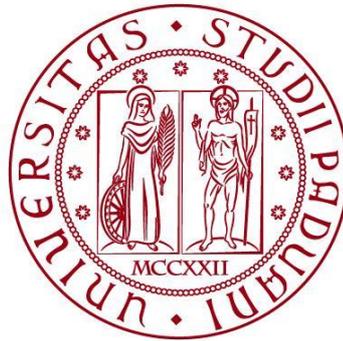


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Tunneling Nanotubes: una possibile via di trasmissione
dell' α -sinucleina implicata nella malattia di Parkinson**

Tutor: Prof.ssa Elisa Greggio

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Martina Campagnaro

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

INTRODUZIONE	1
Capitolo – 1 Introduzione ai Tunneling Nanotubes	3
1.1 Struttura e formazione dei TNTs.....	3
1.2 Funzioni dei TNTs.....	4
1.2.1 Ruolo dei TNTs in contesti fisiologici.....	4
1.2.2 Ruolo dei TNTs in contesti patologici.....	5
Capitolo 2 – Definizione e trasferimento di proteine prion-like	7
2.1 Proteine prion-like.....	7
2.2 Trasmissione di proteine prion-like.....	7
2.3 A-sinucleina e malattia di Parkinson.....	9
2.4 Trasferimento dell' α -sinucleina.....	10
Capitolo 3 – Comportamento di cellule del SNC nella propagazione della malattia di Parkinson	11
3.1 Astrociti: ruoli fisiologici e nella malattia di Parkinson.....	11
3.2 Astrociti e TNTs.....	12
3.3 TNTs come meccanismo protettivo.....	14
3.4 Comunicazione astrociti e neuroni.....	15
3.5 Ruolo della microglia.....	17
3.6 Significato del trasferimento di α -sinucleina in cellule microgliali.....	19
CONCLUSIONE	22
BIBLIOGRAFIA	23

INTRODUZIONE

Il citoscheletro è un elemento cellulare molto importante e con svariate funzioni, non solo strutturali, come ad esempio il sostegno della membrana plasmatica e nucleare e di dendriti ed assoni nei neuroni, ma anche funzioni dinamiche come costituente dei sarcomeri o trasportatore di vescicole. Il citoscheletro è composto da tre strutture principali: microfilamenti di actina, filamenti intermedi e microtubuli di tubulina. Alcuni geni mutati in forme genetiche di malattie neurodegenerative, inclusa la malattia di Parkinson, sono coinvolti nella regolazione di struttura e funzionalità di microtubuli e dei microfilamenti di actina.

In particolare, nella malattia di Parkinson, è evidente l'importanza, nell'evolversi della malattia, di una proteina prodotta dai neuroni e responsabile del controllo del traffico di neurotrasmettitori a livello sinaptico: l' α -sinucleina. Questa è una proteina appartenente alla categoria delle *prion-like proteins*, insieme ad altre (β -amiloidi e proteine tau) che sono implicate nella propagazione di malattie neurodegenerative. In condizioni patologiche, l' α -sinucleina può formare, all'interno dei neuroni, degli aggregati proteici, definiti corpi di Lewy, che vanno ad interferire nella comunicazione tra neuroni, fino a provocare la morte del neurone stesso. Essendo una *prion-like protein*, l' α -sinucleina condivide diverse caratteristiche con i prioni, tra cui, la principale, è quella di auto-propagarsi. L' α -sinucleina patologica (cioè in una conformazione amiloidogena) può trasferirsi da un neurone all'altro e in questo modo reclutare l' α -sinucleina fisiologica del neurone ricevente. [8]

In che modo l' α -sinucleina viene trasmessa permettendo così la propagazione della patologia? Le vie utilizzate da tale proteina potrebbero essere diverse, tra cui la via secretoria, attraverso esocitosi/endocitosi soprattutto a livello sinaptico. Tuttavia, recentemente sono stati scoperti dei nuovi meccanismi di trasporto dell' α -sinucleina, ovvero i Tunneling Nanotubes (TNTs). Si tratta di strutture formate a partire dal citoscheletro, ma che al tempo stesso si differenziano da altri elementi citoscheletrici quali *filopodi* o *cilia*. I TNTs sono strutture tubulari composte da F-actina, ma in alcune linee cellulari possono essere composti da F-actina e microtubuli. I TNTs sono protrusioni della membrana che rimangono sospesi al di sopra del substrato e mettono in comunicazione le cellule attraverso la condivisione del citoplasma, partecipando alla comunicazione cellulare non solo in condizioni fisiologiche, ma anche patologiche.

I TNTs si formano tra diversi elementi cellulari (cellule tumorali e non, astrociti e neuroni, cellule della microglia). Molto importanti sono i TNTs che mettono in comunicazione la microglia, il principale elemento cellulare che si occupa della *clearance* degli aggregati proteici nel SNC limitando la diffusione della malattia di Parkinson. Uno studio recente ha messo in evidenza che, in condizioni patologiche, quando la microglia fatica ad eliminare gli aggregati di α -sinucleina, essa attua un percorso alternativo, che consiste proprio nella formazione di TNTs attraverso i quali l' α -sinucleina viene trasferita alle cellule vicine per condividere il carico degradativo, attraverso le vie lisosomiali. Allo stesso tempo, la presenza di α -

sinucleina induce una produzione massiva di *reactive oxygen species* (ROS) portando ad un'amplificazione del danno mitocondriale: le cellule sane, oltre a farsi carico della degradazione, possono anche fornire, attraverso i TNTs, mitocondri intatti alle cellule che invece contengono aggregati fibrillari.

Tuttavia, nonostante i TNTs possano sembrare un'ottima soluzione per potenziare l'eliminazione di forme patologiche di α -sinucleina e limitare la morte cellulare, al tempo stesso aiutano la malattia a progredire attraverso il trasferimento trans-cellulare, soprattutto se il processo viene attuato tra cellule neuronali. Quindi, a seconda del tipo cellulare, i TNTs possono essere un sistema utile o deleterio per l'evoluzione della malattia, e quindi rappresentare un target terapeutico per la cura della malattia stessa.

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE AI TUNNELING NANOTUBES

1.1 Struttura e formazione dei TNTs

Per lo sviluppo ed il mantenimento di un organismo pluricellulare è fondamentale la comunicazione tra le cellule. Diverse sono le vie di segnalazione, che comprendono processi di esocitosi, seguiti da endocitosi, la trasduzione del segnale mediata da recettori o la comunicazione diretta tramite *gap junctions*. Rustom et al., nel 2004, descrive per la prima volta una struttura differente, basata su canali aperti, che garantiscono la comunicazione diretta e mediano la continuità di membrana tra le cellule collegate, che vengono definiti *Tunneling Nanotubes* (TNTs).^[1]

I TNTs sono strutture aventi un diametro medio di circa 50-200 nm, anche se possono raggiungere i 700 nm ed una lunghezza compresa tra i 20 e i 100 μm . Queste strutture potrebbero essere facilmente confuse con altre protrusioni cellulari (*filopodi* o *cilia*), ma possiedono una caratteristica che ne permette la distinzione: non hanno contatti con il substrato, ma rimangono sospesi e possono distribuirsi liberi nel mezzo. Principalmente i TNTs sono stati descritti come tubuli, non vuoti, costituiti di F-actina (TNTs sottili), ma che talvolta, tra alcuni tipi cellulari quali neuroni primari, astrociti, cellule NK umane e macrofagi, contengono, oltre ad F-actina, anche microtubuli, raggiungendo, quindi, un diametro maggiore (TNTs spessi). Sono, in generale, strutture temporanee che permangono per minuti o anche diverse ore.^[1]

La formazione di queste strutture è promossa da diversi fattori tra cui condizioni infiammatorie, infezioni patologiche e stress ossidativo. In riferimento a quest'ultimo processo, è stato osservato come la quantità elevata di H_2O_2 (perossido di idrogeno) sia in grado di modificare la fluidità della membrana e possa indurre la riorganizzazione del citoscheletro, con conseguente aumento della formazione dei TNTs. Si tratta di un processo riscontrabile maggiormente nei neuroni, in quanto cellule più suscettibili al danno ossidativo, ma che altera anche la funzionalità degli astrociti.^[2]

Per la formazione e la stabilizzazione dei TNTs sono necessarie e fondamentali delle molecole di adesione: N-caderine e β -catenina (proteine che costituiscono, in parte, le giunzioni aderenti). Quando i TNTs si formano e raggiungono le cellule adiacenti, vengono stabilizzati mediante l'adesione alle giunzioni aderenti.

Due meccanismi principali sono stati evidenziati per la formazione dei TNTs:

- Protrusione guidata dall'actina
- Migrazione cellulare

Per quanto riguarda il primo processo, esso consiste nella generazione di cascate di segnale che promuovono il reclutamento di molecole, le quali deformano la membrana e regolano la polimerizzazione dell'actina. Una cellula allo stato inattivo viene stimolata da vari segnali che attivano una Rho GTPase che rilascia, a sua volta, I-BAR, una proteina utile per indurre la curvatura negativa della membrana,

necessaria per la formazione dei TNTs. Viene innescata una polimerizzazione iniziale per generare un fascio di actina (molto simile alla formazione dei *filopodi*) che può consentire l'estensione del TNT dalla cellula 1 alla cellula 2, fino ad unirsi e fondersi con la membrana attraverso un meccanismo non ancora conosciuto. [3]

Il secondo meccanismo si basa sulla migrazione cellulare: due cellule inizialmente in contatto iniziano a migrare in direzioni opposte, rimanendo connesse attraverso un TNT che potrebbe originare da una o da entrambe le cellule coinvolte. Quest'ultimo processo è tipico delle cellule del sistema immunitario come macrofagi e linfociti T. [4]

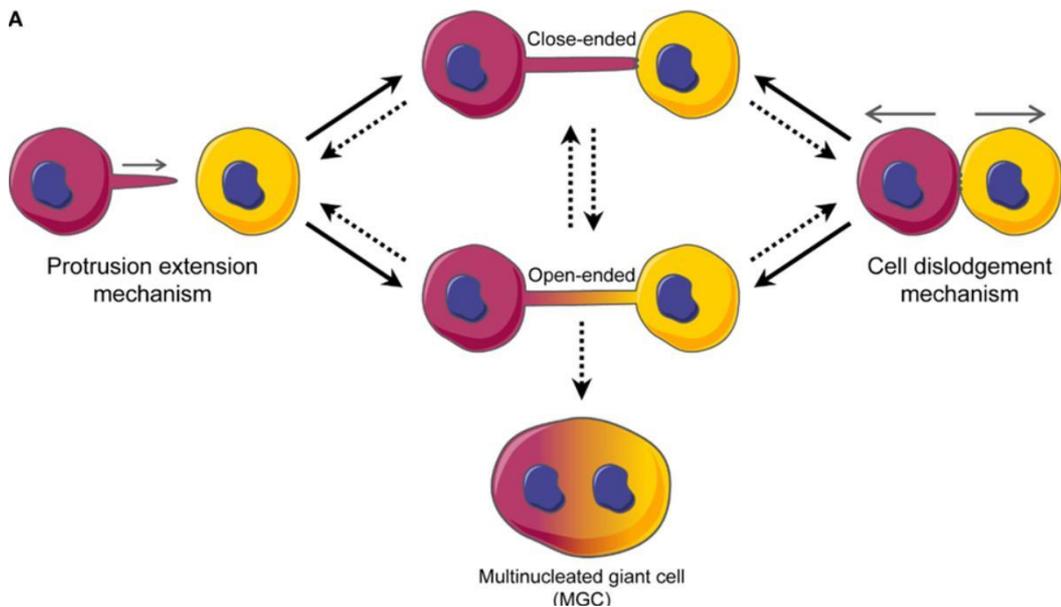


Figura 1. Modello di formazione dei Tunneling nanotubes (adapted from, Dupont et al., 2018)

1.2 Funzioni dei TNTs

1.2.1 Ruolo dei TNTs in contesti fisiologici

Recentemente è stato studiato come i TNTs permettano lo scambio tra cellule, di molecole segnale e messaggeri. Ad esempio, i TNTs possono essere implicati nel trasferimento di ioni Ca^{2+} tra le cellule. Il Ca^{2+} potrebbe trasmettersi mediante le *gap junctions*, ma il trasporto mediato dai TNTs risulta essere più vantaggioso, in termini di distanze raggiunte e dimensioni delle molecole trasferite, oltre al fatto che la segnalazione elettrica, mediata dai TNTs, è più selettiva, in quanto permette il trasferimento del segnale solo alla cellula coinvolta nell'accoppiamento e non provoca la diffusione del segnale anche ad altre cellule vicine. In ogni caso, le *gap junctions* sono importanti anche nel trasferimento di Ca^{2+} mediato dai TNTs andando a supportare una diffusione bidirezionale dei segnali elettrici. [5]

Gli ioni Ca^{2+} possono trasferirsi passivamente tra le cellule mediante l'utilizzo di TNTs, ma questo trasferimento sarebbe inadeguato per una trasmissione efficiente

tra le cellule, motivo per cui, nella propagazione, risulta essere importante l'implicazione del recettore per l'inositolo trifosfato (IP3) e del reticolo endoplasmatico, presenti all'interno TNTs, che permettono di propagare attivamente segnali intercellulari di Ca^{2+} , tramite il rilascio di Ca^{2+} indotto dal Ca^{2+} . In questo modo i TNTs possono diventare siti di amplificazione che superano i limiti imposti dalla diffusione passiva. Alla luce di questo è evidente come i TNTs possano rappresentare un'alternativa via di segnalazione del Ca^{2+} intercellulare. [5]

Durante lo sviluppo neurale precoce del cervello la comunicazione intercellulare mediante *gap junctions* è molto importante, in quanto i progenitori neuronali non sono ancora eccitabili dalle sinapsi chimiche. I TNTs sono associati alle *gap junction*, in quanto la Connexina 43 viene utilizzata per collegare un TNT alla superficie della cellula target e questa conformazione permette una diffusione bidirezionale dei segnali di depolarizzazione tra le cellule, per sincronizzare il rimodellamento dell'actina durante lo sviluppo cerebrale. Quindi, è possibile ipotizzare che l'embriogenesi, ed in particolare lo sviluppo neuronale e cerebrale, siano mediati dai TNTs collegati dalle *gap junctions*. [5,6]

La comunicazione mediata dai TNTs può indurre, inoltre, risposte immunitarie nelle cellule bersaglio. È stato osservato come i TNTs, che compaiono tra le cellule impegnate nella difesa immunitaria, presentino il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I). Le cellule mieloidi rispondono rapidamente ai mediatori solubili, come i prodotti batterici, e alla stimolazione meccanica e possono amplificarsi: questa attivazione cellulare è proprio mediata dalla segnalazione cellulare ad opera dei TNTs. [5]

I TNTs intervengono anche nell'apoptosi, un meccanismo di morte cellulare programmata grazie al quale vengono rimosse cellule ridondanti o danneggiate senza indurre una risposta infiammatoria. Proprio l'interazione tra FasL e il suo recettore, che induce segnali pro-apoptotici, attiva ed incrementa la formazione dei TNTs che saranno responsabili della propagazione di segnali di morte cellulare tra le cellule collegate. [5]

1.2.2 Ruolo dei TNTs in contesti patologici

Studi recenti hanno dimostrato come i TNTs possano fornire un meccanismo, mediante il quale la segnalazione da cellula a cellula e il trasferimento del contenuto cellulare avvengono tra le cellule del microambiente del cancro. Quindi, la formazione di TNTs tra cellule maligne, o tra cellule maligne e cellule della matrice tumorale, può facilitare la progressione del tumore. La capacità, inoltre, dei TNTs di trasportare mitocondri normali e danneggiati può rivelare un possibile meccanismo per la progressione del cancro: il trasferimento di mitocondri danneggiati provenienti da cellule tumorali, comporta una modificazione del metabolismo e della suscettibilità all'ipossia in cellule non tumorali [7]. Oltre a questo, un altro studio recente ha dimostrato come i microRNA oncogenici possano trasferirsi tra le cellule tramite TNTs. [5]

Molte tra le malattie neurodegenerative sono causate da mutazioni genetiche, *misfolding* proteico, disfunzione mitocondriale e stress ossidativo, tutte cause che portano all'induzione della morte cellulare programmata (apoptosi). Studi recenti hanno indicato come le proteine mal ripiegate possano essere trasferite da una cellula all'altra in almeno due modi diversi: per esocitosi e conseguente endocitosi di aggregati o tramite i TNTs. Oltretutto, la capacità dei TNTs di trasportare mitocondri, come in ambito tumorale, rivela un meccanismo per lo sviluppo e la progressione delle malattie neurodegenerative.^[5]

I TNTs sono anche coinvolti nel trasferimento di patogeni come batteri, virus o prioni. I TNTs sottili, per esempio, possono facilitare il trasporto di alcune tipologie di batteri verso i macrofagi, per operare la fagocitosi. Studi recenti, inoltre, hanno dimostrato come i batteri, per spostare materiale alle cellule, utilizzino dei nanotubi batterici che consentono lo scambio di fattori citoplasmatici, quali proteine o materiale genetico, tra organismi della stessa specie o di specie differenti. Questo suggerisce che i TNTs non sono caratteristici solo di organismi animali pluricellulari^[5]. Oltretutto, è stato evidenziato che i TNTs, formati quando le cellule T entrano in contatto e successivamente si separano, forniscono una via per la trasmissione dell'HIV: proprio l'HIV induce la formazione di TNTs nei macrofagi umani per promuovere la sua stessa propagazione tra le cellule. Questo indica come i TNTs siano connessioni fisiche tra le cellule immunitarie, che possono avere importanti conseguenze per consentire una rapida diffusione dell'HIV e di altre patologie virali.^[5]

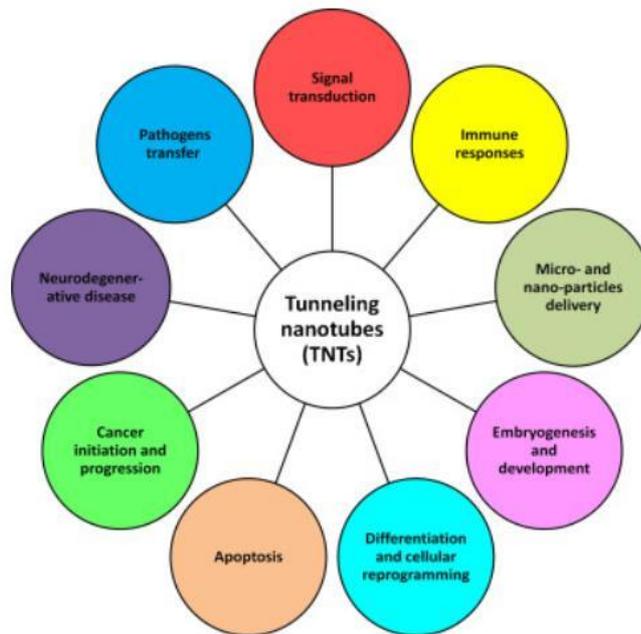


Figura 1.1 Significato funzionale della formazione di TNTs tra le cellule (adapted from Sisakhtnezhad et al., 2015)

CAPITOLO 2 – DEFINIZIONE E TRASFERIMENTO DI PROTEINE PRION-LIKE

2.1 Proteine Prion-like

Una caratteristica patologica in un certo numero di malattie neurodegenerative è la deposizione di aggregati proteici nel cervello, sotto forma di inclusioni intracellulari ed extracellulari. Le malattie caratterizzate da questi processi aberranti sono definite malattie da proteine *prion-like* (malattia di Alzheimer, malattia di Huntington e malattia di Parkinson): diverse proteine (β -amiloide, proteina tau, α -sinucleina) aggregano, modificando la loro struttura di partenza ed andando ad assumere una struttura terziaria ricca in foglietti β , che le rende propense a formare specie oligomeriche intermedie ed aggregati fibrillari di ordine superiore. L'insieme di queste malattie viene definito come malattie da *misfolding* delle proteine e l'input per la loro caratterizzazione deriva dalla scoperta dei prioni. Questo termine è stato coniato per la prima volta da Prusiner (1982), in un studio che identificava la causa della Scrapie (encefalopatia spongiforme trasmissibile che colpisce pecore e capre) in una particella infettiva proteica (PrP^{Sc}). L'agente eziologico di tale malattia è la proteina prionica cellulare PrP^c, che subisce un ripiegamento errato nella forma correlata alla malattia, PrP^{Sc}, in grado, successivamente, di indurre l'ulteriore conversione di molecole naïve di PrP^c, diventando potenzialmente tossiche e provocando la formazione di oligomeri o aggregati fibrillari. Tali aggregati possono successivamente propagarsi e comunicare uno scorretto ripiegamento a molecole PrP^c adiacenti, contribuendo all'espandersi della malattia.^[8]

Le proteine implicate nella generazione di malattie da *misfolding*, come Alzheimer, Parkinson e Huntington, vengono definite *prion-like*: condividono, infatti, alcune caratteristiche tipiche dei prioni, ovvero la capacità di propagare il *misfolding*, ma al tempo stesso, non sono considerate prioni, perché, a differenza di questi, non provocano malattie infettive.^[8]

2.2 Trasmissione di proteine prion-like

La trasmissione intracellulare di aggregati di PrP^{Sc}, ed in generale delle proteine *prion-like*, avviene tra cellule neuronali e tra neuroni ed astrociti. Questi ultimi sono da considerarsi suscettibili all'infezione, causata dai prioni, e hanno la caratteristica di propagare tale infettività sia a neuroni, che ad astrociti naïve, diventando, quindi, un'arma a doppio taglio nella propagazione della malattia. Con l'infezione di neuroni ed astrociti vengono attivate le cellule della microglia, un gruppo di cellule della glia che si occupano della principale difesa immunitaria nel Sistema Nervoso Centrale, essendo questo un sito "immuno-privilegiato" e quindi non accessibile alle cellule del sistema immunitario. La microglia è portata a perdere progressivamente il suo ruolo fagocitico e questo causa un peggioramento della malattia, fino a diventare incontrollabile.^[8]

Un esempio di proteina *prion-like* è l' α -sinucleina: una proteina monomerica intrinsecamente non strutturata che, in presenza di mutazioni nel gene o a seguito di vari fattori predisponenti (genetici e ambientali), si aggrega, causando la malattia di Parkinson insieme ad altre sinucleinopatie, come la demenza da corpi di Lewy. Aggregati di α -sinucleina, insieme ad ubiquitina e neurofilamenti, costituiscono i corpi di Lewy, che sono tra i responsabili del blocco della comunicazione tra neuroni, il quale provoca la malattia di Parkinson, insieme ad altre malattie neurodegenerative.^[8, 9]

I meccanismi più studiati nella trasmissione degli aggregati proteici sono il trasferimento trans-sinaptico e la secrezione mediante esosomi. Tuttavia dal 2004, con la scoperta dei TNTs, è stato caratterizzato un nuovo meccanismo per spiegare la comunicazione intercellulare a lungo raggio. In particolare, con l'utilizzo di inibitori della formazione di TNTs, si vede diminuire il trasferimento intercellulare degli aggregati. Al tempo stesso però, l'accumulo degli stessi aggregati nei neuroni, va ad indurre un aumento della formazione dei TNTs, che ne promuoveranno la propagazione. I TNTs aumentano il loro numero in seguito ad uno stato di stress: lo stress ossidativo, che è una causa di tale incremento, è ulteriormente associato alla presenza di aggregati proteici nella neurodegenerazione, ciò implica che i ROS, generati come conseguenza dell'aggregazione proteica, vadano a stimolare la formazione dei TNTs.^[8]

Un ulteriore fattore che si ipotizza contribuire all'insorgenza e/o progressione delle malattie neurodegenerative, e che favorisce la formazione dei TNTs è la disfunzione del complesso *Retromer*. Si tratta di un complesso proteico per il riciclo di recettori trans-membrana, dagli endosomi al trans-Golgi, e quindi implicato nel traffico endosomiale. Sono stati evidenziati, infatti, in diversi studi dei difetti o delle mutazioni in una o più unità del complesso *Retromer* che, in pazienti con malattia di Alzheimer o Parkinson, possono portare a conseguenze patologiche. Inoltre, sono stati riscontrati livelli ridotti di tale complesso nelle diverse regioni del cervello di pazienti affetti dalla malattia, indicando come queste condizioni potrebbero essere legate ad un malfunzionamento del comparto lisosomiale, che a sua volta è sia causa che conseguenza delle malattie neurodegenerative^[8]. La disfunzione del complesso *Retromer* può far sì che le proteine risiedano per lunghi periodi all'interno dell'endosoma e si accumulino, causando neurotossicità. Inoltre, andando a ridurre il traffico endosomiale, con la compromissione di questa via di riciclo, si può avere una riduzione del numero di recettori presenti sulla superficie cellulare, importanti per la corretta funzione del cervello, come ad esempio i recettori fagocitici della microglia o i recettori postsinaptici, fondamentali nella neurotrasmissione.^[10]

Le proteine *prion-like* vengono indirizzate al lisosoma, dove avviene la degradazione attraverso vie endocitiche e autofagosomiche, ma al tempo stesso, l'accumulo degli aggregati proteici causa problemi al funzionamento di tale organello, attraverso meccanismi come la permeabilizzazione della membrana e la perdita dell'integrità lisosomiale, provocando un ulteriore aumento degli aggregati proteici, e di conseguenza ulteriore compromissione lisosomiale, dando vita ad un circolo vizioso.^[8]

I lisosomi sono centri importanti per la segnalazione di condizioni di stress a nucleo e mitocondri: l'accumulo di aggregati proteici può regolare in modo errato le vie di segnalazione dei lisosomi, spingendo la cellula ad utilizzare vie alternative che permettano di alleggerire il carico di prodotti tossici. Alla luce di questo, quindi, anche il danno lisosomiale porta ad un incremento della formazione dei TNTs, che rappresentano un meccanismo di salvataggio della cellula, usato per liberarsi del materiale tossico. [8]

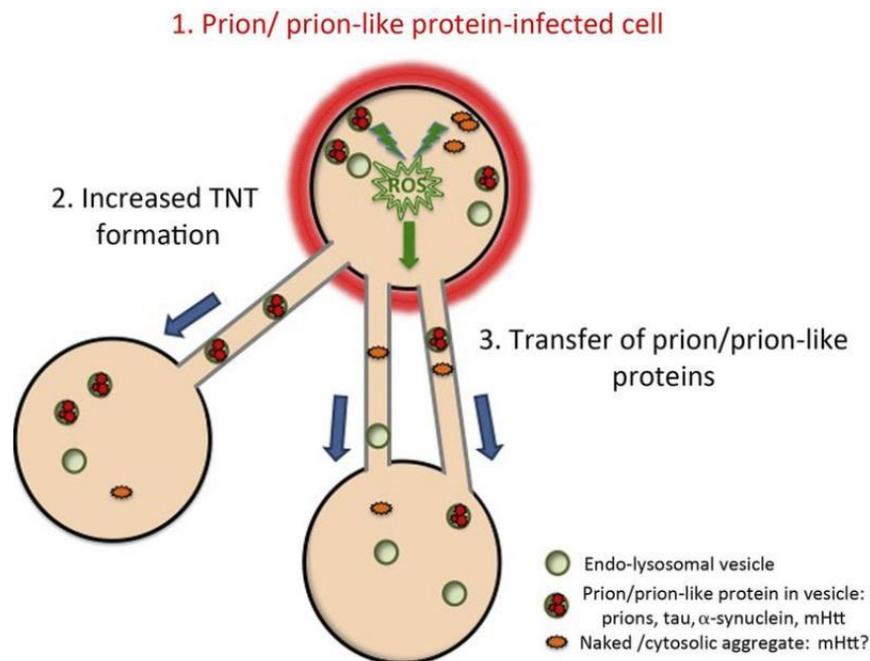


Figura 2 Modello di formazione dei TNTs indotto da proteine prion-like (adapted from Victoria et al., 2017)

2.3 Alfa-sinucleina e malattia di Parkinson

L' α -sinucleina è una proteina di 140 amminoacidi ed è suddivisa in tre regioni: una N-terminale carica positivamente, una regione idrofobica centrale, con elevata propensione ad aggregare, ed un dominio C-terminale altamente acido, che contiene la maggior parte dei siti di modifica post-traduzionali e consente l'interazione con altre proteine [11]. È una proteina intrinsecamente disordinata, ma, grazie alle caratteristiche della regione N-terminale, può ripiegarsi in un' α -elica anfipatica che le consente di legarsi alle membrane [12]. L' α -sinucleina è principalmente presente nel Sistema Nervoso Centrale, anche se la sua presenza è stata evidenziata anche in tessuti non neuronali. Essa è maggiormente presente a livello presinaptico e, nonostante la sua funzione fisiologica non sia ancora del tutto chiara, svolge un ruolo importante nel traffico delle vescicole sinaptiche per il rilascio di neurotrasmettitori, nell'assemblaggio del complesso SNARE (implicato nel trasporto e nel rilascio di vescicole sinaptiche), oltre ad essere coinvolta nei meccanismi regolatori associati al mantenimento dell'omeostasi sinaptica. [11]

Il morbo di Parkinson è una malattia neurodegenerativa associata all'età che colpisce il Sistema Nervoso Centrale e periferico di un individuo ed è caratterizzato dalla neurodegenerazione progressiva di alcune regioni del cervello, in particolare dei neuroni dopaminergici della "substantia nigra pars compacta" (principale centro nel cervello per la coordinazione del movimento). La progressiva degenerazione di questi neuroni è associata alla presenza di inclusioni citoplasmatiche proteiche diffuse, i corpi di Lewy, che contengono, per la maggior parte, aggregati filamentosi della proteina α -sinucleina fosforilata e ubiquitinata. Se la presenza dei corpi di Lewy sia causa o conseguenza della malattia non è ancora del tutto chiaro.^[11]

2.4 Trasferimento dell' α -sinucleina

In condizioni patologiche, l' α -sinucleina può aggregare e trasferirsi da un neurone all'altro, o da un neurone ad una cellula della glia, propagando la patologia.

Per comprendere come tale proteina possa trasferirsi per via trans-cellulare, sono stati compiuti diversi studi, come quelli di Dieriks e colleghi. Gli autori hanno utilizzato delle colture di cellule SH-SY5Y che esprimono α -sinucleina fluorescente (in fusione con la proteina EGFP) per visualizzare il presunto trasferimento di α -sinucleina a livello intercellulare. Le cellule SH-SY5Y sono una linea cellulare di neuroblastoma di derivazione umana, spesso utilizzate come modelli *in vitro* per lo studio dei disturbi neurodegenerativi, in quanto possono essere differenziate in neuroni. Da questo studio è stato possibile evincere che le cellule formano frequentemente delle strutture simili a TNTs, mediante le quali è possibile il trasferimento di α -sinucleina fluorescente tra le cellule SH-SY5Y. Tali TNTs si formano, sia attraverso la migrazione delle due cellule implicate, che prima entrano in contatto e successivamente si allontanano, sia tramite la protrusione cellulare. Indipendentemente dal meccanismo, però, due cellule vicine entrano in contatto mediante i TNTs, i quali successivamente si ritraggono e, nel mentre, una particella viene trasferita ed osservata nella cellula ricevente^[13].

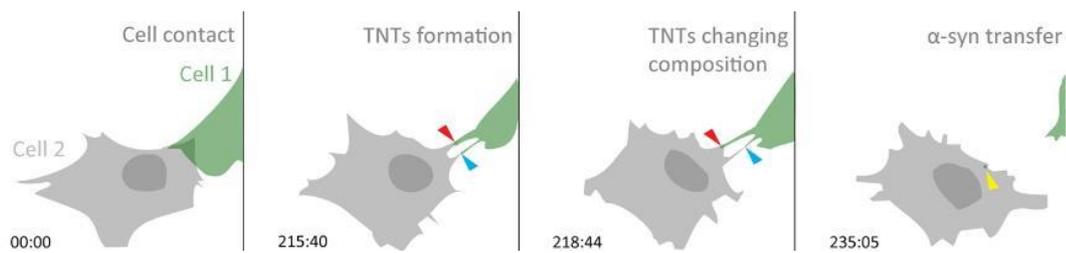


Figura 2.1. Rappresentazione dello scambio di α -sinucleina attraverso TNTs (adapted from Dieriks et al., 2017)

Gli stessi autori hanno osservato che l' α -sinucleina, non solo si può trasferire tra cellule del Sistema Nervoso Centrale, ma è anche in grado di attraversare la barriera ematoencefalica in entrambe le direzioni, nella sua forma fosforilata, presente nel plasma sanguigno. Le cellule necessarie per la formazione ed il mantenimento della barriera ematoencefalica sono i periciti, posizionati tra le cellule endoteliali dei capillari cerebrali, astrociti e neuroni. Dieriks e colleghi hanno riscontrato un'elevata quantità di precipitati di α -sinucleina, nella sua forma fosforilata, in pazienti affetti da malattia di Parkinson, ed alcuni di questi precipitati sono presenti proprio all'interno dei periciti. Analizzando le regioni interessate, sono stati trovati processi simili ai TNTs: le cellule dei periciti sono in grado di trasferire anch'esse gli aggregati di α -sinucleina in modo simile alle cellule SH-SY5Y [13].

Infine, è stato dimostrato come l' α -sinucleina fluorescente, trasportata all'interno di queste cellule, possa rimanere visibile per lunghi periodi, indicando, quindi, una difficoltà nella sua eliminazione e la possibilità che continui a propagarsi nel tempo.

CAPITOLO 3 - COMPORTAMENTO DI CELLULE DEL SNC NELLA PROPAGAZIONE DELLA MALATTIA DI PARKINSON

3.1 Astrociti: ruoli fisiologici e nella malattia di Parkinson

Gli astrociti sono cellule gliali e rappresentano il gruppo cellulare più numeroso all'interno del cervello. Sono cellule di supporto per il Sistema Nervoso Centrale (SNC), ma, oltre ad essere coinvolti nelle funzioni fisiologiche del SNC, sono importanti anche nello sviluppo delle malattie neurodegenerative. Le funzioni di un astrocita sano sono numerose, tra cui garantire la sopravvivenza neuronale e contribuire alla formazione della barriera ematoencefalica. Sono, inoltre, strutture utili per il riciclo e la rimozione, mediante l'utilizzo di trasportatori, dei neurotrasmettitori rilasciati nello spazio post-sinaptico. I principali neurotrasmettitori che richiedono l'utilizzo di questa via di rimozione sono:

- Il glutammato, un amminoacido eccitatorio

- Il GABA (acido gamma aminobutirrico), derivante dal glutammato, ma che svolge un ruolo inibitorio
- La glicina, un amminoacido che ritroviamo nelle sinapsi inibitorie

Una volta che i neurotrasmettitori sono entrati nell'astrocita, fanno il loro ingresso nel catabolismo degli amminoacidi, per poi essere metabolizzati nuovamente dal neurone e sostenere la produzione energetica. ^[14]

Studi recenti stanno evidenziando come gli astrociti giochino un ruolo importante nella propagazione della patologia nelle malattie neurodegenerative, probabilmente una conseguenza sia della perdita delle normali funzioni omeostatiche, sia dell'acquisizione di funzioni tossiche. Infatti, con la manifestazione di malattie neurodegenerative, è comune l'accumulo di aggregati che vanno a perturbare le normali funzioni degli astrociti.

In particolare, nella malattia di Parkinson, caratterizzata dalla perdita di neuroni dopaminergici, si riscontra una diffusa deposizione di α -sinucleina inizialmente all'interno dei neuroni. Successivamente, con l'inizio della perdita neuronale e poi, con l'avanzamento della neurodegenerazione, anche nel citoplasma degli astrociti inizia ad accumularsi α -sinucleina. Si deduce che gli astrociti acquisiscano l' α -sinucleina aggregata "sfuggita" dai terminali assonici ^[15]. Ovviamente, l'accumulo degli aggregati intracellulari va ad agire negativamente sul normale funzionamento degli astrociti. L'insieme dei cambiamenti avvenuti negli astrociti e l'inizio della produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie, come IFN- γ e TNF- α , portano all'attivazione della microglia, in zone dove è stata riscontrata una perdita ingente di neuroni dopaminergici. La microglia, ha la stessa funzione dei macrofagi del sistema immunitario: fagocita i neuroni contenenti aggregati di α -sinucleina, contribuendo all'avanzamento della neurodegenerazione ^[15].

3.2 Astrociti e TNTs

L'accumulo di α -sinucleina negli astrociti va a colpire l'apparato fago-lisosomiale e lisosomiale ed induce danno mitocondriale. Rostami et al. hanno osservato che, in risposta al danno, gli astrociti formano TNTs per trasferire tali aggregati e i mitocondri danneggiati verso cellule adiacenti.

In particolare, per evidenziare se oligomeri di α -sinucleina si accumulino all'interno degli astrociti, Rostami e colleghi hanno esposto degli astrociti umani ad oligomeri di α -sinucleina, marcati con Cy3 (cianina, un colorante sintetico che emette fluorescenza tra il giallo e il verde). Gli oligomeri sono stati effettivamente incorporati dagli astrociti, con un processo simile alla fagocitosi nei macrofagi (contrazione ed arrotondamento della cellula), e l' α -sinucleina è stata trasportata nella regione circostante il nucleo (**figura 3A**).

Confermata la presenza degli aggregati, gli autori hanno investigato se queste inclusioni vengono degradate all'interno degli astrociti: le cellule sono state lavate e quindi esposte ad un mezzo privo di α -sinucleina. Come è possibile notare dalla

figura 3B, gli oligomeri sono mantenuti all'interno delle cellule: infatti, nonostante vengano trasportati nei compartimenti lisosomiali, gli astrociti non sono in grado di degradarli.^[16]

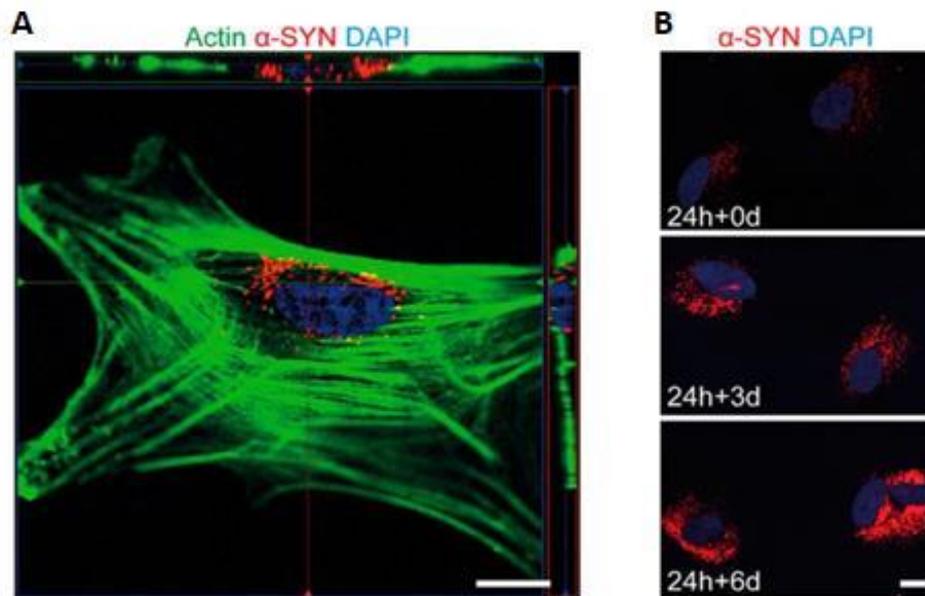


Figura 3 A Posizione intracellulare dell' α -sinucleina dopo l'esposizione

Figura 3 B Quantificazione degli oligomeri di α -sinucleina dopo 0-6 giorni dall'esposizione. (adapted from Rostami et al., 2017)

La generale condizione di stress a cui sono sottoposti gli astrociti ed il conseguente malfunzionamento del comparto lisosomiale, inducono la formazione dei TNTs. Nello studio di Rostami, con l'aumentare dei giorni (da 0 a 6) i TNTs si formano frequentemente tra gli astrociti. Andando a paragonare colture di controllo non trattate, con colture in cui gli astrociti vengono esposti ad α -sinucleina è chiaro come il numero di TNTs sia nettamente superiore nelle seconde (**figura 3.1**)^[16].

All'interno dei TNTs si viene, quindi, a riscontrare la presenza di aggregati, di dimensioni più o meno grandi, di α -sinucleina che si trasferiscono verso astrociti sani, come meccanismo di riduzione dello stress a cui è sottoposto l'astrocita donatore.

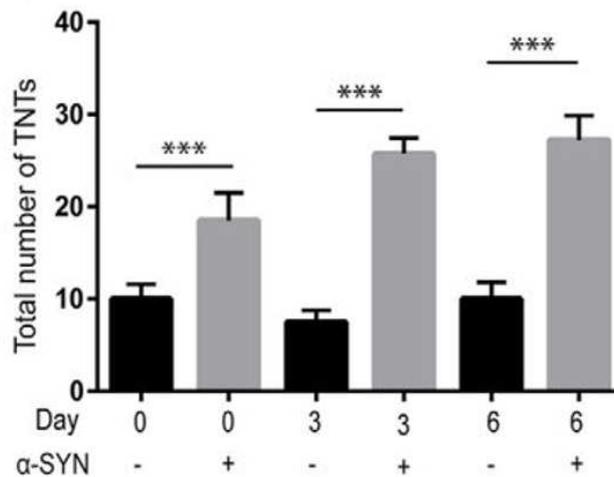


Figura 3.1 Confronto di livelli di TNTs tra controlli e campioni α -sinucleina positivi (adapted from Rostami et al., 2017)

3.3 TNTs come meccanismo protettivo

In aggiunta al malfunzionamento del comparto lisosomiale, Rostami e collaboratori hanno ulteriormente osservato dei difetti negli organelli cellulari. L'accumulo di α -sinucleina provoca, infatti, difetti a livello del reticolo endoplasmatico (ER) ed in particolare ne causa un aumento di volume, tale da renderlo simile all'aspetto vescicolare.^[16]

Un'ulteriore modifica viene riscontrata a livello mitocondriale: sono stati evidenziati, infatti, numerosi mitocondri piccoli e densi all'interno del citoplasma degli astrociti (se i mitocondri normali sono piú grandi di $1\mu\text{m}$, i mitocondri danneggiati hanno dimensioni inferiori)^[16]. In una cellula sana, gli organelli, tra cui i mitocondri difettosi, vengono rimossi mediante autofagia, ma in una cellula danneggiata dalla presenza di oligomeri di α -sinucleina, il flusso autofagico viene parzialmente bloccato. È stato dimostrato, quindi, che i mitocondri potrebbero trasferirsi proprio tramite i TNTs, come meccanismo per proteggere o limitare il danno delle cellule con accumuli proteici (**figura 3.2 A**).

Sono stati eseguiti due esperimenti di co-coltura: nel primo caso gli astrociti accettori sono stati coltivati con astrociti donatori, esposti all'oligomero α -sinucleina, mentre nella seconda configurazione sono stati gli astrociti accettori ad essere esposti all'oligomero. Gli astrociti sani hanno trasferito piú mitocondri alle cellule esposte all' α -sinucleina rispetto al contrario (**figura 3.2 B**)^[16].

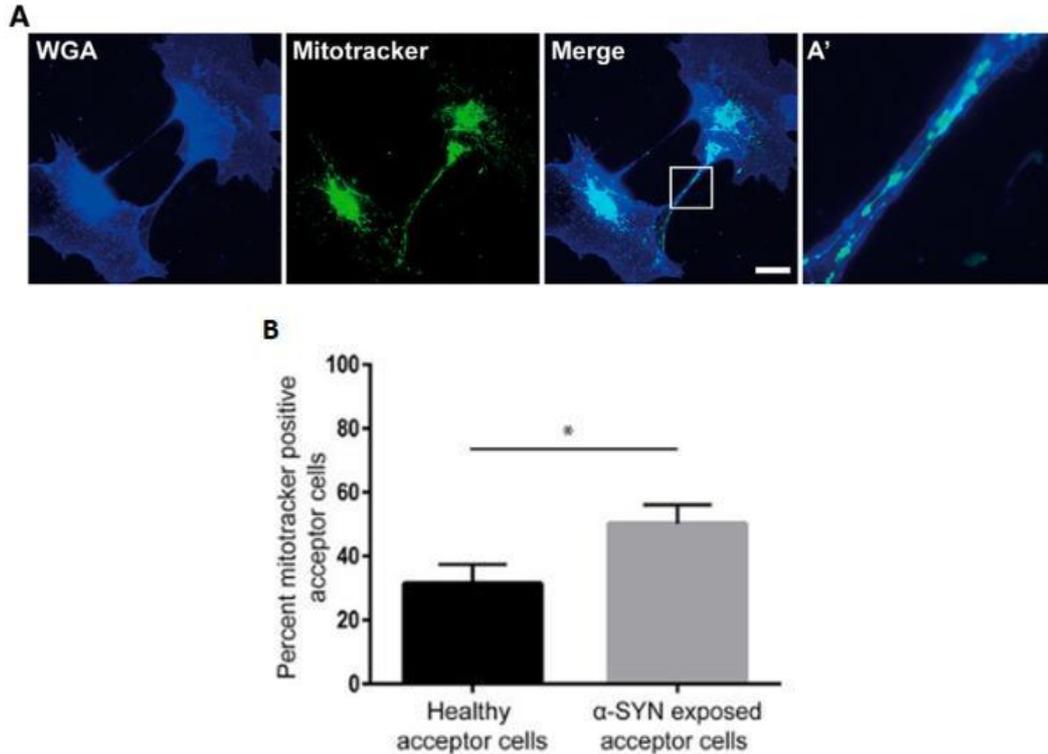


Figura 3.2 A utilizzando il colorante è stata dimostrata la presenza dei mitocondri nei TNTs.
Figura 3.2 B Gli astrociti sani hanno trasferito più mitocondri alle cellule esposte all'oligomero (adapted from Rostami et al., 2017)

3.4 Comunicazione astrociti e neuroni

Oltre alla comunicazione omotipica, gli astrociti comunicano intimamente anche con i neuroni, mediante l'utilizzo dei TNTs. In particolare, i neuroni in via di sviluppo possono produrre prolungamenti citoplasmatici (TNTs) per andare a contattare astrociti più distanti. Sono stati fatti studi *in vivo* per confermare questa possibile via di comunicazione: facendo esprimere la proteina fluorescente verde EGFP all'interno degli astrociti della corteccia di un topo, è stato possibile visualizzare come questa proteina si sia trasferita anche nei neuroni nello strato V della corteccia (**figura 3.3**).

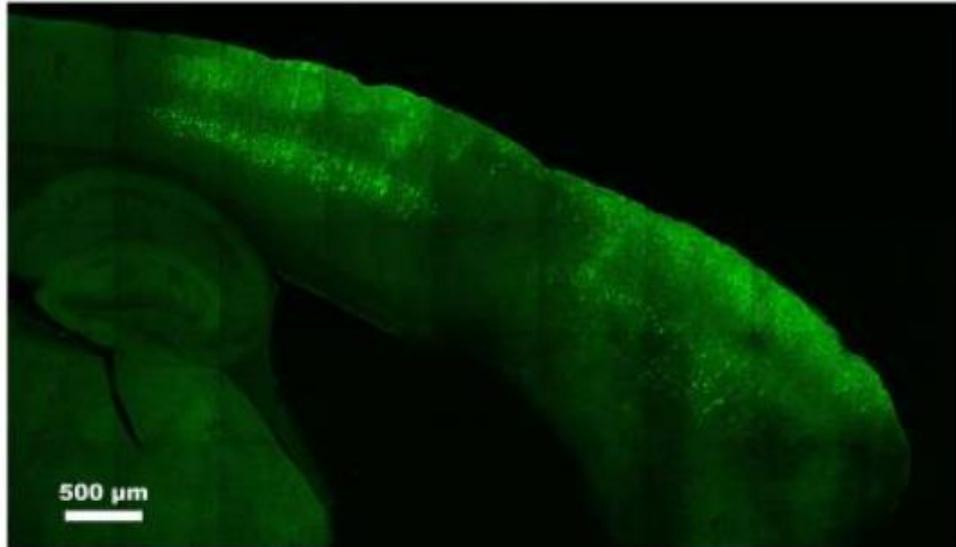


Figura 3.3 distribuzione di EGFP nella corteccia (adapted from Chen et al., 2021)

Per poter confermare che la trasmissione della proteina EGFP avvenga mediante l'utilizzo dei TNTs, è necessario escludere un trasferimento tramite il meccanismo di esocitosi-endocitosi. Nell'esperimento, la maggior parte dei neuroni EGFP+ si trovano nello strato V della corteccia, mentre gli astrociti nello strato I-III della corteccia, quindi, una possibile via di trasferimento potrebbe essere l'esocitosi della proteina fluorescente nell'ambiente extracellulare.^[17]

Per confermare la formazione dei TNTs, gli autori hanno valutato la loro composizione. Poiché un componente fondamentale dei TNTs è l'F-actina, gli autori, nello studio *in vivo*, applicano ai topi un inibitore che blocca la polimerizzazione dell'actina stessa (citocalasina B). Dopo l'applicazione dell'inibitore, la distribuzione di EGFP nella corteccia è molto diversa rispetto a quella dei controlli, ed il numero di neuroni positivi per EGFP si riduce. Questo ha suggerito come il trasporto della proteina fluorescente, dagli astrociti ai neuroni della corteccia, sia basato principalmente sul trasporto via TNTs.^[17]

Questi studi *in vivo* suggeriscono che anche le fibrille di α -sinucleina, e più in generale le proteine *prion-like*, possano trasferirsi dai neuroni agli astrociti con efficiente velocità, proprio come è stato dimostrato per la proteina fluorescente EGFP, mediante l'utilizzo di TNTs. Sarà, inoltre, sempre possibile un trasferimento bidirezionale, ma l'efficienza di trasmissione delle fibrille, dagli astrociti ai neuroni, è piuttosto bassa^[18]. Questo suggerisce come il trasferimento avvenga preferenzialmente in una direzione, quella di astrociti come accettori e neuroni come donatori.

Il fatto che il trasferimento di α -sinucleina dagli astrociti ai neuroni sia inefficiente, suggerisce un ruolo degli astrociti nell'intrappolamento e nella degradazione della proteina, piuttosto che nella sua diffusione.^[18]

Nei neuroni corticali vengono misurati i livelli di α -sinucleina dopo il suo assorbimento, riscontrando una diminuzione della proteina a lunghezza intera a

disapito di un accumulo, nel tempo, del prodotto di scissione dell' α -sinucleina. Al contrario, misurando i livelli della proteina, all'interno degli astrociti caricati con α -sinucleina, non si nota un accumulo del prodotto scisso e l' α -sinucleina viene elaborata più velocemente rispetto che nei neuroni. I dati indicano, quindi, come la degradazione più efficiente dell' α -sinucleina da parte degli astrociti sia responsabile delle differenze nei livelli proteici [18]

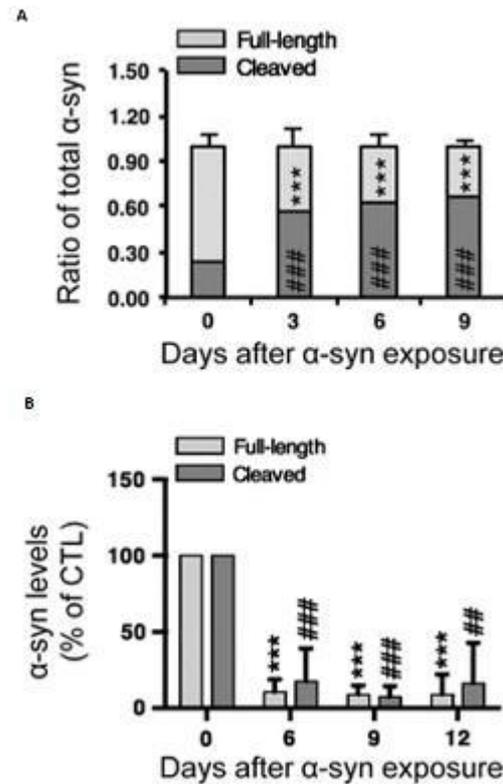


Figura 3.4 A Rapporto tra α -sinucleina intera e frammentata nei neuroni

Figura 3.4 B Rapporto tra α -sinucleina intera e scomposta in astrociti (adapted from Loria et al., 2017)

Nelle condizioni di co-coltura, quindi, gli astrociti, piuttosto che i neuroni, sono responsabili della riduzione di α -sinucleina esogena: i neuroni possono trasferire tramite l'utilizzo di TNTs l' α -sinucleina agli astrociti per permetterne la sua degradazione.

3.5 Ruolo della microglia

Le cellule della microglia sono cellule presenti all'interno del nostro SNC che possiedono delle proprietà immunologiche, derivate dalla loro origine comune con le cellule della linea mieloide (monociti, macrofagi, ecc.). Le cellule microgliali, molto presto durante lo sviluppo, migrano dal sistema circolatorio verso il cervello, dove rimangono quiescenti ed assumono una forma ramificata. Una volta entrato il patogeno nel sito d'interesse, le cellule della microglia cambiano morfologia e diventano ameboidi, proliferano e rilasciano diversi fattori diffusibili, come

citochine pro-infiammatorie o ossido nitrico, responsabili della risposta neuro-infiammatoria. Quindi, le cellule della microglia mediano le risposte immuni nel cervello, un sito privilegiato dove le classiche cellule del sistema immunitario non hanno accesso, e a loro spetterà l'attività fagocitica e di presentazione dell'antigene.^[19]

Uno studio recente di Scheiblich e collaboratori suggerisce che anche la microglia agisca in un modo molto simile a quello degli astrociti. Se esposta ad aggregati di α -sinucleina, la microglia forma una rete cellulare, mediante la formazione di connessioni intercellulari di F-actina, utili nella trasmissione di α -sinucleina aggregata a microglia naïve adiacente, dove gli aggregati sono degradati più efficientemente.^[20]

Come evidenziato in precedenza, l' α -sinucleina si trova prevalentemente nei neuroni, ma, ad uno stadio più avanzato della malattia di Parkinson, può essere rinvenuta frequentemente nelle cellule gliali (astrociti) che possono portare all'attivazione successiva della microglia, come sistema per limitare il danno. Per valutare l'*uptake* di α -sinucleina, gli autori analizzano la microglia esposta a monomeri o fibrille di α -sinucleina fluorescenti: l'analisi FACS (citometria a flusso) ha effettivamente confermato un assorbimento di fibrille fino al 98% (**figura 3.5**).^[20]

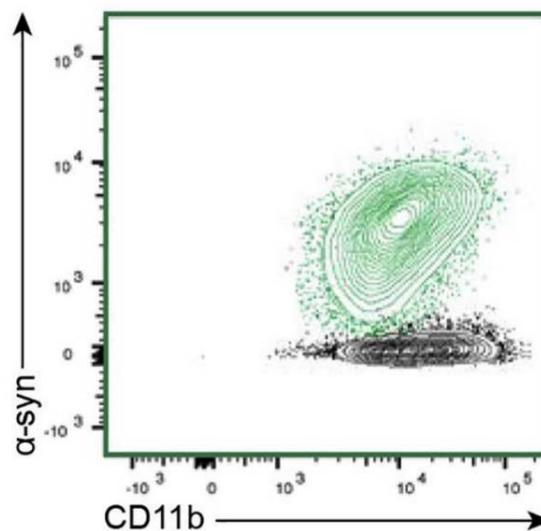


Figura 3.5 Diagramma che rappresenta l'assorbimento di α -sinucleina misurato da FACS (adapted from Heneka et al., 2021)

Mediante analisi *time-lapse* si conferma che l' α -sinucleina fluorescente, viene trasferita tra le cellule mediante due tipi di meccanismi: uno caratterizzato da proiezioni di membrana relativamente corte e spesse, per il trasferimento di grandi aggregati di α -sinucleina ed un secondo, caratterizzato da connessioni più lunghe e sottili, che permettono il trasferimento più veloce di aggregati più piccoli. Il trasporto, in entrambi i casi, avviene preferenzialmente da cellule cariche di fibrille a cellule che invece ne sono prive ^[20]. La microglia va, quindi, a formare una rete

di proiezioni di membrana di varia lunghezza e diametro, dove all'interno viene trasportata l' α -sinucleina.

Per confermare che effettivamente, il trasferimento delle fibrille richieda F-actina e che quindi queste connessioni intercellulari siano a tutti gli effetti TNTs, gli autori del lavoro hanno quantificato le dimensioni del citoscheletro di donatori ed accettori, nel tempo: la lunghezza totale del citoscheletro degli accettori aumenta nel tempo e cambiamenti simili sono stati rilevati nei donatori. Inoltre, la Rho-chinasi ROCK viene identificata come un regolatore del citoscheletro. Utilizzando, infatti, un inibitore di tale chinasi, è possibile osservare un trasferimento in aumento di α -sinucleina da donatori sovraccarichi ad accettori naïve (**figura 3.6**)^[20]

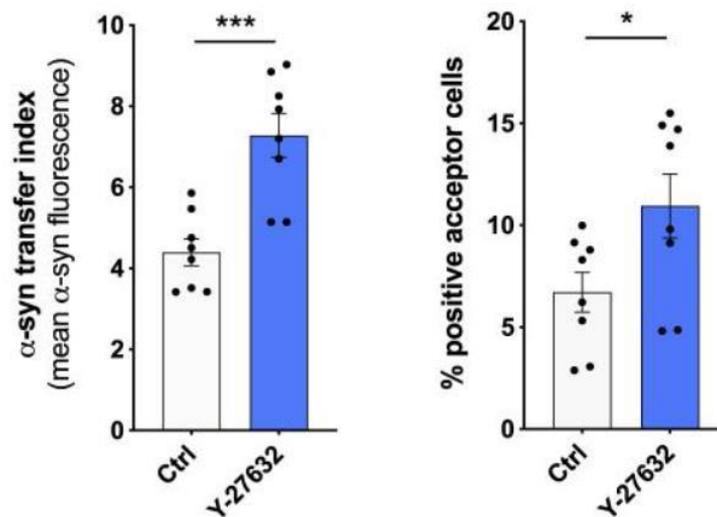


Figura 3.6 Confronto tra controlli e cellule con inibitore per ROCK: indice di trasferimento dell' α -sinucleina a sinistra e percentuale di accettori positivi all' α -sinucleina a destra (adapted from Heneka et al., 2021)

Alla luce di questo, quindi, gli autori concludono che la chinasi ROCK blocca il trasferimento dell' α -sinucleina tra microglia, andando ad inibire la polimerizzazione dell'actina, suggerendo implicitamente la partecipazione di F-actina nel trasferimento di fibrille di α -sinucleina.

3.6 Significato del trasferimento di α -sinucleina in cellule microgliali

L'accumulo di α -sinucleina fibrillare può indurre apoptosi e stress del reticolo endoplasmatico, e attivare il profilo pro-infiammatorio della microglia.

La presenza di α -sinucleina comporta una compromissione della membrana plasmatica, portando a morte cellulare e parallelamente si osserva un aumento della condensazione mitocondriale, insieme ad un disfacimento della rete mitocondriale, che provoca un aumento nella produzione di ROS.

Tramite gli esperimenti di co-cultura di Scheiblich e colleghi, si nota, però, che i donatori in co-cultura con accettori naïve, riducono la produzione di ROS nei donatori stessi. I mitocondri degli accettori sono marcati in rosso, mentre quelli dei donatori in verde per poterne seguire lo scambio intercellulare. Si osserva che tutti i donatori diventano positivi per i mitocondri inviati dagli accettori (**figura 3.7**)^[20]

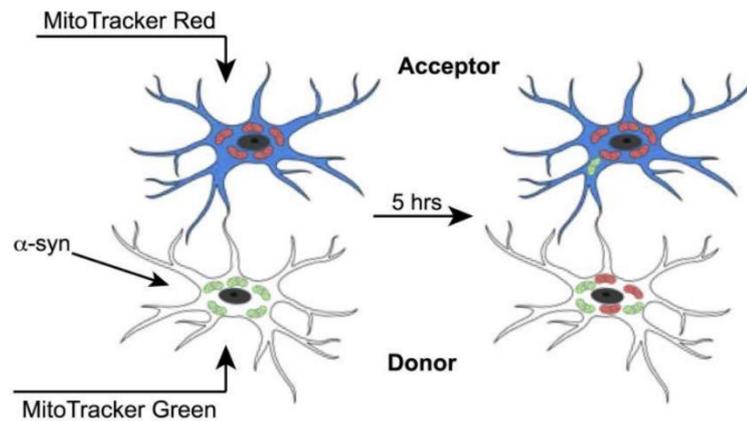


Figura 3.7 Schema della co-cultura (adapted from Heneka et al., 2021)

Tra le cause note di malattia di Parkinson, le più frequenti sono mutazioni nel gene *LRRK2*. Mutazioni *gain-of-function* di *LRRK2* ne aumentano l'attività chinastica, con conseguente deregolazione dei meccanismi utilizzati dalle cellule per poter eliminare l' α -sinucleina in eccesso. Le mutazioni in *LRRK2* sono, inoltre, associate ad una compromissione della funzionalità mitocondriale. Gli autori hanno, quindi, voluto testare se cellule di microglia, con mutazioni in *LRRK2*, avessero una capacità ridotta o compromessa in questo processo di passaggio di α -sinucleina mediante TNTs.^[20]

Mettendo a confronto cellule *wild-type* (WT) e cellule con mutazione *LRRK2*, gli studiosi hanno notato come quest'ultime siano caratterizzate da una ridotta fitness mitocondriale rispetto alla microglia *wild-type*. Al tempo stesso, la microglia con la mutazione è molto meno efficiente nel trasferimento di α -sinucleina verso accettori naïve, rispetto alla *wild-type* esposta alla proteina. Eseguendo esperimenti incrociati, dove sono stati co-cultivati donatori WT con accettori *LRRK2* mutati, è stato possibile notare come la microglia WT, contenente α -sinucleina aggregata, sia in grado di trasferirla alla microglia naïve, la quale, a sua volta, cede mitocondri funzionalmente intatti ai donatori, riuscendo a sfuggire, almeno in parte, alla citotossicità e alla morte cellulare più in generale.^[20] (**figura 3.**)

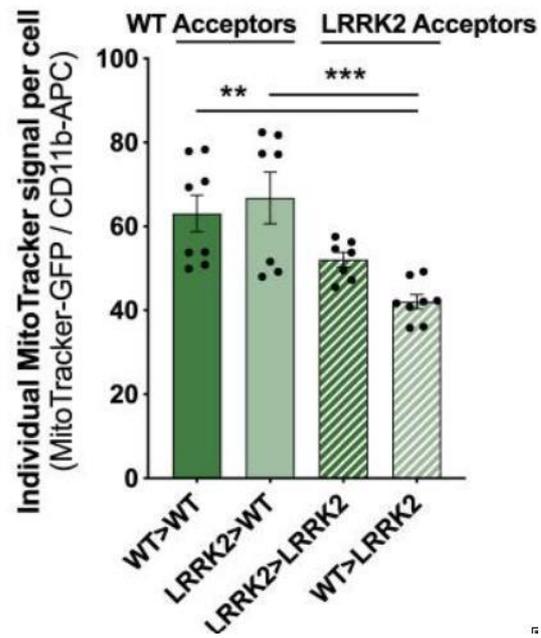


Figura 3.8 Quantificazione del segnale Mitotraker in esperimenti di cross-over LRRK2-WT (adapted from Heneka et al., 2021)

CONCLUSIONE

L'obiettivo di questo elaborato è stato quello di effettuare una ricerca in letteratura ed elaborare un visione dello stato dell'arte sulla struttura, formazione e funzione dei Tunneling Nanotubes (TNTs), una tipologia di comunicazione intercellulare di recente scoperta. In particolare, l'attenzione è stata posta sull'implicazione dei TNTs nelle malattie neurodegenerative e, più precisamente nella malattia di Parkinson. Una delle principali caratteristiche patologiche di questa malattia è l'accumulo di aggregati fibrillari di α -sinucleina, generati da un ripiegamento errato della proteina, che vanno ad interferire con la comunicazione neuronale.

L'implicazione dei TNTs è importante in diversi tipi di comunicazione, ma nel contesto della malattia di Parkinson, si è visto che essi vengono a formarsi tra astrociti, tra cellule della microglia e tra astrociti e neuroni, in risposta a stress indotti proprio dalla presenza di aggregati di α -sinucleina. Possono essere descritti come un'arma a doppio taglio: da un lato costituiscono una via di diffusione della proteina, che, essendo capace di entrare in cellule naïve, comunica il ripiegamento patologico all' α -sinucleina *wild-type*, dall'altro una via utile per proteggere le cellule contenenti aggregati, attraverso la ricezione di organelli funzionanti. Numerosi studi, infatti, dimostrano come i TNTs possano trasferire, a partire da astrociti, neuroni o cellule microgliali naïve, dei mitocondri intatti, che possano andare a compensare le carenze nel funzionamento dei mitocondri di cellule contenenti aggregati di α -sinucleina.

Grazie alla scoperta di questa via di comunicazione alternativa, che complementa i processi di esocitosi ed endocitosi, si sono aperte nuove possibilità nel trattamento di malattie che ancora non hanno una cura, come il morbo di Parkinson, ma anche come altre malattie, come l'HIV o i tumori. Infatti, i TNTs possono essere utilizzati come target di farmaci e possono essere utili per direzionare la funzione dei farmaci stessi verso cellule o tessuti bersaglio, evitandone la dispersione. Sono, inoltre, importanti per evitare la propagazione della tossicità, causata dai farmaci stessi, in aree che non dovrebbero esserne interessate. Inoltre, notando l'elevata implicazione dei TNTs nella trasmissione della malattia, potrebbe essere utile la creazione di farmaci che vadano a ridurre lo stress e la loro stessa formazione, permettendo di mettere un freno al propagarsi della malattia e di agenti patogeni più in generale.^[21]

La comprensione della funzione biologica e potenzialmente patologica dei TNTs rimane ancora incompleta, poiché molti esperimenti vengono eseguiti preferenzialmente "in vitro" o "ex vivo", a discapito di esperimenti "in vivo". Oltretutto, la difficoltà nel visualizzare tali strutture, per problemi tecnici nei meccanismi di imaging attualmente in uso, li rende difficili da studiare. Rimangono, quindi, dei quesiti ancora in sospeso e la ricerca rimane aperta, ma con ottimi spunti e possibilità, anche in ambito medico, per la cura di malattie attualmente incurabili.

BIBLIOGRAFIA

- [1] «Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport». Consultato giugno 2022.
https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.1093133?casa_token=oTXNrRFM54AAAAA%3ALpG9Bvd40m1kaKTfs84iqDXnBELtA9xL6uFiWfuQjic6ujN91HbfGG1exqY1bZxkxLwHN7VChSpIFeoG
- [2] Kimura, S., Hase, K. & Ohno, H. The molecular basis of induction and formation of tunneling nanotubes. *Cell Tissue Res* **352**, 67–76 (2013).
<https://doi.org/10.1007/s00441-012-1518-1>
- [3] Ljubojevic N, Henderson JM, Zurzolo C. The Ways of Actin: Why Tunneling Nanotubes Are Unique Cell Protrusions. *Trends Cell Biol.* 2021 Feb;31(2):130-142. doi: 10.1016/j.tcb.2020.11.008. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33309107.
- [4] Dupont M, Souriant S, Lugo-Villarino G, Maridonneau-Parini I and V erollet C (2018) Tunneling Nanotubes: Intimate Communication between Myeloid Cells. *Front. Immunol.* 9:43. doi: 10.3389/fimmu.2018.00043
- [5] Sisakhtnezhad S, Khosravi L. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol.* 2015 Oct;94(10):429-43. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.06.010. Epub 2015 Jun 25. PMID: 26164368.
- [6] Zurzolo C. «Tunneling Nanotubes: Reshaping Connectivity». *Current Opinion in Cell Biology*, Membrane Trafficking, 71 (1 agosto 2021): 139–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.03.003>.
- [7] Valdebenito, Silvana et al. “Tunneling nanotubes, TNT, communicate glioblastoma with surrounding non-tumor astrocytes to adapt them to hypoxic and metabolic tumor conditions.” *Scientific reports* vol. 11,1 14556. 15 Jul. 2021, doi:10.1038/s41598-021-93775-8.
- [8] Victoria GS, Zurzolo C. The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: Implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol.* 2017 Sep 4;216(9):2633-2644. doi: 10.1083/jcb.201701047. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28724527; PMCID: PMC5584166.
- [9] Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 2010 Jul;33(7):317-25. doi: 10.1016/j.tins.2010.04.003. Epub 2010 May 20. PMID: 20493564.
- [10] Small SA, Petsko GA. Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2015 Mar;16(3):126-32. doi: 10.1038/nrn3896. Epub 2015 Feb 11. PMID: 25669742.

- [11] Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2018 Jan;109(Pt B):249-257. doi: 10.1016/j.nbd.2017.04.004. Epub 2017 Apr 8. PMID: 28400134.
- [12] Mehra S, Sahay S, Maji SK. α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019 Oct;1867(10):890-908. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.03.001. Epub 2019 Mar 7. PMID: 30853581.
- [13] Dieriks BV, Park TI, Fourie C, Faull RL, Dragunow M, Curtis MA. α -synuclein transfer through tunneling nanotubes occurs in SH-SY5Y cells and primary brain pericytes from Parkinson's disease patients. *Sci Rep.* 2017 Feb 23;7:42984. doi: 10.1038/srep42984. PMID: 28230073; PMCID: PMC5322400.
- [14] Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct.* 2017 Jul;222(5):2017-2029. doi: 10.1007/s00429-017-1383-5. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28280934; PMCID: PMC5504258.
- [15] Phatnani H, Maniatis T. Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Apr 15;7(6):a020628. doi: 10.1101/cshperspect.a020628. PMID: 25877220; PMCID: PMC4448607.
- [16] Rostami J, Holmqvist S, Lindström V, Sigvardson J, Westermark GT, Ingelsson M, Bergström J, Roybon L, Erlandsson A. Human Astrocytes Transfer Aggregated Alpha-Synuclein via Tunneling Nanotubes. *J Neurosci.* 2017 Dec 6;37(49):11835-11853. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0983-17.2017. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29089438; PMCID: PMC5719970.
- [17] Chen, J., Cao, J. Astrocyte-to-neuron transportation of enhanced green fluorescent protein in cerebral cortex requires F-actin dependent tunneling nanotubes. *Sci Rep* 11, 16798 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96332-5>
- [18] Loria F, Vargas JY, Bousset L, Syan S, Salles A, Melki R, Zurzolo C. α -Synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading. *Acta Neuropathol.* 2017 Nov;134(5):789-808. doi: 10.1007/s00401-017-1746-2. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28725967.
- [19] «cellula microgliale in “Enciclopedia della Scienza e della Tecnica”». Consultato 11 giugno 2022. [https://www.treccani.it/enciclopedia/cellula-microgliale_\(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica\)](https://www.treccani.it/enciclopedia/cellula-microgliale_(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica)).

[20] Scheiblich H, Dansokho C, Mercan D, Schmidt SV, Bousset L, Wischhof L, Eikens F, Odainic A, Spitzer J, Griep A, Schwartz S, Bano D, Latz E, Melki R, Heneka MT. Microglia jointly degrade fibrillar alpha-synuclein cargo by distribution through tunneling nanotubes. *Cell*. 2021 Sep 30;184(20):5089-5106.e21. doi: 10.1016/j.cell.2021.09.007. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34555357; PMCID: PMC8527836.

[21] Ottonelli I, Caraffi R, Tosi G, Vandelli MA, Duskey JT, Ruozi B. Tunneling Nanotubes: A New Target for Nanomedicine? *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 17;23(4):2237. doi: 10.3390/ijms23042237. PMID: 35216348; PMCID: PMC8878036.