi dimostrano che le cellule staminali mesenchimali da polpa dentaria risultano negative per l'espressione di antigeni ematopoietici di staminalità quali CD14, CD19, CD34 e CD45 (Agha-Hosseini et al., 2010; Kawanabe et al., 2012).

Per quanto riguarda la positività, invece, non essendo disponibile alcun protocollo standardizzato, ci si riferisce normalmente alle linee guida generali, pubblicate già nel 2005, dal Comitato della Società Internazionale per le Terapie Cellulari (ISCT) che ha stabilito dei criteri di identificazione delle MSCs:

- l'adesione alla plastica in condizioni di coltura standard riscontrabile nel 95% delle cellule;
- la capacità di differenziazione *in vitro* secondo diverse linee cellulari quali osteoblasti, adipociti, condroblasti e neuroni;
- la positività a specifici markers di staminalità per cellule mesenchimali.

Facendo dunque riferimento a lavori recenti, in cui sono state studiate le hDPSCs, è stata effettuata l'analisi proteica utilizzando i markers a cui tali cellule sono maggiormente positive: CD44, CD90, CD105 e STRO-1 ed il controllo negativo con i marcatori emopoietici CD14 e CD19.

L'analisi lipidica, invece, è stata condotta mediante cromatografia su strato sottile ad elevata prestazione (HPTLC) per verificare che tali cellule presentassero il caratteristico pattern gangliosidico delle staminali mesenchimali (Ryu et al., 2009).

3.4 Stimolo neuroinduttivo

Per indurre il differenziamento neuronale, le hDPSCs sono state mantenute in coltura fino a 28 gg dalla separazione della polpa e, successivamente, coltivate con l'appropriato terreno di coltura e specifici stimoli per 21 gg (Arthur et al., 2008; Vollner et al., 2009) (Fig. 5A,B).

In breve, le cellule sono state seminate ad una densità pari a $1,2 \times 10^5$ cellule per ml in fiasche per colture cellulari (Sarstedt, Monza, Italia) e tenute in incubazione a 37 °C e 5% di CO₂ fino all'adesione.

In seguito, dopo aver rimosso il terreno di coltura ed effettuato un lavaggio in PBS, le hDPSCs sono state messe in coltura con Neurobasal A contenente L-glutamina supplementato con B27 (Life Technologies, Monza, Italia), Epidermal Growth Factor 20 ng/ml (EGF), basic Fibroblast Growth Factor 40 ng/ml (bFGF) (PeproThec, DBA, Milano Italia).

Una volta ogni 4 gg, per tre settimane, il terreno è stato sostituito aggiungendo ogni volta EGF/bFGF.

Le cellule sono state prelevate a diversi tempi (7 gg, 14 gg, 21 gg), normalizzate per il contenuto proteico e analizzate mediante immunofluorescenza ed immunoblot.

A

B

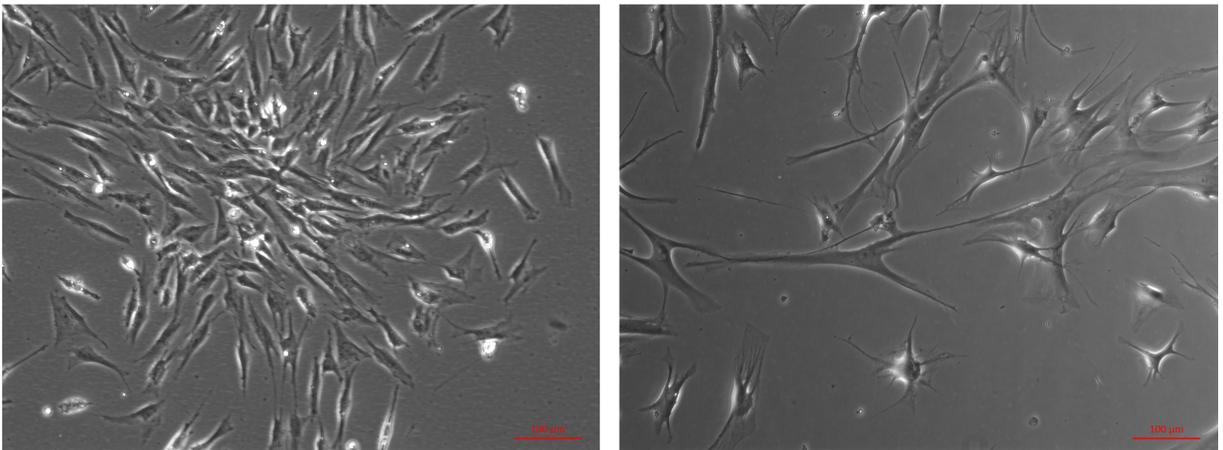


Fig 5. *Contrasto di fase di hDPSCs di controllo, prelevate a 28 gg dalla messa in coltura (A) e a seguito di neuroinduzione per 21 gg (B). Scale bar 100 μ M.*

3.5 Immunofluorescenza

Il giorno precedente all'esecuzione dell'immunofluorescenza sono state contate 10^5 cellule mediante la camera di conta Fast Read 102 (Biosigma, Milano, Italia) e poste in ciascuna delle quattro camere di coltivazione per fluorescenza situate su di un unico vetrino (Sarstedt, Monza, Italia), fatte crescere in terreno di coltura DMEM, supplementato con penicillina-streptomina 1% e Foetal Bovine Serum (FBS) Qualified E.U. 10% (Invitrogen, Monza, Italia). Il giorno seguente, da ogni pozzetto è stato aspirato il terreno di coltura, facendo attenzione a non rimuovere le cellule adese sul vetrino. In seguito è stato effettuato un veloce lavaggio in PBS e sono state fissate le cellule con 300 μ L di Formaldeide al 4% (ECHEM, Farvima Medicinali, Firenze, Italia) per 40 minuti a temperatura ambiente (RT). La formaldeide è stata rimossa con Pasteur di vetro ed è stato effettuato un rapido lavaggio con PBS, a cui è seguita la permeabilizzazione delle cellule con Triton X-100 allo 0.1%. Successivamente è stata utilizzata una soluzione di blocco, costituita da PBS/Bovine Serum Albumine (BSA) 3% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 120 minuti a RT. Dopo la fase di blocco è stato effettuato un rapido lavaggio in PBS, sono stati aggiunti anticorpi primari quali anti-CD105 (BD Biosciences, Milano, Italia), anti-CD44 e anti-STRO-1 (Millipore, Milano, Italia), anti- β 3-tubulina, anti-NFH (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-GAP-43 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), anti-PrP SAF 32 (Spi-Bio Bertin Pharma, Montigny-Le-Bretonneux, Francia) anti-GM2 ed anti-GD3 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), diluiti 1:500 in una soluzione di PBS/BSA 3% ed è stato posto il vetrino in incubazione *over night* (o.n.) a + 4 °C. Il giorno seguente, l'anticorpo è stato rimosso ed i campioni sono stati sottoposti ad un doppio lavaggio in PBS/BSA 3%, l'ultimo dei quali effettuato per 30 minuti. Allo scadere del

tempo i campioni sono stati marcati con i rispettivi anticorpi secondari anti-Mouse IgG Fitch, anti-Mouse IgM Fitch (Sigma-Aldrich, Milano Italia) anti-Mouse Alexa Fluor 488 e anti-Rabbit Alexa Fluor 594 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), diluiti 1:50 in una soluzione di PBS/BSA 3% e lasciati agire per 120 minuti. Alla fine del tempo sono stati effettuati 3 lavaggi da 10 minuti l'uno in PBS, il quale è stato poi rimosso. Il vetrino è stato montato ed analizzato con microscopio a fluorescenza Axio Vert. A1 (Zeiss, Milano, Italia) per la ricerca degli antigeni di staminalità.

3.6 Immunoblot

Le hDPSCs utilizzate nel corso della sperimentazione sono state sottoposte ad analisi in Immunoblot. In particolare, le cellule sono state lisate in tampone di lisi contenente Triton X-100 all'1%, 10mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM Na₃VO₄ e 75 U di aprotinina e lasciate riposare per 20 minuti a 4 °C. I lisati sono stati centrifugati per 6 min a 259g per rimuovere nuclei e detriti di grandi dimensioni. Dopo la valutazione della concentrazione delle proteine con Bradford Dye Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), i lisati sono stati sottoposti a elettroforesi in gel di poliacrilamide sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). Le proteine sono state trasferite elettroforeticamente su membrana di polivinilidene (PVDF) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) per poi essere bloccate con latte privato di grasso in polvere al 5% in una soluzione di TBS contenente lo 0,05% di Tween 20. A seconda dell'obiettivo del test, sono stati utilizzati diversi anticorpi primari monoclonali. Per la caratterizzazione proteica sono stati impiegati anti-CD105 (BD Biosciences, Milano, Italia), anti-CD44, anti-STRO-1 (Millipore, Milano, Italia), anti-Actina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), per l'analisi dell'espressione della proteina prionica è stato impiegato l'anticorpo

anti-PrP SAF 32 (Spi-Bio Bertin Pharma, Montigny-Le-Bretonneux, Francia), mentre per l'immunomarcatura su lastra cromatografica (TLC immunostaining) l'anti-GM2 e l'anti-GD3 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Per la differenziazione neuronale sono stati usati anti-GAP43 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), anti- β 3-tubulina ed anti-Neurofilament-H (NFH) (Cell Signaling Technology Danvers, MA, USA). Infine, per il signal pathway, anti-fosfo-Akt (ser473), anti-Akt totale, anti-fosfo p42/44 MAP chinasi (p-Erk 1/2) (Thr202/tyr204), anti-p42/44 MAP chinasi totale (Erk 1/2) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-EGF-R (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Gli anticorpi legati sono stati visualizzati con perossidasi di rafano (HRP) coniugata ai relativi anticorpi secondari: anti-Mouse IgG ed anti-Rabbit IgG (Sigma-Aldrich, Milano, Italia); l'immunoreattività è stata valutata con reazione di chemiluminescenza utilizzando il sistema di rilevazione ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK).

3.7 Citofluorimetria a flusso

L'espressione di antigeni di superficie delle hDPSCs è stata quantificata anche mediante citofluorimetria a flusso. Le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% e permeabilizzate, nel caso di anticorpi non di membrana, in Triton X-100 allo 0,1% (v/v). Dopo il lavaggio, le cellule sono state incubate per 60 minuti a 4 °C con anticorpi per la caratterizzazione proteica quali anti-CD105 (BD Biosciences, Milano Italia), anti-CD44 e anti-STRO-1 (Millipore, Milano, Italia), anti-PrP SAF 32 (Spi-Bio Bertin Pharma, Montigny-Le-Bretonneux, Francia), anti-PrP EP1802EY (Abcam, Cambridge, MA, USA), mentre a seguito di pretrattamento con metil- β -ciclodestrina (M β CD) per 30 minuti a 37 °C e successivo stimolo con EGF/bFGF per 5 minuti a 37 °C al fine di studiare il signal pathway, sono stati utilizzati anti-fosfo-Akt (ser473) ed

anti-fosfo p44/42 MAP chinasi (Erk 1/2) (Thr202/tyr204). Successivamente, le cellule sono state marcate con gli anticorpi secondari anti-Mouse IgG ed anti-Rabbit IgG H&L (Abcam, Cambridge, USA) coniugati rispettivamente con ficoeritrina (PE) e cianina 5 (CY5) per ulteriori 60 minuti. Tutti i campioni sono stati analizzati con il citofluorimetro BD Accuri C6 (BD Accuri, Milano, Italia) dotato di un laser blu (488 nm) e di un laser rosso (640 nm). Per l'analisi sono stati acquisiti almeno 2×10^4 eventi.

3.8 Frazionamento in gradiente di saccarosio

Brevemente, 1×10^8 cellule sono state risospese in 1 ml di tampone di lisi contenente Triton X-100 1% (detergente non ionico), Tris HCl 10mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, acido etilendiaminotetracetico (EDTA) 5 mM, ortovanadato di sodio (Na_3VO_4) 1mM, 75 U aprotinina e lasciato poi riposare per 20 min. La sospensione cellulare così ottenuta è stata poi sottoposta ad omogeneizzazione mediante Dounce (10 colpi). Il lisato è stato centrifugato per 5 minuti a $1300 \times g$ per rimuovere nuclei e grandi detriti cellulari. Il surnatante, frazione post nucleare, è stato sottoposto ad un gradiente lineare di saccarosio (5-30%) e centrifugato a $2 \times 10^5 \times g$ per 16-18 ore a 4 °C in un rotore SW41 (Beckman Inst., Palo Alto, CA, USA). Dopo centrifugazione, il gradiente è stato frazionato e sono state raccolte 11 frazioni a partire dalla sommità della provetta, ciascuna delle quali è stata divisa in due aliquote: la prima è stata sottoposta ad estrazione gangliosidica, mentre la seconda è stata sottoposta ad analisi in Immunoblot, utilizzando un anticorpo policlonale anti-EGF-R (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) visualizzato in chemiluminescenza con con perossidasi di rafano (HRP) coniugata all'anticorpo secondario anti-Mouse IgM (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Tutte le fasi sono state eseguite a 0-4 °C.

3.9 Estrazione e analisi dei gangliosidi

Lisati e frazioni di cellule hDPSCs, ottenute come sopra riportato, sono state sottoposte ad estrazione gangliosidica mediante il metodo descritto da Svennerholm e Fredman (Svennerholm et al., 1980).

In breve, i gangliosidi sono stati estratti due volte in cloroformio:metanolo:acqua (4:8:3) (v:v:v) e quindi sottoposti a partizione di Folch con ulteriore aggiunta di acqua, così da ottenere un rapporto finale cloroformio:metanolo:acqua pari a 1:2:1,4.

La "fase superiore", contenente i glicosfingolipidi polari, è stata purificata dai sali e dai contaminanti di basso peso molecolare, utilizzando delle colonne in silice Supelclean LC-18 (SUPELCO Inc., Bellefonte, PA, USA) in base al metodo illustrato da Williams e McCluer (Williams et al., 1980).

I glicosfingolipidi eluiti sono stati portati a secco in corrente d'azoto e separati mediante cromatografia su strato sottile ad elevata prestazione *High-Performance-Thin-Layer-Chromatography* (HPTLC). Dopo la corsa, le lastre sono state fatte asciugare all'aria ed i gangliosidi sono stati visualizzati mediante reazione colorimetrica con il resorcinolo, colorante specifico per l'acido sialico e sono state evidenziate bande in blu porpora (Svennerholm L., 1957).

Alternativamente, i gangliosidi estratti dalle frazioni sono stati immunomarcati con anti-GM2 su lastra cromatografica (TLC immunostaining), attraverso l'utilizzo di lastre in gel di silice o alluminio (MERCK, Darmstadt, Germania).

In seguito, la lastra è stata trattata con perossidasi di rafano (HRP) coniugata al relativo anticorpi secondario anti-Mouse IgM (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);

l'immunoreattività è stata valutata con reazione di chemiluminescenza, utilizzando il sistema di rilevazione ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK). Come sistema eluente è stata utilizzata una miscela di cloroformio: metanolo: KCl 0,25% (5:4:1) (v:v:v) e come standards di riferimento, sia per HPTLC sia per TLC immunostaining, sono stati utilizzati due differenti mix di gangliosidi purificati quali mono-sialogangliosidi GM3, GM2 e GM1 e di-sialogangliosidi GD3 e GD1a ed il GD1b (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

3.10 Immunoprecipitazione

hDPSCs, di controllo o trattate con EGF/bFGF per 14 gg, sono stati immunoprecipitate con l'anticorpo anti-PrP SAF32 (Spi-Bio Bertin Pharma, Montigny-Le-Bretonneux, Francia). In breve, le hDPSCs sono state lisate in tampone di lisi (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 10 mg of leupeptin/ml). Dopo il *preclearing*, il surnatante è stato immunoprecipitato con anti-PrP SAF32 (Spi-Bio, Bertin Pharma, France) e protein A-acrylic beads. Come controllo, è stato utilizzato un isotipo anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Gli immunoprecipitati di PrP sono stati impiegati nell'analisi in Dot Blot.

3.11 Dot Blot

Gli immunoprecipitati di PrP sono stati trasferiti su membrane di nitrocellulosa (Bio-Rad, Milano, Italia). L'analisi del Dot Blot è stata eseguita come descritto in un precedente lavoro (Garofalo et al., 2016). Brevemente, le strisce di nitrocellulosa sono state marcate con l'anticorpo policlonale anti-EGF-R (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), l'anticorpo monoclonale anti-GM2 IgM (NANA) e mouse anti-GD3 IgM (Seikagaku Corp., Chou-ku, Tokyo, Giappone). In seguito, sono state

incubate con i relativi anticorpi secondari anti-Mouse IgG ed anti-Rabbit IgG (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). L'immunoreattività è stata visualizzata mediante ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK). Gli immunoprecipitati sono stati testati con anti-PrP 6H4 mAb (Prionics, Milano, Italia).

3.12 Knockdown della proteina prionica

Le hDPSCs sono state coltivate (8×10^4 cells/ml) in piastre da 6 pozzetti (Sarsted, Milano, Italia), utilizzando DMEM-L contenente siero e antibiotici. Ventiquattro ore dopo la semina, le cellule sono state trasfettate con siRNA PrP (Flexitube GeneSolution GS5621 for PRNP), mediante l'impiego di HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA) secondo le istruzioni del produttore. Come controllo sperimentale, le cellule sono state anche trasfettate con 5 nM scrambled siRNA (AllStars Negative Control - Qiagen, Valencia, CA, USA). Dopo 72 ore, le cellule sono state incubate con EGF (PeproThec, DBA, Milano, Italia) per 5 minuti a 37 °C o, in alternativa, con EGF/bFGF per 7 e 14 giorni. L'espressione della PrP^C è stata verificata mediante analisi in citometria a flusso utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-PrP EP1802Y (Abcam, Cambridge, MA, USA).

3.13 Analisi statistica

Le immagini ottenute in Immunoblot e Dot Blot sono state sottoposte ad analisi di scansione densitometrica eseguita con Mac OS X (Apple Inc., Cupertino, CA, USA), utilizzando il software NIH Image 1.62 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Tutti i dati ottenuti nel corso della sperimentazione sono stati verificati in almeno 3 esperimenti differenti e riportati come media \pm deviazione standard (SD). Solo valori di $p < 0,01$ sono stati considerati statisticamente significativi.

4. Risultati

4.1 Caratterizzazione morfologica e proteica delle hDPSCs

Dopo 3 giorni di coltura delle hDPSCs, è stato possibile osservare diversi cloni di cellule aderenti, ciascuno dei quali forma quella che è comunemente chiamata “rosetta”. In circa 7 giorni, sono divenute evidenti grandi colonie di cellule aderenti in colture primarie che hanno raggiunto la confluenza.

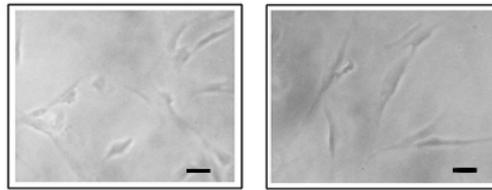
Risulta inoltre interessante notare come le hDPSCs crescano in aderenza e presentino una forma tipica, definita “like fibroblast cells”, entrambe vere e proprie caratteristiche identificative delle MSCs coltivate *in vitro* (Fig. 6A).

A 14 giorni è stato possibile prelevare campioni da sottoporre ad analisi di Immunoblotting, Fluorescenza e Citofluorimetria.

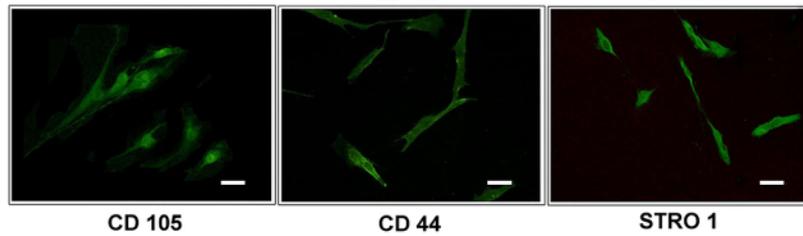
E' stata eseguita una caratterizzazione delle cellule mediante l'utilizzo di antigeni di superficie caratteristici delle staminali mesenchimali come CD105, CD44 e STRO1; come controlli negativi sono invece stati utilizzati tipici marcatori emopoietici come CD14 e CD19 (dati non mostrati).

Le analisi in Immunofluorescenza (Fig. 6B), effettuata su cellule a 28 giorni dalla lavorazione della polpa, e in Immunoblot (Fig. C), eseguita su campioni di cellule prelevate a 14, 21 e 28 giorni dalla lavorazione della polpa, hanno evidenziato la positività delle hDPSCs per i suddetti marcatori. I dati sono stati confermati anche dall'analisi eseguita in Citofluorimetria (Fig. 6D), effettuata su cellule a 28 giorni dalla lavorazione della polpa.

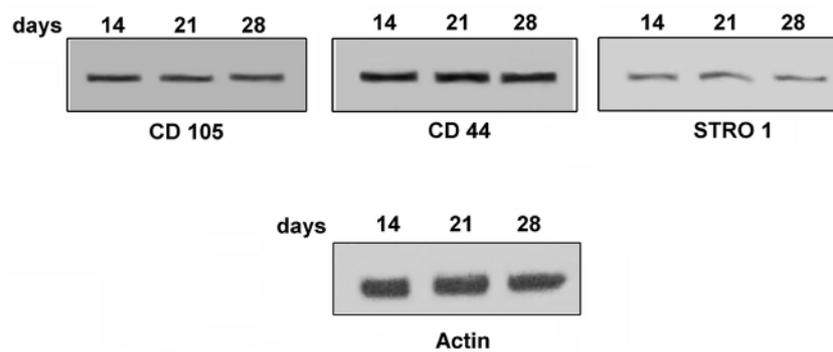
A



B



C



D

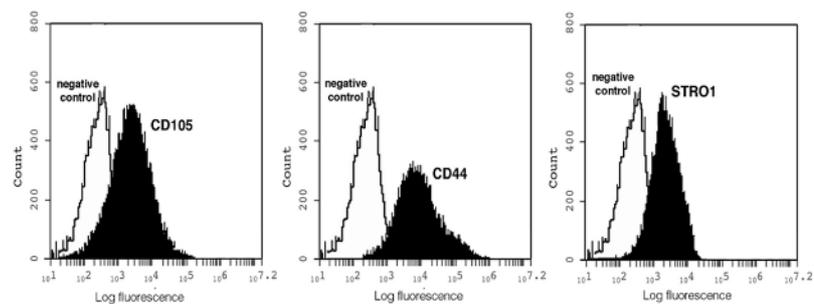


Figura 6. Morfologia delle hDPSCs a 28 gg dalla lavorazione della polpa. Scale bar 50 μ M (A). Caratterizzazione proteica delle hDPSCs mediante le tecniche di Fluorescenza (B), Immunoblot (C) e Citofluorimetria (D).

4.2 Differenziamento neuronale delle hDPSCs

Al fine di effettuare la neuroinduzione, le hDPSCs sono state coltivate in presenza del fattore di crescita epidermico (EGF) e del fattore di crescita fibroblastico (bFGF) per 21 giorni durante i quali è stata valutata l'espressione di marcatori neuronali nelle hDPSCs.

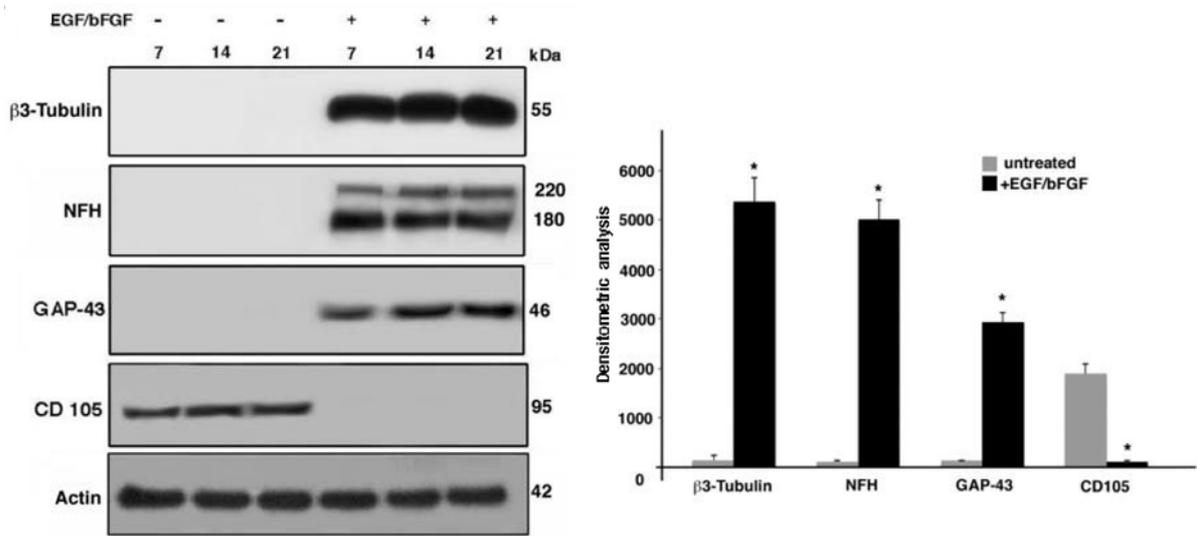
Le cellule sono state raccolte a diversi tempi (7, 14 e 21 giorni) ed analizzate in immunoblotting con gli anticorpi anti- β 3-tubulina, anti-NFH, anti-GAP43 e, come controllo negativo, anti-CD105.

L'analisi in Immunoblot ha rivelato una banda corrispondente rispettivamente a β 3-tubulina, NFH e GAP43 solo nelle cellule ottenute a seguito del trattamento con EGF/bFGF a 7, 14 e 21 giorni, rispetto alle cellule di controllo che invece risultano negative (Fig. 7A).

Per converso, l'espressione CD105 è evidente in cellule di controllo ma non nelle cellule differenziate (Fig. 7A).

I risultati dei dati ottenuti in Immunoblot sono stati poi confermati mediante analisi in immunofluorescenza (Fig. 7B).

A



B

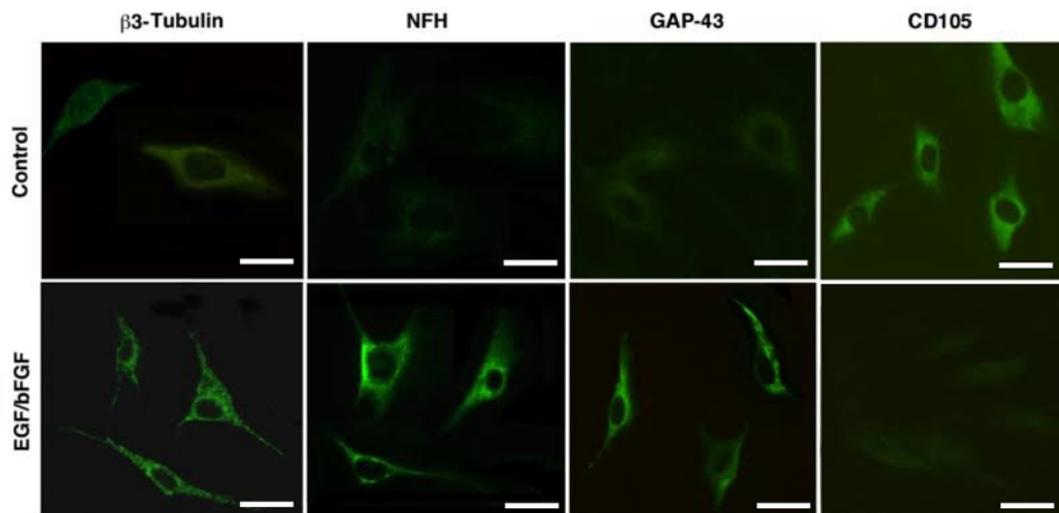


Figura 7. Caratterizzazione proteica delle hDPSCs neuroindotte. Immunoblot su hDPSCs analizzate a 7, 14 e 21 gg dalla lavorazione dell polpa e, successivamente, neuroindotte per 7, 14, 21 gg ed analizzate con marcatori neuronali (A). Immunofluorescenza su hDPSCs neuroindotte per 21 gg. Scale bar 20 μ M (B).

4.3 Caratterizzazione lipidica delle hDPSCs

Diversi studi documentano come il pattern gangliosidico delle hDPSCs cambi durante il processo di differenziamento neuronale (Ryu et al., 2009).

E' stata condotta, quindi, un'analisi della composizione gangliosidica delle hDPSCs effettuando l'estrazione dei gangliosidi da lisati di staminali, di controllo e neuroindotte, mediante il metodo descritto da Svennerholm e Fredman.

I glicosfingolipidi eluiti sono stati separati mediante HPTLC e visualizzati mediante reazione colorimetrica con il resorcinolo.

Interessante notare come il GD1a ed il GM3 siano presenti sia prima sia dopo neuroinduzione (Fig. 8A).

Al contrario, il GM2 è esclusivamente espresso delle staminali di controllo mentre il GD3 è espresso solo nelle neuroindotte (Fig. 8A).

Quindi, essendo questi elementi caratterizzanti, è stata eseguita un'analisi in immunofluorescenza, al fine di valutare la distribuzione del segnale delle molecole gangliosidiche sulla membrana plasmatica.

Il fatto che la distribuzione non sia uniforme, come si può notare, indica la presenza di microdomini di membrana arricchiti in GM2 (Fig. 8B) e GD3 (Fig. 8C).

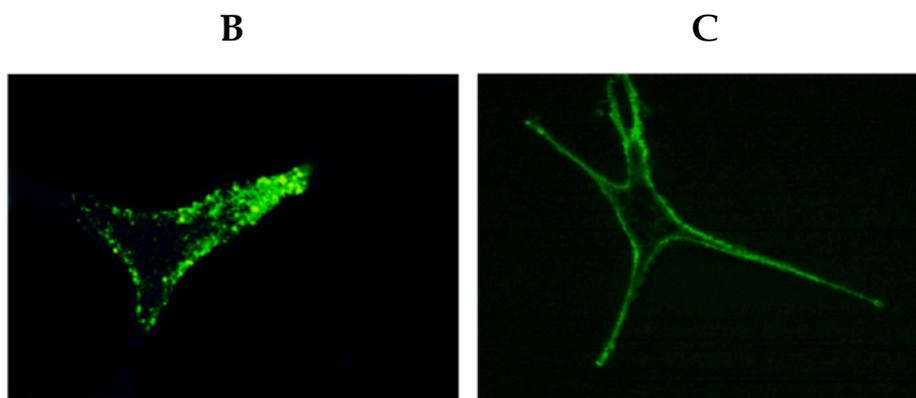
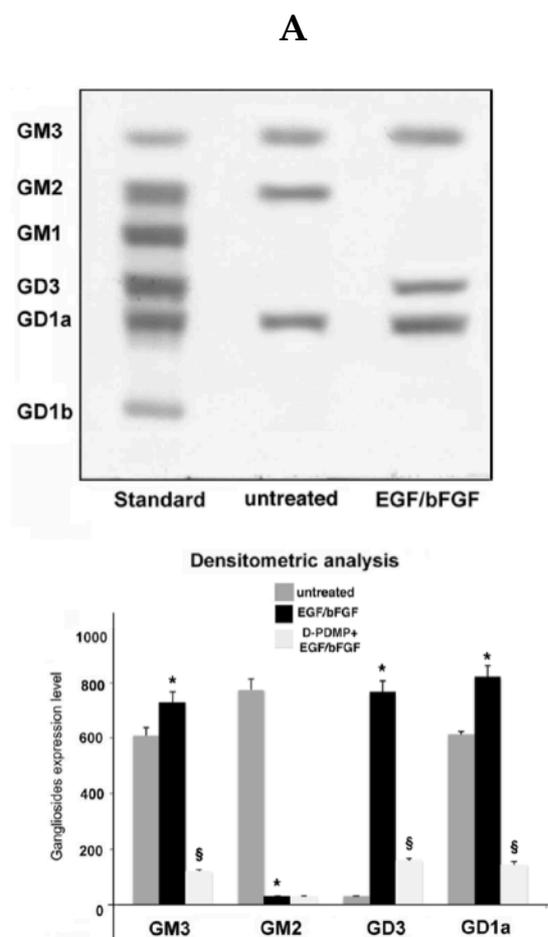


Figura 8. Estrazione dei gangliosidi da lisati di hDPSCs di controllo e neuroindotte mediante il metodo di Svennerholm e Fredman. I glicosfingolipidi eluiti sono stati separati mediante HPTLC e colorati con resorcinolo (A). Analisi in immunofluorescenza della distribuzione sulla membrana plasmatica di GM2 (B) e GD3 (C).

4.4 Analisi dei rafts lipidici nelle hDPSCs

Per confermare la presenza di gangliosidi all'interno dei rafts lipidici è stato eseguito un TLC immunostaining per l'analisi di GM2 nelle frazioni di lisati di hDPSCs, ottenute da un gradiente discontinuo di saccarosio al 5-30%.

L'analisi ha rivelato che il ganglioside è arricchito nelle frazioni 4, 5 e 6, corrispondenti ai rafts lipidici (Fig. 9A).

Inoltre, sempre in frazioni ottenute con lo stesso metodo, è stata condotta l'analisi in Immunoblot della distribuzione di EGF-R, la quale mostra che tale recettore è presente principalmente nelle frazioni 4, 5 e 6 (Fig. 9B).

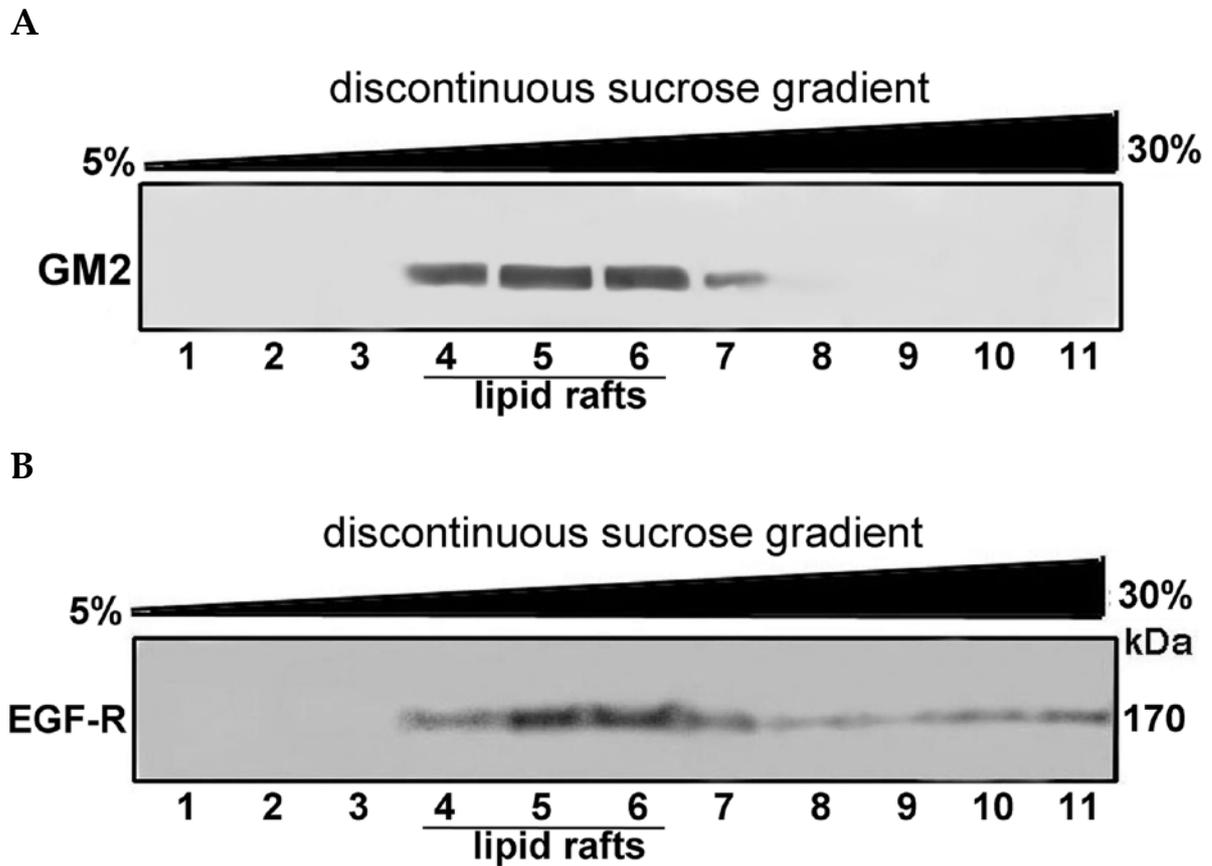


Figura 9. Presenza di gangliosidi all'interno dei rafts lipidici. TLC immunostaining per l'analisi della distribuzione di GM2 in ciascuna delle frazioni ottenute da un gradiente discontinuo di saccarosio al 5-30% ed in presenza di Triton X-100 (A). Immunoblot per l'analisi della distribuzione di EGF-R in frazioni ottenute da gradiente discontinuo di saccarosio al 5-30% ed in presenza di Triton X-100 (B).

4.5 Ruolo funzionale dei rafts lipidici durante la neuroinduzione delle hDPSCs

Poiché i gangliosidi sono coinvolti nel processo di differenziazione neuronale delle hDPSCs (Ryu et al., 2009), è stato analizzato il ruolo funzionale dei gangliosidi nella neuroinduzione con EGF/bFGF, andando ad alterare la biosintesi degli stessi. A questo scopo, le hDPSCs sono state pretrattate con [D]-PDMP, un inibitore competitivo della glucosilceramide sintetasi. L'analisi in Immunoblot ha chiaramente dimostrato come tale pre-trattamento inibisca significativamente la differenziazione neuronale indotta da EGF/bFGF, come rivelato dall'aumento del livello di espressione di CD105, considerato come antigene MSCs-specifico. Per contro, GAP43, β 3-tubulina e NFH, considerati come antigeni specifici neuronali, risultano del tutto assenti in cellule pretrattate con [D]-PDMP rispetto a cellule trattate solo con EGF/bFGF (Fig. 10A). Queste evidenze suggeriscono che i gangliosidi svolgono un ruolo chiave nella differenziazione di hDPSCs.

Inoltre, dal momento che il colesterolo è un componente strutturale dei rafts lipidici, le cellule sono state preincubate con metil- β -ciclodestrina, composto noto per indurre un efflusso di colesterolo dalla membrana e, di conseguenza, lo scompaginamento dei microdomini. Successivamente, quindi, le cellule sono state stimulate con EGF/bFGF. È interessante notare come la M β CD impedisca significativamente la differenziazione neuronale indotta con EGF/bFGF, come confermato sia dalla aumentata espressione di CD105 sia dalla perdita di espressione di β 3-tubulina, NFH e GAP43 (Fig. 10B).

Quest'ultimo dato indica chiaramente che l'integrità dei rafts lipidici è essenziale per la differenziazione delle hDPSCs indotta da EGF/bFGF.

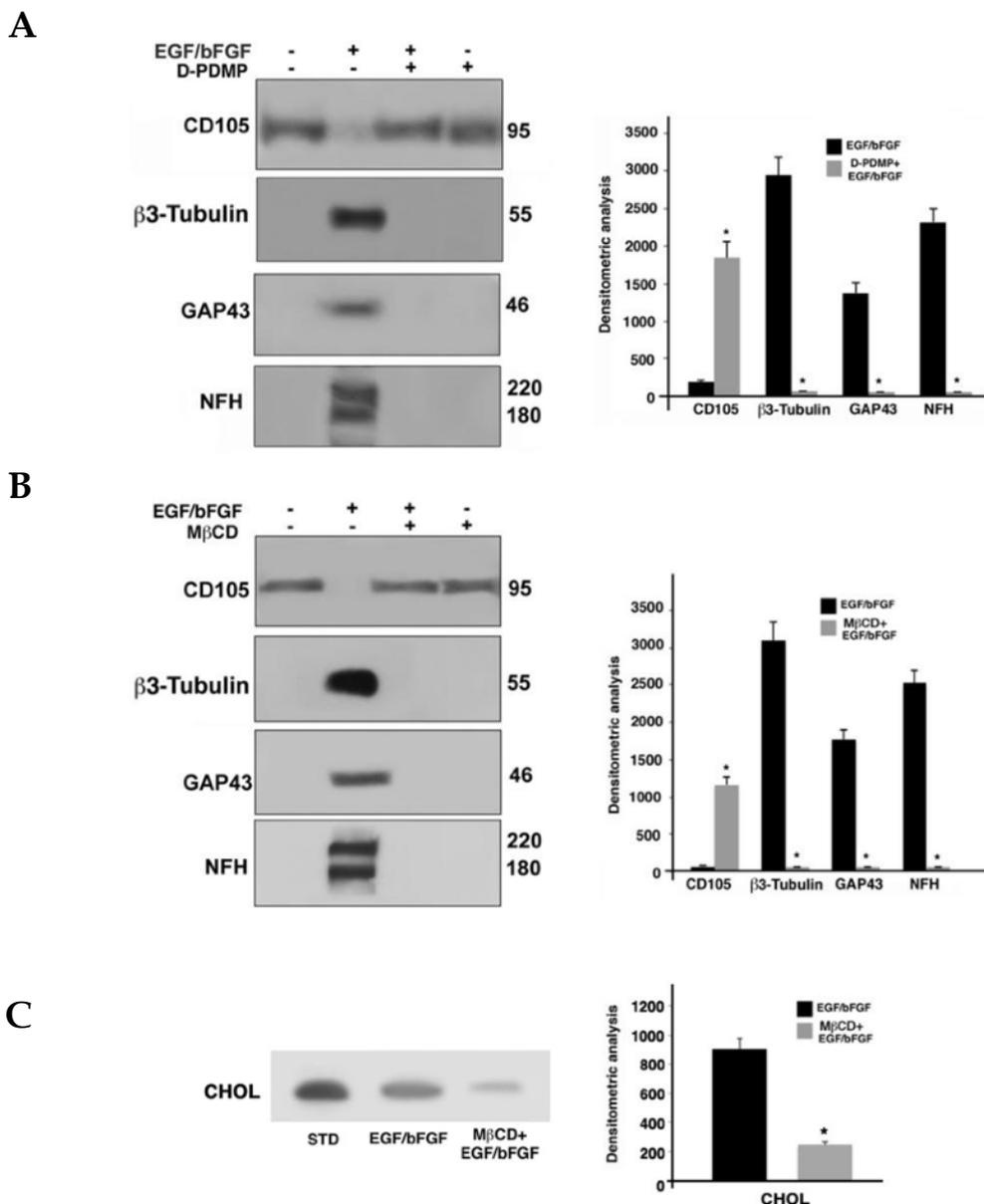


Figura 10. Ruolo funzionale dei rafts lipidici durante la neuroinduzione delle hDPSCs. Immunoblots su hDPSCs, trattate e non con EGF/bFGF, in presenza o assenza di [D]-PDMP (A). Immunoblots su hDPSCs trattate e non con EGF/bFGF in presenza e assenza di M β CD (B). TLC immunostaining per l'analisi del colesterolo condotto su lisati hDPSCs, di controllo e trattate con EGF/bFGF, in presenza o assenza di pretrattamento con M β CD (C).

4.6 Ruolo dei rafts lipidici nella fosforilazione di Erk 1/2 ed AKT indotta da EGF

Dal momento che il trattamento con EGF aumenta la fosforilazione di Akt ser473 e di Erk 1/2 thr308 (Lim et al., 2008), è stato studiato il ruolo dei rafts lipidici nella fosforilazione di Akt ed Erk 1/2 in hDPSCs stimolate con EGF/bFGF.

Le cellule sono state pre-incubate con [D]-PDMP e, quindi, stimolate con EGF/bFGF per 5 minuti a 37 °C. Come dimostra l'analisi in Immunoblot, utilizzando uno specifico anticorpo anti-fosfo Akt (pAkt) è stato possibile osservare che il trattamento con EGF/ β FGF aumenta significativamente i livelli di fosforilazione di Akt, mentre tale fosforilazione diminuisce nettamente in campioni pretrattati con [D]-PDMP (Fig. 11A).

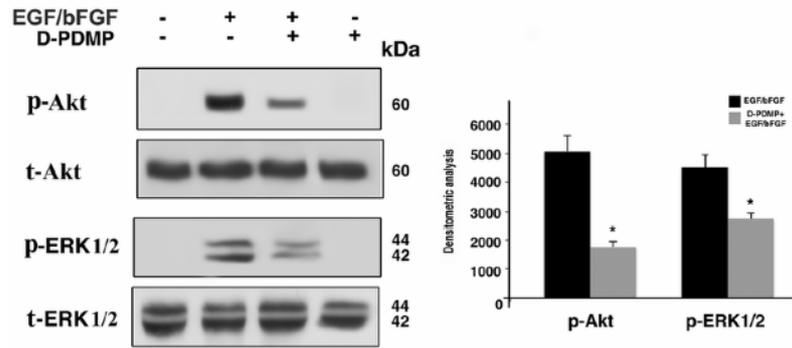
Analogamente, utilizzando l'anticorpo anti-fosfo Erk 1/2 (p-Erk 1/2) è stato possibile osservare che il trattamento con EGF/bFGF aumenta significativamente i livelli di fosforilazione di Erk 1/2 e che, anche in questo caso, il pretrattamento con [D]-PDMP ne diminuisce nettamente la fosforilazione (Fig. 11A).

Risultati del tutto simili sono stati trovati dopo pretrattamento delle hDPSCs con M β CD (Fig. 11B).

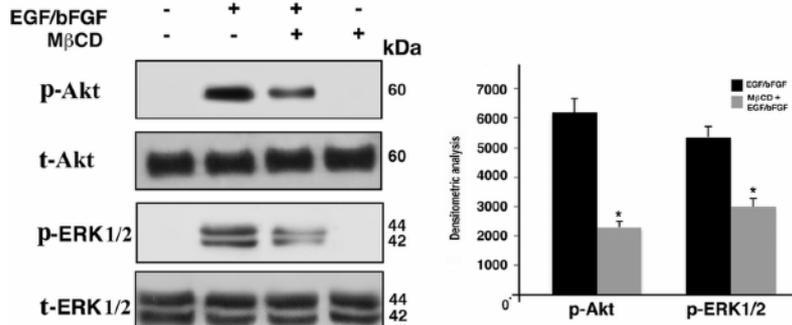
Ad ulteriore conferma dei dati, è stata eseguita l'analisi delle hDPSCs in citofluorimetria, che ha ribadito i risultati ottenuti in precedenza (Fig. 11C).

Questi risultati, quindi, suggeriscono che i rafts lipidici hanno un ruolo importante nella via di trasduzione del segnale innescato da EGF/bFGF.

A



B



C

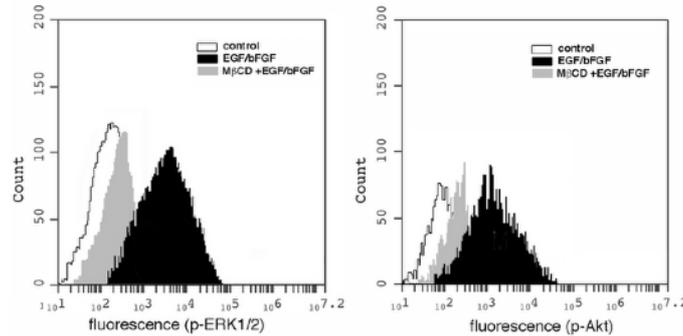


Figura 11. Ruolo dei rafts lipidici nella fosforilazione di ERK e AKT indotta da EGF nelle hDPSCs. Immunoblot su hDPSCs pre-incubate con [D]-PDMP e stimulate con EGF per 5 minuti a 37 °C per l'analisi di pAKT e pERK (A). Immunoblot su hDPSCs pre-incubate con MβCD e stimulate con EGF per 5 minuti a 37 °C per l'analisi di pAKT e pERK (B). Citofluorimetria su hDPSCs, trattate e non, con EGF per cinque minuti in presenza e assenza di MβCD, per l'analisi di pAKT e pERK (C).

4.7 Espressione della PrP^C nelle hDPSCs di controllo e neuroindotte

Al fine di verificare l'espressione della PrP^C nelle hDPSCs, di controllo e neuroindotte, è stata eseguita una citofluorimetria su cellule prelevate a 21 e 28 gg dalla separazione della polpa e dopo stimolo neuroinduttivo per ulteriori 7 e 14 gg (Fig. 12A).

Già nelle staminali a 21 giorni è possibile rilevare la presenza della PrP^C che diviene più marcata a 28 giorni, per raggiungere significative percentuali di positività a seguito di neuroinduzione (Fig. 12A).

Inoltre, su staminali prelevate a 28 gg dalla separazione della polpa, è stata effettuata una doppia marcatura anti-PrP/anti-CD44, marcatore mesenchimale mentre, su staminali a seguito di neuroinduzione, la doppia marcatura è stata effettuata con anti-PrP/anti- β 3-tubulina (Fig. 12B).

Ad ulteriore conferma dei dati ottenuti in citofluorimetria, sono state eseguite, sia su cellule di controllo sia su cellule neuroindotte, l'analisi in Immunoblot (Fig. 12C) e l'analisi in immunofluorescenza (Fig. 12D), andando a testare l'anticorpo anti-Prp.

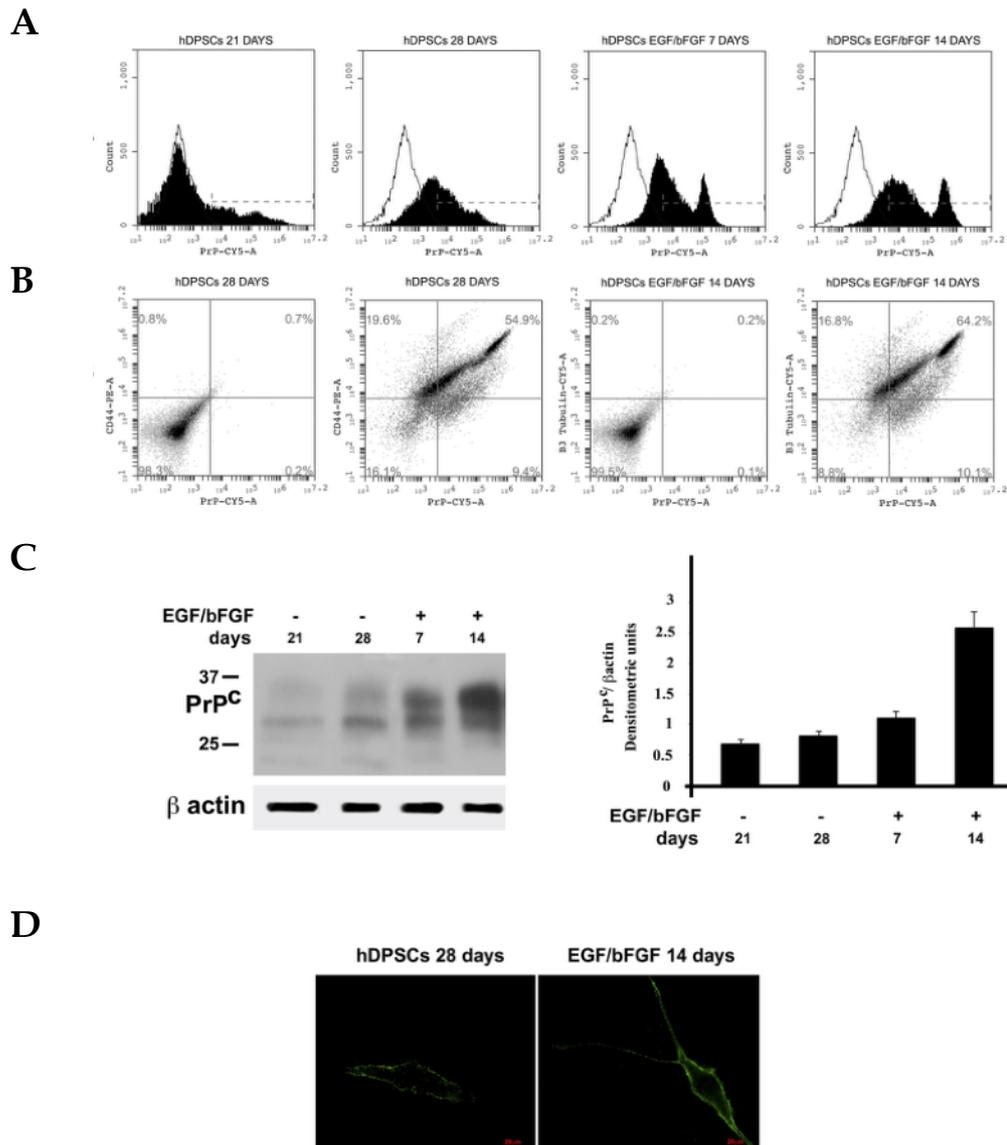


Figura 12. *Espressione della PrP^C nelle hDPSCs di controllo e neuroindotte. Citofluorimetria su hDPSCs a 21 e 28 gg dalla separazione della polpa e dopo stimolo neuroinduttivo per ulteriori 7 e 14 gg (A). Doppia marcatura PrP/CD44 in controlli di hDPSCs a 28 gg dalla separazione della polpa e PrP/β3-tubulin dopo neuroinduzione di 14 gg (B). Analisi in Immunoblot per valutare l'espressione della PrP^C a 21 e 28 gg dalla separazione della polpa ed au ulteriori 7 e 14 gg dopo neuroinduzione (C). Analisi in immunofluorescenza di hDPSCs di controllo e neuroindotte (D).*

4.8 Associazione di gangliosidi ed EGF-R con la PrP^C nelle hDPSCs di controllo e neuroindotte

Dal momento che diversi studi documentano come alcuni gangliosidi, così come l'EGF-R, partecipano alla trasduzione di complessi segnali multimolecolari all'interno dei microdomini, è stata condotta l'analisi dell'associazione tra PrP^C con i gangliosidi espressi dalle hDPSCs mediante coimmunoprecipitazione di lisati cellulari ottenuti da cellule di controllo e neuroindotte per 14 giorni.

Gli immunoprecipitati sono stati depositi su nitrocellulosa ed incubati rispettivamente con anti-GM2, anti-GD3 ed anti-EGF-R.

E' possibile notare come il GM2 associ con la PrP^C nei campioni di controllo ma non nei trattati (Fig. 13A).

Al contrario, il GD3 associa con la PrP^C nei trattati ma non nei campioni di controllo (Fig. 13B).

Infine, l'EGFR-R associa con la PrP^C nei campioni di controllo e, ancora più marcatamente, nei campioni neuroindotti (Fig. 13C).

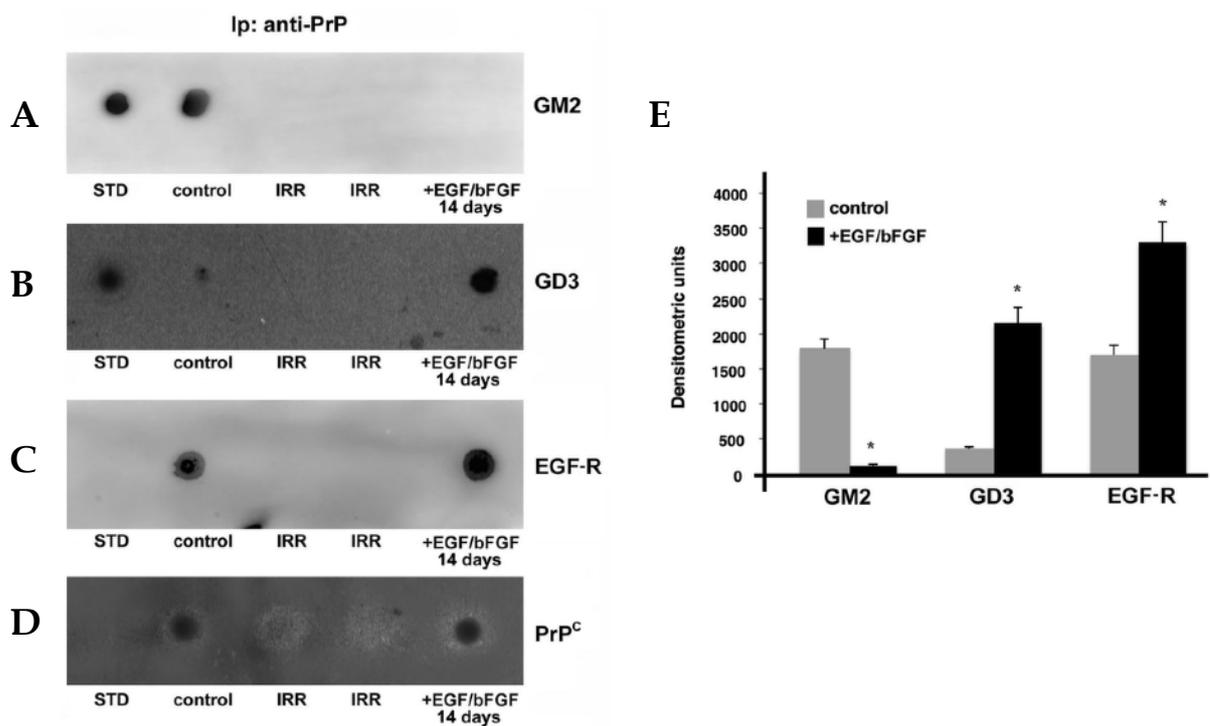


Figura 13. Coimmunoprecipitazione di lisati cellulari di hDPSCs, non trattate e neuroindotte per 14 giorni, seguita da immunoprecipitazione con anti-PrP. Gli immunoprecipitati sono stati depositi su nitrocellulosa ed incubati con anti-GM2 (A), anti-GD3 (B) e anti-EGF-R (C). Gli immunoprecipitati sono stati testati con anti-PrP (D). Analisi densitometrica (E).

4.9 Effetto del silenziamento della PrP^C sulla fosforilazione di Erk 1/2 ed Akt indotta da EGF

Poiché la PrP^C è in grado di regolare l'attivazione delle mitogen-activated protein kinase e del Protein kinase B, è stato studiato l'effetto del silenziamento del gene della PrP sulla fosforilazione di Erk 1/2 ed Akt indotta da EGF.

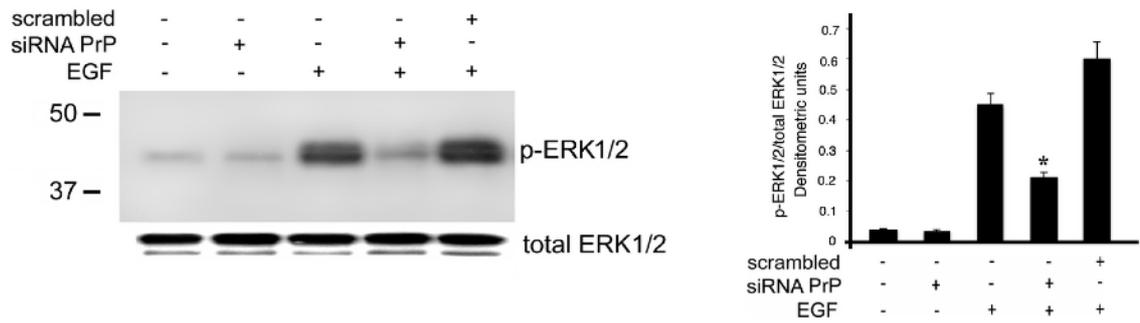
Le hDPSCs sono state stimulate con EGF per 5 minuti in presenza o assenza di silenziamento.

E' stata poi eseguita un'analisi in Immunoblot utilizzando anti-pErk 1/2 ed anti-pAkt.

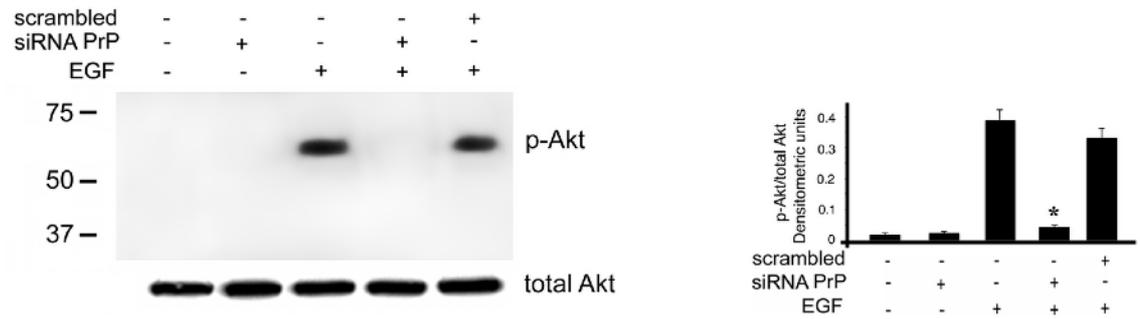
Nei campioni stimolati con EGF c'è una evidente banda di espressione corrispondente ai pesi molecolari di pErk ed pAkt, mentre nei campioni silenziati, tale espressione viene drasticamente ridotta (Fig. 14A,B).

Inoltre, è stata eseguita una citofluorimetria, per verificare l'espressione della PrP^C in hDPSCs di controllo e pretrattate con siRNA PRNP (Fig. 14C).

A



B



C

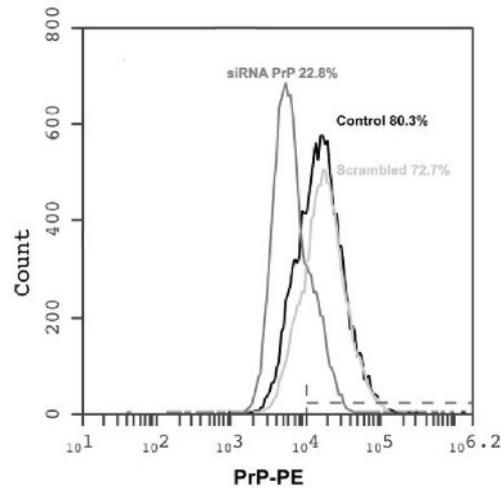


Figura 14. Effetto del silenziamento della PrP^C sulla fosforilazione di Erk ed Akt indotta da EGF. hDPSCs stimulate con EGF per 5 minuti in presenza o assenza di silenziamento del gene PRNP, sono state analizzate in Immunoblot utilizzando anti-pErk 1/2 (A) ed anti-pAKT (B). Espressione della PrP^C in hDPSCs di controllo e pretrattate con siRNA PRNP (C).

4.10 Ruolo del PrP^C nel processo di differenziamento neuronale delle hDPSCs

Al fine di valutare il ruolo della PrP^C nel processo differenziamento neuronale delle hDPSCs, è stata effettuata l'analisi in Immunoblot dell'espressione di β 3-tubulina ed NFH a seguito di neuroinduzione in presenza o assenza di silenziamento del gene PRNP (Fig. 15A).

Come dimostrato dai dati sperimentali, nei campioni neuroindotti si possono osservare evidenti bande di espressione corrispondenti ai pesi molecolari di β 3-tubulina ed NFH, mentre questa stessa espressione diminuisce drasticamente per entrambi i marcatori nei campioni in cui è stato effettuato il silenziamento.

Risultati del tutto coerenti sono stati ottenuti ripetendo l'esperimento in Immunofluorescenza (Fig. 15B).

E' stata eseguita, inoltre, una citofluorimetria per verificare l'espressione della PrP^C in hDPSCs di controllo e pretrattate con siRNA PRNP (Fig. 14C).

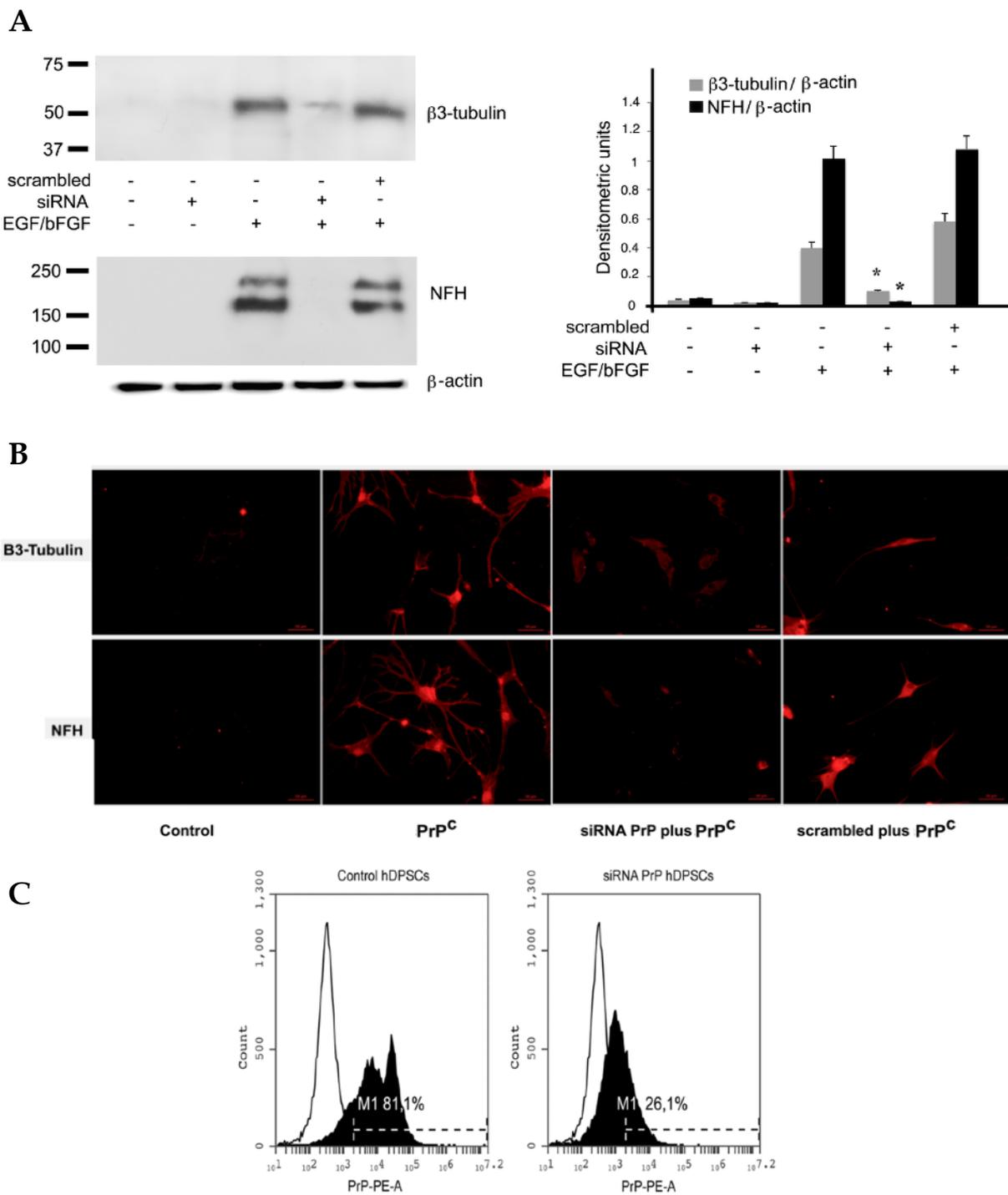


Figura 15. Ruolo della PrP^C nel processo di differenziamento neuronale delle hDPSCs. Analisi in Immunoblot (A) ed Immunofluorescenza (B) dell'espressione di $\beta 3$ -tubulina ed NFH a seguito di neuroinduzione di hDPSCs in presenza o assenza di silenziamento del gene PRNP. Espressione della PrP^C in hDPSCs di controllo e pretrattate con siRNA PRNP (C).

5. Discussione

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di condurre studi sul signaling molecolare che sottende al processo differenziativo neuronale delle cellule staminali. Infatti, ancora oggi, non sono stati completamente chiariti i meccanismi di attivazione delle vie che portano la cellula staminale a differenziare, così come poco conosciuto risulta essere il coinvolgimento in tale processo di particolari strutture di membrana chiamate rafts lipidici. Inoltre, alla luce di recenti studi (Shi et al., 2016; Martin-Lannerée et al., 2017), di notevole interesse è il ruolo svolto da un particolare componente dei rafts lipidici, la PrPC, la cui espressione viene modulata a seconda del grado di differenziamento della cellula staminale e che sembra essere coinvolta nel signaling molecolare del processo differenziativo neuronale (Steele et al., 2006).

Per i test di laboratorio sono state utilizzate le hDPSCs isolate dalla polpa dentaria umana estratta da terzi molari inclusi di soggetti tra i 13 ed i 19 anni. Infatti, tali cellule rappresentano un ottimo modello sperimentale per gli studi *in vitro* dei processi fisiologici (Delle Monache et al., 2019).

E' stata effettuata una caratterizzazione preliminare delle hDPSCs, che ha dimostrato come tali cellule soddisfino i requisiti indicati nelle linee guida della Società Internazionale per le Terapie Cellulari (ISCT). Le hDPSCs coltivate *in vitro*, infatti, presentano adesione alla plastica in condizioni di coltura standard ed esprimono antigeni di superficie caratteristici delle cellule staminali mesenchimali (Huang et al., 2006; Agha-Hosseini et al., 2010). Inoltre, le hDPSCs sono in grado di differenziare in cellule della linea neuronale dopo coltura in terreni addizionati con specifici supplementi e fattori di crescita (Arthur et al., 2008; Jang et al., 2010; Martellucci et

al., 2018). Dal momento che in letteratura è documentato il coinvolgimento dei gangliosidi nel differenziamento neuronale (Kwak et al., 2006, 2011; Ryu et al., 2009; Moussavou et al., 2013; Mattei et al., 2015), è stata effettuata anche la caratterizzazione lipidica delle hDPSCs di controllo e neuroindotte. I risultati ottenuti, che confermano ed estendono gli studi precedenti, mostrano come il GD1a ed il GM3 siano presenti sia prima sia dopo neuroinduzione. Al contrario, il GM2 è esclusivamente espresso dalle staminali di controllo mentre il GD3 è espresso nelle neuroindotte. Inoltre, dall'analisi in immunofluorescenza, la distribuzione del segnale delle molecole gangliosidiche sulla membrana plasmatica è risultata essere non uniforme, fatto questo che indica la presenza di microdomini di membrana arricchiti in GM2 nelle hDPSCs di controllo e GD3 nelle hDPSCs neuroindotte.

E' stata quindi indagata la distribuzione dei gangliosidi nei microdomini, in quanto componenti chiave costitutivi dei rafts lipidici, nonché porzioni specializzate di membrana plasmatica cellulare che servono a concentrare i recettori specifici di membrana e che forniscono anche un'ancora per le proteine di trasduzione del segnale. Dalle indagini è risultato che il GM2 è arricchito nelle frazioni 4, 5 e 6, corrispondenti ai rafts lipidici. E' stata condotta, inoltre, l'analisi in immunoblot della distribuzione di EGF-R, la quale ha mostrato che anche tale recettore è presente principalmente nelle frazioni 4, 5 e 6. In letteratura sono riportati risultati discordanti sulla presenza di EGF-R all'interno dei rafts lipidici (Zurita et al., 2004; Toledo et al., 2005; Sottocornola et al., 2006); tale presenza può infatti dipendere dal tipo di cellula, dall'uso di diversi detergenti (Pike et al., 2005) e dalla composizione in gangliosidi delle cellule stesse. Nelle staminali neuronali, Wang e colleghi hanno riscontrato che il ganglioside GD3 interagisce con EGF-R e che tale interazione è responsabile

dell'espressione del recettore e della sua segnalazione a valle al fine di mantenere la capacità di automantenimento delle cellule (Wang et al., 2013). E' stato inoltre riscontrato che il ganglioside GM3 può specificamente interagire con il dominio extracellulare ricombinante di EGF-R (Miljan et al., 2002) e che questo recettore tirosin chinasi contiene un dominio strutturale con informazioni bersaglio per i domini lipidici (Yamabhai et al., 2002).

Al fine di dimostrare che la deplezione del ganglioside inibisce il differenziamento neuronale delle hDPSCs indotto dal trattamento EGF/bFGF, sono state analizzate cellule non trattate o pretrattate con [D]-PDMP, inibitore competitivo della glucosilceramide sintetasi che blocca la sintesi dei gangliosidi arrestando la formazione dei rafts lipidici. Come evidenziato dai dati sperimentali, mentre l'antigene specifico per le MSCs CD105 è risultato ancora espresso dopo il trattamento con EGF/bFGF, gli antigeni neuronali β 3-tubulina, NFH e GAP43 risultano notevolmente ridotti. Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti su cellule non trattate o pretrattate con M β CD, un composto che è in grado di indurre un particolare efflusso di colesterolo dalla membrana inibendo in tal modo i rafts lipidici.

Inoltre, partendo dall'assunto che sia Erk 1/2 sia Akt siano coinvolti nella differenziazione neuronale delle cellule staminali embrionali (Campos et al., 2004; Colombo et al., 2006) e che il trattamento con EGF aumenti la fosforilazione di ERK e AKT (Zegui et al., 2006; Delcroix et al., 2010; Alomari et al., 2019), è stato indagato il ruolo dei rafts lipidici nella fosforilazione di queste proteinchinasi. Utilizzando specifici anticorpi, anti-fosfo ERK 1/2 (p-ERK1/2) e anti-fosfo Akt (p-Akt), è stato possibile osservare che il trattamento con EGF aumenta significativamente i livelli di

fosforilazione di Erk 1/2 ed Akt, mentre tale fosforilazione, in entrambe le proteinchinasi, diminuisce nettamente in campioni pretrattati con [D]-PDMP. Risultati del tutto simili sono stati trovati dopo pretrattamento delle hDPSCs con M β CD.

I dati, nel loro insieme, indicano che tutti i principali componenti costitutivi dei rafts lipidici siano essenziali per il ruolo che i rafts stessi svolgono nel differenziamento cellulare e suggeriscono, quindi, che queste porzioni specializzate di membrana possono rappresentare siti specifici, dove complessi pathway multimolecolari di segnalazione, tra cui lipidi (gangliosidi, colesterolo) e proteine (EGF-R), svolgono un ruolo chiave nella differenziazione neuronale di hDPSCs.

Come documentato in letteratura (Lewis et al., 2011; Sorice et al., 2012c), tra le diverse proteine localizzate all'interno dei rafts lipidici è annoverata la PrP^C, inserita nella superficie cellulare mediante un'ancora costituita da glicosilfosfatidilinositolo (GPI) (Ikezawa H., 2002; Botto et al., 2014). Recenti studi (Shi et al., 2016; Martin-Lannerée et al., 2017) riportano come l'espressione della PrP^C sia modulata a seconda del grado di differenziamento della cellula staminale e documentano come tale proteina sia coinvolta nel signaling molecolare del processo differenziativo neuronale di cellule progenitrici (Nesti et al., 2011; Park et al., 2012).

Dunque, sulla base dell'ipotesi che la PrP^C possa avere un ruolo anche nel processo differenziativo neuronale delle cellule staminali mesenchimali, è stata verificata l'espressione della proteina nelle hDPSCs sia di controllo sia neuroindotte. Già nelle staminali a 21 gg dalla separazione della polpa, è stato possibile rilevare la presenza della PrP^C, divenuta più marcata a 28 gg, per raggiungere significativi picchi di espressione dopo neuroinduzione. Inoltre, è stata effettuata una doppia marcatura

anti-PrP/anti-CD44, marcatore mesenchimale, su cellule di controllo, mentre, su staminali neuroindotte, la doppia marcatura è stata effettuata con anti-PrP/anti- β -tubulin. Ad ulteriore conferma dei dati ottenuti in citofluorimetria, sono stati eseguiti sia un Immunoblot sia una Immunofluorescenza su cellule di controllo e neuroindotte, utilizzando in entrambi i casi l'anticorpo anti-Prp. Questi dati sono in accordo con diversi autori, i quali hanno dimostrato che la PrP^C è espressa in un'ampia varietà di cellule staminali, comprese le embrionali e le ematopoietiche (Zhang et al., 2006; Lee et al., 2013), delle quali regola l'autorinnovamento, il potenziale differenziativo e il commissionamento (Peralt et al., 2011; Martin-Lannerée et al., 2014).

Poiché in letteratura è documentato che la PrP^C è associata ai gangliosidi all'interno dei rafts lipidici (Mattei et al., 2002), è stata verificata la sussistenza di tale associazione anche nelle hDPSCs.

E' stato osservato come il GM2 associ con la PrP^C nei campioni di controllo ma non nei neuroindotti mentre il GD3 associ con la PrP^C nei campioni neuroindotti ma non in quelli di controllo. E' stato inoltre verificato come l'EGFR-R, invece, associ con la PrP^C nei campioni di controllo e, ancora più marcatamente, nei campioni neuroindotti. D'altra parte, è stato dimostrato che il recettore EGF è il componente di un complesso di segnalazione, locato all'interno dei microdomini, coinvolto in diverse funzioni di cellule di neuroblastoma (N2a) (Llorens et al., 2013); questi dati, inoltre, indicano che la PrP^C fa parte dei complessi di membrana che regolano la segnalazione di EGF/EGF-R.

Sulla base di queste evidenze, dunque, è stato ipotizzato che, dopo l'induzione neuronale, l'EGF-R sia reclutato all'interno dei rafts lipidici dove, interagendo con la

Pr^{PC}, inneschi la trasduzione del segnale. Infatti, i rafts lipidici sono strutture in grado di concentrare recettori specifici, coinvolti nell'avvio della trasduzione del segnale, sulla membrana plasmatica. E' stato quindi indagato se, durante la differenziazione neuronale delle hDPSCs, la Pr^{PC} fosse in grado di regolare le vie di trasduzione del segnale indotte dall'EGF/EGF-R. Infatti, come riportato da altri autori (Mouillet-Richard et al., 2000; Toni et al., 2006; Llorens et al., 2013), la Pr^{PC} è in grado di regolare l'attivazione di MAP chinasi e Protein Kinase B mediante la modulazione di EGF-R nelle cellule N2a e SK-N-SH. In questo contesto è stato ipotizzato che, nelle hDPSCs, la Pr^{PC} possa essere in grado di regolare l'attivazione di ERK 1/2 e Akt. In effetti, come emerso dai dati sperimentali, il pretrattamento con siRNA PrP per 72 ore ha comportato una riduzione dell'attivazione di ERK 1/2 e Akt indotta da EGF. Dunque, nel modello cellulare preso in esame, è stato dimostrato che l'attivazione delle protein chinasi (ERK 1/2 e Akt) è stata mediata dalla Pr^{PC} e che l'associazione con l'EGF-R è aumentata dopo l'induzione neuronale.

Poiché alcuni autori hanno evidenziato il ruolo della Pr^{PC} durante il processo di differenziazione cellulare (Lee et al., 2014; Shi et al., 2016) e, in particolare, il contributo del Pr^{PC} all'acquisizione del fenotipo neuronale modulando l'attività dell'integrina β 1 (Loubet et al., 2012), è stato indagato il ruolo della Pr^{PC} nel processo di differenziazione neuronale delle hDPSCs. A tale scopo è stato silenziato il gene PRNP in modo da ridurre drasticamente l'espressione della Pr^{PC}; questo processo ha influenzato il differenziamento neuronale delle hDPSCs, come mostrato dalla netta riduzione dell'espressione dei marcatori neuronali testati su hDPSCs neuroindotte e pretrattate con siRNA PrP.

Nel loro insieme, i dati indicano che la Pr^{PC} sia espressa nelle hDPSCs non trattate e

che tale espressione aumenti nel corso della neuroinduzione, per raggiungere il picco nelle hDPSCs neuroindotte. Inoltre, è stato dimostrato come la PrP^C regoli il signal pathway indotto da EGF/EGF-R durante il differenziamento neuronale delle hDPSCs e che il silenziamento del gene PRNP porti ad una mancata espressione dei tipici marcatori neuronali.

Concludendo, dunque, è possibile affermare che:

- l'integrità dei rafts lipidici è essenziale nel processo differenziativo neuronale delle hDPSCs;
- la PrP^C interagisce, all'interno dei rafts lipidici, con l'EGF-R, giocando un ruolo chiave nel complesso di segnali multimolecolari coinvolti nel differenziamento neuronale delle hDPSCs.

Il coinvolgimento della PrP^C nel processo differenziativo neuronale delle cellule staminali (Martellucci et al., 2018,2019a,2019b) risulta di grande interesse, poiché apre alla possibilità di applicazioni pratiche nell'ambito delle neuropatologie degenerative (e.g. Alzheimer, Parkinson, Sclerosi multipla) in quanto possibile target molecolare per la rigenerazione del tessuto nervoso.

6. Bibliografia

Pubblicazioni scientifiche

Agha-Hosseini F., Jahani M.A., Jahani M., Mirzaii-Dizgah I., Moghaddam K., 2010. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clinical Transplantation* 24: E23-E28.

Alomari M., Almohazey D., Almofty S.A., Khan F.A., Al Hamad M., Ababneh D., 2019. Role of Lipid Rafts in Hematopoietic Stem Cells Homing, Mobilization, Hibernation, and Differentiation. *Cells* 8(6). pii: E630. doi: 10.3390/cells8060630.

Altman J., Das G., 1967. Postnatal Neurogenesis in the Guinea-pig. *Nature* 214, 1098-1101.

Alvarez-Buylla A., Seri B., Doetsch F., 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Research Bulletin* 57(6):751-8.

Alvarez C.V., Garcia-Lavandeira M., Garcia-Rendueles M.E., Diaz Rodriguez E., Garcia-Rendueles A.R., Perez-Romero S., Vila T.V., Rodrigues J.S., Lear P.V., Bravo S.B., 2012. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs and iPS cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 49(2):R89-111.

Arthur A., Rychkov G., Shi S., Koblar S.A., Gronthos S., 2008. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 26:1787-1795.

Atari M., Gil-Recio C., Fabregat M., García-Fernández D., Barajas M., Carrasco M.A., Jung H.S., Alfaro F.H., Casals N., Prosper F., Ferrés-Padró E., Giner L., 2012. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *Journal of Cell Science* 125:3343-3356.

Baume L.J., 1980. The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. *Monographs in Oral Science* 8:1-220.

Bennion B.J., Daggett V., 2002. Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein. *Clinical chemistry* 48(12):2105-14.

Bianco P., Robey P.G., 2001. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414(6859):118-21.

Bieberich E., 2012. It's a Lipid's World: Bioactive Lipid Metabolism and Signaling in Neural Stem Cell Differentiation. *Neurochemical Research* 37:1208-1229.

Bini L., Pacini S., Liberatori S., Valensin S., Pellegrini M., Raggiaschi M., Pallini V., Baldari C.T., 2003. Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. *The Biochemical Journal* 369(Pt 2):301-309.

Bluteau G., Luder H.U., De Bari C., Mitsiadis T.A., 2008. Stem cells for tooth engineering. *European Cells & Materials Journal* 16 :1-9.

Botto L., Cunati D., Coco S., Sesana S., Bulbarelli A., Biasini E., Colombo L., Negro A4., Chiesa R., Masserini M., Palestini P., 2014. Role of lipid rafts and GM1 in the segregation and processing of prion protein. *PLoS One* 9:e98344.

Brazier M.W., Davies P., Player E., Marken F., Viles J.H., 2008. Brown D.R. Manganese binding to the prion protein. *Journal of Biological Chemistry* 283:12831-9.

Brown D. R., Qin K., Herms J. W., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser P.E., Kruck T., Von Bohlen A., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Westway D., Kretzschmar H. A., 1997. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687.

Brown D.A., 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14:111-136.

Brown D.R., Besinger A., 1998. Prion expression and superoxide dismutase activity. *Biochemical Journal* 334: 423-429.

Bueler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R. A., Autenried P., Auet M., Weissman C., 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339-1347.

Buurma B., Gu K., Rutherford R.B., 1999. Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds. *European Journal of Oral Sciences* 107(4):282-9.

Campos L.S., Leone D.P., Relvas J.B., Brakebusch C., Fässler R., Suter U., ffrench-Constant C., 2004. Beta1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development* 131(14):3433-44.

Caplan A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 9(5):641-50.

Chun S.Y., Soker S., Jang Y.J., Kwon T.G., Yoo E.S., 2016. Differentiation of human dental pulp stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro. *Journal of Korean Medical Science* 31:171-177.

Ciarlo L., Manganelli V., Garofalo T., Matarrese P., Tinari A., Misasi R., 2010. Association of fission proteins with mitochondrial raft-like domains. *Cell Death & Differentiation* 17: 1047-1058.

Colombo E., Giannelli S.G., Galli R., Tagliafico E., Foroni C., Tenedini E., Ferrari S., Ferrari S., Corte G., Vescovi A., Cossu G., Broccoli V., 2006. Embryonic stem-derived versus somatic neural stem cells: a comparative analysis of their developmental potential and molecular phenotype. *Stem Cells* 24(4):825-34. Epub 2005 Dec 9.

Couple M.L., Farges J.C., Bleicher F., Perrat-Mabillon B., Boudeulle M., Magloire H., 2000. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcified Tissue International* 66(2):129-38.

D'Aquino R., De Rosa A., Laino G., Caruso F., Guida L., Rullo R., Checchi V., Laino L., Tirino V., Papaccio G., 2009. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 312B(5):408-15.

De Coppi P., Bartsch G. Jr., Siddiqui M.M., Xu T., Santos C.C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A.C., Snyder E.Y., Yoo J.J., Furth M.E., Soker S., Atala A., 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology* 25(1):100-106.

Delcroix G.J., Curtis K.M., Schiller P.C., Montero-Menei C.N., 2010. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells. *Differentiation* 80: 213-227.

Delle Monache S., Martellucci S., Clementi L., Pulcini F., Santilli F., Mei C., Piccoli L., Angelucci A., Mattei V., 2019. In vitro conditioning determines the capacity of Dental Pulp Stem Cells to function as pericyte-like cells. *Stem Cells and Development* doi: 10.1089/scd.2018.0192. [Epub ahead of print].

Ditadi A., De Coppi P., Picone O., Gautreau L., Smati R., Six E., Bonhomme D., Ezine S., Frydman R., Cavazzana-Calvo M., André-Schmutz I., 2009. Human and murine amniotic fluid c-Kit⁺Lin⁻ cells display hematopoietic activity. *Blood* 113(17):3953-60.

Doherty M.J., Ashton B.A., Walsh S., Beresford J.N., Grant M.E., Canfield A.E., 1998. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* 13(5):828-38.

Dolo V., D'Ascenzo S., Sorice M., Pavan A., Sciannamblo M., Prinetti A., Chigorno V., Tettamanti G., Sonnino S., 2000. New approaches to the study of sphingolipid enriched membrane domains: the use of electron microscopic autoradiography to reveal metabolically tritium labeled sphingolipids in cell cultures. *Glycoconjugate Journal* 17(3-4):261-8.

Evans M.J., Kaufman M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154-6.

Ferrari G., Rossin S., Nobili N., Maggioni D., Garofalo A., Giavazzi R., Mavilio F., Bordignon C., 1992. Transfer of the ADA gene into human ADA-deficient T lymphocytes reconstitutes specific immune functions. *Blood* 80(5):1120-4.

Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S., 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics* 3(4):393-403.

Fuchs E., Tumber T., Guasch G., 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116(6):769-78.

Gabison R., Meiner Z., Halimi M., Bem-Sasson S.A., 1993. Heparine-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *Journal of Cellular Physiology* 157: 319-325.

Galli R., Gritti A., Bonfanti L., Vescovi A.L., 2003. Neural stem cells: an overview. *Circulation Research* 92(6):598-608.

Garner A.E., 2008. Visualization of detergent solubilization of membranes implications for the isolation of rafts. *Biophysical Journal* 94:1326-1340.

Garofalo T., Lenti L., Longo A., Misasi R., Mattei V., Pontieri G.M., 2002. Association of GM3 with Zap-70 induced by T cell activation in plasma membrane microdomains: GM3 as a marker of microdomains in human lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277: 11233-11238.

Garofalo T., Manganelli V., Grasso M., Mattei V., Ferri A., Misasi R., Sorice M., 2015. Role of mitochondrial raft-like microdomains in the regulation of cell apoptosis. *Apoptosis* 20:621-634.

Garofalo T., Matarrese P., Manganelli V., Marconi M, Tinari A, Gambardella L, Faggioni A, Misasi R, Sorice M, Malorni W., 2016. Evidence for the involvement of

lipid rafts localized at the ER-mitochondria associated membranes in autophagosome formation. *Autophagy* 12:917-935.

Gronthos S., Graves S.E., Ohta S., Simmons P.J., 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84(12):4164-73.

Gronthos S., Simmons P.J., 1996. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *Journal of Hematotherapy* 5(1):15-23.

Gronthos S., Mankani M., Brahim J., Robey P.G., Shi S., 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25):13625-30.

Gronthos S., Brahim J., Li W., Fisher L.W., Cherman N., Boyde A., DenBesten P., Robey P.G., Shi S., 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research* 81:531-535.

Gronthos S., Zannettino A.C., Hay S.J., Shi S., Graves S.E., Kortessidis A., Simmons P.J., 2003. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science* 116(Pt 9):1827-35.

Gurdon J.B., Elsdale T.R., Fischberg M., 1958. Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei. *Nature* 182(4627):64-65.

Hachiya N.S., Yamada M., Watanabe K., Jozuka A., Ohkubo T., Sano, K., Takeuchi Y., Kozuka Y., Sakasegawa Y., Kaneko K., 2005a. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neuroscience Letter* 374: 98-103.

Hachiya N.S., Watanabe K., Kawabata M.Y., Jozuka A., Kozuka Y., Sakasegawa Y., Kaneko K., 2005b. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposit in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327: 894-899.

Hakomori S., 2004. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 76(3):553-72.

Harris DA., 2003. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *British Medical Bulletin* 66:71-85.

Hu W., Kieseier B., Frohman E., Eagar T.N., Rosenberg R.N., Hartung H.P., Stüve O., 2008. Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 264:1-8.

Huang G.T., Sonoyama W., Chen J., Park S.H., 2006. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell and Tissue Research* 324(2):225-36.

Huang G.T., 2009. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regenerative Medicine* 4(5):697-707.

Igura K., Zhang X., Takahashi K., Mitsuru A., Yamaguchi S., Takashi T.A., 2004. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 6(6):543-553.

Ikezawa H., 2002. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored proteins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25: 409-417.

Ishii A., Ikeda T., Hitoshi S., Fujimoto I., Totii T., Sakuma K., Nakakita S., Hase S., Ikenaka K., 2007. Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex. *Glycobiology* 17:261-276.

Jang S., Cho H.H., Cho Y.B., Park J.S., Jeong H.S., 2010. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biology* doi: 10.1186/1471-2121-11-25.

Jeffrey M., Halliday W.G., Bell J., Johnston A.R., MacLeod N.K., Ingham C., Sayers A.R., Brown D.A., Fraser J.R., 2008. Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 26:41-54.

Jensen U.B., Lowell S., Watt F.M., 1999. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 126(11): 2409-18.

Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M., 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893):41-9.

Kawanabe N., Murata S., Fukushima H., Ishihara Y., Yanagita T., Yanagita E., Ono M., Kurosaka H., Itoh T., Kuboki T., Yamashiro T., 2012. Stage-specific embryonic

antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. *Experimental Cell Research* YEXCR-08918.

Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K., 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294-1301.

Klamt F., Dal-Pizzol F., Conte da Frota M.L., Walz R., Andrades M.E., Da Silva E.G., Brentani R.R., Izquierdo I., Fonseca Moreira J.C., 2001. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radical Biology and Medicine* 30: 1137-1144.

Kleinsmith L.J., Pierce G.B. Jr., 1964. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Research* 24:1544-51.

Koyama N., Okubo Y., Nakao K., Bessho K., 2009. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 67:501-506.

Kramer M.L., Kratzing H.D., Schmidt B., Romer A., Windl O., Liemann S., Hornemann S., Ketzschmar H., 2001. Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *Journal of Biological Chemistry* 276: 16711-16719.

Ksiazek K.A., 2009. Comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Research* 12:105-116.

Kubosaki A., Nishimura-Nasu Y., Nishimura T., Yusa S., Sakudo A., Saeki K., Matsumoto Y., Itohara S., Onodera T., 2003. Expression of normal cellular prion protein (PrPC) on T lymphocytes and the effect of copper ion: analysis by wild type and prion protein gene-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307: 810-813.

Kumar R., Murali P., 2008. Modeling and analysis of prion dynamics in presence of a chaperone. *Mathematical Biosciences* 213: 50-55.

Kuo M.Y., Lan W.H., Lin S.K., Tsai K.S., Hahn L.J., 1992. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Archives of Oral Biology* 37(11):945-52.

Kwak D.H., Yu K., Kim S.M., Lee D.H., Kim S.M., Jung J.U., 2006. Dynamic changes of gangliosides expression during the differentiation of embryonic and mesenchymal stem cells into neural cells. *Experimental & Molecular Medicine* 38: 668-676.

Kwak D.H., Seo B.B., Chang K.T., Choo Y.K., 2011. Roles of gangliosides in mouse embryogenesis and embryonic stem cell differentiation. *Experimental & Molecular Medicine* 43: 379-388.

Lafont F., 2005. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cellular Microbiology* 7(5):613-620.

Laino G., D'Aquino R., Graziano A., Lanza V., Carinci F., Naro F., Pirozzi G., Papaccio G., 2005. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of Bone and Mineral Research* 20(8):1394-402.

Lasmezas C.I., 2003. Putative functions of PrP(C). *British Medical Bulletin* 66: 61-70.

Lee Y.J., Baskakov I.V., 2013. The cellular form of the prion protein is involved in controlling cell cycle dynamics, self-renewal, and the fate of human embryonic stem cell differentiation. *Journal of Neurochemistry* 124:310-322.

Lee Y.J., Baskakov I.V., 2014. The cellular form of the prion protein guides the differentiation of human embryonic stem cell into neuron-, oligodendrocyte- and astrocyte-committed lineages. *Prion* 8:266-275.

Lewis V., Hooper N.M., 2011. The role of lipid rafts in prion protein biology. *Frontiers Bioscience* 16, 151-168.

Lim J.Y., Park S.I., Oh J.H., Kim S.M., Jeong C.H., Jun J.A., 2008. Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/AKT-dependent signaling pathways. *Journal of Neuroscience Research* 86: 2168-2178.

Llorens F., Carulla P., Villa A., 2013. PrP(c) regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. *Journal of Neurochemistry* 127:124-138.

Loubet D., Dakowski C., Pietri M., Pradines E., Bernard S., Callebert J., Ardila-Osorio H., Mouillet-Richard S., Launay J.M., Kellermann O., Schneider B., 2012. Neuritogenesis: the prion protein controls β 1 integrin signaling activity. *FASEB Journal* 26:678-690.

Lukasewycz O.A., Prohaska J.R., 1990. The immune response in copper deficiency. *The Annals of the New York Academy of Sciences* 587: 147-159.

Merrell A.J., Stanger B.Z., 2016. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nature reviews. Molecular cell biology* 17(7):413-25. doi: 10.1038/nrm.2016.24. Epub 2016 Mar 16.

Makkar R.R., Smith R.R., Cheng K., Malliaras K., Thomson L.E., Bermn D., Czer L.S., Marbàn L., Johnston P.V., Russell S.D., Schuleri K.H., Lardo A.C., Gerstenblith G., Marbàn E., 2012. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 379(9819):895-904.

Malucci G.R., Ratte S., Asante E.A., Linehan J., Gowland I., Jefferys J.G., Collinge J., 2002. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO Journal* 21: 202-210.

Martellucci S., Manganelli V., Santacroce C., Santilli F., Piccoli L., Sorice M., Mattei V., 2018. Role of Prion protein-EGFR multimolecular complex during neuronal differentiation of human dental pulp-derived stem cells. *Prion* 12(2):117-126. doi: 10.1080/19336896.2018.1463797. Epub 2018 May 4.

Martellucci S., Santacroce C., Santilli F., Piccoli L., Delle Monache S., Angelucci A., Misasi R., Sorice M., Mattei V., 2019a. Cellular and molecular mechanisms mediated by recPrPC involved in the neuronal differentiation process of mesenchymal stem

cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20(2), 345; <https://doi.org/10.3390/ijms20020345>.

Martellucci S., Santacroce C., Manganelli V., Santilli F., Piccoli L., Cassetta M., Misasi R., Sorice M., Mattei V., 2019b. Isolation, Propagation and Prion Protein Expression During Neuronal Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments* (145). doi: 10.3791/59282.

Martin-Lannerée S., Hirsch T.Z., Hernandez-Rapp J., Halliez S., Vilotte J.L., Launay J.M., Mouillet-Richard S., 2014. PrP(C) from stem cells to cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2:55.

Martin-Lannerée S., Halliez S., Hirsch T.Z., Hernandez-Rapp J., Passet B., Tomkiewicz C., Villa-Diaz A., Torres J.M., Launay J., Béringue V., Vilotte J.L., Mouillet-Richard S., 2017. The Cellular Prion Protein Controls Notch Signaling in Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells* 35(3):754-765. doi: 10.1002/stem.2501. Epub 2016 Oct 3.

Martins V. R., Mercadante A. F., Cabral A. I. B., Freitas A. R. O., Castro R.M.R, 2001. Insights into physiological function of cellular prion protein. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 585-595.

Mattei V., Garofalo T., Misasi R., Gizzi C., Mascellino M.T., Dolo V., Pontieri G.M., Sorice M., Pavan A., 2002. Association of cellular prion protein with gangliosides in plasma membrane microdomains of neural and lymphocytic cells. *Neurochemical Research* 27:743-749.

Mattei V., Garofalo T., Misasi R., Circella A., Manganelli V., Lucania G., 2004. Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Letters* 560: 14-18.

Mattei V., Matarrese P., Garofalo T., Tinari A., Gambardella L., Ciarlo L., Manganelli V., Tasciotti V., Misasi R., Malorni W., Sorice M., 2011. Recruitment of cellular prion protein to mitochondrial raft-like microdomains contributes to apoptosis execution. *Molecular Biology of the Cell* 22:4842-4853.

Mattei V., Santacroce C., Tasciotti V., Martellucci S., Santilli F., Manganelli V., Piccoli L., Misasi R., Sorice M., Garofalo T., 2015. Role of lipid rafts in neuronal differentiation of dental pulp-derived stem cells. *Experimental Cell Research* 339(2):231-40. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.11.012. Epub 2015 Nov 14.

Mattei V., Martellucci S., Santilli F., Manganelli V., Garofalo T., Candelise N., Caruso A., Sorice M., Scaccianoce S., Misasi R., 2017. Morphine Withdrawal Modifies Prion Protein Expression in Rat Hippocampus. *PLoS One* 12(1):e0169571. doi: 10.1371/journal.pone.0169571. eCollection 2017.

Maximow A., 1909. The Lymphocyte as a stem cell common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals. Originally in German: *Folia Haematologica* 8.1909, 125-134. English translation: *Cell therapy and transplantation* 1:3. e000032.01.

McCulloch E.A., 1997. Toward a leukemia treatment strategy based on the probability of stem cell death: an essay in honor of Dr. Emil J Freireich. *Clinical Cancer Research* 3(12Pt2): 2676-81.

Mediano D.R., Sanz-Rubio D., Ranera R., Bolea R., Martìn-Burriel I., 2014. The potential of mesenchymal stem cell in prion research. *Zoonoses and public Health* 62:165-178.

Mertelsmann R., 2000. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* (6):957-60.

Miljan E.A., Meuillet E.J., Mania-Farnell B., George D., Yamamoto H., Simon H.G., 2002. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *Journal of Biological Chemistry* 277: 10108-10113.

Miranda A., Pericuesta E., Ramírez M.Á., Gutierrez-Adan A., 2011. Prion protein expression regulates embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *PLoS One* 6:e18422. doi:10.1371/journal.pone.0018422.

Miranda A., Ramos-Ibeas P., Pericuesta E., Ramirez M.A., Gutierrez-Adan A., 2013. The role of prion protein in stem cell regulation. *Reproduction* 146(3):R91-9. doi: 10.1530/REP-13-0100. Print 2013 Sep.

Mitalipov S., Wolf D., 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 114:185-99.

Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Robey P.G., Shi S., 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(10):5807-12.

Mo H., Moore R. C., Cohen F. E., Westaway D., Prusiner S. B., Wright P. E., Dyson H. J., 2001. Two different neurodegenerative diseases caused by two proteins with

similar structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 2352-2357.

Mohanty S.T., Cairney C.J., Chantry A.D., Madan S., Fernandes J.A., Howe S.J., Moore H.D., Thompson M.J., Chen B., Thrasher A., 2012. A small molecule modulator of prion protein increases human mesenchymal stem cell lifespan, ex vivo expansion, and engraftment to bone marrow in NOD/SCID mice. *Stem Cells* 30:1134-1143. doi:10.1002/stem.1065.

Moore K.A., Lemischka I.R., 2006. Stem cells and their niches. *Science* 311(5769):1880-5.

Morrison S.J., Kimble J., 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441(7097):1068-74.

Morsczeck C., Gotz W., Schierholz J., Zeilhofer F., Kuhn U., Mohl C., Sippel C., Hoffmann K., 2005. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology* 24(2):155-65.

Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J. L., Lehmann S., Launay J. M., Kellermann O., 2000. Signal transduction through prion protein. *Science* 289:1925-1928.

Moussavou G., Kwak D.H., Lim M.U., Kim J.S., Kim S.U., Chang K.T., 2013. Role of gangliosides in the differentiation of human mesenchymal-derived stem cells into osteoblasts and neuronal cells. *BMB Reports* 46: 527-532.

Muller-Sieburg C.E., Cho R.H., Thoman M., Adkins B., Sieburg H.B., 2002. Deterministic regulation of haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 100:1302-9.

Muller-Sieburg C.E., Cho R.H., Karlson L., Huang J.F., Sieburg H.B., 2004. Myeloid-based hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood* 103:4111-8.

Nesti C., Pardini C., Barachini S., D'Alessandro D., Siciliano G., Murri L., Petrini M., Vaglini F., 2011. Human dental pulp stem cells protect mouse dopaminergic neurons against MPP+ or rotenone. *Brain Research* 1367:94-102.

Ngamukote S., Yanagisawa M., Ariga T., Ando S., Yu R.K., 2007. Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycoproteins in mouse brains. *Journal of Neurochemistry* 103 (6):2327-2341.

Olausson M., Patil P.B., Kuna V.K., Chougule P., Hernandez N., Methe K., Kullberg-Lindh C., Borg H., Ejnell H., Sumitran-Holgersson S., 2012. Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study. *Lancet* 380(9838):230-7.

Orkin S.H., 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Reviews Genetics* (1):57-64.

Park S., Kim E., Koh S.E., Maeng S., Lee W.D., Lim J., Shim I., Lee Y.J., 2012. Dopaminergic differentiation of neural progenitors derived from placental mesenchymal stem cells in the brains of Parkinson's disease model rats and alleviation of asymmetric rotational behaviour. *Brain Research* 1466:158-166.

Peralta O.A., Huckle W.R., Eyestone W.H., 2011. Expression and knockdown of cellular prion protein (PrPC) in differentiating mouse embryonic stem cells. *Differentiation* 81:68-77.

Pike L.J., Han X., Gross R.W., 2005. Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. *Journal of Biological Chemistry* 280: 26796-26804.

Pisciotta A., Carnevale G., Meloni S., Riccio M., De Biasi S., Gibellini L., Ferrari A., Bruzzesi G., De Pol A., 2015. Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Developmental Biology* 15:14.

Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-7.

Pountos I., Giannoudis P.V., 2005. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 36(3)S8-S12.

Prince R.C., Gunson D.E., 1998. Prions are copper-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 23: 197-198.

Prindull G., Prindull B., Meulen N., 1978. Hematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. *Acta Paediatrica Scandinavica* 67(4):413-6.

Prusiner S. B., 1982. Research on Scrapie. *The Lancet* 2: 494-495.

Prusiner S. B., 1995. Le malattie da prioni. *Le Scienze* 319: 22-30.

Quaglio E., Chiesa R., Harris D. A., 2001. Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *Journal of Biological Chemistry* 276: 11432-11438.

Quinn P.J., 2010. A lipid matrix model of membrane raft structure. *Progress in Lipid Research* 49(4):390-406.

Rachidi W., Vilette D., Guiraud P., Arlotto M., Riondel J., Laude H., Lehmann S., Favier A., 2003. Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *Journal of Biological Chemistry* 278: 9064-9072.

Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., Glockshuber R., Wuthrich K., 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121-231). *Nature* 382: 180-182.

Robey P.G., Kuznetsov S.A., Riminucci M., Bianco P., 2014. Bone marrow stromal cell assays: in vitro and in vivo. *Methods in Molecular Biology* 1130:279-293.

Rohban R., Pieber T.R., 2017. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells International* 2017:5173732.

Rudd P. M., Wormald M. R., Wing D. R., Prusiner S. B., Dwek R. A., 2001. Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* 40: 3759-3766.

Ruch J.V., 1998. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochemistry and Cell Biology* 76(6):923-38.

Ryu J.S., Ko K., Lee J.W., Park S.B., Byun S.J., Jeong E.J., Ko K., Choo Y.K., 2009. Gangliosides are involved in neural differentiation of human dental pulp-derived stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387:266-271.

Schöler H.R., 2007. The Potential of Stem Cells: An Inventory in Nikolaus Knoepffler, Dagmar Schipanski, and Stefan Lorenz Sorgner (a cura di). Hum biotech as Soc Chall, Ashg Publ Ltd, pp. 28.

Scintu F., Reali C., Pillai R., Badiali M., Sanna M.A., Argiolu F., Ristaldi M.S., Sogos V., 2006. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effect of two specific treatments. BMC Neuroscience 7:14

Sell S., 2001. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. Hepatology 33(3):758-50.

Semeraro R., Carpino G., Cardinale V., Onori P., Gentile R., Cantafora A., Franchitto A., Napoli C., Anceschi M., Brunelli R., Bosco D., Torrice A., Reid L., Gaudio E., Alvaro D., 2012. Multipotent stem/prgenitor cells in the human foetal biliary tree. Journal of Hepatology 57(5):987-94. DOI 10.1016/j.hep.2012.07.013

Seo B.M., Miura M., Gronthos S., Bartold P.M., Batouli S., Brahim J., Young M., Robey P.G., Wang C.Y., Shi S., 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. The Lancet 362(9429):149-55.

Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C., 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(6):361-374. doi: 10.1038/nrm.2017.16. Epub 2017 Mar 30.

Shiba H., Nakamura S., Shirakawa M., Nakanishi K., Okamoto H., Satakeda H., Noshiro M., Kamihagi K., Katayama M., Kato Y., 1995. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Developmental Biology* 170(2):457-66.

Shi F., Yang Y., Wang T., Kouadir M., Zhao D., Hu S., 2016. Cellular Prion Protein Promotes Neuronal Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells by Upregulating miRNA-124. *Journal of molecular neuroscience* 59(1):48-55. doi: 10.1007/s12031-016-0733-8. Epub 2016 Mar 7.

Shi S., Gronthos S., Chen S., Reddi A., Counter C.M., Robey P.G., Wang CY., 2002. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nature Biotechnology* 20(6):587-91

Simons K., Van Meer G., 1988. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 36(1):51-58.

Simons K., Ikonen E., 1997. Functional rafts in cells membranes: *Nature* 387(6633):569-572.

Simons K., Toomre D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1(1):31-39.

Sisková Z., Reynolds R.A., O'Connor V., Perry V.H., 2013. Brain region specific pre-synaptic and post-synaptic degeneration are early components of neuropathology in prion disease. *PLoS One* 8(1):e55004. doi: 10.1371/journal.pone.0055004. Epub 2013 Jan 30.

Smith A.J., Tobias R.S., Cassidy N., Plant C.G., Browne R.M., Begue-Kirn C., Ruch J.V., Lesot H., 1994. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Archives of Oral Biology* 39(1):13-22.

Smith A.J., Tobias R.S., Cassidy N., Bégue-Kirn C., Ruch J.V., Lesot H., 1995. Influence of substrate nature and immobilization of implanted dentin matrix components during induction of reparative dentinogenesis. *Connective Tissue Research* 32(1-4):291-6.

Sorice M., Mattarese P., Tinari A., Giammarioli A.M., Garofalo T., Manganelli V., Ciarlo L., Gambardella L., Maccari G., Botta M., Misasi R., Malorni W., 2009. Raft component GD3 associates with tubulin following CD95/FAS ligation. *The FASEB Journal* 23(10):3298-308.

Sorice M., Garofalo T., Misasi R., Manganelli V., Vona R., Malorni W., 2012a. Ganglioside GD3 as a raft component in cell death regulation. *Advances in Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 12(4):376-82.

Sorice M., Mattei V., Mattarese P., Garofalo T., Tinari A., Gambardella L., Ciarlo L., Manganelli V., Tasciotti V., Misasi R., Malorni W., 2012b. Dynamics of mitochondrial raft-like microdomains in cell life and death. *Communicative & Integrative Biology* 5(2):217-219.

Sorice M., Mattei V., Tasciotti V., Manganelli V., Garofalo T., Misasi R., 2012c. Trafficking of PrPC to mitochondrial raft-like microdomains during cell apoptosis. *Prion*. 6:354-358.

Sottocornola E., Misasi R., Mattei V., Ciarlo L., Gradini R., Garofalo T., 2006. Role of gangliosides in the association of ErbB2 with lipid rafts in mammary epithelial HC11 cells. *The FEBS Journal* 273: 1821-1830.

Stahl N., Borchelt D.R., Hsiao K., Prusiner S.B., 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51: 229-240.

Steele A.D., Emsley J.G., Ozdinler P.H., Lindquist S., Macklis J.D., 2006. Prion protein (PrPC) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:3416-3421.

Stockel J., Safar J., Wallace A.C., Cohen F.E., Prusiner S.B., 1998. Prion protein selectively binds copper (II) ions. *Biochemistry* 37: 7185-7193.

Suchanek J., Soukup T., Visek B., Ivancakova R., Kucerovac L., Mokry J., 2009. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc* 153(1):31-5.

Sveen O.B., Hawes R.R., 1968. Differentiation of new odontoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. *Archives of Oral Biology* 13(12):1399-409.

Svennerholm L., 1957. Quantitative estimation of sialic acid: colorimetric resorcinol-hydrochloridric acid method. *Biochimica et Biophysica Acta* 24: 604-611.

Svennerholm L., Fredman P., 1980. A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta* 617: 97-109.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-72.

Téclès O., Laurent P., Zygouritsas S., Burger A.S., Camps J., Dejou J., About I., 2005. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Archives of Oral Biology* 50(2):103-8.

Thomas E.D., Loechte H.L. Jr., Lu W.C., Ferrebee J.W., 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England Journal of Medicine* 257(11):491-6.

Thomas H., Simons K., 1997. Caveolae, DIGS, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Current Opinion in Cell Biology* 9:534-542.

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391): 1145–1147.

Till J.E., McCulloch E.A., 1963. Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo. *Radiation Research* 18:96-105.

Toledo M.S., Suzuki E., Handa K., Hakomori S., 2005. Effect of ganglioside and tetraspanins in microdomains on interaction of integrins with fibroblast growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry* 280: 16227-16234.

Toni M., Spisni E., Griffoni C., Santi S., Riccio M., Lenaz P., Tomasi V., 2006. Cellular prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precedes Fyn/Erk 1/2 signal transduction. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006:69469.

Tsukamoto Y., Fukutani S., Shin-Ike T., Kubota T., Sato S., Suzuki Y., Mori M., 1992. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Archives of Oral Biology* 37(12):1045-55.

Tuan R.S., Boland G., Tuli R., 2003. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis research & therapy* 5(1):32-45. Epub 2002 Dec 11.

Ullah I., Subbarao R.B., Kim E.J., Bharti D., Jang S.J., Park J.P., Shivakumar S.B., Lee S.L., Kang D., Byun J.H., Park B.W., Rho G.J., 2016. In vitro comparative analysis of human dental stem cells from a single donor and its neuronal differentiation potential evaluated by electrophysiology. *Life Sciences* 154:39-51.

Verfaillie C.M., Bhatia R., Steinbuch M., De For T., Hirsch B., Miller J.S., Weisdorf D., McClave P.B., 1998. Comparative analysis of autografting in chronic myelogenous leukemia: effects of priming regimen and marrow or blood origin of stem cells. *Blood* 92(5):1820-31.

Vollner F., Ernst W., Driemel O., Morsczecka C., 2009. A two-step strategy for neural differentiation in vitro of human dental follicle cells. *Differentiation* 77:433-441.

Wang J., Yu R., 2013. Interaction of ganglioside GD3 with an EGF receptor sustains the self-renewal ability of mouse neural stem cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:19137-19142.

Watt N.T., Taylor D.R., Gillott A., Thomas D.A., Perera W.S.S., Hooper N.M., 2005. Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 280:35914-35921.

Watt F.M., Driskell R.R., 2010. The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365:155–163.

Weissman I.L., 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and unit in evolution. *Cell* 100(1):157-68.

Williams M.A., McCluer R.H., 1980. The use of Sep-pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *Journal of Neurochemistry* 35: 266-269.

Wong B. S., Brown D. R., Pan T., Whiteman M., Liu T., Bu X., Li R., Gambetti P., Olesik, J., Rubenstein R. and Sy M. S., 2001a. Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metals perturbations and altered antioxidant activities. *Journal of Neurochemistry* 79: 689-698.

Wong B. S., Chen S. G., Colucci M., Xie Z., Pan T., Liu T., Li R., Gambetti P., Sy M. S., Brown D. R., 2001b. Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease. *Journal of Neurochemistry* 78: 1400-1408.

Wulf M.A., Senatore A., Aguzzi A., 2017. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biology* 15:34.

Yamabhai M., Anderson R.G.W., 2002. Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 24843-24846.

Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A., 2003. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* 115(3):281-92.

Young H.E., Black A.C. Jr., 2004. Adult stem cells. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 276(1):75-102.

Young F.I., Telezhkin V., Youde S.J., Langley M.S., Stack M., Kemp P.J., Waddington R.J., Sloan A.J., Song B., 2016. Clonal heterogeneity in the neuronal and glial differentiation of dental pulp stem/progenitor cells. *Stem Cells International* 2016:1290561.

Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A., 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318(5858):1917-20.

Yu R.K., Nakatani Y., Yanagisawa M., 2009. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *The Journal of Lipid Research* 50S:S440-S445.

Yu R.K., Suzuki Y., Yanagisawa M., 2010. Membrane glycolipids in stem cells. *FEBS Letters* 584(9):1694-9.

Yu R.K., Tsai Y.T., Ariga T., Yanagisawa M., 2011. Structures, biosynthesis and functions of gangliosides--an overview. *Journal of Oleo Science* 60(10):537-44.

Zannettino A.C.W., Paton S., Arthur A., Khor F., Itescu S., Gimble J.M., Gronthos S., 2008. Multi-potential Human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Physiology* 214:413-421.

Zegui L., Michelle H.T., Ling W., 2006. Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Development Growth & Differentiation*. 48: 513-523.

Zhang C.C., Steele A.D., Lindquist S., Lodish H.F., 2006. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-

renewal. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:2184-2189.

Zomosa-Signoret V., Arnaud J.D., Fontes P., Alvarez-Martinez, M.T. Liautard J.P., 2008. Physiological role of cellular prion protein. Veterinary Research 39: 09.

Zurita A.R., Crespo P.M., Koritschoner N.P., Daniotti J.L., 2004. Membrane distribution of epidermal growth factor receptors in cells expressing different gangliosides. European Journal of Biochemistry 271: 2428-2437.

Libri di Testo

- a) Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter Peter. Molecular Biology of the cell. Garland Pub 2002, 4°ed.
- b) Angeletti L.R., Gazzaniga V. Storia, filosofia ed etica della medicina. Elsevier Masson 2008, 3°ed.
- c) Gilbert S.F. Biologia dello sviluppo, Zanichelli 2005, 3°ed. ISBN 88-08-07275-4.
- d) McNaught A.D., Wilkinson A. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, the "Gold Book". Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997, 2°ed. ISBN 0-9678550-9-8.
- e) Pavlović M., Radotić K. Essential Characteristics of Stem Cells: Self-renewal, and Plasticity. In: Animal and Plant Stem Cells. Springer, Cham, 2017, 1°ed.
- f) Pollard T.D., William C.E., Lippincott-Schwartz J. Cell Biology. Saunders/Elsevier 2008, 3°ed.
- g) Voet D., Voet J., Pratt C.W. Fondamanti di biochimica. Zanichelli 2013, 3°ed.

Normative

- I. *Direttiva 2004/23/CE* del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 Marzo 2004 sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule;
- II. *Direttive 2006/17/CE* della Commissione dell'8 Febbraio che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda determinate prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umane;
- III. *Direttiva 2006/86/CE* della Commissione del 24 Ottobre 2006, che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazione ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umane;
- IV. *D. Lgs. n° 16 del 25 Gennaio 2010, "Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani"*;
- V. *G.U. Serie Generale n°40 del 18 Febbraio 2010.*

Ringraziamenti

E' indispensabile, nella ricerca scientifica come nella vita, avere una mente aperta: lo studio e l'osservazione dei fenomeni richiedono un'obiettività quasi innaturale per l'uomo. Risulta quindi fondamentale l'ambiente in cui la mente si sviluppa ed impara, tanto quanto le persone che a quella mente insegnano. Vorrei per questo ringraziare tutti coloro i quali hanno sempre mostrato, nei miei confronti, massima disponibilità e cortesia.

Il Dr. Vincenzo Mattei, del Polo Universitario di Rieti "Sabina Universitas", per avermi dato l'opportunità di intraprendere il percorso accademico in un particolare momento della mia vita.

Le dottoresse Francesca Santilli, Jennifer Di Pasquale e Cecilia Mei, colleghe con le quali ho condiviso più che un'esperienza lavorativa .

I professori Maurizio Sorice e Roberta Misasi, del Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università "Sapienza" di Roma, ai quali va la mia riconoscenza per i tanti consigli ricevuti.

I dottori Vincenzo Tasciotti, Antonella Capozzi e Valeria Manganelli, per aver condiviso le loro esperienze professionali ed averle rese insegnamento di vita.

Il Prof. Adriano Angelucci, del Dipartimento di Scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche dell'Università degli Studi dell'Aquila, per aver creduto nelle mie capacità e mostrato rispetto per il mio lavoro; non è certo facile, anzi raro, trovare

qualcuno che si faccia carico delle istanze di un altro e se ne interessi come fossero proprie.

La Prof. Simona Delle Monache ed il Dr. Claudio Festuccia, del medesimo dipartimento, per avermi concesso l'opportunità di espandere le mie conoscenze ed arricchire le mie abilità.

La Prof. Anna Marina Liberati, del Dipartimento di Medicina dell'Università degli Studi di Perugia, senza la quale non avrei intrapreso il percorso di dottorato.

Il Dr. Fabrizio Liberati, responsabile dell'Anatomia Patologica dell'Ospedale San Camillo De Lellis di Rieti, verso i cui dubbi nutro molta più fiducia che nelle certezze di tanti altri.

Voglio inoltre ringraziare il Polo Universitario di Rieti "Sabina Universitas", nella persona del Direttore Daniele Mitolo, per aver finanziato il mio progetto di dottorato di ricerca.

Alla mia famiglia, il merito della parte migliore di me.

...virtute duce, comite fortuna