

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche
Dipartimento di Farmacia



Corso di Laurea Magistrale in Farmacia
Tesi di Laurea

*“I recettori metobotropici glutammatergici del gruppo I
(mGluR1-5) espressi dalla microglia: ruoli fisiopatologici
e focus sulla sclerosi laterale amiotrofica”*

Relatore:

Prof. Marco Milanese

Candidata:

Francesca Caratti

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

Capitolo 1: la microglia nel sistema nervoso centrale ed i suoi recettori.....	6
1.1 Genesi e ruolo della microglia nel sistema nervoso centrale.....	7
1.2 Polarizzazione della microglia e i suoi diversi fenotipi.....	9
1.3 Recettori espressi dalla microglia.....	10
1.3.1 Recettori purinergici.....	10
1.3.2 Recettori serotoninergici.....	12
1.3.3 Recettori istaminergici.....	12
1.3.4 Recettori cannabinoidi.....	12
1.3.5 Recettori glutammatergici.....	13
1.3.6 Altri recettori espressi dalla microglia.....	15
Capitolo 2: Ruoli fisiopatologici dei recettori metabotropi glutammatergici del gruppo I espressi dalla microglia.....	16
2.1 Evidenze a supporto dell' espressione dei recettori mGluR1-5 nelle cellule di microglia.....	17
2.2 Ruolo dei recettori mGluR del gruppo I nei fenomeni di neuroinfiammazione generati dalla microglia.....	19
2.3 Rilascio di vescicole extracellulari dalla microglia e modulazione da parte del recettore mGluR5.....	21
2.4 Trauma cranico e ruolo dei recettori mGluR1-5 espressi dalla microglia.....	22
2.4.1 Connessione tra i recettori mGluR5 espressi dalla microglia e il sistema immunitario, nel TBI.....	24
2.5 Ruolo dei recettori metabotropi mGluR5 espressi su cellule di microglia nella lesione del midollo spinale (SCI).....	25
2.6 Ruolo dei recettori mGluR5 espressi su cellule di microglia nella lesione del midollo spinale.....	29

2.6.1	L' immunoeccitotossicità nell' ASD: il collegamento tra l' alterazione della trasmissione glutammatergica e la neuroinfiammazione.....	33
2.7	Ruolo del recettore mGluR5 espresso dalla microglia in modelli sperimentali di epilessia.....	34
2.8	Recettore mGluR5 espresso dalla microglia nell' emorragia intracerebrale (ICH).....	36
2.9	Ruolo indiretto del recettore mGluR1 nell' attivazione della microglia nella malattia di Alzheimer (AD).....	39
2.9.1	Ruolo della microglia nella perdita delle sinapsi.....	39
2.9.2	Legame tra complemento e AD.....	39
2.9.3	Connessione tra la proteina FMRP e recettori mGluR.....	42
	<i>Capitolo 3: Ruolo dei recettori metabotropi glutammatergici del gruppo I espressi dalla microglia nella sclerosi laterale amiotrofica.....</i>	<i>44</i>
3.1	La sclerosi laterale amiotrofica: una patologia multicellulare e multifattoriale.....	45
3.2	Il duplice ruolo della microglia nella SLA.....	49
3.3	Ruolo della microglia nel modulare la fagocitosi e la neuroinfiammazione nella SLA	52
3.4	Ruolo della microglia nel modulare l' autofagia nella SLA.....	55
3.5	Attivazione della microglia associata all' alterazione di miRNA nella SLA.....	56
3.6	Ruolo dei recettori metabotropi glutammatergici del gruppo I espressi dalla microglia nella SLA.....	58
3.6.1	I recettori glutammatergici nella SLA.....	59
3.6.2	Alterazione della proliferazione gliale e dell' espressione dei recettori mGluR nella SLA.....	61
3.6.3	Ruolo dei recettori mGluR5 in colture di microglia ottenuta da	

topi SOD1 ^{G93A} modello di SLA.....	63
3.6.4 Modulazione genetica e farmacologica dei recettori mGluR1 e mGluR5 nella SLA.....	64
3.7 Conclusioni e prospettive terapeutiche correlate alla modulazione del fenotipo microgliale nella sclerosi laterale amiotrofica.....	70
<i>Bibliografia</i>	74
<i>Ringraziamenti</i>	93

ABSTRACT

Il mio lavoro di tesi si è focalizzato sul ruolo dei recettori metabotropi glutammatergici del gruppo I espressi dalle cellule della microglia in situazioni sia fisiologiche che patologiche e sulla possibilità di sfruttare la modulazione di questi recettori come possibile strategia terapeutica.

La microglia rappresenta una sorta di sistema immunitario residente nel sistema nervoso centrale e svolge diverse funzioni essenziali per il mantenimento dell'omeostasi tissutale come la fagocitosi e il pruning sinaptico. Come accade per i macrofagi si può presentare in diversi stati: uno stato "sorvegliante" caratterizzato da numerose ramificazioni e definito M0 ed uno stato attivato definito "ameboide"; inoltre può presentare almeno due differenti stati di attivazione distinti, detti M1 pro-infiammatorio ed M2 anti-infiammatorio. I due fenotipi sono scatenati da condizioni alterate dell'ambiente extracellulare, ma possono anche essere indotti da diversi mediatori; infine, i due stati di attivazione differiscono in maniera significativa per i fattori rilasciati dalle stesse cellule della microglia.

Nel manoscritto sono stati affrontate diverse situazioni patologiche in cui i recettori mGluR1-5 svolgono un ruolo rilevante nella patogenesi, anche se nella maggior parte dei casi la loro funzione resta non del tutto chiara. Nello specifico, per ogni situazione patologica, si è cercato di capire se un'attivazione/disattivazione di questi recettori espressi dalla microglia possa diventare una possibile strategia terapeutica, in quanto, a seconda dello scenario analizzato l'attivazione o il blocco porta ad un miglioramento del quadro clinico o in generale della condizione sperimentale. L'ultima parte del lavoro rappresenta invece un approfondimento del ruolo dei recettori mGluR1-5 espressi dalla microglia in una specifica patologia neurodegenerativa: la sclerosi laterale amiotrofica. Il motivo di questa scelta è dato dal fatto che rappresenta un ambito di ricerca ancora molto poco indagato, ma che meriterebbe un approfondimento maggiore. Nella sclerosi laterale amiotrofica la microglia sembrerebbe avere un duplice ruolo, in particolare, nelle prime fasi della patologia mostra un fenotipo antinfiammatorio mentre nella fase terminale è caratterizzata da un fenotipo tossico. Un'ablazione genetica o il blocco dei recettori mGluR5 sembrerebbe determinare una riduzione del livello di proliferazione della microglia, tuttavia non è ancora noto se viene modulato il fenotipo neuro-infiammatorio. Sia per quanto riguarda la SLA che per le altre condizioni patologiche analizzate sono necessarie ulteriori indagini quindi per apprendere le dinamiche in cui la microglia è coinvolta e se i recettori mGluR1-5 espressi da queste cellule possano rappresentare dei buoni target terapeutici.

CAPITOLO 1

LA MICROGLIA NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE ED I SUOI RECETTORI

1.1 Genesi e ruolo della microglia nel sistema nervoso centrale

Le cellule della microglia rappresentano una sorta di sistema immunitario residente nel sistema nervoso centrale (SNC) e vengono quindi considerate la prima e principale difesa immunitaria attiva di questo importante distretto del nostro corpo. Diversi studi suggeriscono come la microglia provenga principalmente dal sacco vitellino embrionale e questa evidenza è stata confermata sia in modelli di roditori, sia nella specie umana (Cuadros et al., 1993; Alliot et al., 1999; Rezaie et al., 1999; Chan et al., 2007; Monier et al., 2007; Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012; Kierdorf et al., 2013). Nel topo, le cellule precursori della microglia derivanti dal sacco vitellino entrano a far parte del sistema nervoso in via di sviluppo, intorno al giorno 8.5 di vita

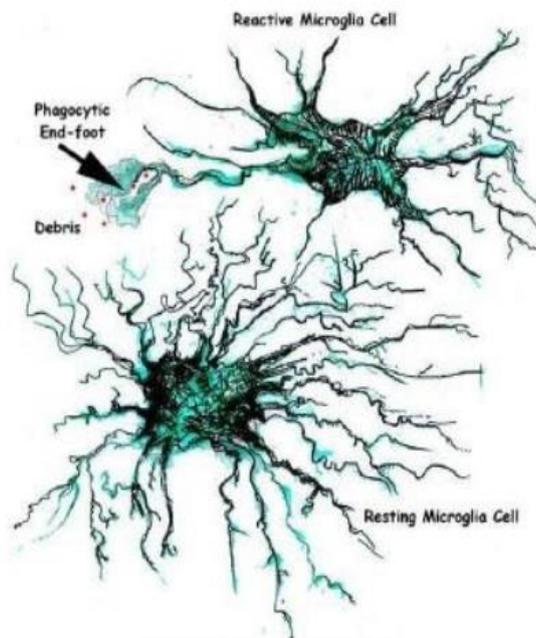


FIGURA 1. Nell'immagine è rappresentata la morfologia di due diverse cellule microgliali: "Resting microglia", ovvero la forma quiescente con numerosi prolungamenti mobili ed altamente sensibili, in grado di scandagliare il territorio circostante e "Reactive microglia", la forma attivata e tipicamente ameboide.

Tratto da : (<https://www.microbiologiaitalia.it/wp-content/uploads/2020/02/microglia-cell.jpg>)

embrionale, attraverso le vie extravascolari poiché i primi capillari cerebrali compaiono solo al decimo giorno di vita embrionale (Kurz e Christ, 1998; Navascues et al., 2000; Ginhoux et al., 2010; Swinnen et al., 2013). Dopo essersi insediate nel cervello, le cellule della microglia aumentano rapidamente il loro numero (Swinnen et al., 2013; Kim et al., 2015; Nikodemova et al., 2015; Eyo et al., 2016). L'ingresso precoce e la successiva colonizzazione del cervello rende la microglia adatta a svolgere ruoli critici nella regolazione di eventi cruciali dello sviluppo precoce del cervello: la regolazione del numero di precursori neurali, la promozione della sopravvivenza delle cellule neuronali, la fagocitosi dei neuroni danneggiati, il "pruning" sinaptico, l'angiogenesi, la sinaptogenesi, oltre che la maturazione dei circuiti neurali (Ashwell, 1991; Cuadros et al., 1993; Monier et al., 2007; Wakselman et al., 2008; Fantin et al., 2010; Schafer et al., 2012; Cunningham et al., 2013; Parkhurst et al., 2013; Swinnen et al., 2013; Ueno et al., 2013; Pont-Lezica et al., 2014; Squarzoni et al., 2014).

Le cellule della microglia oltre ad intervenire in processi fondamentali durante

lo sviluppo del sistema nervoso, svolgono importanti ruoli anche nel cervello adulto sano. Le cellule microgliali a riposo sono caratterizzate da numerose ramificazioni che monitorano e sondano costantemente il microambiente circostante mantenendo l'omeostasi del sistema nervoso centrale mediante la fagocitosi di detriti cellulari (Figura1; Neumann et al.,2009; Nimmerjahn et al., 2005); come avviene nella fase di sviluppo, la microglia ha un ruolo importante nel rimodellamento sinaptico e nella sinaptogenesi attraverso il *pruning sinaptico* per l'ottimizzazione dei processi di neurotrasmissione. Le cellule microgliali sono anche direttamente coinvolte nella formazione e nella riorganizzazione delle reti neurali, oltre che fornire supporto trofico ai neuroni maturi (Bessis et al.,2007; Ueno et al.,2013; Nayak et al.,2014). Questo importante sottotipo cellulare è in grado di percepire le condizioni dell'ambiente esterno attraverso un monitoraggio di tutti i meccanismi critici di segnalazione che assicurano un normale crosstalk tra la microglia e i neuroni, e che risultano fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cerebrale (Ransohoff e Perry, 2009; Li et al., 2012; Eyo e Dailey, 2013; Eyo e Wu, 2013; Nayak et al., 2014). Una minima variazione dell'ambiente extracellulare ed in particolare dei meccanismi di signalling cellulare, consentono alla microglia di rispondere, modulando l'attività neuronale. Inoltre, in risposta ad un trauma del sistema nervoso centrale, la microglia si attiva prontamente e subisce drammatici cambiamenti sia morfologici che funzionali definiti attivazione microgliale. Durante il processo di attivazione la microglia contrae le ramificazioni e si trasforma passando da una morfologia ramificata ad una ameboide simile a quella dei macrofagi circolanti nel torrente ematico, in seguito avviene una fase proliferativa ed infine una migrazione verso il sito della lesione (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al.,2005). La convergenza sul sito della lesione avviene in risposta a diversi segnali quali l'ATP e altre molecole rilasciate dai neuroni danneggiati (Davalos et al.,2005). Quando la microglia diviene iperattivata si possono avere effetti neurotossici causati dal rilascio di sostanze citotossiche, tra cui mediatori pro infiammatori (per es. $TNF\alpha$, interferone γ) e fattori che innescano lo stress ossidativo (per es. radicali liberi superossidi, ossido nitrico) (Block et al.,2005). Tuttavia, la microglia attivata può acquisire, in determinate situazioni, anche un fenotipo definito anti-infiammatorio, attraverso il rilascio di sostanze, in un certo senso, neuroprotettive. Inoltre, le cellule della microglia, hanno la capacità di esprimere recettori per un gran numero di neurotrasmettitori (Kettenmann et al.,2011), e questo consente loro di essere responsive ad una miriade di stimoli esterni. È stato dimostrato, in vitro, che alcuni neurotrasmettitori possono infatti influenzare lo stato di attivazione della microglia, producendo dei cambiamenti nel potenziale di membrana e nella concentrazione di calcio intracellulare provocando il rilascio di citochine e generando motilità cellulare (Kettenmann et al.,2011; Pocock et al.,2007).

1.2 Polarizzazione della microglia ed i suoi diversi fenotipi

In condizioni omeostatiche o di riposo, la microglia mostra un fenotipo detto "sorvegliante" caratterizzato da una bassa mobilità cellulare, da un corpo cellulare piccolo e da ramificazioni estese e altamente mobili per "scansionare" l'ambiente circostante (Davalos et al.,2005; Nimmerjahn et al.,2005). Questo stato quiescente è comunemente indicato come neutro o "M0" (Timmerman et al.,2018) ed è caratterizzato da una bassa espressione di marcatori di superficie comuni ai macrofagi circolanti, come CD45 e MHC II (Lynch et al.,2009).

Come accennato in precedenza, la microglia è estremamente sensibile a cambiamenti dell'ambiente in cui si trova, attivandosi rapidamente a seguito dell'esposizione a particolari segnali come per esempio fattori di crescita, neurotrasmettitori o citochine che indicano la presenza di un' infezione, un trauma, un danno neuronale o un' infiammazione (Lynch et al.,2009). Analogamente ai macrofagi periferici, il concetto di attivazione è stato associato ad almeno due fenotipi distinti di queste cellule: il fenotipo M1 anche definito pro-infiammatorio e spesso neurotossico ed il fenotipo M2, anti-infiammatorio e neuroprotettivo (Figura 2); questi due fenotipi, si differenziano in risposta a diversi segnali microambientali, a loro volta coinvolti nella produzione di molte molecole effettrici (Du et al., 2016). La microglia è in grado di classificare gli agenti patogeni tramite il riconoscimento di Patterns Molecolari associati al Danno (DAMPs), pattern recettoriali di microrganismi esogeni o cellule endogene implicate nella risposta immunitaria, rispettivamente. L'interazione con queste strutture promuove la trascrizione di geni mirati all'avvio di meccanismi di difesa cellulare, compreso il rilascio di citochine infiammatorie e chemochine (Colton, 2009; Kigerl et al., 2014). Un esempio in particolare di questa risposta è rappresentata dall'esposizione a lipopolisaccaride (LPS) o ad interferone gamma (IFN- γ), i quali, in vitro, stimolano la microglia ad assumere un fenotipo attivato M1, e di conseguenza a rilasciare mediatori pro-infiammatori tra cui: citochine (IL -1a, IL-1b, IL-6, IL-12, IL-23, fattore di necrosi tumorale- α – TNF- α), chemochine (CCL2), prostaglandina E2, ROS e ossido nitrico, attraverso l'induzione della ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) (Bagasra et al., 1995; Du et al., 2016; Orihuela et al., 2016).

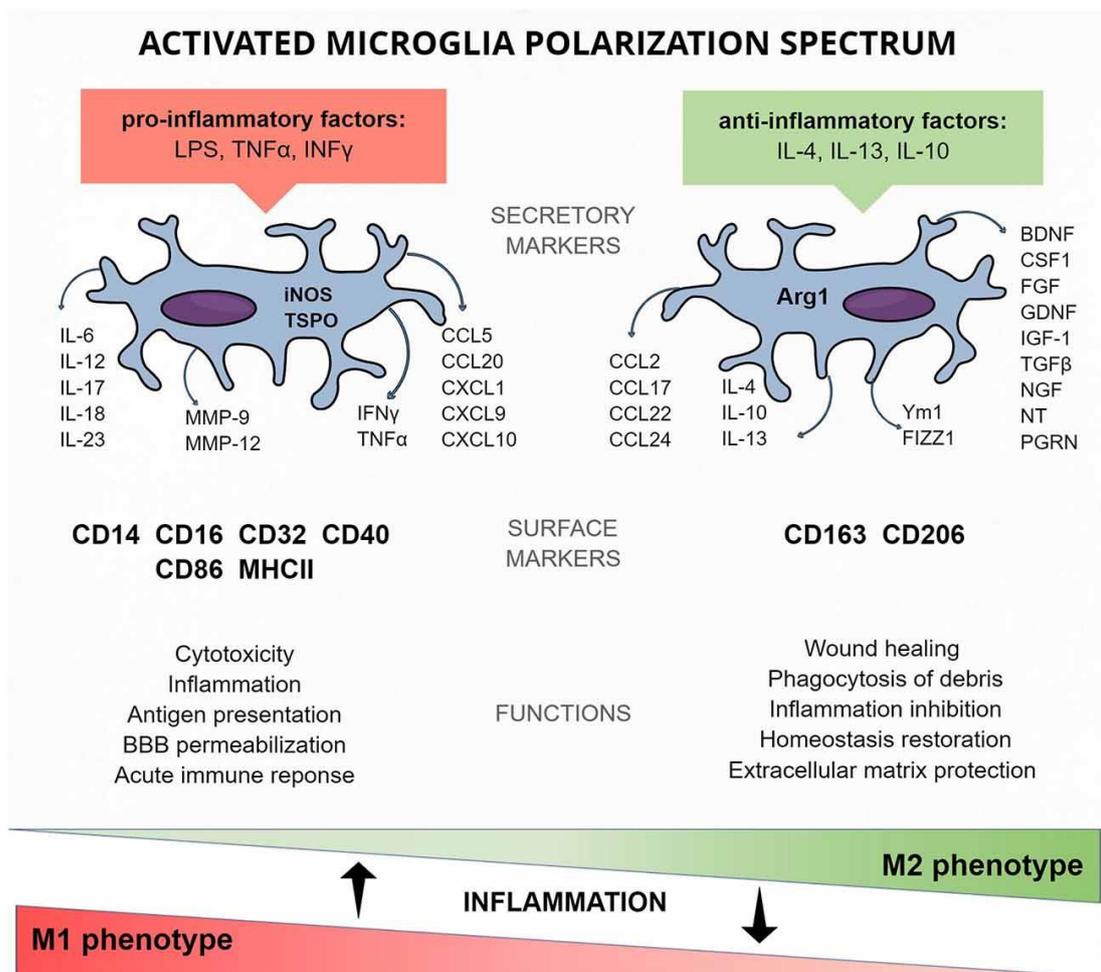


FIGURA 2. Rappresentazione dei markers associati alla microglia polarizzata con fenotipo M1 o M2. Tratto da: (Jurga et al., 2020)

Al contrario, il fenotipo M2 della microglia, anche definita "attivazione alternativa", è indotto dalle citochine antinfiammatorie IL-4, IL-10 o IL-13, sopprime l'infiammazione, rimuove i detriti cellulari attraverso la fagocitosi, promuove la rigenerazione della matrice extracellulare e supporta la sopravvivenza dei neuroni attraverso il rilascio, a loro volta, di fattori protettivi/trofici (Hu et al., 2015; Du et al., 2016; Tang e Le, 2016). Infine terza tipologia di attivazione definita recentemente "Acquired deactivation" rappresenta un altro fenotipo antinfiammatorio della microglia ed è principalmente indotto dalla captazione e fagocitosi di cellule apoptotiche o dall'esposizione a citochine antinfiammatorie, come IL-10 e TGF- β (Tang e Le, 2016).

1.3 Recettori espressi dalla microglia

1.3.1 Recettori purinergici

La concentrazione extracellulare di purine e pirimidine è generalmente bassa nel tessuto sano, ma aumenta nei siti di stress, traumi e lesioni cellulari,

portando all'attivazione dei recettori purinergici. Il ruolo dell'ATP extracellulare nella neurodegenerazione del sistema nervoso è stato riconosciuto da molto tempo (Volonte et al.,2003; Volonte et al.,2006), anzi, tra i tanti fattori rilasciati durante alcune patologie acute e croniche, le purine e le pirimidine agiscono come modulatori diretti della neurodegenerazione e della neuroinfiammazione, attraverso l'interazione con i recettori espressi dalle cellule del sistema nervoso centrale ed innescando la variazione dei diversi fenotipi cellulari che caratterizzano queste popolazioni del sistema nervoso centrale (Di Virgilio et al.,2009; Giuliani et al., 2018). I recettori purinergici si suddividono in due grandi famiglie P1 e P2; a loro volta sono classificati in quattro sottotipi di recettori metabotropi della classe P1 che legano l'adenosina, sette canali ionici della classe P2X per l'ATP ed otto sottotipi P2Y accoppiati a proteine G che hanno come ligandi diversi nucleotidi tra i quali ATP / ADP e UTP/UDP (Ralevic et al.,1998).

Uno screening farmacologico con ligandi selettivi ha mostrato la presenza simultanea di numerosi recettori purinergici sulla microglia, vale a dire A1, A2A, A2B, A3, sottotipi P2X1,4,7 e P2Y1,2,4,6,12,13 (Kettenmann et al.,2011; Fukumoto et al., 2018), che intervengono nel modulare diverse caratteristiche fenotipiche e funzioni della microglia, compresa la motilità delle ramificazioni, il rilascio di citochine, la migrazione e la fagocitosi (Castellano et al.,2016).

Il sottotipo specifico P2X7 (Volonte et al., 2012) è un recettore ionotropo purinergico sensibile all' ATP espresso sulla superficie della membrana di cellule che sono in gran parte, ma non esclusivamente, di origine ematopoietica tra cui i macrofagi, i monociti e la microglia (Di Virgilio et al.,1999; Di Virgilio et al.,2017). P2X7 è un target di studio interessante per alcune condizioni patologiche di tipo neuroinfiammatorio, in quanto svolge un ruolo fondamentale nel rilascio di citochine pro-infiammatorie sia in tessuti periferici, a carico dei monociti macrofagi, sia a livello del sistema nervoso centrale, ruolo svolto dalle cellule della microglia. Un recente lavoro dal gruppo di Savio e collaboratori (Savio et al., 2018) ha mostrato anche un interessante potenziale ruolo neuroprotettivo dello stesso recettore P2X7.

Inoltre, i dati che vengono mostrati da Pascual e collaboratori (2011) supportano un modello nel quale l'attivazione della microglia induce a sua volta una rapida produzione di ATP. L'ATP rilasciato dalla microglia, recluta quindi gli astrociti, che amplificano ulteriormente il rilascio e la produzione di ATP ed altri nucleotidi che esacerbano il danno verso i neuroni limitrofi. E' stato dimostrato come i recettori purinergici espressi dalla microglia siano coinvolti in diverse patologie a carattere neurodegenerativo tra cui la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), ed in questo ambito la prima evidenza pubblicata risale al 2006 dove si dimostra in tessuti post mortem di pazienti SLA, una over espressione del recettore P2X7 responsabile del rilascio della citochina IL-1 β da parte di microglia attivata (Yangou et al., 2006).

1.3.2 Recettori serotoninergici

La serotonina è un importante neurotrasmettitore della famiglia delle monoamine coinvolto in un'ampia varietà di funzioni fisiologiche e comportamentali, al punto che una disregolazione del sistema serotoninergico può portare a diversi disturbi psichiatrici e neurologici. I recettori della serotonina non sono limitati al sistema nervoso centrale, ma sono anche espressi da cellule immunitarie come le cellule T, i macrofagi e le cellule dendritiche. In queste cellule, la serotonina agisce con un'azione antinfiammatoria e nello specifico, sulle cellule immunitarie periferiche influenza il rilascio di citochine (Muller et al., 2009), la maturazione delle cellule dendritiche e l'induzione dell'apoptosi (Kato et al., 2006). I recettori per la serotonina sono stati classificati in famiglie distinte, 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ con vari sottotipi (Filip e Bader, 2009). I risultati di Krabbe et al (2011) indicano che la microglia neonatale, ameboide e adulta esprime recettori funzionali per la serotonina del sottogruppo 5-HT₂. I recettori della serotonina sono presenti anche sulla microglia per modulare la migrazione e l'attività fagocitica e questo aspetto è stato dimostrato sia in studi in vitro che in vivo (Krabbe et al., 2012). Anche per quanto riguarda i recettori serotoninergici espressi dalla microglia sono anch'essi implicati nella patogenesi di diverse patologie tra cui la SLA.

1.3.3 Recettori istaminergici

Tra i neurotrasmettitori che interagiscono con la microglia gioca un ruolo centrale in diverse malattie neurologiche (Volonte et al., 2015) l'istamina; questo aspetto è stato dimostrato solo recentemente e come per le due precedenti classi recettoriali, anche l'istamina rappresenta una molecola segnale implicata nei processi fisiopatologici della SLA, sia durante la progressione della patologia dimostrato in modelli animali di SLA, così come è stata ritrovata in tessuti post mortem di corteccia cerebrale e midollo spinale di pazienti SLA. In particolare, principalmente attraverso l'attivazione di recettori del tipo H₁R e H₄R, l'istamina riduce l'espressione di marcatori proinfiammatori come NADPH ossidasi 2 e NF- κ B, mentre aumenta l'espressione di marker antinfiammatori come arginasi 1, CD163, CD206, IL-10 e P2Y₁₂ (Apolloni et al., 2017).

1.3.4 Recettori cannabinoidi

Le cellule della microglia nel cervello umano e di topo/ratto esprimono anche i recettori per gli endocannabinoidi cannabinoidi (CB) di tipo CB₁ e CB₂ che sono accoppiati a G_{i/o} e proteine G_i. In generale, l'attivazione di questi recettori aumenta la proliferazione della microglia e riduce la neurotossicità

della microglia, mostrandosi quindi potenzialmente neuroprotettivo. Yiangou e collaboratori hanno dimostrato come i recettori CB2 sono up-regolati nella microglia attivata nel cervello dei pazienti con SLA (Yiangou et al.,2006). Inoltre, Bilsland e Greensmith hanno dimostrato come sostanze agoniste dei recettori cannabinoidi inducono azioni anti-glutamatergiche e antinfiammatorie attraverso l'attivazione rispettivamente dei sottotipi CB1 e CB2. Nello specifico, l'attivazione di CB1 inibisce il rilascio di glutammato dai terminali presinaptici e riduce l'afflusso di calcio postsinaptico in risposta alla stimolazione del recettore del glutammato. D'altra parte, CB2 influenza invece la neuro-infiammazione, riducendo l'attivazione della microglia e la secrezione di mediatori neurotossici (Bilsland et al.,2008). Questi risultati contrastanti, a quanto pare, potrebbero suggerire che l'effetto bifasico di un trattamento con sostanze cannabinoidi possa interferire sia con gli effetti benefici che con quelli potenzialmente dannosi della microglia, in base alle diverse fasi di attivazione. La capacità dei cannabinoidi di colpire molteplici vie di segnale neurotossiche o neuroprotettive della microglia possono quindi aumentare il loro potenziale terapeutico nel trattamento di condizioni patologiche che vedono le cellule della microglia direttamente coinvolte.

1.3.5 Recettori glutamatergici

I recettori del glutammato sono largamente espressi dalle cellule gliali, la loro attivazione esercita numerosi effetti cruciali per la funzionalità della glia e per l'interazione glia-neuroni in condizioni fisiologiche e patologiche. Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio a struttura amminoacidica del cervello. Una volta rilasciato a livello presinaptico, principalmente attraverso un meccanismo vescicolare esocitotico, attiva recettori ionotropi postsinaptici (recettori AMPA, NMDA, kainato), per garantire una rapida trasmissione sinaptica (Dingledine et al.,1999), tuttavia il glutammato è in grado anche di attivare recettori glutamatergici metabotropi (mGluR), con una cinetica di trasduzione più lenta rispetto a quelli ionotropi, ed i quali, spesso attraverso un meccanismo a *feedback* negativo sul bottone pre-sinaptico, modulano il rilascio del glutammato stesso, ma nel contempo regolano anche importanti meccanismi e funzioni post-sinaptiche come le correnti eccitatorie o inibitorie dei neuroni limitrofi, piuttosto che l'attività di altre cellule che circondano la biofase sinaptica quali appunto gli astrociti e le cellule della microglia (Conn et al., 1997).

I recettori metabotropi del glutammato (mGluR) sono recettori accoppiati a proteine G, includono otto sottotipi classificati in tre gruppi (I, II e III) in base all'omologia di sequenza, meccanismo di trasduzione del segnale e profilo farmacologico.

Il gruppo I include i recettori mGluR1 e mGluR5, che si accoppiano a una proteina Gq con conseguente attivazione della fosfolipasi C (PLC), come

mostrato nella Figura 3. I recettori del gruppo I sono principalmente localizzati nel compartimento postsinaptico, e alla loro attivazione consegue un aumento dell'eccitabilità cellulare.

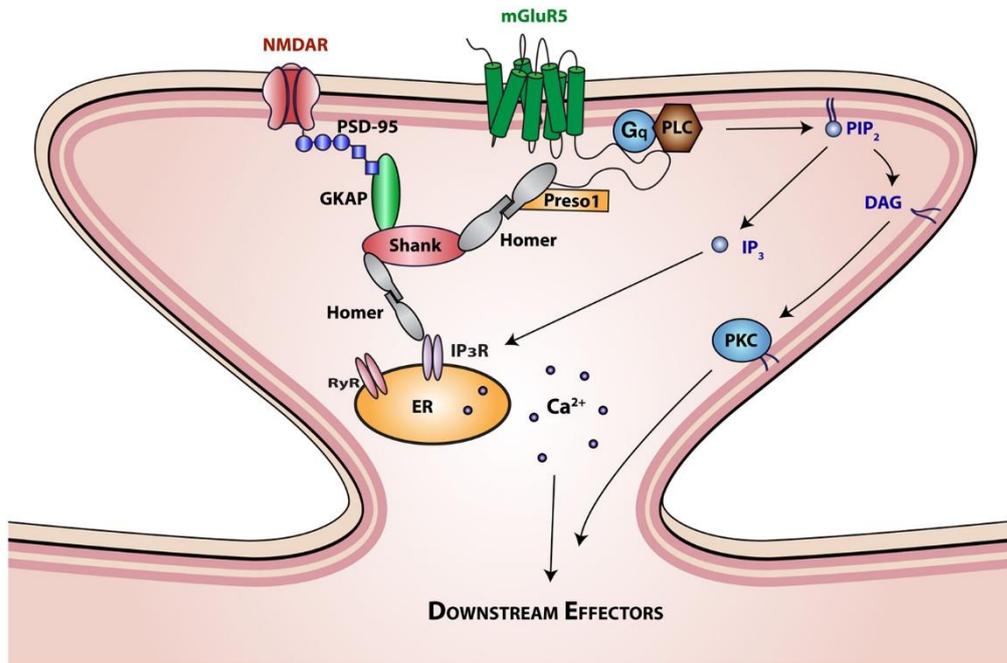


FIGURA 3. Rappresentazione della trasduzione del segnale del recettore mGluR5. Tratto da (Piers et al.,2012).

Il gruppo II (mGluR2, mGluR3) e il gruppo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) si accoppiano a proteine Gi / Go e inibiscono l'adenilato ciclasi (AC); a differenza dei recettori del gruppo I, i recettori del gruppo II / III sono generalmente presinaptici e la loro attivazione riduce il rilascio di glutammato diminuendo l'eccitabilità.

L'attivazione dei recettori mGluR sulla neuroglia sia in condizioni fisiologiche che patologiche media numerose azioni essenziali sia per le cellule gliali stesse, sia per l'interazione tra glia e neuroni. Tuttavia, i recettori mGluR espressi da astrociti e microglia sono coinvolti anche nel modulare processi di morte cellulare e attività neurologiche sia in diverse situazioni patologiche acute che in condizioni di disturbi neurodegenerativi cronici. Questi ultimi effetti sono complessi e bidirezionali e dipendono spesso dalla tipologia del sottotipo mGluR che viene attivato.

Sia l' mRNA che codifica per il recettore mGluR5 sia la proteina sono stati ritrovati espressi sia in linee cellulari di microglia, sia in colture di microglia provenienti dalla corteccia cerebrale (Biber et al.,1999; Byrnes et al., 2009;

Loane et al., 2009). Sebbene un' evidenza indichi che i recettori mGluR5 non siano espressi dalla microglia quiescente "M0" nel cervello sano (Mudo et al., 2007), dopo un trauma al midollo spinale o trauma cranico si nota una significativa espressione di mGluR5 nella microglia attivata nelle vicinanze della lesione (Byrnes et al., 2009; Drouin-Ouellet et al., 2011). Al contrario, i recettori mGluR1 non sono espressi dalla microglia in coltura (Biber et al., 1999; Byrnes et al., 2009); tuttavia, nelle lesioni di sclerosi multipla dell'uomo, l'immunoreattività del recettore è co-localizzata in un sottoinsieme di cellule della famiglia microglia / macrofagi (Geurts et al., 2003). Le colture di microglia esprimono anche l' mRNA e le proteine dei recettori mGluR2 e mGluR3 (Taylor et al., 2002). Per quanto riguarda il gruppo III la microglia esprime i recettori mGluR4, mGluR6 e mGluR8, ma non mGluR7 (Taylor et al., 2003). Per la loro espressione diffusa in tutto il sistema nervoso, ma soprattutto per i meccanismi modulatori che mediano, i recettori mGluR sono riconosciuti come promettenti bersagli terapeutici (Conn et al., 2003). In effetti, alcuni ligandi mGluR sono attualmente in fase di sviluppo clinico per il trattamento di una varietà di disturbi come la sindrome dell'X fragile, la schizofrenia, il morbo di Parkinson e discinesie indotte da L-dopa, disturbo d'ansia generalizzato e il dolore cronico (Nicoletti et al., 2010). Dal momento che in letteratura sono estremamente limitati gli articoli che trattano questo argomento, nel testo di questa tesi saranno messi in evidenza in particolare i ruoli fisiopatologici dei recettori metabotropi glutammatergici del gruppo I espressi dalle cellule di microglia, ed il loro coinvolgimento in una specifica patologia neurodegenerativa quale la sclerosi laterale amiotrofica.

1.3.6 Altri recettori presenti sulla microglia

Oltre a quanto descritto nei paragrafi precedenti è corretto ricordare che, seppure non ancora studiati approfonditamente, la microglia esprime diversi recettori per altri neurotrasmettitori (Kettenmann et al., 2011; Lui et al., 2016) come recettori GABA_A e GABA_B (1a, 1b, 1c) per il GABA, recettori colinergici (nAChRs, sottotipi $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 4$) per l'acetilcolina, recettori adrenergici che legano adrenalina e noradrenalina ($\alpha 1A$, $\alpha 2A$, $\beta 1$, $\beta 2$) e così come l'espressione di recettori dopaminergici funzionali per la dopamina (sottotipi D1-4).

CAPITOLO 2

RUOLI FISOPATOLOGICI DEI RECETTORI METABOTROPI GLUTAMMATERGICI DEL GRUPPO I ESPRESSI DALLA MICROGLIA

2.1 Evidenze a supporto dell'espressione dei recettori mGluR1-5 nelle cellule di microglia

Gli studi che seguono illustrano le prime evidenze che dimostrano la presenza dei recettori mGluR1-5 espressi dalla microglia; sono state ottenute mediante l'utilizzo di agonisti ed antagonisti selettivi, ed hanno mostrato a volte risultati contrastanti soprattutto per quanto riguarda le risposte cellulari innescate in seguito all'attivazione e/o all'inattivazione, di tali recettori sia in situazioni fisiologiche che patologiche.

Nello studio condotto da Biber et al (1999) viene mostrato per la prima volta come la stimolazione della microglia in coltura con l'agonista trans-(1S,3R)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic acid (1S,3R-ACPD) induca l'aumento del calcio intracellulare con una dipendenza dalla concentrazione e dal tempo simile a quanto osservato in colture di astrociti corticali che notoriamente esprimono il recettore glutammatergico mGluR5. Questi sono stati i primi risultati che dimostrarono l'espressione dei recettori mGluR, in particolare, mGluR5, nella microglia. Risultati contrastanti sono stati riportati da Whittemore et al. (1993), che non ha trovato alcuna segnalazione del calcio intracellulare nella microglia stimolata con l'agonista 1S, 3R-ACPD. Le ragioni di questa discrepanza non sono state chiaramente investigate tuttavia, essendo le cellule di microglia una popolazione immuno-competente del sistema nervoso centrale, in grado di essere attivata da diversi stimoli e fattori rilasciati durante condizioni patologiche come traumi, ischemie e stati di neurodegenerazione, e considerando che il glutammato rappresenta uno di questi fattori, si può speculare che la microglia potrebbe essere attivata proprio dal recettore metabotropo mGluR5.

A conferma di queste prime evidenze e teorizzazioni sulla presenza di recettori metabotropi glutammatergici del gruppo I espressi dalla microglia, ci sono state successivamente numerose pubblicazioni di seguito citate. In generale è stato dimostrato come molecole agonisti del gruppo I siano in grado di innescare in colture di microglia l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), che porta al rilascio di calcio e attivazione della protein chinasi C (PKC; Karim et al.,2001). Inoltre, l'attivazione della PKC può causare l'*up-regulation* dei canali del potassio rettificanti entranti e ridurre con feedback negativo l'attivazione della microglia (Eder et al.,1998). I fenomeni di segnalazione a valle dei meccanismi di trasduzione del segnale metabotropico includono la via delle MAPK, ERK1 e ERK2, le quali vengono inibite da antagonisti selettivi di mGluR5 ed mGluR1 come MPEP e CPCCOEt (Karim et al.,2001; Warwick et al.,2005). Nella microglia in coltura, l'attivazione selettiva dei recettori mGluR5 da parte di CHPG ((RS)-2-cloro-5-idrossifenilglicina) o dalla combinazione di un agonista dei recettori mGlu del gruppo I DHPG [(S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine] ed un antagonista del recettore mGluR1 (CPCCOEt) attenua l'attivazione indotta da LPS o interferone- γ della

microglia stessa (Byrnes et al.,2009; Loane et al.,2009; Byrnes et al.,2009; Farso et al.,2009), oltre a ridurre l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno, la produzione di TNF α ed i livelli di ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) e conseguente rilascio di NO. Gli agonisti del gruppo I causano l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), che porta al rilascio di calcio e attivazione della protein chinasi C (PKC; Karim et al.,2001).

Nello studio di Loane et al (2009), si mostra come la microglia esprima recettori mGluR5 funzionali e come la loro attivazione diminuisca il rilascio di mediatori infiammatori da parte della microglia e la neurotossicità correlata. Inoltre, si dimostra che gli effetti protettivi derivati dall'attivazione dei recettori mGluR5 nella microglia sono mediati anche attraverso l' inibizione dell'enzima NADPH ossidasi e si suggerisce quest'ultima come una nuova strategia con rilevanza terapeutica per ridurre la neuroinfiammazione in molti disturbi neurologici che mostrano una neurodegenerazione mediata dalla microglia.

Anche se inizialmente soltanto mRNA codificante per il recettore mGluR5 era stato ritrovato espresso dalla microglia (Biber et al., 1999), in realtà anche il sottotipo recettoriale mGluR1 può essere presente in questa popolazione cellulare. I recettori mGluR1 sono infatti espressi da un gran numero di cellule all'interno del sistema nervoso centrale, inclusi i neuroni, le cellule meninge, gli astrociti, le cellule T e B e anche dalla microglia. Inoltre, è stato visto che gli agonisti di mGluR1 aumentano la proliferazione delle cellule T e promuovono l'attivazione della cascata del segnale delle MAPK, aumentando l'infiammazione (Pacheco et al.,2004). Pertanto, gli antagonisti di mGluR1 possono avere molteplici azioni terapeutiche dopo un trauma del SNC. Ad esempio, dopo una lesione del midollo spinale, un trattamento con l'antagonista non selettivo mGluR AIDA migliora il recupero locomotore precoce, (Mills et al.,2002). Gli effetti benefici sono mediati dal recettore mGluR1, in quanto sono stati riprodotti gli stessi effetti con l'antagonista specifico per mGluR1 LY367385, ma questo non accade con l'antagonista selettivo mGluR5 MPEP. Gli antagonisti di mGluR1 si sono dimostrati protettivi anche in modelli di trauma cranico. Inoltre, l'antagonista mGluR1, YM-202074, è neuroprotettivo dopo evento di ischemia cerebrale (Kohara et al.,2008). Dopo occlusione dell' arteria cerebrale mediana nei ratti, la somministrazione di YM-202074, entro 2 ore dall'insorgenza dell'ischemia, ha infatti ridotto significativamente il volume di infarto nel cervello e ha migliorato il quadro neurologico (Kohara et al.,2008).

I risultati dello studio condotto da Farso et al.,(2009) confermano le evidenze descritte precedentemente confermando l' azione antinfiammatoria mediata da (S) -3,5-DHPG nei confronti della microglia, in coltura, attivata da LPS. Nel complesso, i ligandi selettivi dei recettori mGluR del gruppo I possono rappresentare un potenziale strumento farmacologico per ridurre l'attivazione della microglia e attenuare, potenzialmente, la neuroinfiammazione.

2.2 Ruolo dei recettori mGluR del gruppo I nei fenomeni di neuroinfiammazione generati dalla microglia

Negli ultimi anni, nell'ambito della neuroimmunologia è stato attribuito un grande rilievo al ruolo fisiopatologico della microglia, cellule che raggiungono il sistema nervoso centrale nella vita embrionale molto prima degli astrociti ed anche prima dell' inizio della vera neurogenesi corticale. Tuttavia, la natura dei segnali che attraggono i progenitori della microglia nel cervello in via di sviluppo è ancora controverso. Il fattore stimolante le colonie di macrofagi (CSF1) è un fattore di crescita ematopoietico coinvolto nella proliferazione, differenziazione, e sopravvivenza di monociti, macrofagi e cellule progenitrici del midollo osseo. Il mantenimento della popolazione microgliale nel sistema nervoso centrale dipende dal recettore CSF1 e dal suo ligando IL-34, poiché il blocco del recettore CSF1 e la delezione di IL-34 inducono un depauperamento della microglia nel sistema nervoso centrale (Ulland et al.,2015). L'ATP extracellulare rappresenta un ulteriore segnale per la migrazione della microglia nel sistema nervoso centrale durante lo sviluppo. Infatti, il danno o la morte di cellule progenitrici neurali durante lo sviluppo provoca un massiccio rilascio extracellulare di molecole purinergiche come l'ATP, che a sua volta si comporta come un segnale di allarme che porta all' infiltrazione della microglia nel SNC e conseguente fagocitosi di cellule progenitrici neurali danneggiate o morte (Casano et al.,2016). Non sorprende che l'ATP sia il mediatore chiave dei processi di espansione e migrazione della microglia nei siti di lesione anche in età adulta (Davalos et al.,2005). A seconda della regione del cervello, la microglia rappresenta circa il 5%–12% delle cellule non neuronali nel sistema nervoso centrale; sono cellule molto attive simili alle cellule immunitarie periferiche e ai macrofagi non parenchimali. Tuttavia, possiedono programmi di trascrizione unici rispetto ad altri macrofagi residenti nei tessuti o ai monociti cerebrali (Butovsky et al.,2014; Cronk et al.,2018). Diverse malattie acute e croniche possono modificare la morfologia e l'identità trascrizionale della microglia che può assumere ben diversi profili fenotipici, convenzionalmente classificati come M0, M1 e M2 (Geloso et al.,2017; Cunningham et al.,2013) come già accennato nel capitolo precedente. Questi stati si alternano ciclicamente sotto l'influenza di diverse segnali come citochine, chemochine e fattori di crescita. Il ruolo della microglia durante le condizioni patologiche è duplice, può essere benefico o deleterio; mediando l'immunità parenchimale del cervello, la microglia esibisce una miriade di funzioni. È stato proposto ad esempio come l'infiammazione sistemica dia luogo all'espressione di diversi fenotipi pro-infiammatori della microglia che, mantenendo un'attivazione persistente possono a loro volta causare deleterie risposte immunitarie che peggiorano la morte neuronale. In diversi stati patologici del SNC la microglia può essere attivata da eventi infiammatori instaurati precedentemente o da una predisposizione genetica nel rispondere

più vigorosamente ad una successiva stimolazione infiammatoria. Questo evento trasformerebbe quindi una risposta infiammatoria adattativa del SNC in un'infiammazione sistemica, provocando conseguenze permanenti deleterie e definibili patologiche.

La neuroinfiammazione mediata dalla microglia è implicata in diversi disturbi neurologici causati sia da lesioni acute come l'ictus sia da patologie neurodegenerative croniche. Come accennato nei precedenti paragrafi, la microglia attivata produce specie reattive dell'ossigeno (ROS), proteasi, citochine, prostanoide e monossido di azoto (NO). Un tipico meccanismo in grado di generare citotossicità che può spiegare la maggiore vulnerabilità del tessuto nervoso ad eventi legati all'infiammazione è rappresentato dall'eccitotossicità da glutammato. I risultati suggeriscono che la produzione di aminoacidi eccitatori (EAA) può essere infatti uno dei determinanti critici della risposta maladattiva della microglia. In questo ambito, è stato dimostrato che i recettori glutammatergici mGluR del gruppo I, attraverso l'interazione con le proteine Homer, possono influenzare i meccanismi di segnalazione a valle dell'attivazione dei recettori NMDA (Benarroch et al., 2008), aumentandone la neurotossicità e incrementando il rilascio di acido arachidonico (Allen et al., 2001). La microglia oltre ovviamente allo stesso glutammato, può produrre diversi agonisti dei recettori glutammatergici come il chinolinato e la D-serina (Barger et al., 2004). In diverse patologie come il morbo di Alzheimer, l'encefalite da HIV, la sclerosi multipla, l'ischemia cerebrale, il trauma cranico e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è presente una connessione tra infiammazione ed eccitotossicità. È stato dimostrato che la maggior parte del glutammato rilasciato dalla microglia attivata potrebbe essere attribuito allo scambiatore Xc (Barger e Basile, 2001; Barger et al., 2007), che si basa su un antiporto glutammato / cistina che risiede nel plasmalemma della maggior parte delle cellule. Questo meccanismo diventa estremamente attivo nella microglia perché rappresenta la principale via di internalizzazione della cistina usata per la produzione di glutatione. Dal momento che la microglia attivata produce abbondanti quantità di ROS, è sottoposta ad un grave stress ossidativo e di conseguenza richiede un'elevata produzione di glutatione. Nonostante gran parte dei radicali superossidi sono prodotti dalla NADPH ossidasi e rilasciati nello spazio extracellulare, può capitare che si generino anche all'interno della cellula stessa (Kobayashi et al., 2001); pertanto, l'eccesso di specie ossidanti ossidativo all'interno della cellula microgliale crea una carenza di glutatione (GSH) che è alleviata dall'ingresso di cistina attraverso l'antiporto Xc, mentre il glutammato viene estruso per ripristinare l'equilibrio (Barger et al., 2007). Il glutammato estruso attiva a sua volta tutti i bersagli sulle cellule limitrofe, ma anche espressi sulla microglia stessa quali recettori ionotropi e metabotropi, con conseguenti effetti citotossici sia diretti che indiretti. La NADPH ossidasi è un complesso enzimatico a cui è affidato un ruolo chiave nella produzione

di ROS da parte della microglia. La proteina chinasi C (PKC) e la MAPK mediano la fosforilazione delle subunità citosoliche che traslocano assemblandosi con le subunità di membrana a formare l'enzima NADPH ossidasi attivo (Choi et al., 2005; Zhao et al., 2005). Tra i vari fattori che possono attivare questi fenomeni proprio i recettori glutammatergici mGluR del gruppo I, tra cui il sottotipo mGluR5, determinano come meccanismo a valle proprio l'attivazione della PKC e quindi indirettamente l'enzima NADPH ossidasi attivo. La NADPH produce a sua volta O_2^- , che viene convertito in derivati superossidi come il perossido di idrogeno, il radicale idrossilico e il perossinitrilico, altamente neurotossici. (Block et al., 2007; Qin et al., 2004). La formazione di ROS ha importanti effetti sulla microglia stessa, attivando pathway pro-infiammatorie attraverso la via delle MAPK e NF κ B. Quest'ultimo induce la trascrizione di mediatori pro-infiammatori come iNOS, ossido nitrico (NO) e il fattore di necrosi tumorale (TNF); questi fattori generano un ciclo di auto-propagazione che causa un'attivazione prolungata della microglia e neuroinfiammazione.

2.3 Rilascio di vescicole extracellulari dalla microglia e modulazione da parte del recettore mGluR5

Come accennato nel capitolo introduttivo, la microglia influisce sulle attività neuronali mediante il rilascio di diversi mediatori, ma recentemente, è stato descritto un meccanismo aggiuntivo di comunicazione intercellulare presente in diversi tipi di cellule, tra cui cellule gliali ovvero le vescicole extracellulari. Queste entità subcellulari sono note come microvescicole (MV), macrovescicole ed esosomi, e differiscono molto per dimensioni, contenuto e origine; si formano costitutivamente, o come nel caso della microglia, in seguito a stimolazione di recettori presenti sulla membrana citoplasmatica esterna. In particolare, le MV derivate dalla microglia diffondono nello spazio extracellulare come trasportatori di citochine, RNA, miRNA, ecc. verso le cellule limitrofe che fungono da riceventi questi segnali. Sebbene la cinetica precisa di questa interazione non sia completamente nota, il rilascio di MV da parte della microglia è un evento noto (Turola et al., 2012; Prada et al., 2013) e sembra essere coinvolto nel mediare la neurotossicità attraverso il trasferimento e propagazione di citochine proinfiammatorie (Bianco et al., 2005), o addirittura modulando lo stato di aggregazione della β -amiloide (Joshi et al., 2014). Inoltre, le MV sono state rilevate e aumentate di numero nel liquido cerebrospinale degli esseri umani e roditori in condizioni di infiammazione cerebrale, suggerendo il loro ruolo nella progressione e nella diffusione del processo infiammatorio (Verderio et al., 2012).

I risultati mostrano che il rilascio di MV è direttamente innescato dall'attivazione del recettore P2X7 nella microglia, ma ancora più interessante, è significativamente aumentato in seguito alla stimolazione del recettore mGluR5 con CHPG. In accordo con la maggiore risposta indotta da CHPG, si forma una maggiore quantità di MV e, quando vengono trasferite a colture neuronali, la tossicità indotta dal rotenone, sia come vitalità cellulare che come formazione di ROS, risulta essere aumentata. È stato segnalato che le MV derivate dalla microglia trasportano principalmente la citochina proinfiammatoria interleuchina-1b (Bianco et al., 2005) che può mediare l'interazione con altre cellule della microglia ed i neuroni, oltre che diffondere e propagare la reazione infiammatoria (Verderio et al., 2012; Prada et al., 2013), rafforzando così il processo neuroinfiammatorio (Colombo et al., 2012). Tuttavia, quando le MV derivano dalla microglia trattata con CHPG, la tossicità indotta dal rotenone è significativamente aumentata, suggerendo di nuovo che la segnalazione glia-neurone mediata da MV può essere modulata e nello specifico amplificata con la stimolazione del recettore mGluR5.

I miRNA sono tra i fattori che hanno guadagnato una crescente attenzione per il loro ruolo nella comunicazione glia- neuroni (Su et al., 2016). I miRNA trasferiti attraverso le vescicole extracellulari, sia dalla microglia che dagli astrociti, hanno dimostrato influenzare la vitalità neuronale (Hu et al., 2012; Saba et al., 2012; Mao et al., 2015; Tang et al., 2016; Coleman et al., 2017). In particolare il miR146a è stato ritrovato altamente espresso nelle cellule gliali (Li et al., 2011), è sovra-regolato da segnali pro-infiammatori (Lukiw et al., 2008) e controlla negativamente diversi geni coinvolti nella risposta infiammatoria (Lukiw et al., 2008; Li et al., 2011). La stimolazione del recettore mGluR5 nelle cellule della microglia BV2 aumenta l'espressione di miR146a che, dopo la stimolazione del recettore P2X7, viene inserito nelle microvescicole e diffonde alle cellule vicine. È interessante notare che anche la microglia stimolata da LPS sovra-regola miRNA146a nelle MV. I miRNA trasferiti tramite MV possono contribuire all'interazione tra microglia e neuroni rappresentando così un nuovo bersaglio terapeutico per contrastare la neuroinfiammazione.

2.4 Trauma cranico e ruolo dei recettori mGluR1-5 espressi dalla microglia

La lesione cerebrale traumatica (TBI) è una condizione clinica comune e spesso pericolosa per la vita; circa il 30-35% dei pazienti con trauma cranico moderato o grave muore entro i primi 30 giorni dal ricovero ospedaliero, mentre i sopravvissuti soffrono spesso di disfunzioni motorie e neuropsicologiche, perdendo così la capacità di svolgere le normali attività della vita quotidiana (Corps et al., 2015) (Ghajar et al., 2000). Il trauma cranico (TBI) provoca morte

cellulare e disfunzioni neurologiche sia attraverso il danno fisico al tessuto o alle vie di segnalazione (lesione primaria), sia tramite meccanismi fisiopatologici molecolari e cellulari ritardati (lesione secondaria), potenzialmente reversibili, che portano a un progressivo danno sia della materia grigia che di quella bianca (Loane et al.,2010). Tale lesione ritardata inizia nel giro di alcuni secondi o minuti dopo l'insulto traumatico e può continuare per giorni, settimane, ma potenzialmente per mesi o anni (Bramlett et al.,2007). Questi processi sono caratterizzati dalla morte delle cellule neuronali, così come dall' infiltrazione e attivazione delle cellule del sistema immunitario circolante, come macrofagi e linfociti, e l' attivazione della microglia residente (Loane et al.,2010). Dopo il trauma cranico, la microglia si attiva e subisce marcati cambiamenti nella morfologia e nel comportamento. Dopo attivazione, la microglia contrae le ramificazioni e si trasforma, passando da una morfologia cellulare ramificata ad una ameboidale, seguita da proliferazione e migrazione verso il sito della lesione (Figura 4; Davalos et al.,2005). Studi clinici sull'uomo e pre-clinici su animali, indicano che la neuroinfiammazione sostenuta soprattutto dalla microglia post-traumatica persiste per mesi o anni dopo le lesioni cerebrali (Wilson et al.,2004) (Gentleman et al.,2004) e può contribuire a deficit neurologici significativi connessa a neurodegenerazione cronica. (Smith et al., 1997; Bendlin et al., 2008).

Nello studio di Byrnes e collaboratori (2012) si dimostra che, a seguito di TBI, nel modello sperimentale murino, ottenuto mediante impatto corticale controllato (CCI), il recettore mGluR5 è cronicamente espresso nella microglia reattiva, e come la somministrazione dell'agonista selettivo mGluR5 CHPG, in un'unica dose un mese dopo il trauma cranico, inibisce la successiva e persistente neuro-infiammazione post-lesione riduce il numero di microglia che esprime la NADPH ossidasi come marcatore dello stato attivato. Il trattamento ritardato sopra descritto riduce significativamente la perdita di tessuto dopo il trauma e migliora il recupero sensomotorio e cognitivo a lungo termine. Poiché questo effetto è bloccato dalla somministrazione sistemica concomitante di un antagonista selettivo mGluR5, le azioni terapeutiche sono attribuite quindi all'attività specifica del CHPG sul mGluR5. In particolare, la somministrazione di CHPG in un'unica dose, un mese dopo il trauma cranico ha ridotto specificatamente l'espressione della NADPH ossidasi nella microglia reattiva, e l'effetto è stato confermato fino a quattro mesi dalla lesione. Questi dati suggeriscono la presenza di un feedback positivo che porta ad un incremento della neuroinfiammazione la quale contribuisce alla neurodegenerazione ritardata e relativi deficit funzionali. L'interruzione di questo ciclo di feedback positivo, attraverso l'attivazione del recettore mGluR5 espresso dalla microglia attivata, può spiegare perché anche una singola iniezione di CHPG somministrata dopo un mese dal trauma acuto,

inibisce la neuroinfiammazione cronica e limita la perdita funzionale in questo modello di studio.

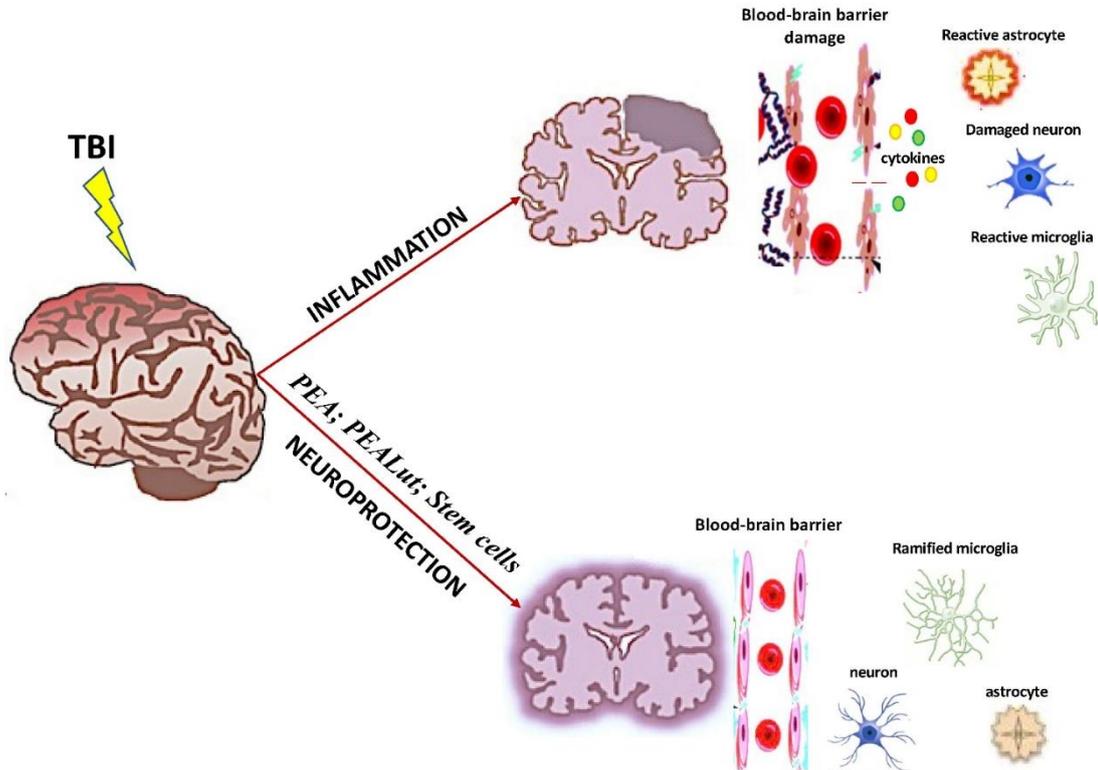


FIGURA 4. Eterogeneità fisiopatologica rilevata nel trauma cranico. Tratto da: (Crupi et al.,2020)

2.4.1 Connessione tra i recettori mGluR5 espressi dalla microglia e il sistema immunitario, nel TBI

Nello studio di Yang e collaboratori (2017), per la prima volta, si riporta l'importante effetto modulatore che il recettore mGluR5 esercita sulle cellule immunitarie circolanti, influenzando la progressione dell'infiammazione cerebrale. Le cellule immunitarie residenti nel cervello ed i globuli bianchi circolanti sono i principali attori del danno infiammatorio post-trauma cranico. I neutrofili sono le prime cellule immunitarie periferiche che attraversano la barriera emato-encefalica (BEE) e si infiltrano nel cervello dopo TBI, contribuendo alla lesione infiammatoria del cervello durante la fase acuta (Corps et al.,2015;Ransohoff et al.,2012). In un modello di TBI nel topo, si è scoperto (Yang et al.,2017) che il knockout

(KO) del recettore mGluR5 riduce significativamente l'infiltrazione dei neutrofili e l'espressione di citochine infiammatorie nel cervello, 24 ore dopo il trauma cranico, accompagnato da un miglioramento del quadro clinico neurologico; questo conferma l'importante effetto di mGluR5 nella regolazione della risposta infiammatoria acuta nel TBI e suggerisce che questa modulazione non è limitata alle cellule residenti nel cervello, ma coinvolge anche il sistema immunitario circolante. Ulteriori indagini hanno indicato come l'ablazione di mGluR5 nel topo abbia ridotto la permeabilità della barriera emato-encefalica(BEE), l'ingresso dei neutrofili nel cervello e ha notevolmente diminuito i livelli di mRNA codificanti per le chemochine associate ai neutrofili infiltrati nel tessuto cerebrale, tra cui CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL4 e CCL5. La carenza di mGluR5 blocca la via di segnalazione mediata dalla protein-chinasi C (PKC), provocando l'inibizione dell'espressione di diverse chemochine. Oltre alla segnalazione attraverso PKC, mGluR5 attiva anche alcune vie PKC indipendenti, tra cui ERK e Akt (Chen et al., 2012); sebbene siano necessarie ulteriori indagini per rilevare se anche queste vie di segnalazione siano coinvolte, questi risultati mettono in luce un ulteriore ruolo di mGluR5 nel TBI.

I risultati mostrati in questi due paragrafi riferiti al ruolo di mGluR5 espressi dalla microglia nel TBI, evidenziano da un lato il ruolo chiave di questi recettori in un fenomeno traumatico molto diffuso e grave quale il TBI, dall'altro lato mostrano la complessa e duplice azione di questi recettori nelle due fasi del TBI. Nella fase acuta, un blocco di mGluR5 frena la massiva infiltrazione ed attivazione delle cellule del sistema immunitario verso l'area interessata dal trauma nel sistema nervoso centrale, diminuendo quindi l'insorgenza del processo neuro-infiammatorio e degenerativo. Nella fase tardiva invece, quando le cellule della microglia sovra-esprimono il recettore mGluR5, in questo caso una sua attivazione anche non necessariamente cronica, determina una modulazione negativa e benefica dei processi neurodegenerativi determinati dal protrarsi della neuroinfiammazione sostenuta dalla microglia attivata.

2.5 Ruolo dei recettori mGluR5 espressi su cellule di microglia nella lesione del midollo spinale (SCI)

La lesione del midollo spinale (SCI) è una condizione patologica grave che è accompagnata da danno e morte cellulare, emorragia, infiammazione, edema tissutale, squilibrio ionico, perdita assonale, demielinizzazione, attivazione del sistema immunitario, astrogliosi, nonché riorganizzazione del sistema

vascolare e dei circuiti neurali (Figura 5; Ban et al.,2019).

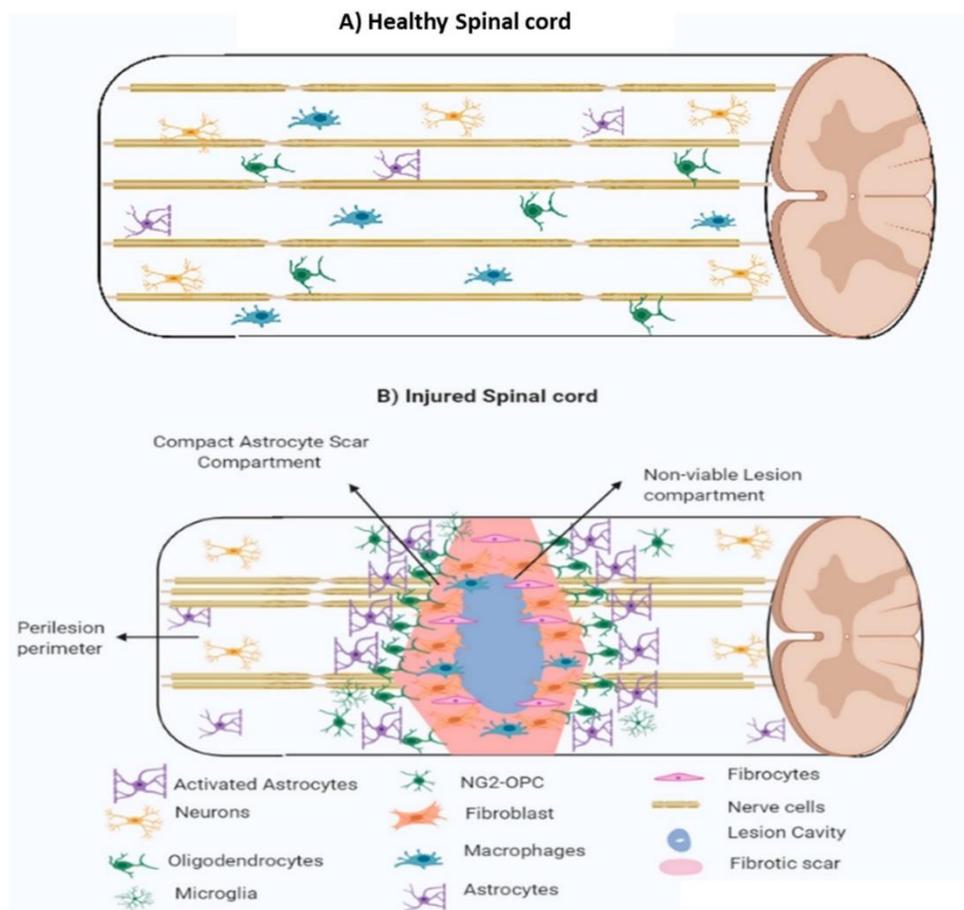


FIGURA 5. (A) Midollo spinale sano e (B) un midollo spinale danneggiato con tre compartimenti di lesione: un piccolo compartimento di lesione interno non vitale, un nucleo di astrociti compatto e un perimetro di perilesione con componenti multicellulari e multimolecolari (astrociti, neuroni, macrofagi, microglia, NG2- OPC, fibrociti, oligodendrociti, fibroblasti, cellule nervose e astrociti attivati) che regolano la gliosi post-SCI. Tratto da: (Anjum et al.,2020).

Nel trauma spinale e altri processi patologici simili come quello trattato precedentemente (TBI), la microglia residente nel SNC rapidamente risponde ai cambiamenti nel microambiente rilasciando citochine, leucotrieni e prostaglandine (Abdanipuor et al.,2013). In determinate circostanze, la microglia può esercitare un effetto protettivo attraverso la sintesi di fattori neurotrofici (Nakajima et al.,2004; Szepesi et al.,2018). Le più importanti funzioni della microglia nel SCI sono: la fagocitosi (rimozione di elementi tissutali danneggiati), il contrasto verso gli agenti infettivi che possono infiltrarsi approfittando della situazione di danno tissutale, ed il ripristino dell'omeostasi. La risposta infiammatoria dopo un trauma al midollo spinale è associata principalmente ad una compromissione della barriera ematoencefalica, seguita dal rilascio di citochine pro-infiammatorie e dall'attivazione di molecole di adesione nell' endotelio vascolare. Successivamente, monociti, linfociti, e macrofagi migrano verso l'area della lesione (Abdanipuor et al.,2013); la risposta infiammatoria può portare alla demielinizzazione locale e all'apoptosi dei neuroni. La microglia del midollo spinale risponde rapidamente al trauma: indirizza ed estende i processi citoplasmatici in direzione della lesione e forma una fitta rete che circonda il sito della lesione. La rapida espansione delle ramificazioni della microglia verso la lesione sono mediati dai recettori purinergici (P2Y₁₂R), che si legano all'ADP rilasciato da neuroni e astrociti danneggiati (David et al.,2011).

Durante i primi giorni dopo un infortunio, la microglia è il principale tipo di cellule con attività fagocitiche. Il ruolo protettivo della microglia è quello di fagocitare ed elaborare in modo efficiente la distruzione dei detriti di mielina derivanti dal danno neuronale (Gaudet et al.,2018; Kroner et al.,2019) fornendo le condizioni adeguate per favorire la rigenerazione degli assoni (Prewitt et al.,1997); gli effetti positivi della microglia compaiono durante la prima settimana dopo il trauma attraverso la formazione di una barriera al confine tra il tessuto connettivo in via di sviluppo e la cicatrice astrocitaria appena formata. La microglia attivata stimola la proliferazione degli astrociti e contribuisce alla formazione di una cicatrice astrocitaria, che confina il sito della lesione. Alcuni studi riportano la capacità della microglia di esprimere il fattore inibitorio della leucemia (LIF), che a sua volta, può aumentare la sopravvivenza degli oligodendrociti dopo una lesione midollare (Bellver et al.,2019; Kerr et al.,2005). Altri fattori neuroprotettivi, come il fattore di crescita neuronale (NGF), il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF) e il fattore neurotrofico derivante dalle cellule gliali (GDNF), vengono rilasciati dalle cellule microgliali durante questo processo patologico. Tuttavia, l'eccessiva stimolazione dell'attività della microglia può anche diventare deleterio accelerando il danno neuronale dopo una lesione spinale. Le cellule della microglia attivata secernono infatti anche mediatori come l'ossido nitrico, il radicale superossido, così come diversi tipi di citochine, tra cui interleuchine

IL-1, IL-6 ed il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), che possono influenzare direttamente o indirettamente l'attività neuronale, esercitando effetti neurotossici e neurodegenerativi. Le interazioni intercellulari che coinvolgono le cellule del sistema immunitario giocano un ruolo importante nel processo di recupero dopo una lesione del midollo spinale. Svariati studi dimostrano che i macrofagi isolati dal midollo spinale lesio inibiscono attivamente l'attività fagocitica della microglia e la produzione di citochine pro-infiammatorie, mentre la microglia aumenta la risposta fagocitica dei macrofagi (Kroner et al.,2019; Greenhalgh et al.,2018; Milich et al.,2019). Pertanto, è possibile mirare ad una potenziale terapia per SCI modulando l'interazione tra queste cellule. Di recente è diventato chiaro che non solo la presenza o assenza di microglia o macrofagi nel sito della lesione, ma anche il rapporto dei loro fenotipi, consente di determinare l'attività del processo patologico dopo SCI. L'equilibrio tra i diversi fenotipi cellulari pro- e anti-infiammatorio che si stabilisce presso il sito della lesione a partire circa dal settimo giorno dopo il trauma è cruciale per gli effetti citotossici acuti. Più tardi, 28 giorni dopo la lesione, microglia e macrofagi esprimono prevalentemente marcatori pro-infiammatori (Gaudet et al.,2018). Un cambiamento dell'equilibrio verso un fenotipo anti-infiammatorio microgliale nella fase acuta, può essere un potenziale efficace trattamento per SCI (Akhmetzyanova et al.,2019). In questo ambito possono entrare in gioco ancora una volta i recettori mGluR5 espressi dalla microglia.

Una lesione del midollo spinale (SCI) si traduce in una risposta patologica prolungata che include, l'attivazione microgliale, l'infiammazione cronica, e la formazione di cicatrici astrogliali che comportano lo sviluppo di profonde cavità nel sito della lesione, la perdita di materia grigia e soprattutto dei neuroni (Dumont et al.,2001; Tator et al.,2006), il tutto associato a deficit funzionali permanenti. I risultati dello studio di Kimberly e collaboratori (2009) forniscono una prima prova di come gli agonisti del recettore mGluR5 possono migliorare significativamente l'esito istopatologico e funzionale in seguito a SCI. La somministrazione dell' agonista CHPG per 7 giorni dopo il trauma si è infatti dimostrato in grado di migliorare notevolmente la funzionalità motoria, a partire da 14 giorni dopo l'infortunio. Inoltre, il trattamento farmacologico ha ridotto significativamente l'area che contraddistingue la perdita di tessuto lesio. L'attivazione di mGluR5 con CHPG in cellule di microglia ottenute da midollo spinale sopprime in modo significativo i marker di attivazione microgliale e tipici di un processo infiammatorio, come iNOS, NO, galectina-3 e la produzione di TNF α . e riduce la tossicità neuronale indotta dalla microglia stessa. Questi dati in vitro ed in vivo suggeriscono come l'attivazione di mGluR5 microgliale possa contribuire agli effetti protettivi di CHPG dopo SCI, tramite un meccanismo antinfiammatorio. Sebbene la galectina-3 indichi un coinvolgimento specifico

della microglia, non non si possono escludere possibili effetti di CHPG sui macrofagi circolanti e su altre cellule del SNC come gli astrociti, i quali esprimo, soprattutto in alcune condizioni patologiche, una maggior quantità di mGluR5.

Come già evidenziato nel capitolo precedente, è importante ricordare che l'influenza della microglia e dei macrofagi dopo un trauma al midollo spinale resta comunque un argomento controverso. È possibile che la tempistica (acuta o cronica) o la durata del trattamento determini effetti neuroprotettivi e neurotossici dati dall'attivazione della microglia/macrofagi. Inoltre, l'attivazione differenziale della microglia / macrofagi in momenti diversi di uno stato clinico, può provocare la perdita o la conservazione del tessuto interessatodal trauma (Rolls et al.,2008). Coerentemente con ciò l' effetto neuroprotettivo dato dalla modulazione della microglia dopo SCI è strettamente correlato al tempo; è stato dimostrato che, sebbene l'inibizione precoce del TNF α migliori il recupero, se si interviene invece eliminando totalmente il gene che ne codifica la trascrizione, questo compromette il processo di rigenerazione e guarigione (Farooque et al.,2001; Kim et al 2001). Gli effetti antinfiammatori dimostrati indicano che l'attivazione di mGluR5 può avere in generale multiple azioni neuroprotettive. I farmaci "multipotenziali" forniscono un' opzione terapeutica vantaggiosa perché modulano molteplici *pathway* coinvolte nella lesione secondaria. Poiché i recettori mGluR5 sono espressi su microglia, neuroni, oligodendrociti e astrociti, gli agonisti di mGluR5 possono avere molteplici effetti modulatori in-vivo (Byrnes et al., 2009) dal momento che sia la neuroinfiammazione che l'apoptosi neuronale caspasi-dipendente sono implicate in molti disturbi acuti e cronici a carattere neurodegenerativo (Bloch et al.,2005; Tansey et al.,2007; Yakovlev et al.,2001).

2.6 Ruolo dei recettori mGluR5 espressi dalla microglia nel disturbo dello spettro autistico (ASD)

I disturbi dello spettro autistico (ASD) sono gravi condizioni che riguardano lo sviluppo neurologico infantile aventi un'eziologia multifattoriale e poligenica. Ad oggi, la patogenesi dell'ASD rimane sconosciuta, tuttavia, il disturbo è altamente ereditabile con tassi di concordanza tra i gemelli monozigoti che raggiungono il 60% ed il 30% per i gemelli dizigoti (Hallmayer et al., 2011).

Nello studio di Zantomio e collaboratori (2015) si evidenziano le prove della presenza di alterazioni nella segnalazione glutamatergica nell'eziologia dell'ASD, con una particolare attenzione per il recettore mGluR5 codificato dal gene GRM5 e per quelli che sono i meccanismi di trasduzione a valle della sua

attivazione. Il funzionamento di mGluR5 è importante per la formazione delle sinapsi, la neuroplasticità la neuroprotezione ed nella long-term-potential (LTP); così come è stato inoltre descritto precedentemente, mGluR5 ha anche un ruolo di modulazione nei fenomeni di neuroinfiammazione. Il collegamento tra neuroinfiammazione ed ASD è supportata dall'aumento delle citochine pro-infiammatorie circolanti nel sangue e nel liquido cerebrospinale (CSF) e dall'aumento del numero di cellule residenti e del loro grado di attivazione nella corteccia prefrontale e dorsolaterale, rilevate in tessuti post-mortem (DLPFC). Ancora una volta, il recettore mGluR5 gioca un potenziale ruolo chiave nell'alterazione delle sinapsi e nella neuroinfiammazione osservate nell' ASD. Inoltre, molte varianti geniche rare sono state associate alla patogenesi dell'ASD come gli elementi codificanti SHANK2 e SHANK3 che fanno parte anch'essi della via di segnalazione di mGluR5 (Gai et al., 2012; Verpelli et al., 2011).

I dati provenienti da modelli murini mGluR5 knockout e forme sindromiche e non sindromiche di ASD sono stati studiati e discussi in relazione al modo in cui le alterazioni di mGluR5 sono associate ai sintomi di ASD.

Diversi studi hanno chiamato in causa il sistema glutammatergico nella patogenesi dell'ASD, con particolare incidenza nella sindrome dell' X fragile, la sclerosi tuberosa e la sindrome di Retts (Gipson e Johnston, 2012; Zhong et al., 2012).

La sindrome dell' X fragile è il risultato dell'espansione di una ripetizione trinucleotidica nel promotore del gene Fmr1 che limita patologicamente la sintesi della proteina Fmr (FMRP), una proteina legante l'RNA coinvolta nella plasticità sinaptica (Provenzano et al., 2012). La perdita di FMRP porta a una disregolazione della via di segnalazione a valle di mGluR5 e ad un aumento della long-term-depression (LTD); questo fenomeno è stato dimostrato nel modello murino di X-fragile/ASD knockout per il gene Fmr1 (Auerbach et al., 2011; Huber et al., 2002). FMRP sopprime la traduzione di mRNA che codificano per effettori a valle nella *pathway* di attivazione di mGluR5 e, in sua assenza si genera un aumento di traduzione di mRNA e conseguente e attivazione dei meccanismi di trasduzione del segnale a valle di mGluR5. Inoltre, in assenza di FMRP, mGluR5 ha un'associazione alterata con la proteina Homer che determina una attivazione costitutiva del recettore (Ronesi et al., 2012). La teoria mGluR' ipotizza che mGluR5 ed FMRP abbiano attività opposte nell' influenzare la plasticità neuronale. L'ipotesi è supportata da risultati che mostrano come gli antagonisti mGluR5 invertano comportamenti ASD simili in più fenotipi di sindrome dell' X fragile (Provenzano et al., 2012) così come è stato dimostrato che riducendo l'espressione di mGluR5 del 50% in topi knockout Fmr1, si ottiene un miglioramento dello score clinico (Dolen et al., 2007).

Questi studi forniscono la prova dell'esistenza di una connessione tra la segnalazione di mGluR5 e una forma sindromica di ASD, nello specifico nel

modello murino di sindrome dell' X fragile, con lo scopo di rafforzare l' ipotesi del ruolo di mGluR5 nella fisiopatologia dell'ASD.

Passando ad un'altra situazione neuropatologica è stato dimostrato come l' alterazione del gene MeCP2, un regolatore della trascrizione genica, causa la sindrome di Rett, ovvero una patologia neurologica che colpisce solo la sfera femminile, caratterizzata da un grave deficit cognitivo spesso associabile al quadro autistico. L'alterazione del gene MeCP2 è associato ad una riduzione di mTOR e ad una ridotta fosforilazione di S6, importanti per la traduzione delle proteine sinaptiche (Ricciardi et al., 2011). MeCP2 regola il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF), il *cAMP response element-binding protein* (CREB-1) e il fattore di crescita insulino simile (IGF-1), che mediano la via di segnale PI3K / Akt / mTOR / MAPK (Figura 6; Castro et al., 2013). È stato dimostrato che la fosforilazione di MeCP2 è necessaria per modulare il ridimensionamento sinaptico tramite l'attivazione di mGluR5 (Zhong et al., 2012). Questo aspetto si inserisce nel quadro trattato dal presente manoscritto in quanto la via di segnalazione mTOR modulata da mGluR5 è implicata anche nell'attivazione e proliferazione della microglia (Dello Russo et al., 2009). Numerose evidenze, come già accennato in precedenza, dimostrano che la microglia ha un ruolo rilevante nel *pruning* sinaptico (Schafer et al. , 2012) e sono stati osservati deficit cognitivo-sociale in topi con una carente segnalazione neurone-microglia (Shi et al., 2014). Molti altri secondi messaggeri e proteine nella segnalazione a valle di mTOR sono stati collegati all'ASD, tra cui eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) (Neves-Pereira et al., 2009) e la Phosphatase and tensin homolog (McBride et al., 2010).

Un significativo numero di geni candidati nella patogenesi di ASD codificano per proteine che interagiscono con mGluR5 comprese le proteine Shank1, Shank2 e Shank3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein) e l'omologo della proteina Homer 1 (Arons et al., 2012; Jiang ed Ehlers, 2013; Tu et al., 1999; Won et al., 2012). È particolarmente interessante come questi geni già candidati nell'eziopatogenesi dell'ASD convergano sul recettore NMDA, che a sua volta è stato associato all'ASD (Gandal et al., 2012). Più specificamente, mGluR5 potenzia l'attività del recettore NMDA, mentre la proteina Homer garantisce la localizzazione appropriata del complesso NMDAR/mGluR5 sulla membrana cellulare (Newell and Matosin, 2014). L'inserimento nella membrana cellulare è facilitato dalle molecole di adesione neuronale Neuroligina 3 e 4 e Neurexina 1, che sono state associate all'ASD (Sudhof, 2008). Il gene Shank3 interagisce con la Neuroligina e Neurexina per accoppiare la segnalazione pre e post-sinaptica nelle sinapsi eccitatorie glutamatergiche (Arons et al., 2012). Allo stesso modo, la proteina Homer accoppia mGluR5 ai messaggeri post sinaptici (Piers et al., 2012). È stato proposto che individui sani possano ospitare alcune di queste mutazioni candidate nella patogenesi di ASD (Sudhof, 2008) e che, a livello individuale, è probabile che rappresentino solo una minoranza dei casi di ASD. È indicativo

quindi che, come detto, un gran numero di queste mutazioni sinaptiche convergono sia spazialmente che funzionalmente sul recettore NMDA. Alla luce di ciò, è particolarmente rilevante che i modelli murini con *downregulation* del recettore NMDA, mostrino comportamenti ASD simili (Gandal et al., 2012). Quindi è possibile che alcune forme di ASD derivino da alterazioni di *pathway* del recettore NMDA, come emerge da una classe di mutazioni osservate in Homer, Shank e mGluR5 (Tu, 1999 # 24) (Arons et al., 2012; Chana et al., 2014; Jiang and Ehlers, 2013; Skafidas et al., 2014; Won et al., 2012).

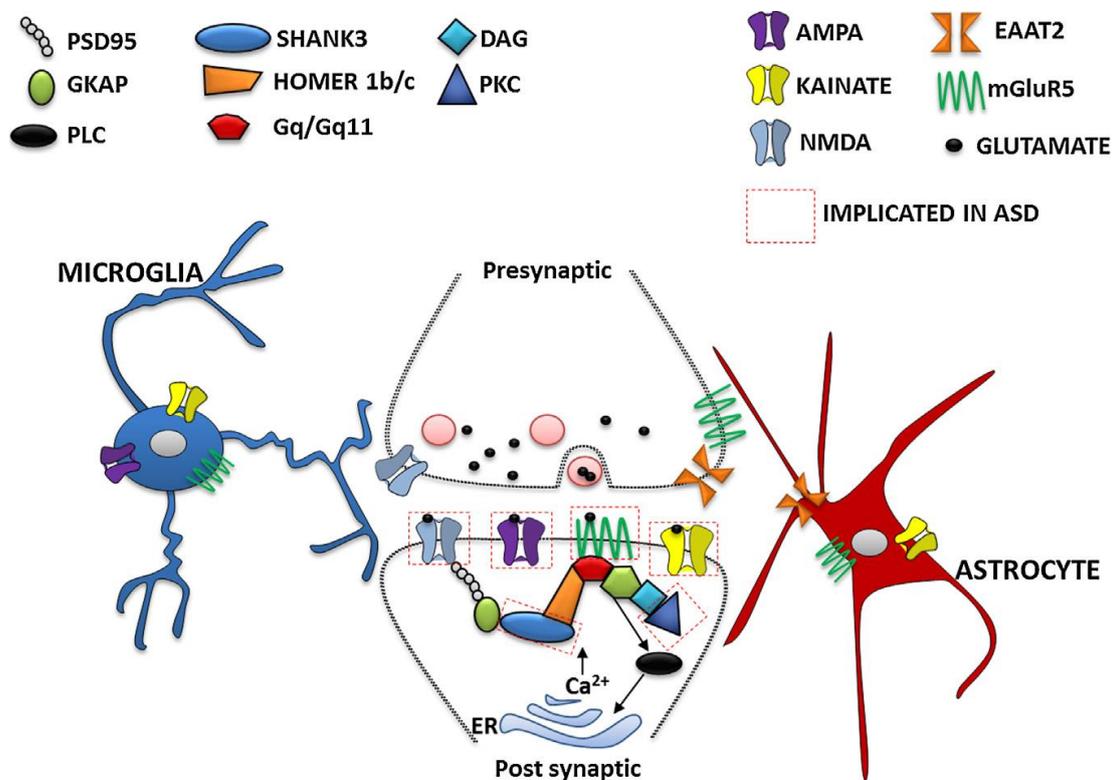


FIGURA 6. Posizione dei recettori sinaptici del glutammato e delle proteine implicate nell'ASD. Il diagramma illustra i recettori del glutammato e gli elementi di segnalazione a valle che sono implicati nell'ASD. È interessante notare che recettori come mGluR5 e i membri della famiglia dei recettori Kainato sono espressi sia sui neuroni che sulla glia. Sebbene questo possa indicare che questi recettori abbiano un ruolo maggiore nel contributo alla disregolazione glutamatergica della fisiopatologia dell'ASD, evidenzia anche la necessità di esaminare il ruolo di questi recettori sia nei neuroni che nella glia e come possono essere alterati nelle pathway candidate come eziologiche dell'ASD (D. Zantomio et al. / *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 52 (2015) 172–177)

2.6.1 L' immunoeccitotossicità nell'ASD: il collegamento tra l'alterazione della trasmissione glutammatergica e la neuronfiammazione

Blaylock e collaboratori hanno introdotto nel 2009 il termine "immunoeccitotossicità" per descrivere il danno neuronale derivante dall'attivazione della microglia (Blaylock, 2009; Blaylock e Strunecka, 2009). La neuroinfiammazione cronica è dimostrata da un aumento del numero della microglia nella corteccia fronto-insulare e visiva (Tetreault et al., 2012) e nella corteccia prefrontale dorsolaterale (DLPC) (Morgan et al., 2010) nel cervello post-mortem di malati di ASD, così come l' evidenza della presenza di microglia attivata nel cervelletto (Vargas et al., 2005). Le citochine pro-infiammatorie possono essere importanti mediatori dell'equilibrio eccitatorio-inibitorio sinaptico, come illustrato in modelli murini con IL-6 cerebrale in eccesso; questi topi mostrano caratteristiche tipiche dell'ASD come l'interazione sociale compromessa e deficit di apprendimento, in cui la formazione delle sinapsi inibitorie è compromessa (Wei et al., 2012). Oltre al suo ruolo nella neuroplasticità, mGluR5 modula gli effetti neurotrofici, così come la proliferazione e le risposte infiammatorie delle cellule gliali (Byrnes et al., 2009). I modelli murini dimostrano gli effetti neuroprotettivi degli agonisti di mGluR5 attraverso una inibizione dell'attivazione e la proliferazione della microglia (Byrnes et al., 2009; Drouin-Ouellet et al., 2011). Oltre alle cellule gliali, mGluR5 è espresso su cellule immunitarie inclusi linfociti e monociti; mGluR5 è in grado di sottoregolare la proliferazione dei linfociti T e la produzione di IL-6 (Pacheco et al., 2006). La disregolazione immunitaria è evidente nella sindrome di Rett, dove la segnalazione di mGluR5 è stata ritrovata ridotta ed allo stesso tempo la microglia e gli astrociti hanno un ruolo complesso nella sua patogenesi. Le cellule gliali prive di MeCP2 mostrano sia un'attività neurotrofica che fagocitica alterata (Maezawa e Jin, 2010). È particolarmente interessante evidenziare che, quando MeCP2 viene ripristinato solo nelle cellule microgliali, tramite trapianto di midollo osseo, sia la disfunzione microgliale che i sintomi comportamentali della sindrome di Rett vengono notevolmente migliorati (Derecki et al., 2013). Questa scoperta indica che i deficit neurologici non sono isolati dalla disfunzione del circuito neuronale e che la mutazione MeCP2 limitata alla microglia può essere sufficiente a produrre sintomi della sindrome di Rett. Ciò aumenta l'importanza della microglia nelle forme sindromiche di ASD. Inoltre, questa scoperta fornisce la prova che la manipolazione della risposta immunitaria può avere un potenziale terapeutico significativo nelle forme non sindromiche di ASD.

Concludendo questo capitolo si può affermare che, anche per quanto riguarda lo spettro autistico ed in generale le patologie con deficit cognitivi, il recettore mGluR5 espresso dalla microglia emerge nuovamente come potenziale modulatore di importanti fenomeni fisiopatologici.

2.7 Ruolo del recettore mGluR5 espresso dalla microglia in modelli sperimentali di epilessia

È stato dimostrato che le infezioni virali del sistema nervoso centrale (SNC) aumentano il rischio di sviluppare convulsioni ed epilessia; dal 4-20% dei pazienti che hanno contratto e superato l'encefalite virale sviluppano svariate forme convulsive (Getts et al., 2008). Inoltre, ci sono oltre 100 diversi virus neurotropi che possono causare encefalite nell'uomo, alcuni dei quali sono stati implicati nello sviluppo di convulsioni ed epilessia (Misra et al., 2008; Libbey e Fujinami, 2011). Il modello di convulsioni/epilessia indotte dal virus dell'encefalomielite murina di Theiler (TMEV) è un modello murino di convulsioni/epilessia del lobo temporale indotte da virus e.

Diversi studi hanno dimostrato l'importanza della neuroinfiammazione nello sviluppo di crisi epilettiche nel modello di crisi convulsive indotte da TMEV (Cusick et al., 2013; Kirkman et al., 2010; Patel et al., 2017) così come in altri modelli (Bertani et al., 2017; Pauletti et al., 2017; Vezzani et al., 2015). L'interleuchina-6 (IL -6) e il fattore di necrosi tumorale (TNF- α) sono due citochine infiammatorie che si sono dimostrate importanti in questo modello. Non solo gli mRNA di TNF- α e IL-6 risultano aumentati nel cervello dei topi infettati da TMEV e affetti da convulsioni, ma è emerso che un numero significativamente inferiore di topi ha convulsioni se carenti nel recettore per TNF di tipo 1 o per IL-6 (Kirkman et al., 2010). Un altro componente importante dell'infezione da TMEV e dello sviluppo di crisi epilettiche è costituito dalle cellule immunitarie residenti e circolanti; infatti è ormai noto che l'infezione da TMEV provoca l'infiltrazione di cellule immunitarie circolanti nel cervello incluse le cellule della microglia (Cusick et al., 2013; Kirkman et al., 2010) e che questa infiltrazione è particolarmente concentrata a livello dell'ippocampo (Howe et al., 2012). Quando l'infiltrazione dei macrofagi viene ridotta attraverso il trattamento con farmaci come la wogonina o la minociclina, due noti antinfiammatori, hanno manifestato convulsioni un numero di topi significativamente inferiore rispetto a quelli non trattati (Cusick et al., 2013; Libbey et al., 2011a). Inoltre, le convulsioni erano significativamente ridotte nei topi infettati da TMEV aventi cellule cerebrali residenti e infiltrate carenti in IL-6 (Libbey et al., 2011b). Questi studi dimostrano che l'infiammazione gioca un ruolo importante nello sviluppo di convulsioni, le quali a loro volta non dipendono esclusivamente dalla sola infezione virale.

Studi precedenti hanno dimostrato che la produzione di TNF- α e IL-6 da parte della microglia residente e dei macrofagi infiltrati, rispettivamente, gioca un ruolo nello sviluppo di crisi acute nel modello di crisi / epilessia indotto da TMEV (Cusick et al., 2013) e che la stimolazione di mGluR5 con il modulatore allosterico positivo VU0360172 può ridurre la produzione di IL-6 e TNF- α ,

oltre ad avere effetti neuroprotettivi in altri modelli di lesione cerebrale (Loane et al., 2009; Zhang et al., 2015). Questo studio mostra che la stimolazione di mGluR5 con VU0360172, a partire dal giorno 0 dopo l'infezione e continuando per i 3 giorni successivi (trattamento a breve termine), modifica gli esiti clinici delle crisi nei topi infettati da TMEV. Il trattamento a lungo termine con VU0360172 (fino a 8 giorni dopo l'infezione) tuttavia non ha eliminato completamente o ridotto le convulsioni rispetto ai topi trattati 3 giorni post infezione. Ciò suggerisce ancora una volta l'esistenza di una finestra terapeutica critica, che in questo caso coincide con i primi tre giorni di infezione, all'interno della quale l'intervento con agonista mGluR5 risulta benefico per il decorso clinico. Nei tempi successivi il ruolo della microglia e conseguentemente gli effetti di una modulazione del recettore mGluR5 potrebbero essere differenti, e addirittura inversi. Un possibile meccanismo attraverso cui il trattamento a breve termine con VU0360172 può migliorare gli esiti clinici nei topi infettati da TMEV è attraverso la sua capacità di ridurre la quantità di TNF- α prodotto dalle cellule immunitarie (microglia e macrofagi) isolate dal cervello di topi trattati con VU0360172 rispetto ai controlli trattati con placebo a 3 giorni dall'infezione. Questi esperimenti mostrano infatti che la stimolazione di mGluR5 sopprime la produzione di TNF- α all'inizio dello sviluppo delle crisi; poiché è stato osservato un miglioramento clinico con la modulazione positiva di mGluR5, si è cercato di indagare se fosse vero anche l'inverso. Pertanto, sono stati trattati i topi infettati da TMEV con l'antagonista allosterico negativo MTEP, selettivo e permeabile alla barriera emato-encefalica (Cosford et al., 2003; Loane et al., 2014; Rodriguez et al., 2010). In questi esperimenti, diversamente da quanto atteso, non sono state notate differenze tra i gruppi, dimostrando che la limitazione della segnalazione di mGluR5 non si traduce in maggior numero di crisi epilettiche nella fase acuta. Poiché l'infiammazione gioca un ruolo importante nello sviluppo di crisi acute in questo modello (Cusick et al., 2013; Kirkman et al., 2010; Patel et al., 2017), e si dimostra che il trattamento a breve termine con VU0360172 agisce limitando la produzione di citochine proinfiammatorie, è possibile che l'incapacità di MTEP di peggiorare la malattia sia dovuto al fatto che l'antagonismo di mGluR5 non aumenta i livelli di TNF- α , o che qualsiasi esito di crisi in questi topi non sia esacerbato da un ulteriore aumento della quantità di TNF- α da parte delle cellule di microglia. Questi risultati indicano che la stimolazione farmacologica di mGluR5, attraverso la somministrazione di VU0361072, ha un potenziale come trattamento per le crisi epilettiche causate da TMEV nella fase acuta, attraverso l'attenuazione dei livelli di TNF- α nel cervello durante le prime fasi della malattia. Ciò è di particolare interesse poiché gli anticorpi monoclonali utilizzati per inibire il TNF- α non attraversano la barriera ematoencefalica e, inoltre, la completa inibizione del TNF- α può avere effetti negativi (Kaltsonoudis et al., 2014; Solomon et al., 2011; Tracey et al., 2008). Il

composto sperimentale VU0360172 ha la capacità di modulare la produzione di TNF- α da parte della microglia e dei macrofagi, ovvero la segnalazione dal parte del fattore TNF- α verrebbe, molto probabilmente, ridotta senza però essere completamente bloccata

2.8 Recettori mGluR5 espressi dalla microglia nell'emorragia intracerebrale (ICH)

L'emorragia intracerebrale (ICH) è un tipo di ictus caratterizzato da un'emorragia nel parenchima cerebrale, causa spesso di devastanti conseguenze (Figura 7; Manno et al.,2012). ICH porta gravi lesioni al tessuto cerebrale con danni neuronali e deficit neurologici a lungo termine (Broderick et al.,1993; Lo et al.,2003). Tuttavia, attualmente mancano strategie terapeutiche efficaci; quindi, una migliore comprensione della fisiopatologia di ICH potrebbe portare a una gestione terapeutica più efficiente dei pazienti che ne sono affetti. Il recettore glutammatergico metabotropo mGluR5 agisce fisiologicamente come modulatore dell' attività sinaptica; inoltre, effetti dannosi a carico di mGluR5 sono stati osservati in diverse patologie a carattere neurodegenerativo come in parte precedentemente descritto(Arif et al.,2014; Um et a.,2013). Il recettore mGluR5 è stato trovato sovraregolato e localizzato sulla microglia reattiva in un modello murino di ICH. Sulla base di questo risultato, si ipotizza che mGluR5 giochi un ruolo essenziale nella morte / sopravvivenza neuronale nei modelli di ICH. La predominanza postsinaptica di mGluR5 modula l'eccitabilità sinaptica (Niswender et al., 2010) e aumenta il danno neuronale causato dall' eccessiva attivazione cellulare coinvolta nel processo patologico di diverse malattie del SNC (Hu et al., 2016; Wagner et al., 2007). Il blocco di mGluR5 invece è stato visto migliorare sia le condizioni cliniche di diverse malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson (Huang et al.,2018; Hsien et al.,2012), la malattia di Huntington (Ribeiro et al.,2014; Abd-Elrahman et al.,2019) e la sclerosi laterale amiotrofica (Bonifacino et al., 2017; Bonifacino et al.,2019), sia i danni cerebrali ed il deterioramento istologico dopo ictus ischemico (Li et al.,2013; Bao et al.,2001;Takagi et al.,2012). Quindi, diverse molecole antagoniste di mGluR5 si prospettano con proprietà neuroprotettive, mentre gli agonisti di mGluR5 potrebbero dimostrarsi neurotossici in determinate condizioni patologiche (Parmentier-Batterur et al.,2014). Tuttavia, gli effetti degli antagonisti di mGluR5 dopo ICH non sono ancora del tutto chiariti.

In seguito a ICH, l'attivazione e l'aggregazione della microglia sono le manifestazioni più comuni della risposta immunitaria e sono tra gli eventi cellulari patologici più precoci e significativi nel mantenimento del danno

post-ICH (Lan et al.,2017; Zhang et al.,2017). La microglia a riposo inizia ad esprimere in maniera significativa il recettore mGluR5, solo dopo aver ottenuto un segnale di attivazione in seguito a lesioni del tessuto cerebrale (Barres et al.,2008; Drouin-Ouellet et al.,2011). Studi precedenti in vitro avevano invece dimostrato come l'attivazione di mGluR5 riduceva l'attivazione e l'infiammazione della microglia (Loane et al.,2009); allo stesso modo è stato dimostrato che mGluR5 interviene nel modulare la polarizzazione della microglia in-vivo dopo un trauma cranico cronico (Loane et al.,2014). Dati contrastanti dimostrano invece come mGluR5 contribuisca all'attivazione della microglia indotta da LPS, la quale assume un fenotipo infiammatorio e come, mediante l'antagonista di mGluR5 MTEP si riduca significativamente questo processo di attivazione (Liu et al.,2014). Curiosamente, sia molecole agoniste che antagonisti di mGluR5 hanno dimostrato di esibire effetti neuroprotettivi in un modello di ictus mediante occlusione intraluminale dell'arteria cerebrale media (MCAO) nel ratto (Bao et al.,2001), mentre l'agonista di mGluR5 non dimostrato effetti sull'ictus ischemico indotto dall'endotelina-1 (Riek-Burchardt et al.,2007). Anche gli effetti antinfiammatori secondari all'attivazione di mGluR5 sono piuttosto controversi.

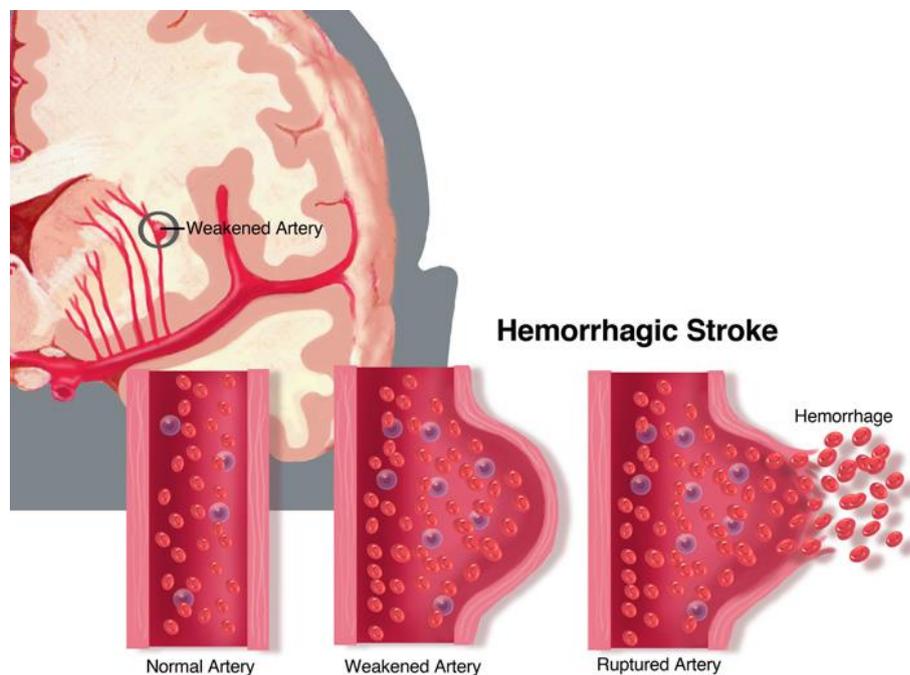


FIGURA 7. Rappresentazione della patogenesi di una emorragia intracerebrale. Tratto da: (<https://upload.orthobullets.com/topic/12288/images/hemorrhagicstroke-large.jpg>)

La sovraregolazione di mGluR5 indotta dall' emorragia cerebrale promuove l'attivazione della microglia, facilitando il rilascio delle citochine infiammatorie TNF- α e IL-6 nelle aree vicine all' ematoma. Attraverso la regolazione dell'attivazione della microglia e delle citochine proinfiammatorie, il recettore mGluR5 sembra giocare un ruolo principale nel mediare la morte neuronale e la degradazione strutturale e funzionale dopo ICH. Pertanto, l'inibizione farmacologica di mGluR5, in vivo, riducendo la microglia reattiva, indirettamente riduce la morte neuronale e promuove il recupero funzionale dopo l'ictus. In linea con questo vi sono diverse osservazioni che supportano, in alcuni disturbi del sistema nervoso centrale, il significativo potenziale terapeutico di antagonisti mGluR5, evidenziato da una considerevole riduzione dello stato di attivazione della microglia, del volume della lesione, della neurodegenerazione ed apoptosi neuronale (Hsieh et al., 2012; Makarewicz et al.,2006; Abushik et al.,2014; Overek et al.,2014). L'antagonista specifico MTEP riduce l'oscillazione del Ca²⁺ citoplasmatico ed attenua l'attivazione della microglia (Liu et al.,2014). Inoltre, il rilascio di citochine proinfiammatorie come IL-6 e TNF- α indotto da trauma al SNC è per lo più potenziato dalla microglia residente fortemente attivata (Lan et al.,2017). Valutando le concentrazioni di citochine proinfiammatorie nel tessuto vicino alla lesione si sono registrati dei livelli aumentati di TNF- α e IL-6, mentre l'inibizione di mGluR5 riduce l'espressione di TNF- α e IL-6. Sebbene studi precedenti abbiano riportato che l'attivazione di mGluR5 riduce l'attivazione microglia e la risposta infiammatoria associata (Loane et al.,2009; Loane et al., 2014; Zhang et al.,2015), questi risultati sono coerenti con le ricerche precedenti che mostrano come il blocco di mGluR5 riduca l'attivazione della microglia in vitro (Liu et al.,2014). Diversi lavori sostengono quindi che l'attivazione di mGluR5 fornisca neuroprotezione e allevi il volume della lesione in diversi modelli di patologie al SNC (Byrnes et al.,2012; Chen et al.,2012; Wang et al.,2013). Al contrario, altre evidenze supportano il fatto chemodulatori antagonisti di mGluR5 sono considerati neuroprotettivi, mentre gli agonisti sono neurotossici (Parmentier-Batteur et al.,2014), in linea con precedente esperimenti che dimostravano il ruolo benefico dell' antagonismo di mGluR5 nell'ictus ischemico (Li et al.,2013; Bao et al.,2001; Szydlowska et al.,2007). Nel complesso, si ipotizza che dopo ictus intracerebrale emorragico, l'attenuazione di mGluR5 mediata da un antagonismo causa una diminuzione della microglia attivata, della risposta infiammatoria, della morte neuronale e dei deficit neurologici; sono necessari tuttavia ulteriori studi per chiarire il meccanismo molecolare sottostante. Pertanto, il blocco di mGluR5 può essere una potenziale strategia per il trattamento dell' ictus intracerebrale emorragico.

Il ruolo inibitorio di mGluR5 nelle patologie del SNC, in particolare ICH, non è stato comunque del tutto chiarito. Infatti, tutti questi i risultati raccolti fino ad ora in letteratura, seppure numerosi, per alcuni aspetti sono anche molto

contrastanti; queste discrepanze potrebbero essere in parte spiegate da motivi quali: i diversi modelli animali studiati, i diversi modelli sperimentali di ischemia adottati, così come i differenti stadi della malattia (Li et al.,2013) all'interno dei quali venivano applicati i trattamenti farmacologici. Pertanto, la microglia rappresenta sicuramente un potenziale bersaglio per ligandi mGluR per ottenere una modulazione del fenotipo della microglia nelle risposte immunitarie e nei disturbi neurologici che coinvolgono il sistema nervoso centrale, tra cui ICH. Al momento tuttavia non ci sono ancora abbastanza evidenze precliniche per poter confermare questa ipotesi e soprattutto per chiaramente indicare quale possa essere il giusto bilancio tra attivazione ed inibizione di mGluR5 e quale sia la finestra temporale adeguata per ottenere il migliore outcome clinico.

2.9 Ruolo indiretto del recettore mGluR1 nell'attivazione della microglia nella malattia di Alzheimer (AD)

Il cervello affetto da malattia di Alzheimer è caratterizzato da un'estesa neuroinfiammazione indotta dalla β -amiloide (ad esempio, causata dall'attivazione della microglia), oltre che dalla perdita di neuroni e sinapsi e da disturbi della memoria (Shankar et al.,2008). Il malfunzionamento delle sinapsi glutammatergiche nell'ippocampo contribuisce notevolmente alla compromissione cognitiva osservata nei pazienti con AD e nei modelli di roditori di AD (Sun et al.,2009; Bie et al.,2014). Attualmente, il meccanismo molecolare e cellulare che sta dietro alla perdita sinaptica indotta dalla β -amiloide è solo parzialmente compresa. La microglia gioca un ruolo centrale nell'induzione e nel mantenimento della plasticità sinaptica nei neuroni, modificando l'ambiente circostante e cambiando la struttura sinaptica (Tremblay et al.,2010; Schafer et al.,2012). La fagocitosi delle sinapsi da parte della microglia contribuisce da un lato al corretto sviluppo delle connessioni sinaptiche (Paolicelli et al.,2011), ma dall'altro lato influisce sui deficit sinaptici in disturbi neurologici, come dimostrati in un modello murino transgenico di AD (Kettenmann et al.,2013;Lui et al.,2016); il meccanismo molecolare legato a questo ultimo aspetto sconosciuto. Inoltre, è stato riportato un aumento dell'attività fagocitica della microglia mediata dalla proteina del complemento C1q, che sembra portare in un secondo stadio a deficit sinaptici e cognitivi

2.9.1 Ruolo della microglia nella perdita delle sinapsi

È stato dimostrato che la β -amiloide induce l'attivazione della microglia e la neuroinfiammazione, potenziando l'azione dei repressori della trascrizione

della proteina neuroligina 1, portando così alla riduzione delle sinapsi glutammatergiche in ippocampo (Bie et al.,2014). La microglia reattiva può rimuovere alcune sinapsi e modellare il circuito neurale, influenzando così lo sviluppo sinaptico e la maturazione del sistema nervoso (Schafer et al.,2012; Paolicelli et al.,2013). La carenza di interazione microglia-neuronale ha dimostrato compromettere il *pruning* sinaptico ed il corretto sviluppo del *network* cerebrale, che sono associati a deficit dell' interazione sociale e manifestazione di fenotipi comportamentali alterati nei roditori (Zhan et al.,2014). Concentrazioni nanomolari di A β inducono, in-vitro, una notevole fagocitosi, ad opera della microglia, di neuroni e sinapsi (Brown et al.,2014). La mancanza della proteina CX3CR1 nella microglia, che è essenziale per il reclutamento della microglia stessa, previene in modo significativo la perdita di neuroni nei modelli di topi transgenici di AD (Fuhrmann et al.,2010). La microglia reattiva può fagocitare in modo inappropriato le sinapsi e portare alla perdita sinaptica nella fase iniziale della malattia in un modello di topo AD (Hong et al.,2016).

2.9.2 Legame tra complemento e AD

Il sistema del complemento funge da prima linea di difesa contro le infezioni causate da agenti patogeni esogeni e rimuove i detriti cellulari come protezione dall'autoimmunità (Ricklin et al.,2010). Mentre le proteine del complemento circolanti sono principalmente sintetizzate nel fegato, molte altre sono prodotte localmente dai neuroni o dalle cellule gliali nel cervello (Stephan et al.,2012). È stato precedentemente segnalato che C1q, la proteina iniziatrix della via classica di attivazione del complemento, è sintetizzata dalle cellule gangliari della retina (Bialas et al.,2013) e il recettore del complemento CR3 (un complesso composto da CD11b e CD18) si trova esclusivamente nella microglia (Ransohoff et al.,2010; Zhang et al.,2014). Il legame di C1q alla membrana della cellula apoptotica o dell' agente patogeno determinano l'opsonizzazione e successivamente la fagocitosi da parte dei macrofagi che esprimono i recettori del complemento (Stephan et al.,2012). C1q contribuisce anche al *pruning* sinaptico mediante la marcatura delle sinapsi danneggiate, con la loro conseguente fagocitosi da parte della microglia in un modello murino transgenico di malattie neurodegenerative (Lui et al.,2016; Stephan et al.,2012). L'espressione di C1q è sostanzialmente aumentata in diverse regioni del cervello sia umano che di topo durante l' invecchiamento (Stephan et al.,2013). L' inibizione di C1q o del recettore microgliale del complemento CR3 riduce la fagocitosi delle sinapsi da parte della microglia e la perdita sinaptica nella fase iniziale della malattia (3 mesi) nei topi transgenici AD (Hong et al.,2016). I risultati di uno studio hanno rivelato che l'espressione di C1q è notevolmente aumentata in prossimità delle sinapsi di diverse regioni del cervello, tra cui l'ippocampo e la corteccia, sia nel

cervello umano che murino invecchiato (Stephan et al.,2013). È stato evidenziato mediante alcuni test comportamentali in topi anziani che un deficit di C1q determina un declino cognitivo e della memoria significativamente inferiore rispetto a condizioni naive, con una maggiore plasticità sinaptica e riorganizzazione dei circuiti dell'ippocampo (Stephan et al.,2013). Il contenuto di C1q è risultato essere elevato, in particolare nell'ippocampo e nella corteccia frontale, ed è stato associato ad una perdita sinaptica precoce mediata dalla microglia in due modelli di topi transgenici di AD (Topi J20 e APP / PS1) (Hong et al.,2016). È stato dimostrato un aumento significativo di C1q nelle sinapsi glutamatergiche dell'ippocampo di roditori modello di AD, e la soppressione della sovraregolazione di C1q attenua notevolmente la fagocitosi microgliale delle sinapsi glutamatergiche, ripristinando in parte la trasmissione glutamatergica ippocampale e la funzione cognitiva nei ratti trattati con fibrille amiloidi. È stata anche scoperta una certa immunoreattività di C1q non solamente co-localizzata con i marker sinaptici, e questo indica come l'espressione di C1q possa non essere esclusiva ma al contrario presente anche su altre strutture cellulari (come ad esempio le cellule della microglia) che potrebbero contribuire al processo patologico. Coerentemente con la scoperta della fagocitosi delle sinapsi glutamatergiche mediata dalla microglia, altri studi hanno anche mostrato come la delezione genetica della proteina del complemento C3 o del suo recettore CR3 ha sostanzialmente migliorato la perdita sinaptica ippocampale in topi APP / PS1 o topi infusi con A β oligomero (Hong et al.,2016). Presi insieme, questi risultati hanno confermato il ruolo critico dell'attivazione di C1q, con la potenziale collaborazione di C3 e CR3 e altri componenti della cascata di attivazione del complemento, nella fagocitosi delle sinapsi glutamatergiche mediata dalla microglia, nella perdita delle sinapsi e la sua influenza nei modelli di roditori dell'AD, come mostrato nella figura 8.

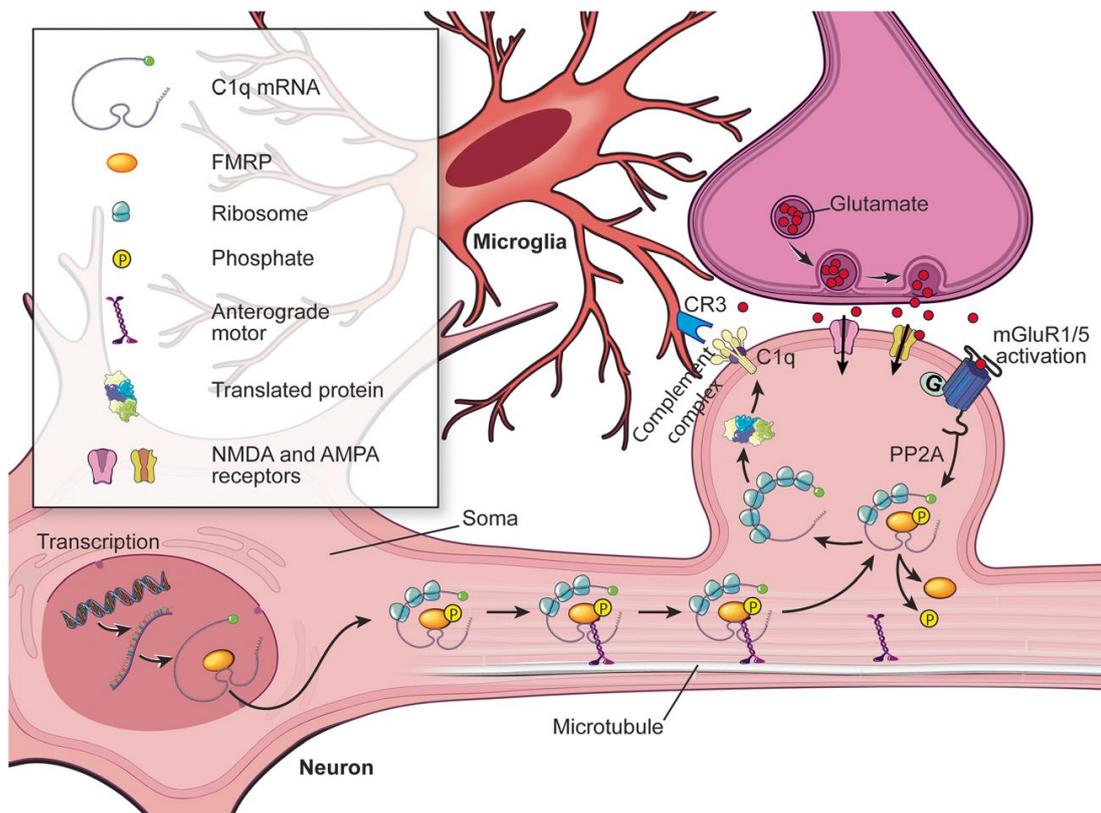


FIGURA 8. Il diagramma mostra uno schema dell'ipotesi legata all'accumulo anormale di fibrille di amiloide che inducono la neuroinfiammazione (ad es. attivazione microglia) e la sovraregolazione della segnalazione di mGluR1 nell'ippocampo CA1. L'attivazione della segnalazione di mGluR1 induce una notevole attività di PP2A, che innesca la defosforilazione di FMRP nelle sinapsi glutammatergiche. Questo adattamento del macchinario deputato alla traduzione, a sua volta, facilita il trasporto e la traduzione locale dell'mRNA di C1q sinaptico in sinapsi glutammatergiche. La maggiore espressione di C1q in sinapsi glutammatergiche avvia la risposta del complemento che porta a opsonizzazione mediante CR3 presente sulla microglia attivata che porta, in ultima istanza, alla fagocitosi microgliale delle sinapsi glutammatergiche ippocampali, contribuendo alla disfunzione sinaptica e al deficit cognitivo indotti dalle fibrille amiloidi.

2.9.3 Connessione tra la proteina FMRP e i recettori mGluR

La proteina FMRP è una proteina legante l'mRNA abbondante nel cervello, modula il trasporto e la traduzione locale dell'mRNA sinaptico (Ashley et al.,1993; Bassell et al.,2008) e recentemente è stata segnalata una maggiore espressione di FMRP nel modello murino transgenico di AD (Hamilton et al.,2015). È attualmente riconosciuto come la sintesi proteica non si verifichi solo nel soma cellulare ma anche nei neuriti (Wang et al.,2010). Le prove suggeriscono che una modifica della traduzione dell'mRNA dendritico prenda

parte a diversi processi neurali come la formazione delle sinapsi, la plasticità sinaptica correlata all'apprendimento o alla rimozione di sinapsi non funzionali (Wang et al.,2010; Wang et al.,2009; Wu et al.,2016). La fosforilazione di FMRP (Ser499) è associato a poliribosomi bloccati mentre FMRP defosforilata viene rilasciata dal poliribosoma, facilitando il trasporto e la traduzione locale di mRNA (Ceman et al.,2003). L'ablazione di FMRP porta a un'eccessiva ed alterata traduzione di mRNA a livello sinaptico, alterando alcune funzioni cellulari e diminuendo la produzione di proteine essenziali per la plasticità sinaptica (Bassell et al.,2008; Martin et al.,2016). Inoltre, è stato suggerito che la proteina FMRP sia coinvolta nella modulazione dell'espressione della proteina precursore dell'amiloide e l'accumulo di aggregati di proteine amiloidi nel cervello (Sokol et al.,2011; Lee et al.,2010). È stata osservata una significativa diminuzione di p-FMRP, così come una riduzione del legame tra p-FMRP e C1q mRNA, in sinaptosomi ippocampali di roditori. La soppressione indiretta della defosforilazione di p-FMRP mediante l'inibizione del segnale di trasduzione di mGluR1 diminuisce a sua volta l'espressione di C1q sinaptico e la fagocitosi microgliale delle sinapsi oltre che favorire il recupero della trasmissione glutammatergica e le capacità cognitive nei ratti trattati con frammenti di amiloide (Di Prisco et al.,2014).

Inoltre, l'attivazione dei recettori glutammatergici metabotropi del gruppo I induce LTD (Di Prisco et al.,2014) e sono fortemente coinvolti nella disfunzione sinaptica indotta dalla β -amiloide nei neuroni dell'ippocampo (Ostapchenko et al.,2013; Chen et al.,2013). Si dimostra infatti che l'*up-regulation* di mGluR induce la defosforilazione di FMRP e facilita la traduzione locale dell' mRNA di C1q sinaptico, aumentando di conseguenza la fagocitosi delle sinapsi ippocampali e contribuendo alla disfunzione cognitiva nei modelli di AD in roditori. Presi insieme, i dati dimostrano il ruolo critico della segnalazione di mGluR1 nella fagocitosi delle sinapsi microglia-C1q-dipendente, ma non possiamo escludere il potenziale coinvolgimento di altri sottotipi di recettori (ad es. mGluR5) poiché i modulatori mGluR1 (ad esempio, DHPG e JNJ16259685) non sono propriamente selettivi ed agiscono anche sui recettori mGluR5 (Lavreysen et al.,2004; Niswender et al.,2010).

Per quanto riguarda la patologia AD si evince quindi un ruolo chiave delle cellule della microglia che sembrerebbero in qualche modo essere eccessivamente attivate da parte della β -amiloide nel loro processo di pruning sinaptico, contribuendo ad un progressivo deficit cognitivo. I recettori mGluR1 ed una loro patologica sovraregolazione può portare ad un indiretto aumento della fagocitosi sinaptica, tuttavia al momento non è ancora stato approfonditamente studiato e dimostrato il ruolo diretto dei recettori glutammatergici mGluR del gruppo I espressi dalla microglia ed il loro coinvolgimento nel processo di attivazione e fagocitosi sinaptica C1q-mediata nel morbo di AD. Questo aspetto resta quindi un punto interessante da sviluppare in studi futuri.

CAPITOLO 3

RUOLO DEI RECETTORI METABOTROPI GLUTAMMATERGICI DEL GRUPPO I ESPRESSI DALLA MICROGLIA NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

3.1 La sclerosi laterale amiotrofica: una patologia multifattoriale e multicellulare

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa fatale caratterizzata dalla progressiva degenerazione dei motoneuroni (MN) superiori definti primari, di natura glutammatergica e situati nella corteccia motoria e dei motoneuroni inferiori o secondari presenti a livello del tronco encefalico e del midollo spinale. La perdita progressiva di questa classe di cellule neuronali manifesta con debolezza muscolare nella prima fase della malattia, seguita da una graduale perdita del controllo e della capacità di contrazione muscolare, atrofia e paralisi che portano infine, alla morte per blocco della respirazione, deperimento per incapacità di nutrimento autonomo, infezioni all'apparato respiratorio (Brown e Al-Chalabi, 2017).

Purtroppo fino ad ora solo due farmaci sono stati approvati per la terapia, il Riluzolo e l'Edaravone, i quali si sono dimostrati clinicamente non efficaci. Il Riluzolo prolunga la sopravvivenza media solo di 2-3 mesi (Bucchia et al., 2015; Miller et al., 2012). L' Edaravone migliora solo leggermente i punteggi della funzione motoria nei pazienti affetti da SLA con diagnosi precoce (Kosuge et al., 2020; Okada et al., 2018; Sawada, 2017), inoltre in Europa non è più al momento utilizzato per inconsistenza dei dati clinici a supporto della sua efficacia. Il fallimento dei vari strumenti terapeutici fino ad ora testati può essere in gran parte attribuito ad una incompleta comprensione delle cause che stanno alla base della patologia.

La maggioranza dei casi di SLA è di tipo sporadico (sALS), ovvero non direttamente collegato ad una causa eziologica nota ed apparentemente non geneticamente trasmissibile, mentre solo il 10% dei casi è di tipo familiare (fALS), quindi direttamente legati e causati da particolari mutazioni genetiche con caratteristiche di trasmissibilità ed ereditaria. (Renton et al., 2014; Rowland e Shneider, 2001). In realtà, più di 40 geni sono stati trovati mutati nella SLA e colpiscono numerose funzioni cellulari (Al-Chalabi et al., 2017); le mutazioni più rilevanti sono: un'espansione esanucleotidica ripetuta (GGGGCC) in un introne del gene C9orf72 (Dejesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011), la quale si suppone generare un RNA tossico, perdita di proteine e/o formazione di ripetizioni di di-peptidi dannosi per le cellule neuronali (Haeusler et al., 2016).

Le mutazioni a carico del gene che codifica per l'enzima superossido dismutasi 1 (SOD1; Rosen et al., 1993), sono le prime ad essere state individuate e correlate geneticamente alla SLA; le mutazioni determinano un ripiegamento alterato della struttura proteica terziaria dell'enzima tale da formare aggregati di SOD1 tossici, che interferiscono con le funzioni mitocondriali e l'autofagia (Turner e Talbot, 2008) oltre a determinare una grande quantità di altre alterazioni cellulari patologiche a carico dei

motoneuroni. I segni distintivi patologici che caratterizzano i motoneuroni in degenerazione sono le inclusioni citoplasmatiche contenenti proteine aggregate / ubiquitinate ed accumulo di RNA. Infatti, l' errato ripiegamento delle proteine, lo stress del reticolo endoplasmatico (ER), una alterata autofagia e i danni al citoscheletro sono meccanismi intracellulari coinvolti nella patogenesi della malattia (Taylor et al., 2016). Topi SOD1 transgenici sono fino ad ora il modello più utilizzato per studiare la SLA in quanto sviluppano un fenotipo clinico estremamente somigliante a quello che caratterizza i pazienti umani di SLA. Infatti, sia nel caso in cui la mutazione SOD1 produca una proteina attiva (SOD1^{G93A}, SOD1^{G37R}) che inattiva (SOD1^{G85R}) si sviluppa un fenotipo caratterizzato da una paralisi progressiva e morte (rispettivamente a 5, 7 e 8,5 mesi), causata dalla degenerazione dei motoneuroni (limitato al 40% nei topi SOD1^{G85R}); inoltre mostrano segni di gliosi nel midollo spinale, tronco encefalico e corteccia cerebrale (Philips e Rothstein, 2015), suggerendo che la neurodegenerazione si basa sull' acquisizione di una funzione tossica ed ubiquitaria della proteina. Altre proteine mutate che risultano coinvolte nella SLA sono: FUS (fused in sarcoma; Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009) e la proteina legante TAR-DNA-43 (TDP-43; Neumann et al., 2006), coinvolta nella maturazione degli mRNA e ritrovata nelle inclusioni citoplasmatiche (Guerrero et al., 2016); Altre proteine mutate sono a carico di profiling-1, che regola l'architettura del citoscheletro (Wu et al., 2012; Yang et al., 2016), VAPB (Vesicle-associated membrane protein-associated protein) che regola il traffico di vescicole (Nishimura et al., 2004; Tsuda et al., 2008), proteine coinvolte nell'autofagia, tra le quali sequestosoma- 1 (Teyssou et al., 2013), optineurina (Nakazawa et al., 2016) e protein chinasi-1 legante TANK (TBK-1; Cirulli et al., 2015; Freischmidt et al., 2015). Mutazioni in questi geni influenzano la funzione dei diversi tipi cellulari che compongono il SNC così come i motoneuroni ed il loro stato funzionale.

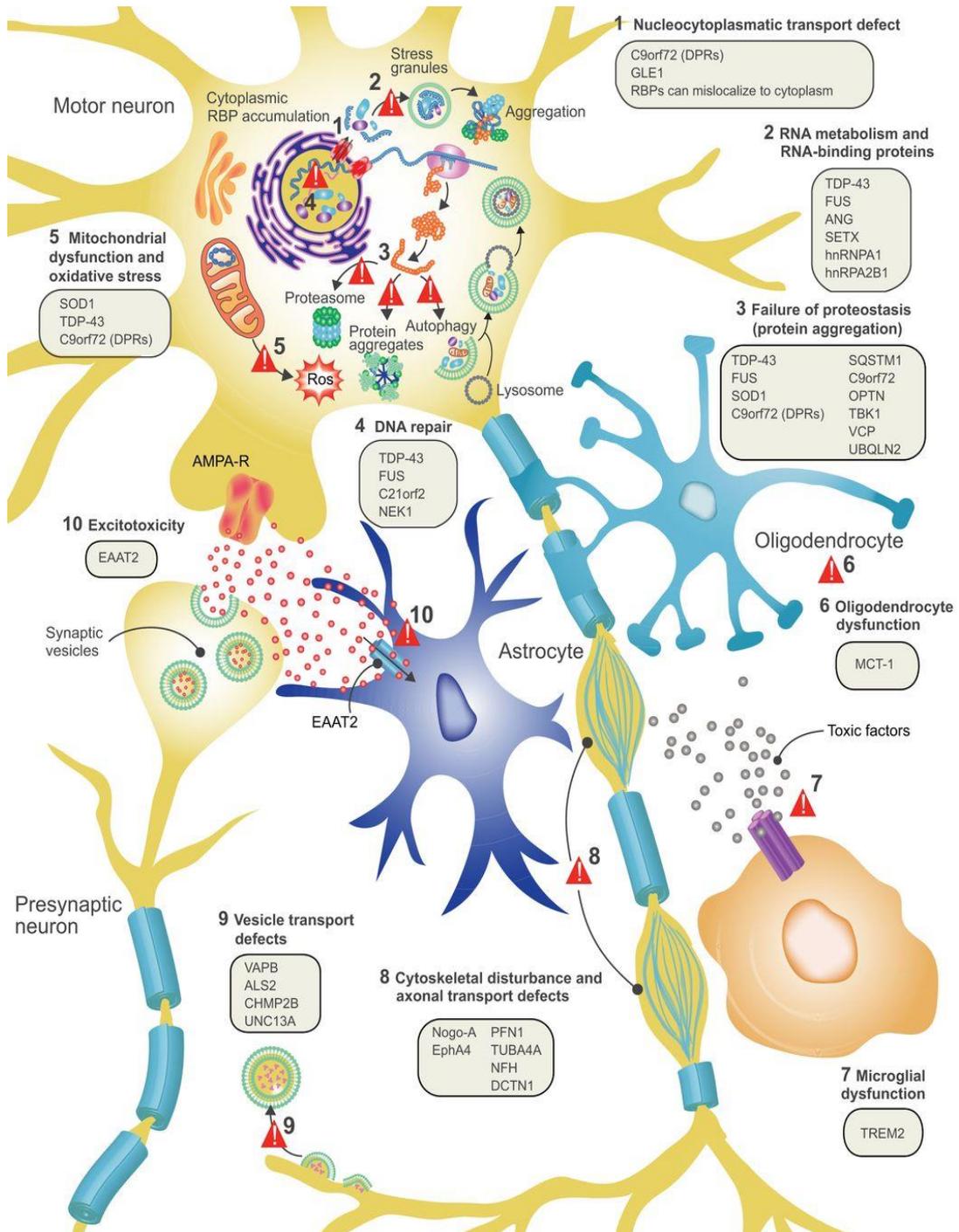


FIGURA 9. Rappresentazione dei principali fattori e delle cellule implicate nella patogenesi della SLA. Tratto da: (Van Damme et al., 2017).

La visione neurocentrica iniziale della SLA derivava, in parte, dall'idea che la degenerazione dei motoneuroni (MN) fosse causato da processi cellulari indipendenti dalle influenze extracellulari. Tuttavia, prove crescenti ed ormai inequivocabili indicano che le cellule non neuronali svolgono un ruolo chiave nella patogenesi della SLA così come per una serie di altri disturbi neurodegenerativi (Garden et al., 2012). In effetti, nella SLA, anche gli astrociti e la microglia possono partecipare alla determinazione del fenotipo della malattia mediante una risposta infiammatoria locale (neuroinfiammazione) contraddistinta da una transizione fenotipica, accompagnata dalla migrazione al sito delle lesioni, proliferazione e secrezione di mediatori pro-infiammatori (Philips e Rothstein, 2014). L'attivazione gliale porta a cambiamenti nell'espressione di un'ampia gamma di geni legati alla produzione di molecole solubili, come citochine e chemochine, molecole associate al danno cellulare (DAMP), specie reattive di azoto e ossigeno (RNS e ROS), dando luogo a profondi cambiamenti per quanto riguarda aspetti fondamentali nelle interazioni tra glia e neuroni (Becher et al., 2017). Un elevato livello di neuroinfiammazione è stato rilevato sia nei casi di sALS che di fALS, così come nei modelli transgenici della malattia (Troost et al., 1989; Engelhardt e Appel, 1990; Schiffer et al., 1996; Hall et al., 1998; Henkel et al., 2004, 2006). Segni inequivocabili della reattività della microglia sono stati rilevati ben prima della comparsa palese dei sintomi (Brites e Vaz, 2014; Tang e Le, 2016), in concomitanza con la perdita delle prime giunzioni neuromuscolari (Gerber et al., 2012) e la degenerazione precoce dei motoneuroni (Alexianu et al., 2001). È stata recentemente proposta una stretta relazione tra l'interruzione della capacità autofagica e l'attivazione della microglia (Plaza-Zabala et al., 2017); questo può indicare che un'autofagia compromessa, collegata a modifiche nella risposta a stimoli pro-infiammatori da parte delle cellule immunitarie residenti nel SNC, probabilmente contribuisce all'eziopatologia della malattia. Dati recenti mostrano un decorso clinico precoce e più dannoso nei topi SOD1^{G93A} mancanti di telomerasi (Linkus et al., 2016), evidenziando un possibile effetto dell'invecchiamento sul reclutamento della microglia nella SLA.

La neuroinfiammazione è una caratteristica di fondamentale importanza in molte malattie neurodegenerative, tra cui la SLA, e ha attirato sempre più attenzione; è caratterizzata dall'attivazione della microglia e degli astrociti residenti nel sistema nervoso centrale, linfociti periferici e macrofagi, ed è stata osservata sia nei pazienti che nei modelli animali (Beers and Appel, 2019; Beers et al., 2006; Beers et al., 2008; Chiu et al., 2009; Lincecum et al., 2010; McGeer e McGeer, 2002; Zhao et al., 2017).

La sclerosi laterale amiotrofica è considerata una patologia eterogenea per i differenti tassi di progressione ed i variabili tempi di sopravvivenza nei pazienti (Appel et al., 2010; Beers et al., 2017; Zhao et al., 2013). Recenti prove hanno rivelato che la neuroinfiammazione partecipa alla creazione di questa

eterogeneità (Beers and Appel, 2019; Frakes et al., 2014; Rusconi et al., 2017). Tradizionalmente si credeva infatti che il sistema nervoso centrale fosse immunologicamente privilegiato perché ai componenti del sistema immunitario periferico non fosse permesso l'ingresso nel SNC (Appel et al., 2010; Carson et al., 2006). Tuttavia, ora ci sono prove convincenti che indicano come la risposta immunitaria può verificarsi anche nel sistema nervoso centrale e di come attivamente interagisca con il sistema immunitario circolante (Appel et al., 2010; Bechmann, 2005; Carson et al., 2006; Ransohoff et al., 2003; Wekerle, 2006).

3.2 Il duplice ruolo della microglia nella SLA

Diversi studi in vivo, che hanno indagato la progressione della malattia nei modelli murini di SLA indicano come durante il decorso patologico, aumenta la quantità di cellule circolanti di microglia e soprattutto, il loro stato di attivazione è rappresentato da una alternanza del rapporto tra i due classici fenotipi M1 (tossico) ed M2 (neuroprotettivo) (Liao et al., 2012; Chiu et al., 2013). In linea con queste evidenze, sono stati recentemente descritti e caratterizzati i due diversi fenotipi delle cellule microgliali, sulla base della loro morfologia, in topi transgenici SOD1^{G93A}; cellule definite di tipo "R1", sono caratterizzate da processi corti e poco ramificati, e rappresentano la stragrande maggioranza della microglia nella fase iniziale della malattia, corrispondente all'inizio della trasformazione della microglia sorvegliante; mentre viene registrato uno shift verso cellule di microglia del tipo "R3", che mostrano grandi corpi cellulari con processi brevi e folti, tipici delle fasi terminali della malattia (Ohgomori et al., 2016). Coerentemente, è stato dimostrato che la microglia esibisce, nella fase di pre-insorgenza dei sintomi clinici della malattia, un profilo antinfiammatorio e una sovraespressione dell'interleuchina antinfiammatoria IL-10 (Gravel et al., 2016). Successivamente, è stato dimostrato che, nel midollo spinale lombare di topi affetto da SLA, all'esordio della malattia e durante la fase di lenta progressione, è presente l'espressione prevalente di marcatori specifici M2 (ad esempio, Ym1 e CD206) (Beers et al., 2011a). Al contrario, negli animali allo stadio terminale, è predominante un fenotipo microgliale che esprime alti livelli di NOX2, la subunità di nicotinamide-adenina-dinucleotide-fosfato ossidasi espressa dai macrofagi, considerata il prototipo di marker M1 (Beers et al., 2011b). La microglia M1 nella SLA appare iper-reattiva agli stimoli infiammatori (D'Ambrosi et al., 2009) e la maggiore tossicità è stata attribuita alla presenza di proteine mutate (Beers et al., 2006; Xiao et al., 2007; Liao et al., 2012). A titolo di esempio, le forme mutate di TDP-43 sono in grado di attivare la microglia ed aumentare il rilascio di mediatori pro-infiammatori, tra cui NOX2, TNF- α e IL-1 β (Zhao et al., 2015). Coerentemente, anche l'espressione intracellulare di alti livelli di TDP-43 risultano alla base della formazione di un fenotipo

microgliale più tossico quando viene stimolato, in vitro, con LPS o ROS (Swarup et al., 2011). Analogamente, SOD1^{G93A} o SOD1^{G85R} inducono, in vitro, un cambiamento morfologico e funzionale della microglia, aumentando il rilascio di citochine pro-infiammatorie e ROS (Zhao et al., 2010). Nei topi chimerici con cellule che esprimono sia SOD1 mutata che non mutata, le cellule non neuronali che non esprimono mSOD1, compresa la microglia, ritardano la degenerazione e estendono significativamente la sopravvivenza dei motoneuroni nonostante questi esprimano le proteine mutate (Clement et al., 2003). È interessante notare come anche l'espressione di mSOD1 nella microglia sia alla base della trasformazione fenotipica durante la progressione della malattia. Più specificamente, sono state fornite prove in-vitro che dimostrano come studiando co-culture di motoneuroni *wild-type* (WT) e microglia mSOD1 ottenuta a diversi stadi di maturazione, la microglia attivata precocemente, che esprime mSOD1, esibisce caratteristiche neuroprotettive, migliorando la sopravvivenza neuronale, mentre la microglia mSOD1 derivata dallo stadio terminale mostra proprietà tossiche con significativo aumento del tasso di mortalità neuronale (Liao et al., 2012). Inoltre, la microglia mSOD1 mostra una maggiore espressione di molecole coinvolte nello stress del reticolo endoplasmatico (Ito et al., 2009). A livello molecolare, le proteine mutate, tra cui TDP-43 e FUS, inducono l'attivazione selettiva del fattore nucleare-kappa B (NF-kB), il principale regolatore della neuro-infiammazione (Frakes et al., 2014). Successivamente, è stato dimostrato che l'up-regulation del fattore NF-kB nella microglia *wild-type* induce gliosi e morte dei motoneuroni, sia in vitro che in vivo, mentre la down-regulation di NF-kB nella microglia determina una protezione verso la morte dei motoneuroni in vitro e prolunga la sopravvivenza in topi affetti da SLA, modulando l'attivazione della microglia con attività proinfiammatoria. Questi dati indicano quindi che la morte dei motoneuroni indotta dalla microglia nella SLA avviene tramite l'attivazione della classica pathway di NF-kB (Frakes et al., 2014; Zhao W. et al., 2015). Alla luce di quanto descritto, la possibilità di modulare opportunamente i fenotipi microgliali, potenziando l'azione antinfiammatoria e inibendo o riducendo la tossicità M1, potrebbe essere una strategia terapeutica promettente per la SLA. Tuttavia, emergenti evidenze suggeriscono che il paradigma M1/M2 potrebbe rappresentare una semplificazione eccessiva (Ransohoff, 2016) dei diversi fenotipi della microglia, in quanto pare vi siano differenze sostanziali tra microglia del SNC e macrofagi periferici, dai quali è nata originariamente l'attuale terminologia M1/M2 (Figura 9). Così come i macrofagi residenti nel cervello, la microglia ha un elaborato repertorio di funzioni specifiche, mantenuto da un peculiare profilo di espressione genica (Gautier et al., 2012). In vitro, il ridirezionamento fenotipico è una caratteristica tipica dei macrofagi periferici, mentre la microglia mostra un grado di plasticità inferiore (Parisi et al., 2016b). La coesistenza dei due fenotipi opposti, oltre che la transizione da M2 a M1,

durante la progressione della SLA è stata recentemente messa in evidenza da diverse scoperte. Ad esempio, fattori favorenti l'infiammazione, come il fattore di crescita insulino simile IGF-1, il cui rilascio è soppresso in un ambiente proinfiammatorio (M1), e favorito in un ambiente protettivo M2 (Suh et al., 2013), è stato ritrovato iper-espresso dalla microglia SOD1^{G93A} non solo nella fase pre-sintomatica, ma anche nella fase terminale (Chiu et al., 2008). Inoltre, è stata segnalata una *down-regulation* di IL-6 nel tempo, associata ad una sovraregolazione dell'antagonista di IL-1R, suggerendo la presenza di una risposta anti-infiammatoria (Chiu et al., 2008).

Le analisi dei cambiamenti del trascrittoma nella microglia mutata SOD1^{G93A} hanno confermato queste osservazioni; hanno anche evidenziato che l'attivazione dei geni coinvolti nelle pathway antinfiammatorie, tra cui, Igf1, Progranulin e Trem2, coesiste con la sovraregolazione di geni correlati a fattori potenzialmente neurotossici, tra cui MMP-12 e citochine proinfiammatorie (Chiu et al., 2013). È interessante notare come emergono delle differenze critiche nel profilo di espressione genica tra cellule filogeneticamente simili come i macrofagi M1/M2, la microglia attivata da LPS e la microglia attivata in topi SOD1^{G93A}. Mentre la microglia attivata da LPS mostra un aumento della replicazione del DNA, del ciclo cellulare e della trascrizione di geni legati alla segnalazione dell'immunità innata, suggerendo un'impronta neurodegenerativa che caratterizza la microglia nella patogenesi della SLA.

La microglia che esprime la mutazione SOD1^{G93A} non mostra una prevalenza significativa e chiara del fenotipo M1 o M2 in qualsiasi stadio della malattia (Chiu et al., 2013). In linea con questi risultati, è stata infatti mostrata sia una maggiore espressione di iNOS (marcatore M1) che dell'arginasi 1 (Arg1; marcatore M2), parallelamente all'incremento generalizzato dell'attivazione della microglia in topi SOD1^{G93A} (Lewis et al., 2014).

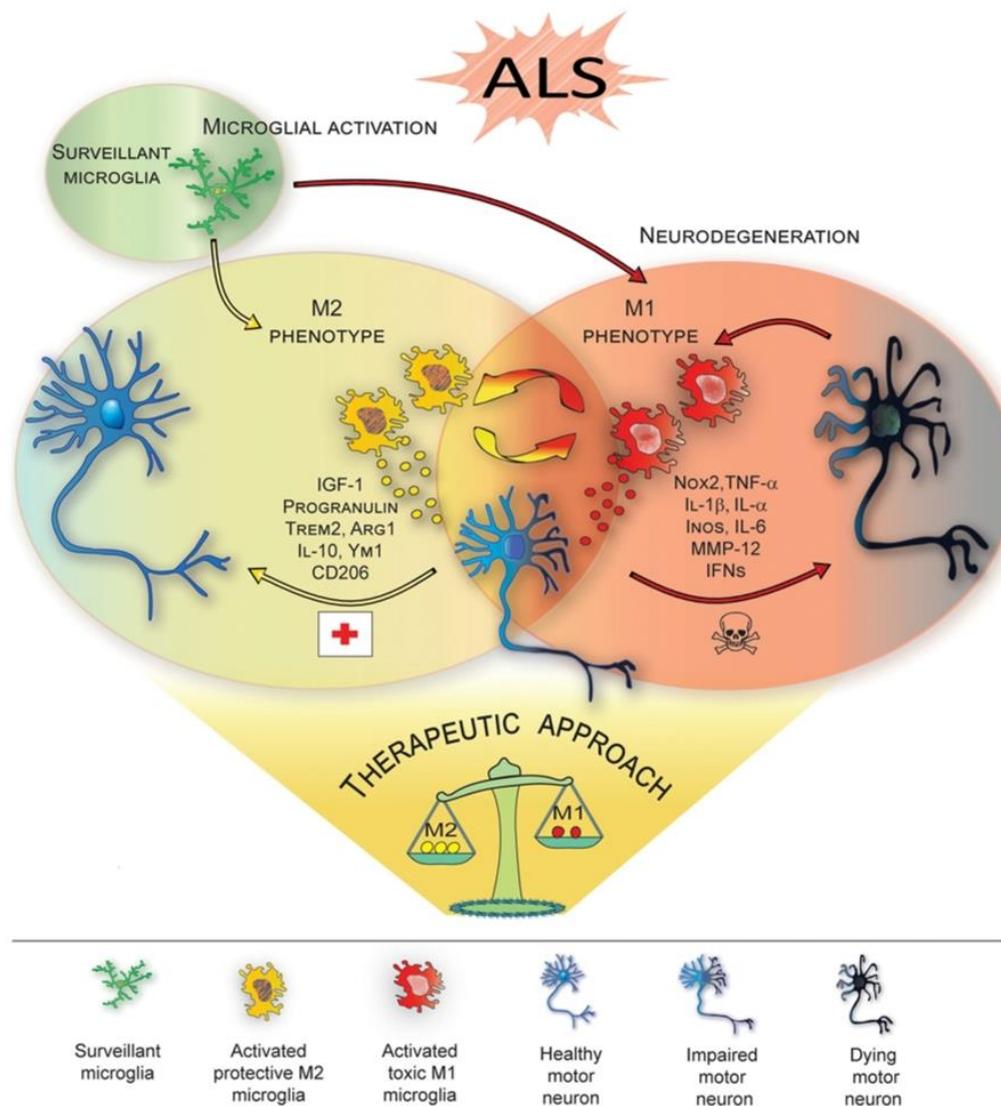


FIGURA 10. Polarizzazione della microglia M1/M2 durante la degenerazione dei motoneuroni nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Durante la progressione della patologia la microglia rappresenta un continuum tra il fenotipo M2 neuroprotettivo, che promuove la riparazione dei tessuti e supporta la sopravvivenza dei neuroni rilasciando fattori neuroprotettivi, rispetto al fenotipo tossico M1, che produce citochine infiammatorie aumentando la neuroinfiammazione e supportando ulteriormente la polarizzazione M1, che sostiene così alla morte neuronale. Diversi approcci terapeutici mirati a modulare lo stato di polarizzazione della microglia, inducendo una transizione verso il fenotipo M2 possono rappresentare strategie promettenti nel migliorare la neurodegenerazione locale e migliorare l'esito clinico della malattia. Tratto da(Geloso et al.,2017)

3.3 Ruolo della microglia nel modulare la fagocitosi e la neuroinfiammazione nella SLA

È stato accertato come le cellule immunitarie svolgano un ruolo importante nella neurodegenerazione e la scoperta che particolari geni espressi dal sistema immunitario conferiscono un rischio elevato di SLA/FTD, supporta questa teoria (McCauley et al.,2018). La microglia può eliminare gli agenti

patogeni o le cellule apoptotiche attraverso la fagocitosi; di conseguenza, mutazioni di geni associati alla fagocitosi espressi dalla microglia sono stati identificati come fattori di rischio sia per la SLA che per FTD (Figura 11); a titolo di esempiosi riporta la mutazione del gene TREM2. Le mutazioni in questo gene sono state collegate alla perdita della funzione della proteina TREM2, portando ad un'alterata risposta infiammatoria e ridotta fagocitosi da parte della microglia (Cady et al.,2014; Colonna et al.,2003;Kleinberger et al.,2014). Mutazioni in GRN, d'altra parte, sono state direttamente associate con FTD e possono anche loro conferire un certo rischio di sviluppare la SLA. Il gene PGRN (progranulin) è espresso sia dai neuroni che dalla microglia e permette alle estroflessioni della microglia di riconoscere gli elementi tossici e le cellule apoptotiche (Pickford et al.,2011). Mutazioni in questo gene causano disfunzioni della fagocitosi; la mancanza di PGRN nella microglia causa la disregolazione dell'espressione genica del complemento, la compromissione del pruning sinaptico e una generale alterazione della funzione microgliale (Lui et al.,2016; Minami et al.,2014).

Mutazioni in PFN1, che codifica per la proteina Profilina, sono state identificate come predisponenti alla SLA. La profilina è importante per la regolazione dell'actina necessaria per la fagocitosi e per la formazione dei fagosomi (Wu et al.,2012). Mutazioni in PFN1 sono in grado di attivare la microglia (Fil et al.,2017).

Il fatto che i geni menzionati siano altamente espressi nella microglia, o in grado di attivare la microglia quando sono mutati, indica l' esistenza di un collegamento tra fagocitosi microgliale, neuroinfiammazione e neurodegenerazione e questi aspetti sono importanti non solo nella SLA ma anche in altre patologie neurologiche che condividono tra loro alcuni aspetti. Per approfondire il ruolo della microglia nei disturbi neurodegenerativi, è importante considerare come queste cellule vanno incontro al processo di attivazione. Per quanto concerne la SLA, l'attivazione della microglia potrebbe essere innescata da accumulo di proteine mal ripiegate, uno dei tratti patologici distintivi della malattia. Una volta attivata, è stato dimostrato che la microglia possiede proprietà neuroprotettive durante le fasi presintomatiche, ma muta in un fenotipo neurotossico nelle fasi successive, incrementando ulteriormente la progressione della malattia (Henkel et al.,2009). Il gene C9Orf72 è altamente espresso nelle cellule mieloidi e la sua carenza è stato segnalato causare accumulo lisosomiale, iperattivazione delle risposte immunitarie mediante l'alterazione dell'attività delle cellule mieloidi e una neuroinfiammazione sistemica. Questo è accompagnato da un aumento dell' espressione di citochine proinfiammatorie come IL-1 β e IL-6 (Renton et al.,2011; DeJesus-Hernandez et al.,2011); inoltre, è stato osservato che una riduzione dell'espressione di C9Orf72 causa up-regulation dei geni che portano all' attivazione della microglia, come TREM2. Ciò potrebbe contribuire ad alterare l'attività della microglia, con conseguente

neuroinfiammazione cronica e promuovendo la neurodegenerazione (Lall et al.,2017). La mutazione recentemente scoperta del gene TBK1, , fornisce un'ulteriore evidenza dell'alterazione immunitaria nei casi di SLA/FTD, sottolineando il ruolo delle cellule gliali e della neuroinfiammazione nella patogenesi della malattia (Freischmidt et al.,2015). TBK1 è un noto regolatore del sistema immunitario innato, influenzante la produzione di interferone- α (IFN α) e interferone- β (IFN β), ed è quindi direttamente coinvolto nella neuroinfiammazione (Oakes et al.,2017). Anche le proteine Optineurina (OPTN), Sequestosoma 1/p62 (SQST1) così come la Valosin-containing protein (VCP) sono state collegate alla neuroinfiammazione e alla microglia, poiché, insieme a TBK1, possono regolare il fattore NF- κ B, ovvero, come ricordato in precedenza, uno dei cruciali regolatori dell'attivazione gliale e della neuroinfiammazione (Zhu et al.,2007; Cirulli et al.,2015). Inoltre, alcune proteine come PGRN e UBQLN2, sono analogamente importanti all'interno delle pathway autofagiche e lisosomiali, sottolineando chiaramente il ruolo dell'autofagia e della disfunzione lisosomiale nei pazienti con SLA/FTD (Chang et al.,2017; Lui et al.,2016; Rothenberg et al.,2010). Il fatto che i geni coinvolti in questi sistemi sono espressi sia dai neuroni che dalla microglia indica che entrambi i tipi cellulari potrebbero promuovere l'accumulo di proteine e alterazioni nelle risposte infiammatorie della microglia, che insieme portano ragionevolmente alla neurodegenerazione. Le mutazioni di questi geni comportano la perdita parziale della loro funzione con conseguente compromissione dell'induzione dell'autofagia, che sembra essere un meccanismo chiave alterato nella SLA/FTD.

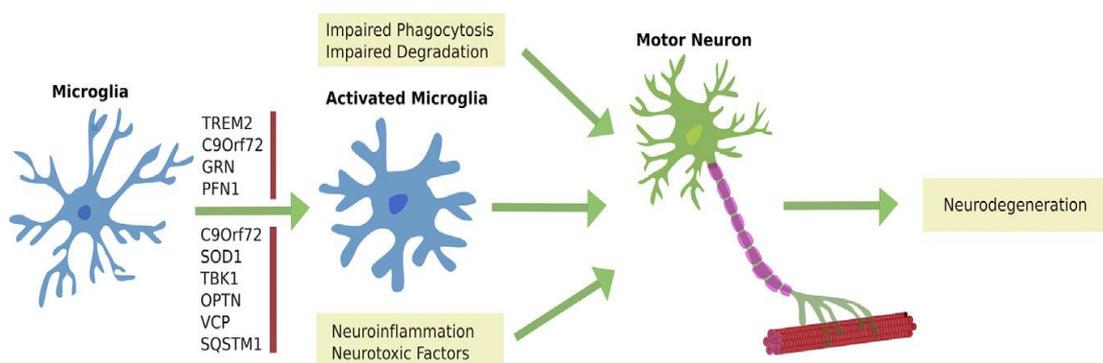


FIGURA 11. Microglia e infiammazione nella SLA/FTD. Mutazioni in geni come C9Orf72, SOD1, TBK1, OPTN, VCP e SQSTM1 hanno dimostrato attivare la microglia aumentando la produzione di fattori neurotossici e quindi la neuroinfiammazione; mentre, è stato osservato che mutazioni in TREM2, C9Orf72, GRN e PFN1 compromettono la fagocitosi microgliale. Le alterazioni in questi sistemi causano ulteriori danni alle cellule neurali, tra cui i motoneuroni nella SLA, portando alla neurodegenerazione e promuovendo la progressione della malattia. Tratto da (Haukedal et al.,2019)

3.4 Ruolo della microglia nel modulare l' autofagia nella SLA

L'autofagia è un termine generico che indica le pathway con cui componenti cellulari, come proteine malripiegate o ubiquitinate oppure organelli danneggiati, vengono consegnati ai lisosomi per la loro degradazione. Si tratta di un importante meccanismo per il mantenimento dell'omeostasi cellulare e per la sopravvivenza; sono stati descritti tre tipologie di autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia chaperone-mediata, con la macroautofagia come forma predominante (Nixon et al.,2013; Menzies et al.,2017). L'autofagia consiste in un sistema costituito da proteine correlate, note come ATGS, essenziali per mediare la formazione dell' autofagosoma (Shibutani et al.,2015). Sorprendentemente, è stato scoperto come questa pathway e le proteine ad essa associate possono influenzare l'infiammazione e l'immunità (Figura 12). Sembra infatti che le proteine dell'autofagia possano agire sia come soppressori e che come induttori di risposte infiammatorie. Gli stimoli infiammatori a loro volta influenzano l'autofagia, indicando così una chiara connessione tra i due percorsi (Levine et al.,2011; Su et al.,2016). È stato osservato che l'autofagia influenza l' attività della microglia, sia in termini di fagocitosi che di infiammazione. Sia l'autofagia che la fagocitosi mostrano molte somiglianze, basandosi sulla formazione di strutture vescicolari, autofagosomi e fagosomi, rispettivamente. Entrambi i processi inglobano e forniscono ai lisosomi sia componenti intracellulari (autofagia) che extracellulari (fagocitosi), per procedere con la loro degradazione e sono essenziali per mantenere l'omeostasi cellulare (Plaza-Zabala et al.,2017). La carenza di proteine associate all'autofagia è stato suggerito alterare l'espressione di recettori correlati alla fagocitosi, come TREM2, fornendo un'ulteriore prova della correlazione tra autofagia, fagocitosi e microglia (O'Rourke et al., 2016).

L'autofagia ha dimostrato inibire indirettamente la produzione di IL-1 β e IL-18. Ciò si ottiene tramite la digestione di mitocondri anormali e malfunzionanti, riducendo di conseguenza la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). L' aumento della quantità di ROS può infatti attivare l'inflammasoma, promuovendo la maturazione e la secrezione di citochine proinfiammatorie (Crisan et al.,2011). Sorprendentemente, gli autofagosomi possono mirare anche a tali inflammasomi e degradarli, impedendo ulteriormente la produzione di citochine e sopprimendo la risposta infiammatoria (Shi et al.,2012). Inoltre, l'autofagia può inghiottire citochine pro-infiammatorie, fornendo una regolazione aggiuntiva. Tutte queste azioni legate alla risposta infiammatoria sottolineano chiaramente il ruolo del macchinario autofagico nella microglia e nell'infiammazione (Ceisan et al.,2011; Trotti et al.,2011).

L' autofagia è un processo che è stato documentato essere compromesso in una serie di disturbi neurodegenerativi, tra cui la SLA e la FTD. Sulla base di quanto descritto sopra, se questo sistema è compromesso, può quindi causare

l'accumulo di proteine e mitocondri malfunzionanti ed un aumento del rilascio di mediatori infiammatori (Nakahira et al.,2011).

Nel complesso, le evidenze emergenti indicano che l'autofagia normalmente promuove un fenotipo della microglia anti-infiammatorio, prevenendo l'attivazione dell'inflammasoma e bloccando il rilascio di citochine proinfiammatorie. La disregolazione di questo sistema può influenzare l'attività microgliale e potenzialmente contribuire alla neuroinfiammazione cronica nei disturbi neurodegenerativi tra i quali la SLA (Plaza-Zabala et al.,2017).

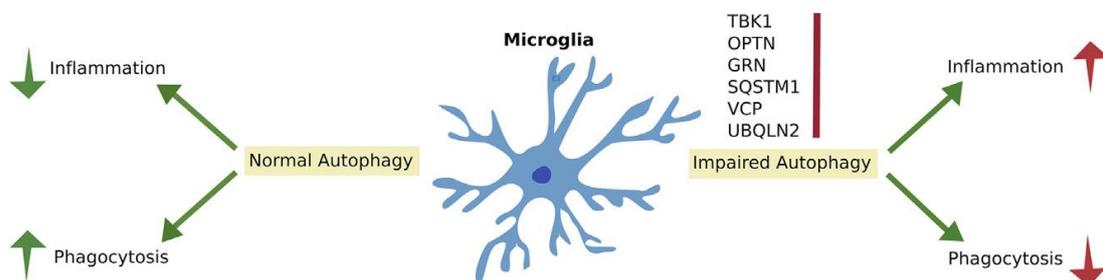


FIGURA 12. Correlazione tra autofagia e attività della microglia. Normalmente, si suggerisce come l'autofagia svolga un ruolo antinfiammatorio, promuovendo la fagocitosi e riducendo la maturazione ed il rilascio di citochine infiammatorie e fattori neurotossici. Quando questo sistema è compromesso, può, tuttavia, regolare in modo dannoso la microglia e la risposta infiammatoria. È stato dimostrato che mutazioni nei geni TBK1, OPTN, GRN, SQSTM1, VCP e UBQLN2 alterano i macchinari deputati all'autofagia. La carenza di queste proteine causa una ridotta autofagia, che si traduce in un aumento dell'infiammazione, attivazione di l'inflammasoma e un'alterata fagocitosi. Ciò indica una correlazione rilevante tra autofagia, funzione microgliale e neuroinfiammazione. Tratto da (Haukedal et al.,2019)

3.5 Attivazione della microglia associata ad un'alterazione di miRNA nella SLA

I miRNA sono piccoli RNA non codificanti, lunghi circa 22 nucleotidi, trascritti, mediante la RNA polimerasi, da regioni intergeniche o da introni di geni codificanti proteine (Krol et al.,2010) e sono coinvolti nella regolazione dei processi di traduzione e sintesi proteica (Filipowicz et al.,2008). Si legano alla sequenza di mRNA complementare, con conseguente silenziamento genico (nella maggior parte dei casi, ma possono anche promuovere una maggior espressione genica) attraverso, la degradazione dell'mRNA o tramite la repressione della traduzione (Bartel et al.,2009). Un solo miRNA di solito bersaglia molti geni diversi e spesso vari miRNA colpiscono sinergicamente un singolo gene (Thomson et al.,2011).

Il cervello ha la più alta espressione di miRNA tessuto-specifico (Babak et al.,2004; Sempere et al.,2004), con un gruppo in particolare localizzato nei

dendriti dove svolgono un ruolo importante nella plasticità neuronale del cervello adulto (Gao et al.,2010; McNeill et al.,2012) e nella morfologia delle spine dendritiche (Schratt et al.,2009). I geni FUS e TARDBP sono direttamente coinvolti nella formazione dei miRNA, attraverso il reclutamento di Drosha, un enzima ribonucleasico coinvolto nella biogenesi dei miRNA (Morlando et al.,2012), e promuovendo l'interazione tra Drosha e Dicer, un'endonucleasi RNasi coinvolta nell'elaborazione del pre-miRNA (Kawahara et al.,2012). Inoltre, la proteina TDP-43 è normalmente coinvolta nella maturazione post-trascrizionale di alcuni miRNA nel citoplasma e nel nucleo. Di conseguenza, la sua errata localizzazione in aggregati citoplasmatici presenti nella SLA è stata associata a una diminuzione nell'elaborazione di miRNA regolati da TDP-43 (Kawahara et al.,2012). È stato evidenziato il ruolo dei miRNA nella SLA quando è stato osservato un profilo di espressione di miRNA diverso nel liquido cerebrospinale, nel siero e nel sangue tra pazienti affetti da SLA e controlli sani (Butovsky et al.,2012; Benigni et al.,2016; Xu et al., 2018), dando così l'opportunità di utilizzarli come potenziali biomarcatori (Joilin et al.,2019; Ricci et al.,2018). Tuttavia, la fonte di questi miRNA rimane sconosciuta e sono necessari ulteriori studi per identificare se questi vengano rilasciati dai motoneuroni degenerati, dai muscoli atrofizzati, dagli astrociti e microglia attivati o da altri tipi cellulari.

Recenti prove suggeriscono che la disregolazione di alcuni miRNA è collegata all'attivazione microgliale nella SLA. Ad esempio, miR-22-3p, miR-125b-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, miR-214-3p e miR-365-3p sono sovraespressi nella microglia dei topi SOD1^{G93A}, e modulano i geni infiammatori legati alla SLA, come la pathway di IL-6 che determina la trascrizione di TNF (Parisi et al.,2013). Inoltre, l'attivazione in vitro della microglia wild-type provoca la sovraregolazione di alcuni miRNA, tra cui miR-22-3p, miR-125b-5p, miR-146b-5p e miR-155-5p, che sono similmente sovraregolati nella microglia SOD1^{G93A}. La sovraespressione di miR-155-5p è stata osservata prima dell'insorgenza dei sintomi e durante tutta la progressione della malattia nel midollo spinale di pazienti sia affetti da sSLA che da fSLA (Cunha et al.,2018), ma è stata riscontrata anche nel midollo spinale di ratti e topi SOD1^{G93A} allo stadio terminale. Questa sovraespressione è accompagnata da un aumento di tutti i miRNA pro-infiammatori, così come diversi geni associati alla neuroinfiammazione, alla astrogliosi e all'attivazione della microglia (Koval et al.,2013). Inoltre, l'ablazione genetica di miR-155-5p nei topi SOD1^{G93A} riduce il numero di microglia infiltrante ed attivata nel midollo spinale, prolunga la sopravvivenza, migliora le prestazioni motore e ritarda l'insorgenza della malattia (Butovsky et al.,2015). È interessante notare che anche se la microglia ha una normale capacità fagocitica in topi miR-155-5p ^{-/-}, i topi SOD1^{G93A}/ miR-155-5p ^{+/-} producono una microglia con capacità fagocitica alterata e di conseguenza non sono in grado di eliminare i neuroni degenerati. In parallelo, la maggior parte dei geni target di miR-155-5p non sono più repressi nei topi

miR-155-5p - / -. Allo stesso modo, la somministrazione centrale di anti-miR-155-5p in modelli di topo mSOD1 de-reprime i bersagli del gene miR-155-5p all'interno di neuroni, astrociti e microglia, parallelamente aumenta la sopravvivenza e si ha un miglioramento della funzione motoria. Questi risultati sono coerenti con le prove che hanno trovato miR-155-5p sovraregolato nei pazienti con SLA e che anti-miR-155-5p estende la sopravvivenza nei topi con mutazioni SOD1 (Koval et al., 2013). Pertanto, miR-155-5p sembra svolgere un ruolo nella SLA attraverso la modulazione della funzionalità microgliale. Tuttavia, a parte due studi che mostrano la sovraregolazione di alcuni miRNA all'interno microglia in modelli murini di SLA (Butovsky et al., 2012; Parisi et al., 2013), nessuno studio ha confermato se questo sia presente anche nei pazienti di SLA. Dei 29 miRNA sovraregolati nella microglia dai modelli di topo SLA, 6 sono anche sovraregolati in CSF e/o siero di pazienti umani (Tabella 1). Questi sei miRNA mirano collettivamente a oltre 10.000 geni sperimentalmente convalidati. Analisi di ontologia genica hanno mostrato un arricchimento in diversi processi biologici, tra cui alcuni processi che sono interrotti nella SLA, come la dinamica del citoscheletro, lo stress ossidativo, l'infiammazione, la regolazione dell'RNA e il trasporto organelli.

Ancora una volta si evince quindi come lo stato di attivazione della microglia nella SLA, determinato da mutazione geniche o in generale dallo stato patologico, influenza anche il profilo di miRNA prodotti e potenzialmente rilasciati dalla stessa microglia attraverso vescicole extracellulari (vedi capitolo 2.3). Alla luce di questi aspetti, la possibilità di una modulazione farmacologica attraverso i recettori espressi dalla microglia, e tra questi i recettori glutammatergici mGluRs del gruppo I, rappresenta un approccio potenzialmente percorribile per il trattamento della SLA.

3.6 Ruolo dei recettori metabotropi glutammatergici del gruppo I espressi dalla microglia nella SLA

I recettori extra-sinaptici svolgono un ruolo regolatorio nella rete neuronale coordinando la comunicazione cellula-cellula. In questo modo, le sostanze neuroattive non sono solo confinate alla fessura sinaptica a governare la conduttività e la connessione neuronale, ma si diffondono anche nello spazio extracellulare, attraverso il gradiente di concentrazione, al fine di comunicare con le cellule non neuronali. In questo ambito la microglia, come visto nel capitolo iniziale, esprime una grande varietà di recettori per diversi neurotrasmettitori, i quali possono essere attivati e determinare variazioni significative del fenotipo cellulare durante il decorso della SLA; questi

cambiamenti cellulari della microglia indotti dai neurotrasmettitori o fattori che diffondono nello spazio extracellulare, a loro volta influenzano altre cellule gliali come gli astrociti e soprattutto impattano sulla vitalità dei MN circostati. Nei paragrafi successivi verranno evidenziate nello specifico le attività che vengono modulate dai recettori metabotropi glutammatergici del gruppo I espressi dalla microglia durante la progressione della SLA ed il loro potenziale ruolo eziopatologico.

3.6.1 I recettori glutammatergici nella SLA

L'eccitotossicità glutammatergica è stato suggerito giocare un ruolo importante nella neurogenerazione mediata dalla microglia nella SLA. Ad esempio, sono stati rilevati livelli aumentati di glutammato nel liquido cerebrospinale di alcuni pazienti con SLA (Rothstein et al.,1990). La microglia attivata aumenta la suscettibilità dei motoneuroni alla tossicità del glutammato, riducendo la ricaptazione del glutammato da parte degli astrociti (Zhao et al.,2004). Inoltre, il rilascio di glutammato da parte della microglia attivata, causato dall'azione del TNF induce già di per sé morte neuronale (Takeuchi et al.,2006); per contro, il blocco dell'eccessivo rilascio di glutammato sopprime la perdita neuronale nel midollo spinale di modelli murini di SLA (Takeuchi et al.,. 2011).

Relativamente il coinvolgimento del glutammato nella fisiopatologia della SLA è stato a lungo studiato considerando anche che l'unica molecola farmacologica approvata per il trattamento della SLA dal 1995, resta fino ad ora il riluzolo, ovvero un inibitore in grado di modificare, seppure in maniera molto aspecifica, il rilascio di glutammato, ottenendo un modestissimo miglioramento del decorso clinico dei pazienti SLA. (Oskarsson et al.,2018). La microglia esprime sia recettori ionotropi che metabotropi che mediano complessivamente la risposta al glutammato e partecipano al processo di neuroinfiammazione e di neurodegenerazione (Liu et al.,2016). Ad esempio, il glutammato rilasciato dalla microglia attivata induce la morte diretta dei motoneuroni per eccitotossicità. Inoltre, sia nel midollo spinale che in alcune aree della corteccia motoria si registrano gravi danni ai motoneuroni, per una perdita o in generale disfunzione selettiva dei trasportatori che si occupano del re-uptake del glutammato da parte degli astrociti, contribuendo ulteriormente all'aumento dell'eccitotossicità e di conseguenza alla morte dei motoneuroni (Pehar et al.,2017). Questi aspetti hanno sollevato la necessità e possibilità di individuare nuovi target terapeutici rivolti in particolare alla modulazione del sistema glutammatergico in diversi tipi di cellule gliali, anche perché i farmaci che agiscono sul sistema glutammatergico sono in grado di contrastare l'eccitotossicità non solo riducendo il glutammato rilasciato, ma anche indirettamente inducendo la produzione di fattori neurotrofici (Battaglia et al.,2018; Blasco et al.,2014). Nel 2004, Zhao et al.

hanno studiato gli effetti diretti del glutammato su cellule di microglia derivante da pazienti affetti da SLA e attivata da LPS o da immunocomplessi IgG e i loro effetti sulla sopravvivenza sui motoneuroni in coltura. Hanno dimostrato che la microglia induce direttamente danno ai motoneuroni mediante il glutammato, e l'inibizione dei recettori AMPA e kainato era in grado di prevenire gli effetti tossici della microglia attivata. Inoltre, l'aggiunta di astrociti sani alle co-culture di motoneuroni e microglia attivata era in grado di prevenire la morte dei motoneuroni, diminuendo il glutammato nell'ambiente extracellulare. Infine, la microglia attivata aumenta indirettamente la suscettibilità dei motoneuroni agli effetti tossici del glutammato riducendo l'uptake del glutammato da parte degli astrociti (Zhao et al.,2004). Il rilascio dannoso di glutammato microgliale è stato ulteriormente studiato da Takeuchi e collaboratori dimostrando che il TNF- α induce neurotossicità attraverso un significativo rilascio di glutammato autocrino da parte della microglia principalmente attraverso le gap-junctions e causato dall' up-regulation della glutaminasi (Takeuchi et al.,2006). Gli autori hanno anche dimostrato che la morte neuronale è prevenuta da un inibitore della glutaminasi o da bloccanti degli emicanali in grado di ripristinare il rilascio fisiologico di glutammato da parte della microglia. Successivamente, lo stesso gruppo di lavoro ha generato un bloccante degli emicanali permeabile alla barriera ematoencefalica a base di acido glicirretico, e ha dimostrato come il blocco farmacologico degli emicanali inibisce il rilascio eccessivo di glutammato da parte della microglia attivata, sia in vitro che in vivo (Takeuchi et al.,2011; Takeuchi et al.,2014). Ancora più importante, la somministrazione di inibitori delle gap-junction in topi SOD1^{G93A} e SOD1^{G37R} modello di SLA, determina un'inibizione significativa del rilascio eccessivo di glutammato microgliale, una ridotta perdita di motoneuroni nel midollo spinale, che si traduce in un miglioramento della progressione della malattia e della sopravvivenza (Takeuchi et al.,2011; Takeuchi et al.,2014). Questi risultati suggeriscono che le gap-junction e gli emicanali potrebbero rappresentare un nuovo target per la prevenzione della morte neuronale mediata dalla microglia nella SLA. Il legame tra glutammato e microglia è stato ulteriormente confermato anche dal lavoro di Liu e collaboratori dimostrando che il riluzolo è in grado di modulare l'attivazione della microglia primaria nel ratto diminuendo i marcatori proinfiammatori indotti da LPS e aumentando i marcatori indicativi del fenotipo di microglia protettiva come per esempio IL-4, suggerendo così che il riluzolo è neuroprotettivo anche attraverso meccanismi mediati dalla microglia (Liu et al.,2013).

Dal momento che il rilascio di glutammato da parte della microglia attivata si verifica principalmente attraverso l'antiporto cistina/glutammato attraverso la subunità xCT/Sistema Slc7a11, nel 2015 Boille e collaboratori hanno studiato questo sistema come potenziale approccio per rallentare la progressione della malattia in topi modello di SLA(Mesci et al., 2015). I risultati ottenuti hanno

mostrato per la prima volta che l'espressione di xCT è aumentata nella microglia presente nel midollo spinale del topo SLA e assente nei motoneuroni. Inoltre è stato dimostrato che, durante la progressione della malattia, la microglia attivata induce l'espressione di xCT e che i livelli di xCT sono aumentati sia nel tessuto midollo spinale che nella microglia isolata da topi SOD1^{G93A}. È interessante notare che l'espressione di xCT è presente anche nel midollo spinale post mortem di pazienti con SLA ed è associata ad un'aumentata infiammazione. Inoltre, sostenendo l'idea che il sistema xCT potrebbe essere un mediatore di attività della microglia, è stato dimostrato che la delezione genetica di xCT nei topi SLA diminuisce i livelli di fattori pro-infiammatori associati alla microglia come l'ossido nitrico, TNF- α e IL-6, mentre aumenta l'espressione dei marker neuroprotettivi Ym1 / Chil3. Sorprendentemente, la delezione di xCT nei topi mSOD1 anticipa l'insorgenza della malattia, ma ne rallenta la progressione, coerentemente con il duplice ruolo della microglia e del glutammato durante la progressione della malattia (Mesci et al.,2015). Presi insieme, questi studi rivelano un ruolo importante del glutammato e della sua attività nel modulare il fenotipo della microglia e l'acquisizione di funzioni neurotossiche suggerendo come la strategia terapeutica mirata a bloccare o modulare gli effetti del glutammato sulla microglia può rivelarsi un approccio promettente.

3.6.2 Alterazioni della proliferazione gliale e dell'espressione dei recettori mGluR nella SLA

Come ricordato nei capitoli iniziali, la massiccia astrogliosi e la degenerazione dei motoneuroni nella corteccia e nel midollo spinale sono le caratteristiche peculiari istopatologiche della SLA (Kushner et al.,1991; Schiffer et al.,1996). Tradizionalmente, l'astrogliosi si pensava essere secondaria alla perdita dei motoneuroni con lo scopo di sostituire il tessuto degenerato e formare la tipica "cicatrice astrogliale". Tuttavia, prove crescenti indicano come la disfunzione gliale possa essere direttamente coinvolta nella patogenesi di SLA.

Nello studio di Anneser e collaboratori (2004) è stata descritta una sovraregolazione delle proteine e dell' mRNA dei recettori mGluR del gruppo I e II in cellule gliali provenienti dal midollo spinale di pazienti con SLA. Nei pazienti di controllo risultavano espressi solo livelli moderati di mRNA codificanti per i mGluR1 e mGluR3 in cellule gliali del midollo spinale, mentre GluR2 e GluR5 erano molto poco rilevabili. Ciò è in accordo con i risultati in vitro descritti in precedenza da Silva e collaboratori (1999) dove si mostrava una robusta espressione di mGluR1 ed mGluR2/3 in astrociti di midollo spinale coltivati in vitro, mentre gli altri sottotipi recettoriali risultavano pressochè assenti. Quindi, l'espressione di mGluR1 sembra essere specifica per la glia del midollo spinale, poiché non è stata rilevata negli astrociti di altre

regioni (Biber et al.,1999; Ciccarelli et al.,1997; Heck et al.,1997). Tuttavia, nonostante i livelli moderati di mRNA di mGluR1 e mGluR3 osservati nei pazienti di controllo, i livelli di mRNA non coincidevano con le intensità del segnale IHC, che erano ugualmente basse con tutti gli anticorpi utilizzati. Sono state inoltre descritte discrepanze simili tra l'espressione dell'mRNA di mGluR ed il contenuto proteico (Ciccarelli et al.,1997). Tuttavia, grandi variazioni nei livelli di espressione mGluR gliale sono state riscontrate tra i vari pazienti. Similmente all'estensione variabile dell'astrogliosi nei pazienti con SLA, che è stata descritta in precedenza (Schiffer et al.,1996), questa osservazione può mettere in luce le differenze nei diversi stadi della malattia e/o la gravità della patologia.

Tuttavia, solamente da questi dati post-mortem, non si può dedurre l'impatto della sovraregolazione di mGluR nelle cellule gliali durante tutto il processo patologico. Pertanto, si è cercato di correlare questi risultati con effetti funzionali valutabili dell'attivazione di mGluR in cellule gliali. Nello studio post-mortem, l'espressione di mGluR era principalmente osservata in astrociti che mostravano cambiamenti delle caratteristiche morfologiche delle cellule gliali reattive (Ludolph et al.,2000). Siccome l'attivazione di mGluR è stata associata alla proliferazione gliale (Ciccarelli et al.,1997; Schinkmann et al.,2000), si è formulata l'ipotesi secondo cui l'attivazione di mGluR possa contribuire alla proliferazione gliale nella SLA. Vari studi hanno rivelato in precedenza che il liquido cerebrospinale (CSF) può esacerbare proprietà specifiche della malattia nelle colture cellulari. Il CSF estratto da modelli di SLA si è dimostrato essere tossico in colture di cellule corticali (Terro et al.,1996; Couratier et al., 1994) e di aumentare l'espressione di c-Fos in fettine di midollo spinale tramite un incremento dell'attività glutamatergica (Manabe et al.,1999). Livelli elevati di glutammato nel liquido cerebrospinale dei pazienti con SLA sono stati infatti descritti precedentemente, sebbene questi risultati non siano stati confermati (Camu et al.,1993; Spreux-Varoquaux et al.,2002). In vivo, il CSF, iniettato per via intratecale, ha causato astrogliosi reattiva nei topi neonati (Shahani et al.,1998). Allo stesso modo, è stata riscontrata una differenza significativa nel tasso di proliferazione tra colture trattate con CSF e di controllo. Inoltre, è stata riscontrata una riduzione del numero di cellule in proliferazione e nell'espressione della vimentina dopo l'aggiunta dell'antagonista mGluR del gruppo I AIDA in entrambi i gruppi trattati, suggerendo che la promozione della proliferazione per azione del CSF di controllo e di quello malato era almeno parzialmente mediata dall'attivazione di mGluR. Sorprendentemente, la riduzione proporzionale delle cellule proliferanti per addizione di AIDA era significativamente più alto nelle colture trattate con CSF malato che nelle colture trattate con CSF di controllo. Questi dati dimostrano la presenza nella SLA, di profonde alterazioni soprattutto di carattere funzionale e meccanicistico dei recettori mGluR gliali espressi nel midollo spinale. Inoltre, suggeriscono che la

stimolazione dei recettori mGluR nella SLA può indurre la proliferazione gliale e regola l'espressione dei trasportatori del glutammato (Gevelashvili et al., 2000; Aronica et al., 2003). I recettori mGluR gliali possono quindi collegare l'astrogliosi e la microgliosi con i disturbi nell'omeostasi del glutammato, due fenomeni chiave osservati nella SLA. Ulteriori studi con topi transgenici SOD1 mutati sono tutt'ora attivi per studiare l'espressione di mGluR nelle cellule gliali reattive durante il decorso della malattia e per testare possibili interventi farmacologici in questo modello animale.

3.6.3 Ruolo dei recettori mGluR5 in colture di microglia ottenuta da topi SOD1^{G93A} modello di SLA

I dati di Berger e collaboratori (2012) suggeriscono come un tessuto infiammato inneschi una regolazione opposta nell'espressione genica dei due predominanti sottotipi mGluR (mGluR5 e mGluR3) nelle cellule gliali e che questa regolazione sia particolarmente sostenuta in colture cellulari SOD1^{G93A}. Lo studio in questione ha avuto come obiettivo quello di esaminare l'espressione genica di mGluR5 e mGluR3 in colture primarie di microglia e astrociti esposte a stimoli infiammatori. Si dimostra che le citochine pro-infiammatorie, TNF α e IL-1 inducono una massiccia diminuzione dell'espressione di mGluR5 e un aumento mGluR3 negli astrociti coltivati; una regolazione opposta di mGluR3 e mGluR5 è stata osservata invece nella microglia dopo esposizione ad LPS. La down-regulation di mGluR5 era già stata evidenziata, sia a livello di mRNA che di proteine, sia in astrociti differenziati trattati con IL-1 (Aronica et al., 2005) o con trombina (Miller et al., 1996) sia in colture di astrociti naive incubati con terreno condizionato dalla microglia attivata da LPS (Tilleux et al., 2007). Nella microglia in vitro, invece, la regolazione di mGluR5 dopo l'attivazione, non era mai stata caratterizzata. La diminuzione dell'espressione di mGluR5 in condizioni infiammatorie è piuttosto inaspettata dato che diversi modelli patologici hanno dimostrato essere associati a una sovraregolazione di mGluR5, come l'epilessia (Aronica et al., 2000), il danno neuronale indotto dal kainato (Ferraguti et al., 2001), la sclerosi multipla (Geurts et al., 2003) o le lesioni dell'ippocampo di natura eccitotossica (Drouin-Ouellet et al., 2011). Diversamente dallo studio di Berger e collaboratori (2012), questi modelli patologici tengono conto del persistente crosstalk esistente tra i diversi tipi di cellule, che portano a un ambiente complesso e arricchito di molti mediatori infiammatori provenienti da molteplici fonti. In colture gliali derivate da topi SOD1^{G93A} l'*up-regulation* di mGluR3, ma non la down-regulation di mGluR5, è risultata essere incrementata sia in astrociti che nelle cellule di microglia. Mostrando quindi un incremento della risposta a stimoli infiammatori

(Hensley et al., 2006), le colture gliali SOD1^{G93A} costituiscono un modello interessante per caratterizzare ulteriormente l'impatto della neuroinfiammazione su target selezionati. Nello studio riportato, nella microglia e negli astrociti di ratti neonati wild-type o transgenici, sono stati misurati simili livelli di mRNA che codificano per mGluR3. Al contrario, l'espressione genica di mGluR5 era maggiore nella glia hSOD1^{G93A} rispetto alle cellule wild-type (1.2 e 2 volte maggiore rispettivamente negli astrociti e nella microglia). La stimolazione di mGluR5 espresso dalla microglia sembra supportare la neuroprotezione in quanto attenua la reattività e la tossicità della microglia attivata da LPS attraverso la riduzione dell'ossido nitrico (NO), specie reattive dell'ossigeno (ROS) e produzione di TNF α (Byrnes et al., 2009b; Loane et al., 2009). Per quanto riguarda mGluR3, è stata evidenziata sia negli astrociti che nella microglia una robusta sovraregolazione a livello di mRNA, mentre la rilevazione proteica si è rivelata estremamente difficile nelle colture gliali (Aronica et al., 2003; Ciccarelli et al., 1997) anche dopo la forte up-regulation innescata da trattamenti infiammatori. È stato segnalato che l'attivazione di questo recettore negli astrociti promuove il rilascio di TGF β , che media la neuroprotezione contro la tossicità indotta da NMDA (Bruno et al., 1998; Corti et al., 2007), mentre nella microglia attenua la neurotossicità (Pinteaux-Jones et al., 2008). Da questi studi, che rappresentano gli unici al momento svolti su colture di microglia preparata da modelli SLA, emerge come sia ancora molto poco chiaro il ruolo dei recettori mGluRs espressi dalla microglia ed il loro potenziale ruolo come target terapeutici.

3.6.4 Modulazione genetica e farmacologica dei recettori mGluR1 ed mGluR5 nella sclerosi laterale amiotrofica: implicazione della microglia

Un importante contributo allo studio dei recettori glutamatergici nel modello murino di SLA viene dai risultati del gruppo di ricerca del Prof. Bonanno, presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università di Genova, dove ho svolto il mio periodo di studi e con il quale gruppo ho potuto sviluppare la presente tesi compilativa. Nello specifico, Milanese e collaboratori hanno primariamente dimostrato una alterata espressione e funzionalità dei recettori mGluR1 ed mGluR5 espressi da terminazioni glutamatergiche purificate da midollo spinale di topi SOD1^{G93A} (Giribaldi et al., 2013; Bonifacino et al., 2019). Innanzi tutto è stato dimostrato per la prima volta come questa disregolazione funzionale dei due sottotipi recettoriali è presente sia in una fase tardiva sintomatica che in una fase molto precoce e pre-sintomatica della patologia, determinando una ulteriore modulazione positiva del rilascio di glutammato, già patologicamente aumentato nei neuroni glutamatergici del midollo spinale di topi SOD1^{G93A} (Milanese et al., 2010; Milanese et al., 2011; Bonifacino

et al., 2016).

Successivamente, mediante modelli murini doppi transgenici è stato dimostrato come la riduzione in eterozigosi di mGluR1 nel topo SOD1^{G93A} ritardi l'insorgenza della malattia, migliori la progressione della patologia, così come determina un incremento significativo dell'aspettativa di vita dei topi doppi mutanti. Questi eventi erano accompagnati da una riduzione concomitante dell'espressione di mGluR5 ed una diminuzione dell'eccessivo rilascio di glutammato, rispetto ad animali SOD1^{G93A} di controllo. Parallelamente ai dati comportamentali e di sopravvivenza sono stati dimostrati anche dei miglioramenti istologici ovvero una ridotta perdita dei motoneuroni spinali, un ridotto danno mitocondriale, una diminuzione dell'attivazione degli astrociti e soprattutto anche una ridotta proliferazione della microglia positiva per il marcatore IBA1 (Figura 13), suggerendo quindi che livelli ridotti di mGluR1, oltre a determinare un miglioramento generale dell'outcome clinico in topi SOD1^{G93A}, determinano una significativa ridotta proliferazione ed attivazione gliale, inclusa quella della microglia, quindi potrebbero costituire un nuovo razionale per strategie farmacologiche della SLA (Milanese et al., 2014). Purtroppo non esistono al momento molecole sperimentali farmacologicamente e soprattutto farmacocineticamente favorevoli per trattamenti cronici con antagonisti mGluR1. Inoltre bisogna tenere in considerazione che una totale ablazione genetica così come il blocco farmacologico totale degli stessi recettori mGluR1 determina una grave sintomatologia atassica paradossalmente addirittura peggiorativa rispetto ai soli tratti clinici della SLA (Bonifacino et al., 2019).

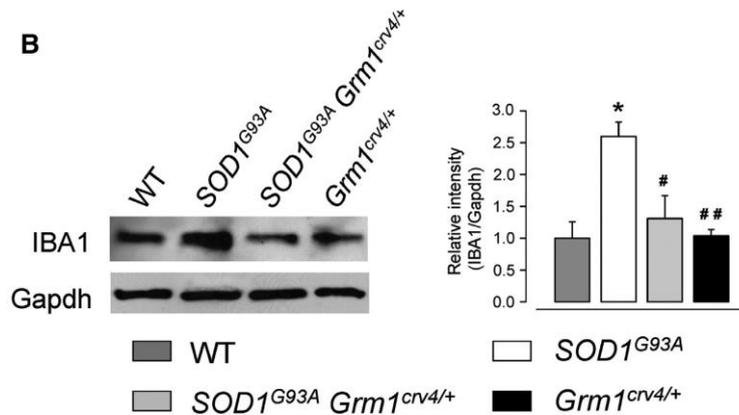


FIGURA 13. Microgliosi nel midollo spinale di topi WT, SOD1^{G93A}, SOD1^{G93A}Grm1^{crv4/+} e Grm1^{crv4/+}. L'espressione di IBA-1 (**B**) è stata misurata come indice di attivazione e proliferazione della microglia, rispettivamente. IBA-1 è stato determinato in omogenati del midollo spinale lombare mediante SDS-PAGE e Western blotting utilizzando un anticorpo monoclonale murino anti-IBA-1. Sono riportate bande immunoreattive rappresentative (pannelli di sinistra) e l'analisi quantitativa (pannelli di destra). La sovraespressione di IBA-1 rilevata nei topi SOD1^{G93A} è stata normalizzata nei topi SOD1^{G93A}Grm1^{crv4/+}. Tratto da (Milanese et al.,2013)

In un articolo successivo gli autori hanno studiato gli effetti dell'ablazione genetica parziale di mGluR5 in topi SOD1^{G93A}, dimostrando come la perdita di questo recettore riduca ancora una volta l'eccessivo rilascio di glutammato nel midollo spinale dei topi mSOD1, ritarda l'insorgenza della malattia, prolunga la sopravvivenza dei topi e diminuisce la perdita dei motoneuroni spinali. Per quanto riguarda l'ambito del presente manoscritto anche una parziale ablazione genetica del recettore mGluR5 si traduceva in una ridotta attivazione delle cellule gliali e nello specifico sia gli astrociti positivi per GFAP, e soprattutto la microglia marcata con CD11b, come marker di attivazione (Figura 14). Questi risultati rafforzano l'ipotesi che gli mGluR5 appartenenti al gruppo I possano diventare potenziali bersagli contro la SLA (Bonifacino et al.,2017).

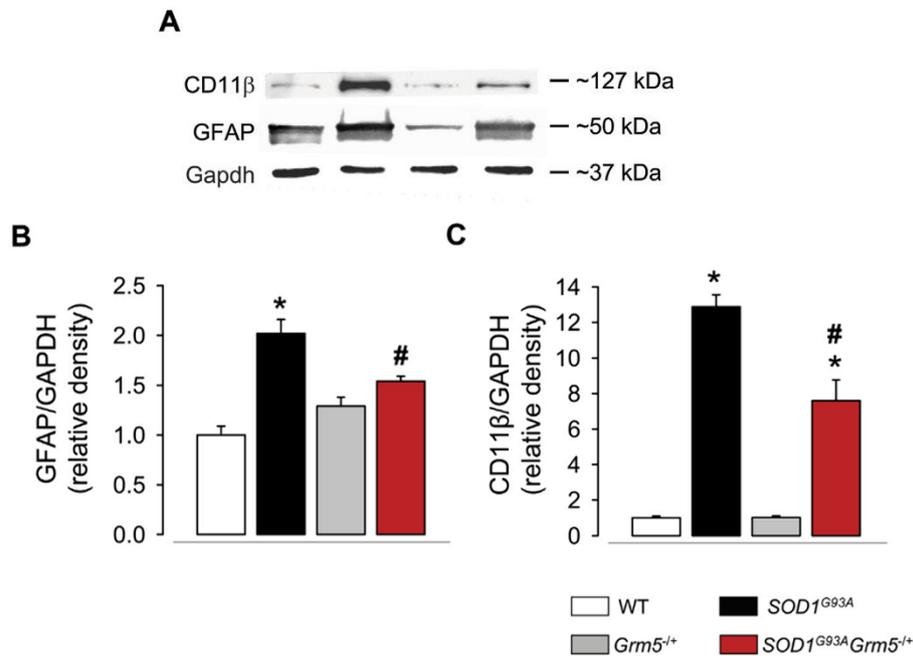


FIGURA 14. L'espressione di GFAP e CD11b è stata misurata, come indice di astrogliosi e di microglia proliferante, rispettivamente, in omogenati di midollo spinale in topi WT, SOD1^{G93A}, Grm5^{-/+} e SOD1^{G93A}Grm5^{-/+}. Sono riportate le quantificazioni della densitometrie dei blots (A), per astrogliosi (B) e di microglia proliferante (C). GFAP e CD11b sono stati determinati mediante SDS-PAGE e Western blotting utilizzando un anticorpi monoclonali anti-GFAP e anti-CD11b. I dati dei grafici a barre sono espressi come media \pm s.e.m di 4 esperimenti indipendenti (replicati biologici bilanciati per sesso), eseguiti in triplicato (replicati sperimentali); ovvero 4 topi per gruppo; 3 topi WT maschi e 1 femmina WT; 2 topi maschi e due femmine SOD1^{G93A}; 1 maschio e 3 femmine Grm5^{-/+} e 2 topi maschi e 2 femmine SOD1^{G93A}Grm5^{-/+}). * $p < 0,01$ rispetto ai topi WT; # $p < 0,05$, rispetto ai topi SOD1^{G93A}. Tratto da: (Bonifacino et al.,2017)

Sulla base dei promettenti risultati del 2017 e considerando che, a differenza del sottotipo mGluR1, una totale assenza o blocco del recettore mGluR5 non produce un fenotipo con palesi effetti collaterali, è stato prodotto un terzo modello doppio mutante apportando una totale ablazione genetica del recettore mGluR5 nel modello murino SOD1^{G93A} (Bonifacino et al., 2019). L'abolizione di mGluR5 nei topi SOD1^{G93A} ha portato complessivamente ad un pronunciato miglioramento clinico, sia per quanto riguarda l'insorgenza dei sintomi di malattia che della probabilità di sopravvivenza, addirittura più evidenti rispetto ai topi eterozigoti per il recettore. Il quadro clinico era, come nei casi precedenti accompagnato da una maggior preservazione dei MN nel midollo spinale, ma soprattutto ad una ridotta attivazione e proliferazione gliale di asrociti e microglia (IBA1 positiva), come mostrato nella figura 15.

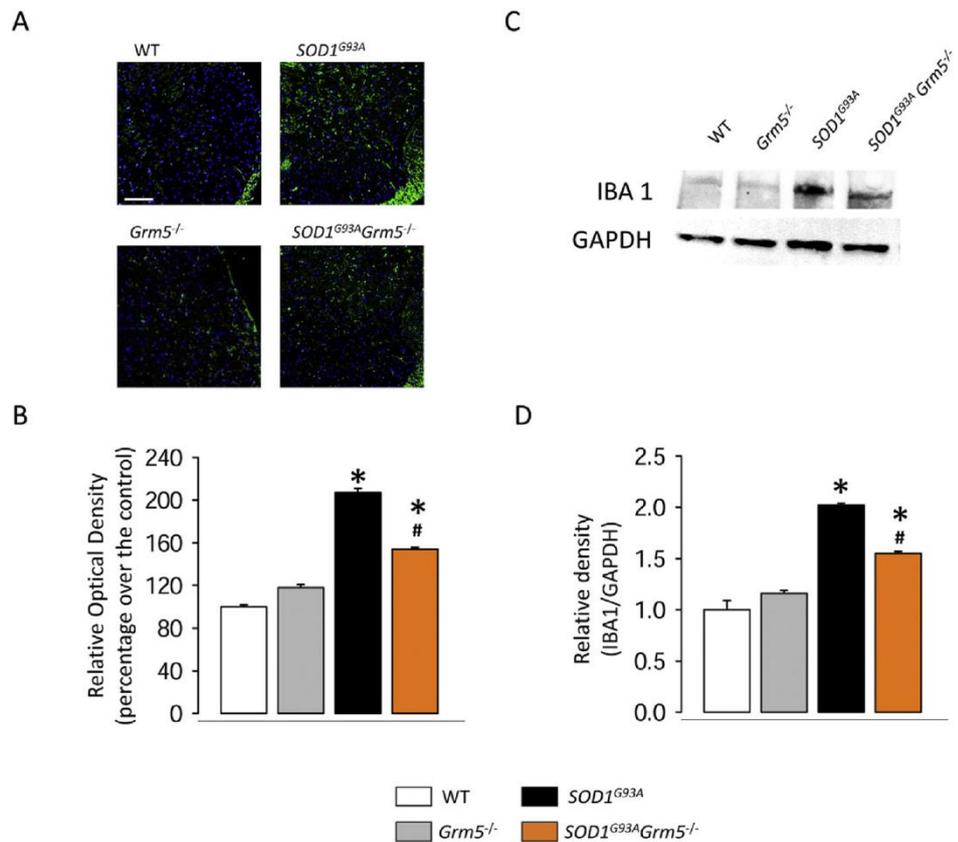


FIGURA 15. Valutazione della microgliosi nel midollo spinale da topi WT, Grm5^{-/-}, SOD1^{G93A} e SOD1^{G93A}Grm5^{-/-}. L'espressione di IBA-1 è stata misurata come indice di proliferazione della microglia ed è stata determinata in fettine di midollo spinale mediante immunofluorescenza (IF) e microscopia confocale e negli omogenati di tessuto mediante SDS-PAGE e WB, utilizzando un anticorpo policlonale anti-IBA-1. Sono riportate le immagini ottenute mediante immunofluorescenza (IF- A, barra della scala: 200 μ m), analisi quantitativa della IF (B), bande di immunoreattività tramite WB (C) e analisi quantitativa die WB (D). I dati quantitativi dagli esperimenti di microscopia confocale sono espressi come media \pm s.e.m. di 3 esperimenti indipendenti (replicati biologici) eseguiti in triplicato (replicati sperimentali), ovvero 3 topi per gruppo bilanciati per sesso; 3 sezioni per topo; topi WT: 1 maschio e 2 femmine; topi Grm5^{-/-}: 2 maschi e 1 femmina; topi SOD1^{G93A}: 1 maschio e 2 femmine; topi SOD1^{G93A}Grm5^{-/-} topi: 1 maschio e 2 femmine. I dati quantitativi dagli esperimenti di WB sono espressi come media \pm s.e.m. di 3 esperimenti indipendenti (replicati biologici) eseguiti in triplicato (replicati sperimentali), ovvero 3 topi per gruppo bilanciati per sesso; topi WT: 2 maschi e 1 femmina; topi Grm5^{-/-}: 1 maschio e 2 femmine; topi SOD1^{G93A}: 2 maschi e 1 femmina; topi SOD1^{G93A}Grm5^{-/-} topi: 2 maschi e 1 femmina). *p < .001 rispetto ai rispettivi controlli; #p < .001 rispetto a topi SOD1^{G93A}. Tratto da (Bonifacino et al.,2019)

Come ultimo step con proiezione traslazionale di questa linea di ricerca, è stato pubblicato recentemente un ultimo articolo dello stesso gruppo di ricerca dove sono stati testati gli effetti del trattamento farmacologico cronico di topi SOD1^{G93A} topi con il composto sperimentale 2-cloro-4-((2,5-dimetil-1-(4-(trifluorometossi)fenil)-1H-imidazol-4-il)etil)piridina (CTEP), un modulatore allosterico negativo (NAM) selettivo dei recettori mGlu5 (Milanese et al., 2021). Questo è un composto biodisponibile per via orale e presenta proprietà farmacocinetiche estremamente favorevoli (Lindemann et al., 2011). I risultati ottenuti dimostrano come il trattamento con CTEP, a partire dal 90 giorno di vita, ovvero una fase sintomatica precoce della malattia, sia stato in grado, in maniera dose dipendente, di aumentare significativamente la probabilità di sopravvivenza degli animali, rallentando la progressione della patologia oltre che migliorando diversi parametri biochimici legati alla SLA. Questi effetti erano più evidenti nelle femmine che nei topi maschi SOD1^{G93A}. Di rilevante importanza, come accaduto negli studi precedenti dove si era apportata un'ablazione parziale o totale del recettore mGluR5, anche dopo trattamento cronico con il farmaco CTEP, si è registrata una ridotta attivazione gliale. Nello specifico è stata evidenziata una minor astrogliosi ma anche una minor proliferazione delle cellule di microglia positive al marcatore specifico IBA1, nel midollo spinale di topi SOD1^{G93A} trattati con CTEP rispetto ad animali di controllo trattati con il veicolo (Figura 16).

Questo recente ed ultimo articolo, segna un importante passo avanti verso l'applicabilità di un farmaco in grado di modulare efficacemente l'attività del recettore mGluR5 nello specifico, e conseguentemente andare a modificare positivamente molti aspetti legati all'insorgenza, ma anche al decorso di questa infausta patologia neurodegenerativa quale la SLA. Al centro di tutti gli effetti terapeutici si ipotizza ci possano essere ancora una volta le cellule gliali astrociti e microglia, il loro stato di attivazione e quindi la possibilità attraverso un approccio farmacologico di ridurre in qualche modo le caratteristiche neurotossiche.

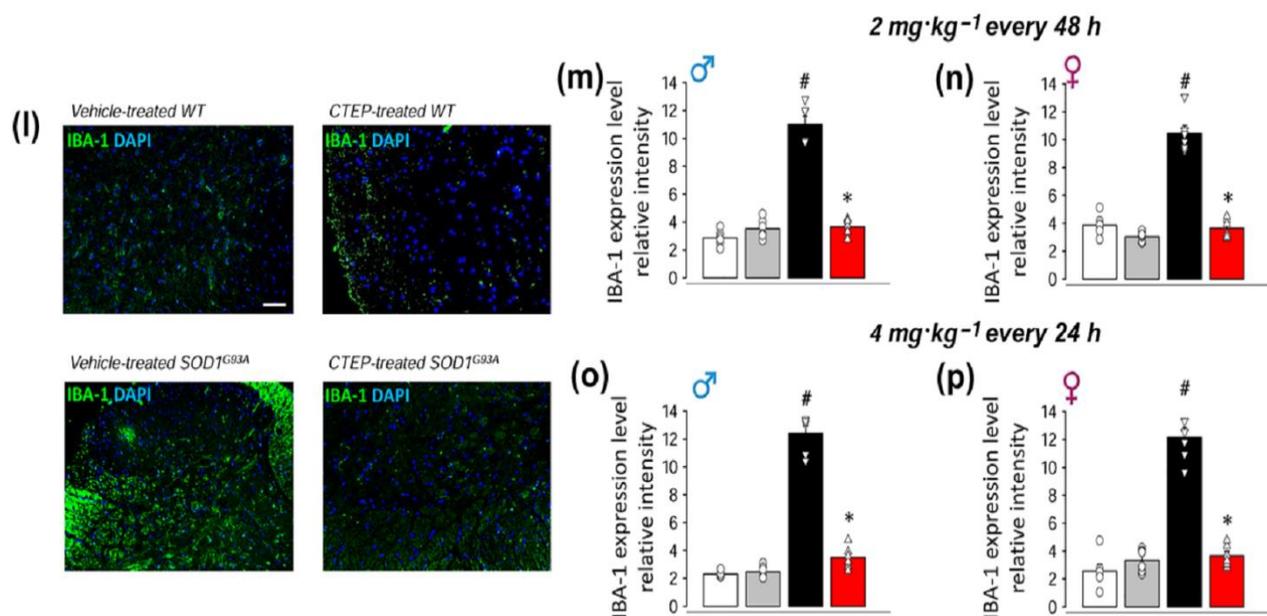


FIGURA 16. L' espressione del marcatore IBA-1 è stato utilizzato per identificare il grado di proliferazione della microglia attraverso esperimenti di IF usando anticorpi policlonali anti-IBA1 ed il colorante fluorescente DAPI per i nuclei. (l) Immagini rappresentative degli esperimenti di IF ottenute in topi SOD1^{G93A} trattati con CTEP a dose elevata e animali di controllo trattati con veicolo e topi WT. (m e n) Analisi quantitativa dell' intensità di IF in topi SOD1^{G93A} trattati con bassa dose di CTEP e con veicolo e topi WT, maschi o femmine. (o e p) Analisi quantitativa dell' intensità di IF in topi SOD1^{G93A} trattati con alta dose di CTEP e con veicolo e topi WT, maschi o femmine. I dati quantitativi sono espressi come media \pm SEM da 6 replicati biologici (n=6 topi per gruppo per sesso). Il grafico di dispersione mostra i punti corrispondenti alle singole repliche biologiche. *P<0,05 significativamente diverso da gruppo di topi SOD1^{G93A} trattati con veicolo; #P<0,05 significativamente diverso dal corrispondente topo WT. Tratto da: (Milanese et al.,2021)

Conclusioni e prospettive terapeutiche correlate alla modulazione del fenotipo microgliale nella sclerosi laterale amiotrofica

Molte strategie terapeutiche neuroprotettive hanno come nuovo target la microglia, e sono basate su approcci farmacologici e genetici, mirando a modulare la reattività della microglia nel tentativo di migliorare l'esito clinico primariamente testandoli su modelli animali prima di passare all'uomo. A questo proposito, studi pionieristici basati sulla somministrazione di minociclina, un antibiotico appartenente alla classe delle tetracicline, ha dimostrato prevenire l'attivazione della microglia quando somministrato in

topi SOD1^{G93A} e SOD1^{G37R} prima dell'insorgenza della malattia; è in grado di attenuare l'attivazione della microglia oltre che ritardare l'insorgenza e la mortalità (Kriz et al., 2002; Van Den Bosch et al., 2002; Zhu et al., 2002). D'altra parte, se somministrato dopo l'insorgenza della malattia, non riesce a migliorare l'andamento della patologia, aumentando perfino la microgliosi (Keller et al., 2011). È interessante notare che i recenti risultati ottenuti in topi SOD1^{G37R} hanno dimostrato che la minociclina attenua in modo specifico il fenotipo M1, senza influenzare l'espressione di marcatori M2 (Kobayashi et al., 2013), evidenziando così il ruolo cruciale esercitato dalla modulazione dell'equilibrio M1 / M2 nell'efficacia terapeutica.

L'iperattivazione dei recettori P2X7, fortemente coinvolti nella risposta neuroinfiammatoria (Burnstock, 2008; Apolloni et al., 2009; Volonté et al., 2012; Sperlágħ e Illes, 2014), sono stati descritti nella microglia sia di pazienti affetti da SLA che di modelli animali (Yiangou et al., 2006; D'Ambrosi et al., 2009), dove sono associati alla produzione di fattori pro-infiammatori, compreso miR-125b (D'Ambrosi et al., 2009; Parisi et al., 2013, 2016a). Coerentemente con questo, la somministrazione dell'antagonista P2X7 Brilliant Blue G (BBG), in un lasso di tempo critico, migliora diverse caratteristiche della malattia (Cervetto et al., 2013; Apolloni et al., 2014). La neuroprotezione di BBG, ottenuta con una somministrazione alla fine della fase asintomatica, è supportata dalla sovraregolazione di IL-10 e BDNF, associata al fenotipo M2 insieme a una riduzione di NF-kB, NOX-2 e IL-1b, marcatori di polarizzazione M1. Tuttavia, la somministrazione di BBG nelle fasi troppo precoci della malattia non riesce a contrastarne la progressione. In questo caso, anche se si riducono i marcatori M1, non si influenza l'espressione dei mediatori M2, le cui proprietà neuroprotettive sembrano essere essenziali per migliorare il risultato clinico (Apolloni et al., 2014).

La neuroinfiammazione mediata dalla microglia è modulata anche dall'istamina (Ferreira et al., 2012; Volonté et al., 2015; Barata- Antunes et al., 2017). Il farmaco antistaminico Clemastina, somministrato a topi SOD1^{G93A} nella fase asintomatica fino allo stadio terminale della malattia, non riesce a migliorare i sintomi e la durata della vita, sebbene moduli l'equilibrio M1/M2 riducendo l'espressione di CD68, NOX2 e P2X7 e contemporaneamente sovraregolando Arg1 (Apolloni et al., 2016b). Al contrario, quando somministrato all'inizio della fase asintomatica, ritarda l'insorgenza della malattia e migliora le funzioni motorie e il tasso di sopravvivenza (Apolloni et al., 2016a). La Clemastina attiva anche l'autofagia nella microglia primaria SOD1^{G93A}, suggerendo così che il targeting dell'autofagia nella microglia potrebbe essere una promettente strategia terapeutica (Apolloni et al., 2016a). Strategie terapeutiche alternative per spostare l'equilibrio tra fenotipo M2 ed M1 comportano anche l'uso di fattori trofici. Diversi risultati hanno mostrato che il rilascio di vettori virali codificanti fattori di crescita, come IGF-1, il fattore neurotrofico derivato dalla glia, il fattore di crescita endoteliale vascolare

(VEGF), estende la durata della vita e rallenta la progressione della malattia nei modelli animali di SLA (Acsadi et al., 2002; Kaspar et al., 2003; Azzouz et al., 2004; Dodge et al., 2010; Wang et al., 2016). È interessante notare che l'iniezione intratecale all'esordio della malattia di virus autocomplementari (scAAV) per 9-VEGF riduce TNF- α , IL-1b e CD68 e aumenta Arg-1 e Ym-1, mostrando che la modulazione del bilanciamento M1 / M2 potrebbe supportare gli effetti protettivi correlati alla somministrazione di VEGF (Wang et al., 2016). Inoltre, l'eliminazione dell'antiporto cistina / glutammato xCT / Slc7a11 (xCT), un sistema di trasporto gliale critico coinvolto nell'eccessivo rilascio di glutammato dalla microglia M1, ha portato a ulteriori scoperte. Infatti, la l' eliminazione di xCT nelle prime fasi della malattia, aumenta l'espressione del marker M1, IL-1b, e contemporaneamente riduce il marker M2 Ym1 / Chil3, con conseguente insorgenza precoce della malattia. Al contrario, la mancanza di xCT, allo stadio finale, aumenta Ym1 / Chil3 e l'espressione di Arg1, sostenendo probabilmente il ritardo della progressione della malattia (Mesci et al., 2015). Tuttavia, prove crescenti suggeriscono che una strategia terapeutica di successo per la SLA potrebbe essere ottenuta solo interferendo con differenti pathway in diversi tipi cellulari e soprattutto nelle giuste finestre temporali. Alla luce di ciò, è stato recentemente dimostrato che la soppressione microgliale di NF-kB combinata con la riduzione di mSOD1 negli astrociti e nei motoneuroni non solo attenua la neurodegenerazione e la neuroinfiammazione, ma aumenta anche la sopravvivenza media dei topi (Frakes et al., 2017), dimostrando che il reindirizzamento della polarizzazione della microglia può essere ancora una strategia efficace per contrastare la SLA quando associata con l'intercettazione di altri meccanismi patologia.

Nel contesto trattato in questa tesi, il blocco selettivo dei recettori mGluR del gruppo I sembrerebbe contrastare l' andamento progressivo della patologia e quindi la morte dei MN ma soprattutto la degenerazione ed attivazione delle cellule gliali inclusa la microglia, per questo motivo i recettori mGluR 1-5 sono stati proposti come nuovi bersagli terapeutici.

In effetti, era già stato dimostrato in precedenza come delle co-culture di motoneuroni e astrociti reattivi provenienti dal midollo spinale di topi SLA incubati in presenza del modulatore allosterico negativo (NAM) selettivo per i recettori mGlu5, 2-metil-6-(feniletinil)piridina (MPEP), mostravano una ridotta tossicità mediata dai recettori AMPA (D'Antoni et al., 2011); allo stesso modo era già stato dimostrato che il trattamento sistemico di topi SOD1^{G93A} con MPEP rallenta la degenerazione e allunga la sopravvivenza (Rossi et al., 2008), seppure in maniera poco significativa rispetto al CTEP.

Tutti insieme questi dati confermano l'importante ruolo del glutammato nella fisiopatologia della SLA e del blocco farmacologico dei recettori mGluR1 o mGluR5 come valido approccio per il trattamento della patologia. Secondo questa ipotesi, il blocco sia di mGluR1 che di mGluR5 potrebbe dare risultati sinergici, rispetto al blocco singolo; ma questo deve essere ancora testato e non

si escludono effetti collaterali maggiori. Nuovi ligandi selettivi, che si comportano come NAM e, quindi, in grado di bloccare i recettori mGluR1 e mGluR5 indipendentemente dalle concentrazioni extracellulari di glutammato, sono disponibili e sono in fase di test.

In particolare, il ruolo dei recettori metabotropi mGluR del gruppo I espressi dalla microglia nella patogenesi della SLA non è ancora completamente chiarito e, ad oggi, sono presenti pochi dati a riguardo nella letteratura scientifica. I dati esposti precedentemente confermano sicuramente il ruolo centrale del glutammato come fattore di segnalazione e causa di variazioni fenotipiche di queste cellule tanto importanti per il SNC quanto complesse nelle loro innumerevoli funzionalità.

Occorre non dimenticare infine che i recettori mGlu sono coinvolti nei meccanismi di neurodegenerazione di diversi disturbi neurologici e sono quindi considerati utili candidati per nuovi farmaci neuroprotettivi non solo per quanto riguarda la SLA ma potenzialmente anche per altre patologie neurodegenerative al momento senza alcuna cura efficace.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdanipour A., Tiraihi T., Taheri T., Kazemi H. // Iran.Biomed. J. 2013. V. 17. № 4. P. 214–220.
2. Abd-Elrahman KS, Ferguson SSG Modulation of mTOR and CREB pathways following mGluR5 blockade contribute to improved Huntington's pathology in zQ175 mice (2019). *Mol Brain*12:35
3. Abushik PA, Niittykoski M, Giniatullina R, Shakirzyanova A, Bart G, Fayuk D, Sibarov DA, Antonov SM, Giniatullin R The role of NMDA and mGluR5 receptors in calcium mobilization and neurotoxicity of homocysteine in trigeminal and cortical neurons and glial cells (2014). *J Neurochem* 129:264–274
4. Acsadi, G., Anguelov, R. A., Yang, H., Toth, G., Thomas, R., Jani, A., et al. . Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy (2002). *Hum. Gene Ther.* 13, 1047–1059.doi: 10.1089/104303402753812458
5. Akhmetzyanova E., Kletenkov K., Mukhamedshina Y., Rizvanov A. // *Front. Syst. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 37
6. Al-Chalabi, A., Van Den Berg, L. H., and Veldink, J. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. *Nat. Rev.Neurol.* (2017) 13, 96–104. doi:10.1038/nrneurol.2016.182
7. Alexianu, M. E., Kozovska, M., and Appel, S. H. . Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression.(2001) *Neurology* 57, 1282–1289. doi:10.1212/wnl.57.7.1282
8. Allen JW, Vicini S, Faden AL Exacerbation of neuronal cell death by activation of group I metabotropic glutamate receptors: role of NMDA receptors and arachidonic acid release(2001). *Exp Neurol*2001;169:449–460.
9. Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain.(1999) *Dev. Brain Res.* 117, 145–152. doi: 10.1016/s0165-3806(99)00113-3
10. Anneser JM, Chahli C, Ince PG, Borasio GD, Shaw PJ Glial proliferation and metabotropic glutamate receptor expression in amyotrophic lateral sclerosis (2004). *J Neuropathol Exp Neurol* 63:831–840.
11. Apolloni A., P. Fabbriozio, S. Amadio, G. Napoli, V. Verdile, G. Morello, R. Iemmolo, E. Aronica, S. Cavallaro, C. Volonté, Histamine regulates the inflammatory profile of SOD1-G93A microglia and the histaminergic system is dysregulated in amyotrophic lateral sclerosis,(2017) *Front. Immunol.* 8, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01689>.
12. Apolloni S, P. Fabbriozio, S. Amadio, C. Volonté, Actions of the antihistaminergic clemastine on presymptomatic SOD1-G93A mice ameliorate ALS disease progression, *J. Neuroinflammation* 13 (2016b), <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0658-8>.
13. Apolloni S., P. Fabbriozio, C. Parisi, S. Amadio, C. Volonté, Clemastine confers neuroprotection and induces an anti-inflammatory phenotype in SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis,(2016a) *Mol. Neurobiol.* 53 , <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9019-8>.
14. Apolloni S., P. Fabbriozio, S. Amadio, G. Napoli, V. Verdile, G. Morello, R. Iemmolo, E. Aronica, S. Cavallaro, C. Volonté, Histamine regulates the inflammatory profile of SOD1-G93A microglia and the histaminergic system is dysregulated in amyotrophic lateral sclerosis, (2017) *Front. Immunol.* 8 , <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01689>.
15. Apolloni S., S. Amadio, C. Montilli, C. Volonté, N. D'ambrosi, Ablation of p2X7 receptor exacerbates gliosis and motoneuron death in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (2013), *Hum. Mol. Genet.* 22 , <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt259>.
16. Apolloni S., S. Amadio, C. Parisi, A. Matteucci, R.L. Potenza, M. Armida, P. Popoli, N. D'Ambrosi, C. Volonte, Spinal cord pathology is ameliorated by P2X7 antagonism in a SOD1-mutant mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, (2014) *Dis. Model. Mech.* 7 , <https://doi.org/10.1242/dmm.017038>
17. Apolloni S., S. Amadio, P. Fabbriozio, G. Morello, A.G. Spampinato, E.C. Latagliata, I. Salvatori, D. Proietti, A. Ferri, L. Madaro, S. Puglisi-Allegra, S. Cavallaro, C. Volonté, Histaminergic transmission slows progression of amyotrophic lateral sclerosis,(2019) *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* , <https://doi.org/10.1002/jcsm.12422>.
18. Apolloni, S., Amadio, S., Parisi, C., Matteucci, A., Potenza, R. L., Armida, M., et al. Spinal cord pathology is ameliorated by P2X7 antagonism in a SOD1-mutant mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (2014). *Dis. Model. Mech.* 7, 1101–1109. doi: 10.1242/dmm.017038
19. Apolloni, S., Fabbriozio, P., Parisi, C., Amadio, S., and Volonte, C. Clemastine confers neuroprotection and induces an anti-inflammatory phenotype in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.(2016b) *Mol. Neurobiol.* 53, 518–531. doi: 10.1007/s12035-014-9019-8
20. Apolloni, S., Montilli, C., Finocchi, P., and Amadio, S. Membrane compartments and purinergic signalling: P2X receptors in neurodegenerative and neuroinflammatory events (2009). *FEBS J.* 276, 354–364. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06796.x
21. Appel, S. H., Beers, D. R., and Henkel, J. S. . T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? (2010) *Trends Immunol.* 31, 7–17. doi:10.1016/j.it.2009.09.003
22. Arif M, Kazim SF, Grundke-Iqbal I, Garruto RM, Iqbal K Tau pathology involves protein phosphatase 2A in parkinsonism/dementia of Guam. (2014)*Proc Natl Acad Sci USA* 111:1144–1149
23. Aronica E, Catania MV, Geurts J, Yankaya B, Troost D Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes. (2001) *Neuroscience*105:509–520
24. Aronica E, Gorter JA, Ijlst-Keizers H, et al. Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: Opposite regulation of glutamate transporter proteins (2003) *Eur J Neurosci* 2003;17:2106–18
25. Aronica E, Gorter JA, Ijlst-Keizers H, Rozemuller AJ, Yankaya B, Leenstra S, Troost D Expression and functional role

- of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. (2003) *Eur J Neurosci* 17:2106–2118.
26. Aronica E, Gorter JA, Rozemuller AJ, Yankaya B, Troost D Interleukin-1 beta down-regulates the expression of metabotropic glutamate receptor 5 in cultured human astrocytes. (2005) *J neuroimmunol* 160:188–194.
 27. Aronica E, van Vliet EA, Mayboroda OA, Troost D, da Silva FH, Gorter JA Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. (2000) *Eur J Neurosci* 12:2333–2344.
 28. Arons, M.H., Thynne, C.J., Grabrucker, A.M., Li, D., Schoen, M., Cheyne, J.E., Boeckers, T.M., Montgomery, J.M., Garner, C.C., Autism-associated mutations in ProSAP2/Shank3 impair synaptic transmission and neuroligin-neurotrophin-mediated transsynaptic signaling. (2012) *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 32,14966–14978.
 29. Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. (1993) *Science* 262(5133):563–566
 30. Ashwell, K. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain (1991). *Brain Res. Dev. Brain Res.* 58, 1–12. doi: 10.1016/0165-3806(91)90231-7
 31. Auerbach, B.D., Osterweil, E.K., Bear, M.F. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology (2011). *Nature* 480, 63–68
 32. Azzouz, M., Ralph, G. S., Storkebaum, E., Walmsley, L. E., Mitrophanous, K. A., Kingsman, S. M., et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model (2004). *Nature* 429, 413–417. doi: 10.1038/nature02544
 33. Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. (2004). *RNA*. 2004;10(11):1813–9
 34. Bagasra, O., Michaels, F. H., Zheng, Y. M., Bobroski, L. E., Spitsin, S. V., Fu, Z. F., et al. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 12041–12045. doi: 10.1073/pnas.92.26.12041
 35. Ban J., Samano C., Mladinic M., Munitic I. // *Croat. Med. J.* (2019). V. 60. № 2. P. 109–120.
 36. Bao WL, Williams AJ, Faden AI, Tortella FC. Selective mGluR5 receptor antagonist or agonist provides neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemia (2001). *Brain Res* 922:173–179
 37. Barata-Antunes S., A.C. Cristóvão, J. Pires, S.M. Rocha, L. Bernardino, Dual role of histamine on microglia-induced neurodegeneration, (2017) *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863 , <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.12.016>.
 38. Barres BA The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease (2008). *Neuron* 60:430–440
 39. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions (2009). *Cell*. 2009;136(2):215–33.
 40. Bassell GJ, Warren ST Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. (2008) *Neuron* 60(2):201–214. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.004>
 41. Battaglia G., V. Bruno, Metabotropic glutamate receptor involvement in the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis: new potential drug targets for therapeutic applications (2018), *Curr. Opin. Pharmacol.* 38 , <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.02.007>.
 42. Becher, B., Spath, S., and Goverman, J. Cytokine networks in neuroinflammation (2017). *Nat. Rev. Immunol.* 17, 49–59. doi: 10.1038/nri.2016.123
 43. Bechmann, I. Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege? (2005) *Neuromol. Med.* 7, 217–228. doi: 10.1385/nmm:7:3:217
 44. Beers, D. R., and Appel, S. H. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. (2019) *Lancet Neurol.* 18, 211–220. doi: 10.1016/s1474-4422(18)30394-6
 45. Beers, D. R., Henkel, J. S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A. A., et al. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16021–16026. doi: 10.1073/pnas.0607423103
 46. Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhao, W., Wang, J., and Appel, S. H. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15558–15563. doi: 10.1073/pnas.0807419105
 47. Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhao, W., Wang, J., Huang, A., Wen, S., et al. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. (2011a) *Brain* 134, 1293–1314. doi:10.1093/brain/awr074
 48. Beers, D. R., Zhao, W., Wang, J., Zhang, X., Wen, S., Neal, D., et al. ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. (2017) *JCI Insight* 2:e89530. doi: 10.1172/jci.insight.89530
 49. Beers, D.R. and Appel, S.H. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. (2019) *Lancet Neurol.* 18, 211–220
 50. Bellver-Landete V., Bretheau F., Mailhot B., Vallieres N., Lessard M., Janelle M.E., Vernoux N., Tremblay M.E., Fuehrmann T., Shoichet M.S., et al. // (2019) *Nat. Commun.* V.10. № 1. P. 518.
 51. Benarroch EE. Metabotropic glutamate receptors: synaptic modulators and therapeutic targets for neurologic disease. (2008) *Neurology* 2008;70:964–968.
 52. Bendlin BB, Ries ML, Lazar M, Alexander AL, Dempsey RJ, Rowley HA, Sherman JE, Johnson SC: Longitudinal changes in patients with traumatic brain injury assessed with diffusion-tensor and volumetric imaging (2008). *NeuroImage* , 42:503-514.
 53. Benigni M, Ricci C, Jones AR, Giannini F, Al-Chalabi A, Battistini S. Identification of miRNAs as potential biomarkers

- in cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients.(2016) *Neuro Mol Med.* 2016;18(4):551–60.
54. Bessis A., Bechade C., Bernard D., Roumier A. // *Glia.* (2007) V. 55. P. 233–238.
 55. Bialas AR, Stevens B. TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement.(2013) *Nat Neurosci* 16(12):1773–1782.
<https://doi.org/10.1038/nn.3560>.<http://www.nature.com/neuro/journal/v16/n12/abs/nn.3560.html#supplementary-information>. Accessed 27 Oct 2013
 56. Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Moller, T., Matteoli, M., et al. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia.(2005) *J. Immunol.* 174, 7268–7277. doi: 10.4049/jimmunol.174.11.7268
 57. Biber K, Laurie DJ, Berthele A, et al. Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia.(1999) *J Neurochem* 1999;72:1671–80
 58. Biber K, Laurie DJ, Berthele A, Sommer B, Tolle TR, et al. Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia.(1999) *Journal of neurochemistry.* 1999;72(4):1671–1680. [PubMed: 10098876]
 59. Bie B, Wu J, Yang H, Xu JJ, Brown DL, Naguib M. Epigenetic suppression of neuroligin 1 underlies amyloid-induced memory deficiency.(2014) *Nat Neurosci* 17(2):223–231.
<https://doi.org/10.1038/nn.3618>.<http://www.nature.com/neuro/journal/vaop/ncurrent/abs/nn.3618.html#supplementary-information>. Accessed 19 Jan 2014
 60. Bilsland L.G. and Greensmith L.; The endocannabinoid system in amyotrophic lateral sclerosis (2008); *Curr Pharm Des* 2008;14(23):2306-16.doi: 10.2174/138161208785740081.
 61. Blasco H., S. Mavel, P. Corcia, P.H. Gordon, The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development, (2014) *Curr. Med. Chem.* 21 , <https://doi.org/10.2174/0929867321666140916120118>
 62. Blaylock R.L., A possible central mechanism in autism spectrum disorders, (2009)Part 2: immunoexcitotoxicity. *Altern. Ther. Health Med.* 15, 60–67
 63. Blaylock R.L., Strunecka, A. Immune-glutamatergic dysfunction as a central mechanism of the autism spectrum disorders.(2009) *Curr. Med. Chem.* 16, 157–170.
 64. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism.(2005) *Prog Neurobiol.* 2005; 76(2):77–98. [PubMed: 16081203]
 65. Block, M. L., Zecca, L., and Hong, J. S. (2007) *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 57– 69
 66. Bonifacino T. , Provenzano F. , Gallia E. , Ravera S. , Torazza C. , Bossi S. , Ferrando S. , Puliti A. , Van Den Bosch L. , Bonanno G. , Milanese M. ; In-vivo genetic ablation of metabotropic glutamate receptor type 5 slows down disease progression in the SOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (2019); *Neurobiol Dis* 2019 Sep;129:79-92. doi: 10.1016/j.nbd.2019.05.007. Epub 2019 May 15.
 67. Bonifacino T, Cattaneo L, Gallia E, Puliti A, Melone M, Provenzano F, Bossi S, Musante I, Usai C, Conti F, Bonanno G, Milanese M. In-vivo effects of knocking-down metabotropic glutamate receptor 5 in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.(2017) *Neuropharmacology* 123:433–445
 68. Bonifacino T, Musazzi L, Milanese M, Segui M, Marte A, Gallia E, Cattaneo L, Onofri F, Popoli M, Bonanno G. Altered mechanisms underlying the abnormal glutamate release in amyotrophic lateral sclerosis at a pre-symptomatic stage of the disease (2016) *Neurobiol Dis.* 2016 Nov;95:122-33. doi: 10.1016/j.nbd.2016.07.011. Epub 2016 Jul 16. PMID: 27425885.
 69. Bramlett HM, Dietrich WD: Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies.(2007) *Prog Brain Res* 2007, 161:125-141.
 70. Brites, D., and Vaz, A. R. Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity.(2014) *Front. Cell. Neurosci.* 8:117. doi: 10.3389/fncel.2014.00117
 71. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Huster G. Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality. (1993) *Stroke* 24:987–993
 72. Brown GC, Neher JJ Microglial phagocytosis of live neurons.(2014) *Nat Rev Neurosci* 15(4):209–216.
<https://doi.org/10.1038/nrn3710>
 73. Brown, R. H., and Al-Chalabi, A. Amyotrophic lateral sclerosis. (2017) *New Engl. J. Med.* 377, 162–172. doi: 10.1056/NEJMra1603471
 74. Bruno V, Battaglia G, Casabona G, Copani A, Caciagli F, Nicoletti F Neuroprotection by glial metabotropic glutamate receptors is mediated by transforming growth factor-beta. (1998) *J Neurosci* 18:9594–9600
 75. Bucchia, M., Ramirez, A., Parente, V., Simone, C., Nizzardo, M., Magri, F., et al. Therapeutic development in amyotrophic lateral sclerosis.(2015) *Clin. Ther.*37, 668–680
 76. Burnstock, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. (2008) *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 575–590. doi: 10.1038/nrd2605
 77. Butovsky O, Jedrychowski MP, Cialic R, Krasemann S, Murugaiyan G, Fanek Z, et al. Targeting miR-155 restores abnormal microglia and attenuates disease in SOD1 mice. (2015) *Ann Neurol.* 2015;77(1):75–99.
 78. Butovsky O, M.P. Jedrychowski, C.S. Moore, R. Cialic, A.J. Lanser, G. Gabriely, T. Koeglsperger, B. Dake, P.M. Wu, C.E. Doykan, Z. Fanek, L. Liu, Z. Chen, J.D. Rothstein, R.M. Ransohoff, S.P. Gygi, J.P. Antel, H.L. Weiner, Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia, (2014) *Nat. Neurosci.* 17 , <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
 79. Butovsky O, Siddiqui S, Gabriely G, Lanser AJ, Dake B, Murugaiyan G, et al. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. (2012) *J Clin Invest.* 2012;122(9):3063–87.
 80. Butovsky O., M.P. Jedrychowski, C.S. Moore, R. Cialic, A.J. Lanser, G. Gabriely, T. Koeglsperger, B. Dake, P.M. Wu,

- C.E. Doykan, Z. Fanek, L. Liu, Z. Chen, J.D. Rothstein, R.M. Ransohoff, S.P. Gygi, J.P. Antel, H.L. Weiner, Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia,(2014) *Nat. Neurosci.* 17 , <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
81. Byrnes KR, Loane DJ, Faden AI. Metabotropic glutamate receptors as targets for multipotential treatment of neurological disorders.(2009) *Neurotherapeutics.* 2009; 6(1):94–107. [PubMed: 19110202]
 82. Byrnes KR, Loane DJ, Stoica BA, Zhang J, Faden AI (2012) Delayed mGluR5 activation limits neuroinflammation and neurodegeneration after traumatic brain injury. *J Neuroinflamm* 9:43
 83. Byrnes KR, Stoica B, Loane DJ, Riccio A, Davis MI, Faden AI. Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity.(2009b) *Glia* 57:550–560
 84. Byrnes KR, Stoica B, Riccio A, Pajoohesh-Ganji A, Loane DJ, Faden AI. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 improves recovery after spinal cord injury in rodents. (2009) *Ann Neurol.* 2009; 66(1):63–74. [PubMed: 19670441]
 85. Cady J., E.D. Koval, B.A. Benitez, C. Zaidman, J. Jockel-Balsarotti, P. Allred, R.H. Baloh, J. Ravits, E. Simpson, S.H.Appel, A. Pestronk, A.M. Goate, T.M. Miller, C. Cruchaga, M.B. Harms, TREM2 variant p.R47H as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis,(2014) *JAMA Neurol.* 71 449, <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.6237>
 86. Cady, J. et al. TREM2 variant p.R47H as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis.(2014) *JAMA Neurol.* 71, 449–453
 87. Camu W, Billiard M, Baldy-Moulinier M. Fasting plasma and CSF amino acid levels in amyotrophic lateral sclerosis: A subtype analysis.(1993) *Acta Neurol Scand* 1993;88:51–55
 88. Cardona, A.E., Piro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J.C., Cook, D.N., Jung, S., Lira, S.A., Littman, D.R., Ransohoff, R.M., Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor.(2006) *Nat. Neurosci.* 9, 917–924.
 89. Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., and Ploix, C. C. CNS immune privilege: hiding in plain sight.(2006) *Immunol. Rev.* 213, 48–65. doi:10.1111/j.1600-065x.2006.00441.x
 90. Casano A.M., M. Albert, F. Peri, Developmental apoptosis mediates entry and positioning of microglia in the zebrafish brain, (2016) *Cell Rep.* 16, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.033>
 91. Castellano B., M. Bosch-Queralt, B. Almolada, N. Villacampa, B. González, Purine signaling and microglial wrapping, (2016) *Adv. Exp. Med. Biol.* 949 , https://doi.org/10.1007/978-3-319-40764-7_7.
 92. Castro, J., Mellios, N., Sur, M.. Mechanisms and therapeutic challenges in autism spectrum disorders: insights from Rett syndrome.(2013) *Curr. Opin. Neurol.* 26, 154–159.
 93. Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST Phosphorylation influences the translation state of FMRP associated polyribosomes. (2003) *Hum Mol Genet* 12(24):3295–3305. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg350>
 94. Cervetto, C., Frattaroli, D., Maura, G., and Marcoli, M. Motor neuron dysfunction in a mouse model of ALS: gender-dependent effect of P2X7 antagonism. (2013) *Toxicology* 311, 69–77. doi: 10.1016/j.tox.2013.04.004
 95. Chan, W. Y., Kohsaka, S., and Rezaie, P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. (2007) *Brain Res. Rev.* 53, 344–354. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.11.002
 96. Chana, G., Testa, R., Gillett, P., Williams, D., Bousman, C.A., Zantomio, D., Everall, I.P., Pantelis, C., Skafidas, E., Construction of a genetic classifier for ASD using gene pathway analysis. (2014) In: Hu, V. (Ed.), *Frontiers in Autism Research*. WorldScientific Publishing Co, Hackensack NJ.
 97. Chang M.C., K. Srinivasan, B.A. Friedman, E. Suto, Z. Modrusan, W.P. Lee, J.S. Kaminker, D.V. Hansen, M. Sheng, Progranulin deficiency causes impairment of autophagy and TDP-43 accumulation,(2017) *J. Exp. Med.* 214, 2611–2628, <https://doi.org/10.1084/jem.20160999>
 98. Chen T, Zhang L, Qu Y, Huo K, Jiang X, Fei Z. The selective mGluR5 agonist CHPG protects against traumatic brain injury in vitro and in vivo via ERK and Akt pathway. (2012). *Int J Mol Med* 29:630–636
 99. Chen X, Lin R, Chang L, Xu S, Wei X, Zhang J, Wang C, Anwyl R et al. Enhancement of long-term depression by soluble amyloid beta protein in rat hippocampus is mediated by metabotropic glutamate receptor and involves activation of p38MAPK, STEP and caspase-3.(2013) *Neuroscience* 253:435–443. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.054>
 100. Chen, T. et al. The selective mGluR5 agonist CHPG protects against traumatic brain injury in vitro and in vivo via ERK and Akt pathway. *Int J Mol Med* 29, 630–636, doi:10.3892/ijmm.2011.870 (2012)
 101. Chiu, I. M., Chen, A., Zheng, Y., Kosaras, B., Tsiftoglou, S. A., Vartanian, T. K., et al. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS.(2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 17913–17918. doi: 10.1073/pnas.0804610105
 102. Chiu, I. M., Morimoto, E. T., Goodarzi, H., Liao, J. T., O'Keefe, S., Phatnani, H. P., et al. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. (2013) *Cell Rep.* 4, 385–401. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.018
 103. Chiu, I. M., Phatnani, H., Kuligowski, M., Tapia, J. C., Carrasco, M. A., Zhang, M., et al. Activation of innate and humoral immunity in the peripheral nervous system of ALS transgenic mice. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 20960–20965. doi: 10.1073/pnas.0911405106
 104. Choi, S. H., Lee, D. Y., Kim, S. U., and Jin, B. K. (2005) *J. Neurosci.* 25, 4082–4090
 105. Ciccarelli R, Suredda FX, Casabona G, Di IP, Caruso A, Spinella F, Condorelli DF, Nicoletti F, Caciagli F. Opposite influence of the metabotropic glutamate receptor subtypes mGlu3 and -5 on astrocyte proliferation in culture. (1997) *Glia* 21:390–398.
 106. Ciccarelli R, Suredda FX, Casabona G, et al. Opposite influence of the metabotropic glutamate receptor subtypes mGluR3 and 25 on astrocyte proliferation in culture. (1997) *Glia* 1997;21:390–98

107. Cirulli E.T., B.N. Lasseigne, S. Petrovski, P.C. Sapp, P.A. Dion, C.S. Leblond, J. Couthouis, Y.-F. Lu, Q. Wang, B.J. Krueger, Z. Ren, J. Keebler, Y. Han, S.E. Levy, B.E. Boone, J.R. Wimbish, L.L. Waite, A.L. Jones, J.P. Carulli, A.G. Day-Williams, J.F. Staropoli, W.W. Xin, A. Chesi, A.R. Raphael, D. McKenna-Yasek, J. Cady, J.M.B. Vianney de Jong, K.P. Kenna, B.N. Smith, S. Topp, J. Miller, A. Gkazi, A. Al-Chalabi, L.H. van den Berg, J. Veldink, V. Silani, N. Ticozzi, C.E. Shaw, R.H. Baloh, S. Appel, E. Simpson, C. Lagier-Tourenne, S.M. Pulst, S. Gibson, J.Q. Trojanowski, L. Elman, L. McCluskey, M. Grossman, N.A. Shneider, W.K. Chung, J.M. Ravits, J.D. Glass, K.B. Sims, V.M. Van Deerlin, T. Maniatis, S.D. Hayes, A. Ordureau, S. Swarup, J. Landers, F. Baas, A.S. Allen, R.S. Bedlack, J.W. Harper, A.D. Gitler, G.A. Rouleau, R. Brown, M.B. Harms, G.M. Cooper, T. Harris, R.M. Myers, D.B. Goldstein, D.B. Goldstein, Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways, (2015) *Science* (80-.) 347, 1436–1441, <https://doi.org/10.1126/science.aaa3650>
108. Cirulli, E. T., Lasseigne, B. N., Petrovski, S., Sapp, P. C., Dion, P. A., Leblond, C. S., et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. (2015) *Science* 347, 1436–1441. doi: 10.1126/science.aaa3650
109. Clement, A. M., Nguyen, M. D., Roberts, E. A., Garcia, M. L., Boillée, S., Rule, M., et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. (2003) *Science* 302, 113–117. doi: 10.1126/science.1086071
110. Clement, A.M. et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. (2003) *Science* 302, 113–117
111. Coleman, L. G. Jr., Zou, J., and Crews, F. T. Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. (2017) *J. Neuroinflammation* 14, 22. doi:10.1186/s12974-017-0799-4
112. Colombo, E., Cordiglieri, C., Melli, G., Newcombe, J., Krumbholz, M., Parada, L. F., et al. Stimulation of the neurotrophin receptor TrkB on astrocytes drives nitric oxide production and neurodegeneration. (2012) *J. Exp. Med.* 209, 521–535. doi: 10.1084/jem.20110698
113. Colonna M., TREMs in the immune system and beyond, (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3, 445–453, <https://doi.org/10.1038/nri1106>.
114. Colton, C. A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. (2009) *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4, 399–418. doi: 10.1007/s11481-009-9164-4
115. Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. (1997) *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37:205–237. [PubMed: 9131252]
116. Conn PJ. Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. (2003) *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1003:12–21. [PubMed: 14684432]
117. Corps, K. N., Roth, T. L. & McGavern, D. B. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. (2015) *JAMA Neurol* 72, 355–362, doi:10.1001/jamaneurol.2014.3558.
118. Corti C, Battaglia G, Molinaro G, Riozzi B, Pittaluga A, Corsi M, Mugnaini M, Nicoletti F, Bruno V. The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/neuroprotection. (2007) *J Neurosci* 27:8297–8308.
119. Cosford ND, Tehrani L, Roppe J, Schweiger E, Smith ND, Anderson J, Bristow L, Brodtkin J, Jiang X, McDonald I, Rao S, Washburn M, Varney MA. 3-[(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl) ethynyl]-pyridine: a potent and highly selective metabotropic glutamate subtype 5 receptor antagonist with anxiolytic activity. (2003). *J Med Chem* 46:204–206
120. Cosford NDP, Roppe J, Tehrani L, Schweiger EJ, Seiders TJ, Chaudary A, Rao S, Varney MA. [3H]-Methoxymethyl-MTEP and [3H]-methoxy-PEPy: potent and selective radioligands for the metabotropic glutamate subtype 5 (mGlu5) receptor. (2003) *Bioorg Med Chem Lett* 13:351–354
121. Couratier P, Sindou P, Escriaire F, Louvel E, Hugon J. Neuroprotective effects of riluzole in ALS CSF toxicity. (1994) *NeuroReport* 1994;5:1012–14
122. Crişan T.O., T.S. Plantinga, F.L. van de Veerdonk, M.F. Farçaş, M. Stoffels, B.-J. Kullberg, J.W.M. van der Meer, L.A. B. Joosten, M.G. Netea, Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells, (2011) *PLoS One* 6 , e18666. <https://doi.org/10.1371/journal.Pone.0018666>.
123. Cronk J.C., A.J. Filiano, A. Louveau, I. Marin, R. Marsh, E. Ji, D.H. Goldman, I. Smirnov, N. Geraci, S. Acton, C.C. Overall, J. Kipnis, Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia, (2018) *J. Exp. Med.* 215 , <https://doi.org/10.1084/jem.20180247>
124. byrnesCuadros, M. A., Martin, C., Coltey, P., Almendros, A., and Navascues, J. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. (1993) *J. Comp. Neurol.* 330, 113–129. doi:10.1002/cne.903300110
125. Cunha C, Santos C, Gomes C, Fernandes A, Correia AM, Sebastião AM, et al. Downregulated glia interplay and increased miRNA-155 as promising markers to track ALS at an early stage. (2018) *Mol Neurobiol.* 2018;55(5):4207–24.
126. Cunningham C., Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation, (2013) *Glia* 61, <https://doi.org/10.1002/glia.22350>
127. Cunningham, C. L., Martinez-Cerdeno, V., and Noctor, S. C. Microgliaregulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. (2013) *J. Neurosci.* 33, 4216–4233. doi: 10.1523/jneurosci.3441-12.2013
128. Cusick MF, Libbey JE, Patel DC, Doty DJ, Fujinami RS, Infiltrating Macrophages Are Key to the Development of Seizures following Virus Infection. (2013) *J. Virol* 87, 1849–1860. <https://doi.org/10.1128/JVI.02747-12> [PubMed: 23236075]
129. D’Ambrosi N., P. Finocchi, S. Apolloni, M. Cozzolino, A. Ferri, V. Padovano, G. Pietrini, M.T. Carri, C. Volonte, The proinflammatory action of microglial P2 receptors is enhanced in SOD1 models for amyotrophic lateral

- sclerosis.(2009) *J. Immunol.* 183, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901212>.
130. D'Antoni S, Berretta A, Seminara G, Longone P, Giuffrida-Stella AM, Battaglia G, Sortino MA, Nicoletti F, Catania MV. A prolonged pharmacological blockade of type-5 metabotropic glutamate receptors protects cultured spinal cord motor neurons against excitotoxic death. (2011) *Neurobiol Dis* 42:252–264.
 131. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. (2005) *Nature neuroscience.*; 8(6):752–758.
 132. David S., Kroner A. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2011. V. 12. № 7. P. 388–399
 133. DeJesus-Hernandez M., I.R. Mackenzie, B.F. Boeve, A.L.Boxer, M. Baker, N.J. Rutherford, A.M. Nicholson, N.A. Finch, H. Flynn, J. Adamson, N. Kouri, A. Wojtas, P. Sengdy, G.-Y.R. Hsiung, A. Karydas, W.W. Seeley, K.A. Josephs, G. Coppola, D.H. Geschwind, Z.K. Wszolek, H. Feldman, D.S. DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., et al. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. (2011) *Neuron* 72, 245–256. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011
 134. Dello Russo, C., Lisi, L., Tringali, G., Navarra, P., Involvement of mTOR kinase in cytokine-dependent microglial activation and cell proliferation. (2009) *Biochem. Pharmacol.* 78, 1242–1251
 135. Derecki, N.C., Cronk, J.C., Kipnis, J., The role of microglia in brain maintenance: implications for Rett syndrome. (2013) *Trends Immunol.* 34, 144–150.
 136. Di Prisco GV, Huang W, Buffington SA, Hsu CC, Bonnen PE, Placzek AN, Sidrauski C, Krnjevic K et al. Translational control of mGluR-dependent long-term depression and objectplace learning by eIF2alpha. (2014) *Nat Neurosci* 17(8):1073–1082. <https://doi.org/10.1038/nn.3754>
 137. Di Virgilio F., D. Dal Ben, A.C. Sarti, A.L. Giuliani, S. Falzoni, The P2X7 receptor in infection and inflammation, *Immunity.* (2017) 47, <https://doi.org/10.1016/j.Immuni.2017.06.020>.
 138. Di Virgilio F., J. Sanz, P. Chiozzi, S. Falzoni, The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor, (1999) *Prog. Brain Res.* 120, 355–368, [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)63569-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63569-4).
 139. Di Virgilio F., S. Ceruti, P. Bramanti, M.P. Abbracchio, Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system, (2009) *Trends Neurosci.* 32, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.003>.
 140. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. (1999) *Pharmacol Rev.*; 51(1):7–61. [PubMed: 10049997]
 141. Dolen, G., Osterweil, E., Rao, B.S., Smith, G.B., Auerbach, B.D., Chattarji, S., Bear, M.F., Correction of fragile X syndrome in mice. (2007) *Neuron* 56, 955–962.
 142. Drouin-Ouellet J, Brownell AL, Saint-Pierre M, Fasano C, Emond V, et al. Neuroinflammation is associated with changes in glial mGluR5 expression and the development of neonatal excitotoxic lesions. (2011) *Glia.*; 59(2):188–199. [PubMed: 21125661]
 143. Du, L., Zhang, Y., Chen, Y., Zhu, J., Yang, Y., and Zhang, H.-L. Role of microglia in neurological disorders and their potentials as a therapeutic target. (2016) *Mol. Neurobiol.* doi: 10.1007/s12035-016-0245-0 [Epub ahead of print].
 144. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. (2001) *Clin Neuropharmacol.*; 24:254–264. [PubMed: 11586110]
 145. Eder C. Ion channels in microglia (brain macrophages). (1998) *Am J Physiol* 1998;275:C327–C342.
 146. Engelhardt, J. I., and Appel, S. H. IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. (1990) *Arch. Neurol.* 47, 1210–1216. doi:10.1001/archneur.1990.00530110068019
 147. Eyo, U. B., Miner, S. A., Weiner, J. A., and Dailey, M. E. Developmental changes in microglial mobilization are independent of apoptosis in the neonatal mouse hippocampus. (2016) *Brain Behav. Immun.* 55, 49–59. doi: 10.1016/j.bbi.2015.11.009
 148. Fantin, A., Vieira, J. M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhodzhiy, S., et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. (2010) *Blood* 116, 829–840. doi: 10.1182/blood-2009-12-257832
 149. Farooque M, Isaksson J, Olsson Y. Improved recovery after spinal cord injury in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice but not in TNF-alpha-deficient mice. (2001) *J Neurotrauma.*; 18:105–114. [PubMed: 11200245]
 150. Farso MC, O'Shea RD, Beart PM. Evidence group I mGluR drugs modulate the activation profile of lipopolysaccharide-exposed microglia in culture. (2009) *Neurochemical research*; 34(10):1721–1728. [PubMed: 19479374]
 151. Ferraguti F, Corti C, Valerio E, Mion S, Xuereb J. Activated astrocytes in areas of kainate-induced neuronal injury upregulate the expression of the metabotropic glutamate receptors 2/3 and 5. (2001) *Exp Brain Res* 137:1–11
 152. Ferreira, R., Santos, T., Gonçalves, J., Baltazar, G., Ferreira, L., Agasse, F., et al. Histamine modulates microglia function. (2012) *J. Neuroinflammation* 9:90. doi: 10.1186/1742-2094-9-90
 153. Fil D., A. DeLoach, S. Yadav, D. Alkam, M. MacNicol, A. Singh, C.M. Compadre, J.J. Goellner, C.A. O'Brien, T. Fahmi, A.G. Basnakian, N.Y. Calingasan, J.L. Klessner, F.M. Beal, O.M. Filip, M., Bader, M., Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. (2009) *Pharmacol. Rep.* 61, 761–777.
 154. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? (2008) *Nat Rev Genet*; 9:102
 155. Frakes, A. E., Braun, L., Ferraiuolo, L., Guttridge, D. C., and Kaspar, B. K. Additive amelioration of ALS by co-targeting independent pathogenic mechanisms. (2017) *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 4, 76–86. doi: 10.1002/acn3.375
 156. Frakes, A. E., Ferraiuolo, L., Haidet-Phillips, A. M., Schmelzer, L., Braun, L., Miranda, C. J., et al. Microglia induce motor neuron death via the classical NF-κB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. (2014) *Neuron* 81, 1009–1023.

doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.013

157. Frakes, A. E., Ferraiuolo, L., Haidet-Phillips, A. M., Schmelzer, L., Braun, L., Miranda, C. J., et al. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. (2014) *Neuron* 81,1009–1023. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.013
158. Freischmidt A., T. Wieland, B. Richter, W. Ruf, V. Schaeffer, K. Müller, N. Marroquin, F. Nordin, A. Hübers, P. Weydt, S. Pinto, R. Press, S. Millecamps, N. Molko, E. Bernard, C. Desnuelle, M.-H. Soriani, J. Dorst, E. Graf, U. Nordström, M.S. Feiler, S. Putz, T.M. Boeckers, T. Meyer, A.S. Winkler, J. Winkelmann, M. de Carvalho, D.R. Thal, M. Otto, T. Brännström, A.E. Volk, P. Kursula, K.M. Danzer, P. Lichtner, I. Dikic, T. Meitinger, A.C. Ludolph, T.M. Strom, P.M. Andersen, J.H. Weishaupt, Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia, (2015) *Nat Neurosci.* 18 631–636, <https://doi.org/10.1038/nn.4000>
159. Freischmidt, A., Wieland, T., Richter, B., Ruf, W., Schaeffer, V., Müller, K., et al. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. (2015) *Nat. Neurosci.* 18, 631–636. doi: 10.1038/nn.4000
160. Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, Haass C, LaFerla FM et al. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer’s disease.(2010) *Nat Neurosci* 13(4):411–413. <https://doi.org/10.1038/nn.2511>
161. Fukumoto Y., K.F. Tanaka, B. Parajuli, K. Shibata, H. Yoshioka, K. Kanemaru, C. Gachet, K. Ikenaka, S. Koizumi, H. Kinouchi, Neuroprotective effects of microglial P2Y1 receptors against ischemic neuronal injury, (2018) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18 , <https://doi.org/10.1177/0271678X18805317> 0271678X1880531.
162. Gai, X., Xie, H.M., Perin, J.C., Takahashi, N., Murphy, K., Wenocur, A.S., D’Arcy, M., O’Hara, R.J., Goldmuntz, E., Grice, D.E., Shaikh, T.H., Hakonarson, H., Buxbaum, J.D., Elia, J., White, P.S., Rare structural variation of synapse and neuro-transmission genes in autism.(2012) *Mol. Psychiatry* 17, 402–411.
163. Gandal, M.J., Anderson, R.L., Billingslea, E.N., Carlson, G.C., Roberts, T.P., Siegel, S.J., Mice with reduced NMDA receptor expression: more consistent with autism than schizophrenia? (2012) *Genes, Brain, Behav.* 11, 740–750
164. Gao F-B. Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development. (2010) *Neural Dev.* 5(1):25
165. Garden, G.A. and La Spada, A.R. Intercellular (mis)communication in neurodegenerative disease. (2012) *Neuron* 73, 886–901
166. Gaudet A.D., Fonken L.K. // *Neurotherapeutics*. 2018. V.15. № 3. P. 554–577.
167. Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages.(2012) *Nat. Immunol.* 13, 1118–1128. doi: 10.1038/ni.2419
168. Gegelashvili G, Dehnes Y, Danbolt NC, Schousboe A. The highaffinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. (2000) *Neurochem Int*; 37:163–70
169. Geloso M.C., V. Corvino, E. Marchese, A. Serrano, F. Michetti, N. D’Ambrosi, The dual role of microglia in ALS: mechanisms and therapeutic approaches, (2017) *Front. Aging Neurosci.* 9 , <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00242>.
170. Gentleman SM, Leclercq PD, Moyes L, Graham DI, Smith C, Griffin WS, Nicoll JA: Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. (2004) *Forensic Sci Int*, 146:97-104.
171. Gerber, Y. N., Sabourin, J. C., Rabano, M., Vivanco, M., and Perrin, F. E. Early functional deficit and microglial disturbances in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. (2012) *PLoS One* 7:e36000. doi: 10.1371/journal.pone.0036000
172. Getts DR, Balcar VJ, Matsumoto I, Müller M, King NJC, Viruses and the immune system: their roles in seizure cascade development. (2008) *J. Neurochem* 104, 1167–1176. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05171.x> [PubMed: 18205751]
173. Geurts JJ, Wolswijk G, Bo L, et al. Expression patterns of group III metabotropic glutamate receptors mGluR4 and mGluR8 in multiple sclerosis lesions. (2005) *J Neuroimmunol*; 158:182–190.
174. Geurts JJ, Wolswijk G, Bo L, van der Valk P, Polman CH, et al. Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. (2003) *Brain*; 126(Pt 8): 1755–1766. [PubMed: 12805104]
175. Geurts JJ, Wolswijk G, Bö L, van der Valk P, Polman CH, Troost D, Aronica E. Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis .(2003) *Brain* 126:1755–1766.
176. Ghajar, J. Traumatic brain injury.(2000) *Lancet* 356, 923–929, doi:10.1016/s0140-6736(00)02689-1
177. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages.(2010) *Science* 330, 841–845. doi: 10.1126/science.1194637
178. Gipson, T.T., Johnston, M.V., Plasticity and mTOR: towards restoration of impaired synaptic plasticity in mTOR-related neurogenetic disorders. (2012) *Neural Plast.* 2012, 486402
179. Giribaldi F., M. Milanese, T. Bonifacino, P.I. Anna Rossi, S. Di Prisco, A. Pittaluga, C. Tacchetti, A. Puliti, C. Usai, G. Bonanno, Group I metabotropic glutamate autoreceptors induce abnormal glutamate exocytosis in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, (2013) *Neuropharmacology.* 66 , <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.018>.
180. Glass, G. Siciliano, E.T. Cirulli, D.B. Goldstein, F. Salachas, V. Meiningner, W. Rossoll, A. Ratti, C. Gellera, D.A. Bosco, G.J. Bassell, V. Silani, V.E. Drory, R.H. Brown Jr., J.E. Landers, Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis,(2012) *Nature* 488 , 499–503, <https://doi.org/10.1038/nature11280>
181. Gravel, M., Béland, L. C., Soucy, G., Abdelhamid, E., Rahimian, R., Gravel, C., et al. IL-10 controls early microglial phenotypes and disease onset in ALS caused by misfolded superoxide dismutase 1.(2016) *J. Neurosci.* 36, 1031–1048. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0854-15.2016
182. Greenhalgh A.D., Zarruk J.G., Healy L.M., Baskar Jesudasan S.J., Jhelum P., Salmon C.K., Formanek A., Russo M.V., Antel J.P., McGavern D.B., et al. // *PLoS Biol.* 2018.V.16. e2005264.

183. Guerrero, E. N., Wang, H., Mitra, J., Hegde, P. M., Stowell, S. E., Liachko, N. F., et al. TDP-43/FUS in motor neuron disease: complexity and challenges. (2016) *Prog. Neurobiol.* 145–146, 78–97. doi:10.1016/j.pneurobio.2016.09.004
184. Haeusler, A. R., Donnelly, C. J., and Rothstein, J. D. The expanding biology of the C9orf72 nucleotide repeat expansion in neurodegenerative disease. (2016) *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 383–395. doi: 10.1038/nrn.2016.38
185. Hall, E. D., Oostveen, J. A., and Gurney, M. E. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. (1998) *Glia* 23, 249–256. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199807)23:3<249::aid-glia7>3.0.co;2-#
186. Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L.A., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J.K., Risch, N., Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. (2011) *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 1095–1102.
187. Hamilton A, Esseltine JL, DeVries RA, Cregan SP, Ferguson SS. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout reduces cognitive impairment and pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. (2014) *Mol Brain* 7:40. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-40>
188. Harris J., M. Hartman, C. Roche, S.G. Zeng, A. O'Shea, F.A. Sharp, E.M. Lambe, E.M. Creagh, D.T. Golenbock, J. Tschopp, H. Kornfeld, K.A. Fitzgerald, E.C. Lavelle, Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation, (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 9587–9597, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.202911>.
189. Heck S, Enz R, Richter-Landsberg C, Blohm DH. Expression of eight metabotropic glutamate receptor subtypes during neuronal differentiation of P19 embryocarcinoma cells: A study by RT-PCR and in situ hybridization. (1997) *Dev Brain Res* 1997;101:85–91
190. Henkel J.S., D.R. Beers, W. Zhao, S.H. Appel, Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting, (2009) *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4, 389–398, <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9171-5>.
191. Henkel, J. S., Beers, D. R., Siklos, L., and Appel, S. H. The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. (2006) *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 427–437. doi: 10.1016/j.mcn.2005.10.016
192. Henkel, J. S., Engelhardt, J. I., Siklós, L., Simpson, E. P., Kim, S. H., Pan, T., et al. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. (2004) *Ann. Neurol.* 55, 221–235. doi: 10.1002/ana.10805
193. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. (2016) *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aad8373>
194. Hsieh MH, Ho SC, Yeh KY, Pawlak CR, Chang HM, Ho YJ, Lai TJ, Wu FY. Blockade of metabotropic glutamate receptors inhibits cognition and neurodegeneration in an MPTP-induced Parkinson's disease rat model. (2012) *Pharmacol Biochem Behav* 102:64–71
195. Hu P, Kalb RG. BDNF heightens the sensitivity of motor neurons to excitotoxic insults through activation of TrkB. (2003) *J Neurochem* 84:1421–1430.
196. Hu X, Tao C, Gan Q, Zheng J, Li H, You C. Oxidative stress in intracerebral hemorrhage: sources, mechanisms, and therapeutic targets. (2016) *Oxid Med Cell Longev* 2016:3215391
197. Hu, G., Yao, H., Chaudhuri, A. D., Duan, M., Yelamanchili, S. V., Wen, H., et al. Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated neuronal dysfunction. (2012) *Cell Death Dis.* 3:e381. doi: 10.1038/cddis.2012.114
198. Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., et al. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. (2015) *Nat. Rev. Neurol.* 11, 56–64. doi: 10.1038/nrneuro.2014.207
199. Huang Y, Shu H, Li L, Zhen T, Zhao J, Zhou X. L-DOPA-Induced motor impairment and overexpression of corticostriatal synaptic components are improved by the mGluR5 antagonist MPEP in 6-OHDA-lesioned rats. (2018) *ASN Neuro* 10:1759091418811021
200. Huber, K.M., Gallagher, S.M., Warren, S.T., Bear, M.F., Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7746–7750.
201. Ito, Y., Yamada, M., Tanaka, H., Aida, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., et al. Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. (2009) *Neurobiol. Dis.* 36, 470–476. doi: 10.1016/j.nbd.2009.08.013
202. Jiang, Y.H., Ehlers, M.D., Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. (2013) *Neuron* 78, 8–27
203. Johnson, K. Mok, M. Ryten, D. Trabzuni, R.J. Guerreiro, R.W. Orrell, J. Neal, A. Murray, J. Pearson, I.E. Jansen, D. Sondervan, H. Seelaar, D. Blake, K. Young, N. Halliwell, J.B. Callister, G. Toulson, A. Richardson, A. Gerhard, J. Snowden, D. Mann, D. Neary, M.A. Nalls, T. Peuralinna, L. Jansson, V.-M. Isoviita, A.-L. Kaivorinne, M. Hölttä-Vuori, E. Ikonen, R. Sulkava, M. Benatar, J. Wu, A. Chiò, G. Restagno, G. Borghero, M. Sabatelli, D. Heckerman, E. Rogaeva, L. Zinman, J.D. Rothstein, M. Sendtner, C. Drepper, E.E. Eichler, C. Alkan, Z. Abdullaev, S.D. Pack, A. Dutra, E. Pak, J. Hardy, A. Singleton, N.M. Williams, P. Heutink, S. Pickering-Brown, H.R. Morris, P.J. Tienari, B.J. Traynor, A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD, (2011) *Neuron* 72, 257–268, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>
204. Joilin G, Leigh PN, Newbury SF, Hafezparast M. An overview of microRNAs as biomarkers of ALS. (2019) *Front Neurol.* 2019;10:186
205. Joshi, P., Turola, E., Ruiz, A., Bergami, A., Libera, D. D., Benussi, L., et al. Microglia convert aggregated amyloid-beta into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. (2014) *Cell Death. Differ.* 21, 582–593. doi: 10.1038/cdd.2013.180

206. Karim F, Wang CC, Gereau RW 4th. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. (2001) *J Neurosci* 21:3771–3779.
207. Kaspar, B. K., Lladó, J., Sherkat, N., Rothstein, J. D., and Gage, F. H. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. (2003) *Science* 301, 839–842. doi:10.1126/science.1086137
208. Katoh, N., Soga, F., Nara, T., Tamagawa-Mineoka, R., Nin, M., Kotani, H., Masuda, K., Kishimoto, S., Effect of serotonin on the differentiation of human monocytes into dendritic cells. (2006) *Clin. Exp. Immunol.* 146, 354–361
209. Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. (2012) *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(9):3347.
210. Keller, A. F., Gravel, M., and Kriz, J. Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice. (2011) *Exp. Neurol.* 228, 69–79. doi:10.1016/j.expneurol.2010.12.010
211. Kerr B.J., Patterson P.H. // *Glia.* 2005. V. 51. № 1. P. 73–79
212. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. (2013) *Neuron* 77(1):10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
213. Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. // *Physiol. Rev.* (2011). V. 91. № 2. P. 461–553.
214. Kettenmann H., U.-K. Hanisch, M. Noda, A. Verkhratsky, Physiology of microglia, (2011) *Physiol. Rev.* 91, <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.
215. Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E. G., et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. (2013) *Nat. Neurosci.* 16, 273–280. doi: 10.1038/nn.3318
216. Kigerl, K. A., de Rivero Vaccari, J. P., Dietrich, W. D., Popovich, P. G., and Keane, R. W. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. (2014) *Exp. Neurol.* 258, 5–16. doi:10.1016/j.expneurol.2014.01.001
217. Kim GM, Xu J, Song SK, et al. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor- κ B activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. (2001) *J Neurosci*; 21:6617–6625. [PubMed: 11517251]
218. Kim, I., Mlsna, L. M., Yoon, S., Le, B., Yu, S., Xu, D., et al. A postnatal peak in microglial development in the mouse hippocampus is correlated with heightened sensitivity to seizure triggers. (2015) *Brain Behav.* 5:e00403
219. Kleinberger G., Y. Yamanishi, M. Suarez-Calvet, E. Czirr, E. Lohmann, E. Cuyvers, H. Struyfs, N. Pettkus, A. Wenninger-Weinzierl, F. Mazaheri, S. Tahirovic, A. Lleo, D. Alcolea, J. Fortea, M. Willem, S. Lammich, J.L. Molinuevo, R. Sanchez-Valle, A. Antonell, A. Ramirez, M.T. Heneka, K. Slegers, J. van der Zee, J.-J. Martin, S. Engelborghs, A. Demirtas-Tatlidede, H. Zetterberg, C. Van Broeckhoven, H. Gurvit, T. Wyss-Coray, J. Hardy, M. Colonna, C. Haass, TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis, (2014) *Sci. Transl. Med.* 6, 243ra86–243ra86. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009093>.
220. Knopman, R.C. Petersen, B.L. Miller, D.W. Dickson, K.B. Boylan, N.R. Graff-Radford, R. Rademakers, Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS, (2011) *Neuron* 72, 245–256, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>.
221. Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. (2013) *Cell Death Dis.* 4:e525. doi:10.1038/cddis.2013.54
222. Kohara A, Takahashi M, Yatsugi S, et al. Neuroprotective effects of the selective type 1 metabotropic glutamate receptor antagonist YM-202074 in rat stroke models. (2008) *Brain Res* 2008;1191:168–179
223. Kopper T.J., Gensel J.C. // *J. Neurosci. Res.* 2018. V. 96. № 6. P. 969–977
224. Kostic, V. et al. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. (1997) *Science* 277, 559–562
225. Kosuge, Y., Kaneko, E., Nango, H., Miyagishi, H., Ishige, K., and Ito, Y. Bidens pilosa extract administered after symptom onset attenuates glial activation, improves motor performance, and prolongs survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. (2020) *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020, 1–11. doi: 10.1155/2020/1020673
226. Koval ED, Shaner C, Zhang P, du Maine X, Fischer K, Tay J, et al. Method for widespread microRNA-155 inhibition prolongs survival in ALS-model mice. (2013) *Hum Mol Genet*;22(20):4127–35.
227. Krabbe G., V. Matyash, U. Pannasch, L. Mamer, H.W.G.M. Boddeke, H. Kettenmann, Activation of serotonin receptors promotes microglial injury-induced motility but attenuates phagocytic activity, (2012) *Brain Behav. Immun.* 26, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.12.002>.
228. Kriz, J., Nguyen, M. D., and Julien, J. P. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. (2002) *Neurobiol. Dis.* 10, 268–278. doi: 10.1006/nbdi.2002.0487
229. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. (2010) *Nat Rev Genet*;11:597
230. Kroner A., Rosas Almanza J. // *Neurosci. Lett.* 2019. V.709. P. 134370
231. Kurz, H., and Christ, B. Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. (1998) *Glia* 22, 98–102. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199801)22:1<98::aid-glia10>3.0.co;2-v
232. Kushner PD, Stephenson DT, Wright S. Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. (1991) *J Neuropathol Exp Neurol* 1991;50:263–77
233. Kwiatkowski, T. J. Jr., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vandenberg, C. R., Russ, C., et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. (2009) *Science* 323, 1205–1208. doi: 10.1126/science.1166066
234. Lall D., R.H. Baloh, Microglia and C9orf72 in neuroinflammation and ALS and frontotemporal dementia, (2017) *J. Clin. Invest.* 127, 3250–3258, <https://doi.org/10.1172/JCI90607>

235. Lan X, Han X, Li Q, Li Q, Gao Y, Cheng T, Wan J, Zhu W, Wang J. Pinocembrin protects hemorrhagic brain primarily by inhibiting toll-like receptor 4 and reducing M1 phenotype microglia. (2017) *Brain Behav Immun* 61:326–339
236. Lan X, Han X, Li Q, Li Q, Gao Y, Cheng T, Wan J, Zhu W, Wang J. Pinocembrin protects hemorrhagic brain primarily by inhibiting toll-like receptor 4 and reducing M1 phenotype microglia. (2017) *Brain Behav Immun* 61:326–339
237. Lasiene, J., Yamanaka, K., Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. (2011) *Neurol. Res. Int.* 718987.
238. Lavreysen H, Wouters R, Bischoff F, Nobrega Pereira S, Langlois X, Blokland S, Somers M, Dillen L et al. JNJ16259685, a highly potent, selective and systemically active mGlu1 receptor antagonist. (2004) *Neuropharmacology* 47(7):961–972. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.08.007>
239. Lee EK, Kim HH, Kuwano Y, Abdelmohsen K, Srikantan S, Subaran SS, Gleichmann M, Mughal MR et al. hnRNP C promotes APP translation by competing with FMRP for APP mRNA recruitment to P bodies. (2010) *Nat Struct Mol Biol* 17(6):732–739. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1815>
240. Levine B., N. Mizushima, H.W. Virgin, Autophagy in immunity and inflammation, (2011) *Nature* 469, 323–335, <https://doi.org/10.1038/nature09782>
241. Lewis, K. E., Rasmussen, A. L., Bennett, W., King, A., West, A. K., Chung, R. S., et al. Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. (2014) *J. Neuroinflammation* 11:55. doi: 10.1186/1742-2094-11-55
242. Li H, Zhang N, Sun G, Ding S. Inhibition of the group I mGluRs reduces acute brain damage and improves long-term histological outcomes after photothrombosis-induced ischaemia. (2013) *ASN Neuro* 5:195–207
243. Li, Y. Y., Cui, J. G., Dua, P., Pogue, A. I., Bhattacharjee, S., and Lukiw, W. J. Differential expression of miRNA-146a-regulated inflammatory genes in human primary neural, astroglial and microglial cells. (2011) *Neurosci. Lett.* 499, 109–113. doi: 10.1016/j.neulet.2011.05.044
244. Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S., and Appel, S. H. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS (2012). *Exp. Neurol.* 237, 147–152. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.06.011
245. Libbey JE, Fujinami RS, Neurotropic viral infections leading to epilepsy: focus on Theiler's murine encephalomyelitis virus. (2011) *Future Virol.* 6, 1339–1350. <https://doi.org/10.2217/fvl.11.107> [PubMed: 22267964]
246. Lincoffum, J. M., Vieira, F. G., Wang, M. Z., Thompson, K., De Zutter, G. S., Kidd, J., et al. From transcriptome analysis to therapeutic anti-CD40L treatment in the SOD1 model of amyotrophic lateral sclerosis. (2010) *Nat. Genet.* 42, 392–399. doi: 10.1038/ng.557
247. Lindemann, L., Gjaeschke, G., Michalon, A., Vieira, E., Honer, M., Spooren, W., Porter, R., Thartung, T., Kolczewski, S., Buttelmann, B., Flament, C., Diener, C., Fischer, C., Gatti, S., Prinssen, E., Parrott, N., Hoffmann, G., & Wettstein, J. (2011). CTEP: A novel, potent, long-acting, and orally bioavailable metabotropic glutamate receptor 5 inhibitor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339(2), 474–486. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.185660>
248. Linkus, B., Wiesner, D., Meßner, M., Karabatsiakos, A., Scheffold, A., Rudolph, K. L., et al. Telomere shortening leads to earlier age of onset in ALS mice. (2016) *Aging (Albany NY)* 8, 382–393. doi: 10.18632/aging.100904
249. Lisa Giuliani A., A. Clara Sarti, F. Di Virgilio, Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules, (2018) *Immunol. Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.11.006> 0–1
250. Liu B.S., R. Ferreira, S. Lively, L.C. Schlichter, Microglial SK3 and SK4 currents and activation state are modulated by the neuroprotective drug, riluzole, (2013) *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9365-0>.
251. Liu F, Zhou R, Yan H, Yin H, Wu X, Tan Y, Li L. Metabotropic glutamate receptor 5 modulates calcium oscillation and innate immune response induced by lipopolysaccharide in microglial cell. (2014) *Neuroscience* 281:24–34
252. Liu H., R.K. Leak, X. Hu, Neurotransmitter receptors on microglia, (2016) *Stroke Vasc. Neurol.* 1, <https://doi.org/10.1136/svn-2016-000012>.
253. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. (2003) *Nat Rev Neurosci* 4:399–415
254. Loane DJ, Byrnes KR: Role of microglia in neurotrauma. (2010) *Neurotherapeutics*, 7:366–377.
255. Loane DJ, Faden AI: Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. (2010) *Trends Pharmacol Sci*, 31:596–604
256. Loane DJ, Stoica BA, Pajoohesh-Ganji A, Byrnes KR, Faden AI. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 modulates microglial reactivity and neurotoxicity by inhibiting NADPH oxidase. (2009) *J Biol Chem* 284:15629–15639
257. Loane DJ, Stoica BA, Pajoohesh-Ganji A, Byrnes KR, Faden AI. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 modulates microglial reactivity and neurotoxicity by inhibiting NADPH oxidase. (2009) *The Journal of biological chemistry.*; 284(23):15629–15639. [PubMed: 19364772]
258. Loane DJ, Stoica BA, Tchantchou F, Kumar A, Barrett JP, Akintola T, Xue F, Conn PJ, Faden AI Novel mGluR5 positive allosteric modulator improves functional recovery, attenuates neurodegeneration, and alters microglial polarization after experimental traumatic brain injury. (2014) *Neurotherapeutics* 11:857–869
259. Loane DJ, Stoica BA, Tchantchou F, Kumar A, Barrett JP, Akintola T, Xue F, Conn PJ, Faden AI. Novel mGluR5 positive allosteric modulator improves functional recovery, attenuates neurodegeneration, and alters microglial polarization after experimental traumatic brain injury. (2014) *Neurotherapeutics* 11:857–869
260. Lomen-Hoerth C., T. Anderson, B. Miller, The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, (2002) *Neurology* 59, 1077–1079 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370467>, Accessed date: 8 November 2018
261. London A., M. Cohen, M. Schwartz, Microglia and monocytederived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair, (2013) *Front. Cell. Neurosci.* 7, 34, <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00034>

262. Ludolph AC, Meyer T, Riepe MW. The role of excitotoxicity in ALS—What is the evidence? (2000) *J Neurol* 2000;247(Suppl 1):17–16
263. Lui H, Zhang J, Makinson SR, Cahill MK, Kelley KW, Huang HY, Shang Y, Oldham MC et al. Progranulin deficiency promotes circuit-specific synaptic pruning by microglia via complement activation. (2016) *Cell* 165(4):921–935. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.001>
264. Lui H, J. Zhang, S.R. Makinson, M.K. Cahill, K.W. Kelley, H.-Y. Huang, Y. Shang, M.C. Oldham, L.H. Martens, F. Gao, G. Coppola, S.A. Sloan, C.L. Hsieh, C.C. Kim, E.H. Bigio, S. Weintraub, M.-M. Mesulam, R. Rademakers, I.R. Mackenzie, W.W. Seeley, A. Karydas, B.L. Miller, B. Borroni, R. Ghidoni, R.V. Farese, J.T. Paz, B.A. Barres, E.J. Huang, Progranulin deficiency promotes circuit-specific synaptic pruning by microglia via complement activation, (2016) *Cell* 165, 921–935, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.001>
265. Lukiw, W. J., Zhao, Y., and Cui, J. G. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 31315–31322. doi: 10.1074/jbc.M805371200
266. Maezawa, I., Jin, L.W., Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. (2010) *J. Neurosci.* 30, 5346–5356.
267. Makarewicz D, Duszczak M, Gadamski R, Danysz W, Lazarewicz JW. Neuroprotective potential of group II metabotropic glutamate receptor antagonists in two ischemic models. (2006) *Neurochem Int* 48:485–490
268. Manabe Y, Kashihara K, Shiro Y, Shohmori T, Abe K. Enhanced Fos expression in rat lumbar spinal cord cultured with cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. (1999) *Neurol Res* 1999;21:309–12
269. Manno EM. Update on intracerebral hemorrhage. (2012) *Continuum (Minneapolis, Minn)* 18:598–610
270. Mao, S., Sun, Q., Xiao, H., Zhang, C., and Li, L. Secreted miR-34a in astrocytic shedding vesicles enhanced the vulnerability of dopaminergic neurons to neurotoxins by targeting Bcl-2. (2015) *Protein Cell* 6, 529–540. doi: 10.1007/s13238-015-0168-y
271. Martin HGS, Lassalle O, Brown JT, Manzoni OJ. Agedependent long-term potentiation deficits in the prefrontal cortex of the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. (2016) *Cereb Cortex* 26(5):2084–2092. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv031>
272. Matarredona ER, Santiago M, Venero JL, Cano J, Machado A. Group II metabotropic glutamate receptor activation protects striatal dopaminergic nerve terminals against MPP-induced neurotoxicity along with brain-derived neurotrophic factor induction. (2001) *J Neurochem* 2001;76:351–360.
273. McBride, K.L., Varga, E.A., Pastore, M.T., Prior, T.W., Manickam, K., Atkin, J.F., Her-man, G.E., Confirmation study of PTEN mutations among individuals with autism or developmental delays/mental retardation and macrocephaly. (2010) *Autism Res.* 3, 137–141.
274. McCauley M.E., R.H. Baloh, Inflammation in ALS/FTD pathogenesis, (2018) *Acta Neuropathol.* <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1933-9>
275. McGeer, P. L., and McGeer, E. G. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. (2002) *Muscle Nerve* 26, 459–470. doi: 10.1002/mus.10191
276. McNeill E, Van Vactor D. microRNAs shape the neuronal landscape. (2012) *Neuron*. 2012;75(3):363–79.
277. Menzies F.M., A. Fleming, A. Caricasole, C.F. Bento, S.P. Andrews, A. Ashkenazi, J. Füllgrabe, A. Jackson, M. Jimenez Sanchez, C. Karabiyik, F. Licitra, A. Lopez Ramirez, M. Pavel, C. Puri, M. Renna, T. Ricketts, L. Schlotawa, M. Vicinanza, H. Won, Y. Zhu, J. Skidmore, D.C. Rubinsztein, Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities, (2017) *Neuron* 93, 1015–1034, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>.
278. Mesci P., S. Zaidi, C.S. Lobsiger, S. Millecamps, C. Escartin, D. Seilhean, H. Sato, M. Mallat, S. Boillée, System xC⁻ is a mediator of microglial function and its deletion slows symptoms in amyotrophic lateral sclerosis mice, (2015) *Brain* 138, <https://doi.org/10.1093/brain/awu312>.
279. Milanese M, Zappettini S, Jacchetti E, Bonifacino T, Cervetto C, Usai C, Bonanno G. In vitro activation of GAT1 transporters expressed in spinal cord gliosomes stimulates glutamate release that is abnormally elevated in the SOD1/G93A(+) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. (2010) *J Neurochem.* 2010 Apr;113(2):489–501. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06628.x. Epub 2010 Feb 1. PMID: 20132478.
280. Milanese M., F. Giribaldi, M. Melone, T. Bonifacino, I. Musante, E. Carminati, P.I.A. Rossi, L. Vergani, A. Voci, F. Conti, A. Puliti, G. Bonanno, Knocking down metabotropic glutamate receptor 1 improves survival and disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, (2014) *Neurobiol. Dis.* 64, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.11.006>
281. Milanese M, Zappettini S, Onofri F, Musazzi L, Tardito D, Bonifacino T, Messa M, Racagni G, Usai C, Benfenati F, Popoli M, Bonanno G. Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. (2011) *J Neurochem.* 2011 Mar;116(6):1028–42. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07155.x. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21175617.
282. Milanese, M., Bonifacino, T., Torazza, C., Provenzano, F., Kumar, M., Ravera, S., Zerbo, A. R., Frumento, G., Balbi, M., Nguyen, T. P. N., Bertola, N., Ferrando, S., Viale, M., Profumo, A., & Bonanno, G. (2021). Blocking glutamate mGlu5 receptors with the negative allosteric modulator CTEP improves disease course in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 1–18. <https://doi.org/10.1111/bph.15515>
283. Milich L.M., Ryan C.B., Lee J.K. // *Acta Neuropathol.* 2019. V. 137. № 5. P. 785–797
284. Miller S, Sehati N, Romano C, Cotman CW. Exposure of astrocytes to thrombin reduces levels of the metabotropic glutamate receptor mGluR5. (1996) *J Neurochem* 67:1435–1447
285. Miller, R. G., Mitchell, J. D., and Moore, D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease

- (MND). (2012) *Cochr. Database Syst. Rev.*3:Cd001447
286. Mills CD, Johnson KM, Hulsebosch CE. Group I metabotropic glutamate receptors in spinal cord injury: roles in neuroprotection and the development of chronic central pain. (2002) *J Neurotrauma* 2002;19:23–42.
 287. Minami S.S., S.-W. Min, G. Krabbe, C. Wang, Y. Zhou, R. Asgarov, Y. Li, L.H. Martens, L.P. Elia, M.E. Ward, L. Mucke, R.V. Farese, L. Gan, L. Gan, Progranulin protects against amyloid β deposition and toxicity in Alzheimer's disease mouse models, (2014) *Nat. Med.* 20, 1157–1164, <https://doi.org/10.1038/nm.3672>
 288. Misra UK, Tan CT, Kalita J, Viral encephalitis and epilepsy. (2008) *Epilepsia* 49 Suppl 6, 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01751.x>
 289. Monier, A., Adle-Biassette, H., Delezoide, A. L., Evrard, P., Gressens, P., and Verney, C. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. (2007) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 372–382. doi:10.1097/nen.0b013e3180517b46
 290. Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., Everall, I.P., Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. (2010) *Biol. Psychiatry* 68,368–376.
 291. Morlando M, Dini Modigliani S, Torrelli G, Rosa A, Di Carlo V, Caffarelli E, et al. FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. (2012). *EMBO J.*2012;31(24):4502–10
 292. Mudo G, Trovato-Salinaro A, Caniglia G, Cheng Q, Condorelli DF. Cellular localization of mGluR3 and mGluR5 mRNAs in normal and injured rat brain. (2007) *Brain Res*; 1149:1–13. [PubMed: 17428452]
 293. Muller, T., Durk, T., Blumenthal, B., Grimm, M., Cicko, S., Panther, E., Sorichter, S., Herouy, Y., Di Virgilio, F., Ferrari, D., Norgauer, J., Idzko, M., 5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. (2009) *PLoS One* 4, e6453
 294. Nakahira K., J.A. Haspel, V.A.K. Rathinam, S.-J. Lee, T. Dolinay, H.C. Lam, J.A. Englert, M. Rabinovitch, M. Cernadas, H.P. Kim, K.A. Fitzgerald, S.W. Ryter, A.M.K. Choi, Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome, (2011) *Nat. Immunol.* 12, 222–230, <https://doi.org/10.1038/ni.1980>
 295. Nakajima K., Kohsaka S. // *Curr. Drug Targets Cardiovas. Haematol. Disord.* (2004). V. 4. № 1. P. 65–84.
 296. Nakazawa, S., Oikawa, D., Ishii, R., Ayaki, T., Takahashi, H., Takeda, H., et al. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. (2016) *Nat. Commun.* 7:12547. doi: 10.1038/ncomms12547
 297. Navascues, J., Calvente, R., Marin-Teva, J. L., and Cuadros, M. A. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. (2000) *An. Acad. Bras. Cienc.* 72, 91–102. doi: 10.1590/s000137652000000100013
 298. Nayak D., Roth T.L., McGavern D.B. // *Annu. Rev. Immunol.*2014. V. 32. P. 367–402
 299. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. (2009) *Brain.* 2009; 132(Pt 2):288–295. [PubMed: 18567623]
 300. Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. (2006) *Science* 314, 130–133. doi: 10.1126/science.1134108
 301. Neves-Pereira, M., Muller, B., Massie, D., Williams, J.H., O'Brien, P.C., Hughes, A., Shen, S.B., Clair, D.S., Miedzybrodzka, Z., Deregulation of EIF4E: a novel mechanism for autism. (2009) *J. Med. Genet.* 46, 759–765.
 302. Newell, K.A., Matosin, N., Rethinking metabotropic glutamate receptor 5 pathological findings in psychiatric disorders: implications for the future of novel therapeutics. (2014) *BMC Psychiatry* 14, 23
 303. Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, et al. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. (2010) *Neuropharmacology.*
 304. Nikodemova, M., Kimyon, R. S., De, I., Small, A. L., Collier, L. S., and Watters, J. J. Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. (2015) *J. Neuroimmunol.* 278, 280–288. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.11.018
 305. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. (2005) *Science.* 2005; 308(5726):1314–1318. [PubMed: 15831717]
 306. Nishimura, A. L., Mitne-Neto, M., Silva, H. C., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. (2004) *Am. J. Hum. Genet.* 75, 822–831. doi: 10.1086/425287
 307. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. (2010) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:295–322
 308. Nixon R.A., The role of autophagy in neurodegenerative disease, (2013) *Nat. Med.* 19, 983–997, <https://doi.org/10.1038/nm.3232>
 309. O'Rourke, J. G., Bogdanik, L., Yáñez, A., Lall, D., Wolf, A. J., Muhammad, A. K., et al. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. (2016) *Science* 351, 13241329. doi: 10.1126/science.aaf1064
 310. Oakes J.A., M.C. Davies, M.O. Collins, TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation, (2017) *Mol. Brain* 10, 1–10, <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0287-x>.
 311. Ohgomori, T., Yamada, J., Takeuchi, H., Kadomatsu, K., and Jinno, S. Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. (2016) *Eur. J. Neurosci.* 43, 1340–1351. doi: 10.1111/ejn.13227
 312. Okada, M., Yamashita, S., Ueyama, H., Ishizaki, M., Maeda, Y., and Ando, Y. Long-term effects of edaravone on survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis. (2018) *eNeurologicalSci* 11, 11–14. doi:

10.1016/j.ensci.2018.05.001

313. Orihuela, R., McPherson, C. A., and Harry, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. (2016) *Br. J. Pharmacol.* 173, 649–665. doi: 10.1111/bph.13139
314. O'Rourke J.G., L. Bogdanik, A. Yáñez, D. Lall, A.J. Wolf, A.K. M.G. Muhammad, R. Ho, S. Carmona, J.P. Vit, J. Zarrow, K. J. Kim, S. Bell, M.B. Harms, T.M. Miller, C.A. Dangler, D.M. Underhill, H.S. Goodridge, C.M. Lutz, R.H. Baloh, C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice, (2016) *Science* 351, 1324–1329, <https://doi.org/10.1126/science.aaf1064>
315. Oskarsson B., T.F. Gendron, N.P. Staff, Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2018, (2018) *Mayo Clin. Proc.* 93, 1617–1628, <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.04.007>.
316. Ostapchenko VG, Beraldo FH, Guimaraes AL, Mishra S, Guzman M, Fan J, Martins VR, Prado VF et al. Increased prion protein processing and expression of metabotropic glutamate receptor 1 in a mouse model of Alzheimer's disease. (2013) *J Neurochem* 127(3):415–425. <https://doi.org/10.1111/jnc.12296>
317. Overk CR, Cartier A, Shaked G, Rockenstein E, Ubhi K, Spencer B, Price DL, Patrick C, Desplats P, Masliah E. Hippocampal neuronal cells that accumulate alpha-synuclein fragments are more vulnerable to Abeta oligomer toxicity via mGluR5-implications for dementia with Lewy bodies. (2014) *Mol Neurodegener* 9:18
318. Pacheco R, Ciruela F, Casado V, et al. Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation. (2004) *J Biol Chem* 2004;279:33352–33358
319. Pacheco, R., Oliva, H., Martinez-Navio, J.M., Climent, N., Ciruela, F., Gatell, J.M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. (2006) *J. Immunol.* 177, 6695–6704
320. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. (2011) *Science* 333(6048):1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
321. Paolicelli, R.C., Bisht, K., Tremblay, M.E., Fractalkine. regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. (2014) *Front. Cell. Neurosci.* 8, 129.
322. Parisi C, Arisi I, D'Ambrosi N, Storti AE, Brandi R, D'Onofrio M, et al. Dysregulated microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis microglia modulate genes linked to neuroinflammation. (2013) *Cell Death Dis.* 2013;4(12):e959.
323. Parisi C., G. Napoli, P. Pelegrin, C. Volonté, M1 and M2 functional imprinting of primary microglia: role of P2X7 activation and miR-125b, (2016) *Mediators Inflamm.* , <https://doi.org/10.1155/2016/2989548>.
324. Parisi, C., Arisi, I., D'Ambrosi, N., Storti, A. E., Brandi, R., D'Onofrio, M., et al. Dysregulated microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis microglia modulate genes linked to neuroinflammation. (2013) *Cell Death Dis.* 4:e959. doi: 10.1038/cddis.2013.491
325. Parisi, C., Napoli, G., Amadio, S., Spalloni, A., Apolloni, S., Longone, P., et al. MicroRNA-125b regulates microglia activation and motor neuron death in ALS. (2016a) *Cell Death Differ.* 23, 531–541. doi: 10.1038/cdd.2015.153
326. Parisi, C., Napoli, G., Pelegrin, P., and Volonté, C. M1 and M2 functional imprinting of primary microglia: role of P2X7 activation and miR-125b. (2016b) *Mediators Inflamm.* 2016:2989548. doi: 10.1155/2016/2989548
327. Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R. III, Lafaille, J. J., et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. (2013) *Cell* 155, 1596–1609. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.030
328. Parmentier-Batteur S, Hutson PH, Menzel K, Uslander JM, Mattson BA, O'Brien JA, Magliaro BC, Forest T, Stump CA, Tynebor RM, Anthony NJ, Tucker TJ, Zhang XF, Gomez R, Huszar SL, Lambeng N, Faure H, Le Poul E, Poli S, Rosahl TW, Rocher JP, Hargreaves R, Williams TM. Mechanism based neurotoxicity of mGlu5 positive allosteric modulators- development challenges for a promising novel antipsychotic target. (2014) *Neuropharmacology* 82:161–173
329. Pehar M., B. Harlan, K. Kiolly, M. Vargas, Role and therapeutic potential of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis, (2017) *Curr. Pharm. Des.* 23 <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622095802>
330. Peters, J. Metterville, R.H. Brown, K.K.Y. Ling, F. Rigo, P.H. Ozdinler, M. Kiaei, M. Kiaei, Mutant Profilin1 transgenic mice recapitulate cardinal features of motor neuron disease, (2017) *Hum. Mol. Genet.* 26, 686–701, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw429>.
331. Philips T., W. Robberecht, Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease, (2011) *Lancet Neurol.* 10, 253–263.
332. Philips, T., and Rothstein, J. D. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. (2014) *Exp. Neurol.* 262, 111–120. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.05.015
333. Pickford F., J. Marcus, L.M. Camargo, Q. Xiao, D. Graham, J.-R. Mo, M. Burkhardt, V. Kulkarni, J. Crispino, H. Hering, M. Hutton, Progranulin is a chemoattractant for microglia and stimulates their endocytic activity, (2011) *Am. J. Pathol.* 178, 284–295, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.002>
334. Piers, T.M., Kim, D.H., Kim, B.C., Regan, P., Whitcomb, D.J., Cho, K., Translational concepts of mGluR5 in synaptic diseases of the brain. (2012) *Front. Pharmacol.* 3, 199.
335. Pinteaux-Jones F, Sevastou IG, Fry VA, Heales S, Baker D, Pocock JM. Myelin-induced microglial neurotoxicity can be controlled by microglial metabotropic glutamate receptors. (2008) *J Neurochem* 2008;106:442–454.
336. Plaza-Zabala A., V. Sierra-Torre, A. Sierra, Autophagy and microglia: novel partners in neurodegeneration and aging, (2017) *Int. J. Mol. Sci.* 18, <https://doi.org/10.3390/ijms18030598>
337. Pocock J.M., Kettenmann H. // *Trends Neurosci.* 2007. V.30 № 10. P. 527–535
338. Pont-Lezica, L., Beumer, W., Colasse, S., Drexhage, H., Versnel, M., and Bessis, A. Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. (2014) *Eur. J. Neurosci.* 39, 1551–1557. doi:

10.1111/ejn.12508

339. Prada, I., Furlan, R., Matteoli, M., and Verderio, C. Classical and unconventional pathways of vesicular release in microglia. (2013) *Glia* 61, 1003–1017. doi: 10.1002/glia.22497
340. Prewitt C.M., Niesman I.R., Kane C.J., Houle J.D. // *Exp. Neurol.* 1997. V. 148. № 2. P. 433–443
341. Provenzano, G., Zunino, G., Genovesi, S., Sgado, P., Bozzi, Y. Mutant mouse models of autism spectrum disorders. (2012) *Dis. Markers* 33, 225–239
342. Qin, L., Liu, Y., Wang, T., Wei, S. J., Block, M. L., Wilson, B., Liu, B., and Hong, J. S. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 1415–1421
343. Ralevic V., G. Burnstock, Receptors for purines and Pyrimidines, purinergic signal, (1998) *Nerv. Syst.* https://doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0_5.
344. Ransohoff, R. M. & Brown, M. A. Innate immunity in the central nervous system. (2012) *The Journal of clinical investigation* 122, 1164–1171, doi:10.1172/jci58644 .
345. Ransohoff, R. M., Kivisakk, P., and Kidd, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3, 569–581. doi: 10.1038/nri1130
346. Ransohoff, R.M., Cardona, A.E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. (2010) *Nature* 468, 253–262.
347. Ratnavalli E., C. Brayne, K. Dawson, J.R. Hodges, The prevalence of frontotemporal dementia, (2002) *Neurology* 58, 1615–1621 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058088>, Accessed date: 8 November 2018.
348. Renton A.E., E. Majounie, A. Waite, J. Simón-Sánchez, S. Rollinson, J.R. Gibbs, J.C. Schymick, H. Laaksovirta, J.C. van Swieten, L. Myllykangas, H. Kalimo, A. Paetau, Y. Abramzon, A.M. Remes, A. Kaganovich, S.W. Scholz, J. Duckworth, J. Ding, D.W. Harmer, D.G. Hernandez, J.O. Renton, A. E., Chiò, A., and Traynor, B. J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. (2014) *Nat. Neurosci.* 17, 17–23. doi: 10.1038/nn.3584
349. Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. (2011) *Neuron* 72, 257–268. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.010
350. Rezaie, P., Patel, K., and Male, D. K. Microglia in the human fetal spinal cord—patterns of distribution, morphology and phenotype. (1999) *Brain Res. Dev. Brain Res.* 115, 71–81. doi: 10.1016/s0165-3806(99)00043-7
351. Ribeiro FM, Devries RA, Hamilton A, Guimaraes IM, Cregan SP, Pires RG, Ferguson SS. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout promotes motor and biochemical alterations in a mouse model of Huntington’s disease. (2014) *Hum Mol Genet* 23:2030–2042
352. Ricci C, Marzocchi C, Battistini S. MicroRNAs as biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. (2018) *Cells*. 2018;7(11).
353. Ricciardi, S., Boggio, E.M., Grosso, S., Lonetti, G., Forlani, G., Stefanelli, G., Calcagno, E., Morello, N., Landsberger, N., Biffo, S., Pizzorusso, T., Giustetto, M., Broccoli, V., Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. (2011). *Hum. Mol. Genet.* 20, 1182–1196
354. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. (2010) *Nat Immunol* 11(9):785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
355. Riek-Burchardt M, Henrich-Noack P, Reymann KG, No improvement of functional and histological outcome after application of the metabotropic glutamate receptor 5 agonist CHPG in a model of endothelin-1-induced focal ischemia in rats. (2007) *Neurosci Res* 57:499–503
356. Rolls A, Shechter R, London A, et al. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: a role in microglia/macrophage activation. (2008) *PLoS Med*; 5:e171. [PubMed: 18715114]
357. Ronesi, J.A., Collins, K.A., Hays, S.A., Tsai, N.P., Guo, W., Birnbaum, S.G., Hu, J.H., Worley, P.F., Gibson, J.R., Huber, K.M., Disrupted Homer scaffolds mediate abnormal mGluR5 function in a mouse model of fragile X syndrome. (2012) *Nat. Neurosci.* 15, 431–440 (S431).
358. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. (1993) *Nature* 362, 59–62. doi: 10.1038/362059a0
359. Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C.F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., et al., Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. (2008) . *Cell Death Differ.* 15, 1691–1700
360. Rothenberg C., D. Srinivasan, L. Mah, S. Kaushik, C.M. Peterhoff, J. Ugolino, S. Fang, A.M. Cuervo, R.A. Nixon, M.J. Monteiro, Ubiquilin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy, (2010) *Hum. Mol. Genet.* 19 , 3219–3232, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq231>
361. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. (1990) *Ann Neurol.*;28(1):18–25.
362. Rowland, L. P., and Shneider, N. A. Amyotrophic lateral sclerosis. (2001) *New Engl. J. Med.* 344, 1688–1700. doi:10.1056/nejm200105313442207
363. Saba, R., Gushue, S., Huzarewich, R. L., Manguiat, K., Medina, S., Robertson, C., et al. MicroRNA 146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. (2012) *PLOS ONE* 7:e30832. doi:10.1371/journal.pone.0030832
364. Savio L.E.B., P. de A. Mello, C.G. da Silva, R. Coutinho-Silva, The P2X7 receptor in inflammatory diseases: angel or demon? (2018) *Front. Pharmacol.* 9, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00052>.
365. Sawada, H. Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. (2017) *Expert Opin. Pharmacother.* 18, 735–738. doi: 10.1080/14656566.2017.1319937
366. Schafer D.P., B. Stevens, Microglia function in central nervous system development and plasticity, (2015) *Cold Spring*

- Harb. *Perspect. Biol.* 7, a020545.
367. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. (2012) *Neuron* 74(4):691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
368. Schafer DP, Stevens B. Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. (2013) *Curr Opin Neurobiol* 23(6):1034–1040. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.09.012>
369. Schiffer D, Cordera P, Cavalla P, Migheli A. Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. (1996) *J Neurol Sci*;139(Suppl):27–33
370. Schinkmann KA, Kim TA, Avraham S. Glutamate-stimulated activation of DNA synthesis via mitogen-activated protein kinase in primary astrocytes: Involvement of protein kinase C and related adhesion focal tyrosine kinase. (2000) *J Neurochem*;74:1931–40
371. Schrott G. microRNAs at the synapse. (2009) *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:842.
372. Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. (2012) *Science* 336, 86–90. doi: 10.1126/science.1219179
373. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. (2004) *Genome Biol.* 2004;5(3):R13.
374. Shafer, O. T., Chen, A., Kumar, S. M., Muller, K. J., and Sahley, C. L. Injury-induced expression of endothelial nitric oxide synthase by glial and microglial cells in the leech central nervous system within minutes after injury. (1998) *Proc. Biol. Sci.* 265, 2171–2175. doi: 10.1098/rspb.1998.0555
375. Shahani N, Gouri-Devi M, Nalini A, Raju TR. Reactive astrogliosis in neonatal rat spinal cord after exposure to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. (1998) *Exp Neurol* 1998;149:295–98
376. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. (2008) *Nat Med* 14(8):837–842. <https://doi.org/10.1038/nm1782>
377. Shi C.S., K. Shenderov, N.N. Huang, J. Kabat, M. Abu-Asab, K.A. Fitzgerald, A. Sher, J.H. Kehrl, Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction, (2012) *Nat. Immunol.* 13, 255–263, <https://doi.org/10.1038/ni.2215>
378. Shi, F., Duan, S., Cui, J., Yan, X., Li, H., Wang, Y., Chen, F., Zhang, L., Liu, J., Xie, X., Induction of Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) Expression in the Microglia by Lipopolysaccharide (LPS) via Upregulation of Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma B (GPNMB) Expression. (2014) *J. Mol. Neurosci.: MN.*
379. Shibutani S.T., T. Saitoh, H. Nowag, C. Münz, T. Yoshimori, Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system, (2015) *Nat. Immunol.* 16, 1014–1024, <https://doi.org/10.1038/ni.3273>.
380. Silva GA, Theriault E, Mills LR, Pennefather PS, Feeney CJ. Group I and II metabotropic glutamate receptor expression in cultured rat spinal cord astrocytes. (1999) *Neurosci Lett* 1999;263:117–20
381. Skafidas, E., Testa, R., Zantomio, D., Chana, G., Everall, I.P., Pantelis, C., Pre-dicting the diagnosis of autism spectrum disorder using gene pathway analysis. (2014) *Mol. Psychiatry* 19, 504–510
382. Smith DH, Chen XH, Pierce JE, Wolf JA, Trojanowski JQ, Graham DI, McIntosh TK: Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. (1997) *J Neurotrauma* 1997, 14:715-727.
383. Sokol DK, Maloney B, Long JM, Ray B, Lahiri DK. Autism, Alzheimer disease, and fragile X: APP, FMRP, and mGluR5 are molecular links. (2011) *Neurology* 76(15):1344–1352. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182166dc7>
384. Sperlágh, B., and Illes, P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. (2014) *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 537–547. doi: 10.1016/j.Tips.2014.08.002
385. Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, et al. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: A reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. (2002) *J Neurol Sci* 2002;193:73–78
386. Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., et al. Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. (2014) *Cell Rep.* 8,1271–1279. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.042
387. Stephan AH, Barres BA, Stevens B. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. (2012) *Annu Rev Neurosci* 35:369–389. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113810>
388. Stephan AH, Madison DV, Mateos JM, Fraser DA, Lovelett EA, Coutellier L, Kim L, Tsai HH et al. A dramatic increase of C1q protein in the CNS during normal aging. (2013) *J Neurosci* 33(33):13460–13474. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1333-13.2013>
389. Su P., J. Zhang, D. Wang, F. Zhao, Z. Cao, M. Aschner, W. Luo, The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia, (2016) *Neuroscience* 319, 155–167, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.035>
390. Su, W., Aloï, M. S., and Garden, G. A. MicroRNAs mediating CNS inflammation: small regulators with powerful potential. (2016) *Brain Behav. Immun.* 52, 1–8. doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.003
391. Sudhof, T.C., Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. (2008) *Nature* 455, 903–911.
392. Suh, H. S., Zhao, M. L., Derico, L., Choi, N., and Lee, S. C. Insulinlike growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators. (2013) *J. Neuroinflammation* 10:37. doi: 10.1186/1742-2094-10-37
393. Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop JJ, Yu G, Mucke L, Gan L. Imbalance between GABAergic and glutamatergic transmission impairs adult neurogenesis in an animal model of Alzheimer's disease. (2009) *Cell Stem Cell* 5(6):624–

633. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.10.003>
- 394.Swarup, V., Phaneuf, D., Dupre, N., Petri, S., Strong, M., Kriz, J., et al. Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor κB-mediated pathogenic pathways. (2011) *J. Exp. Med.* 208, 2429–2447. doi: 10.1084/jem.20111313
- 395.Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., et al. Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. (2013) *Glia* 61, 150–163. doi: 10.1002/glia.22421
- 396.Szepesi Z., Manouchehrian O., Bachiller S., Deierborg T. // *Front. Cell. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 323
- 397.Szydłowska K, Kaminska B, Baude A, Parsons CG, Danysz W. Neuroprotective activity of selective mGlu1 and mGlu5 antagonists in vitro and in vivo. (2007) *Eur J Pharmacol* 554:18–29
- 398.Takagi N, Besshoh S, Marunouchi T, Takeo S, Tanonaka K. Effects of metabotropic glutamate mGlu5 receptor antagonist on tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits and cell death in the hippocampus after brain ischemia in rats.(2012) *Neurosci Lett* 530:91–96
- 399.Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, et al. Tumor necrosis factor-α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner.(2006) *J Biol Chem.* 2006;281(30):21362–8.
- 400.Takeuchi H, Mizoguchi H, Doi Y, Jin S, Noda M, Liang J, et al. Blockade of gap junction hemichannel suppresses disease progression in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. (2011) *PloS One.* 2011;6(6):e21108.
- 401.Takeuchi H, A. Suzumura, Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases,(2014) *Front. Cell.Neurosci.* 8, <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00189>
- 402.Tang, L. L., Wu, Y. B., Fang, C. Q., Qu, P., and Gao, Z. L. NDRG2 promoted secreted miR-375 in microvesicles shed from M1 microglia, which induced neuron damage.(2016) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469, 392–398. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.098
- 403.Tang, Y., and Le, W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases.(2016) *Mol. Neurobiol.* 53, 1181–1194. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5
- 404.Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. (2007) *Exp Neurol.* 2007; 208:1–25. [PubMed: 17720159]
- 405.Tator CH. Experimental and clinical studies of the pathophysiology and management of acute spinal cord injury. (1996) *J Spinal Cord Med.* 1996; 19:206–214. [PubMed: 9237787]
- 406.Taylor DL, Diemel LT, Cuzner ML, Pocock JM. Activation of group II metabotropic glutamate receptors underlies microglial reactivity and neurotoxicity following stimulation with chromogranin A, a peptide up-regulated in Alzheimer's disease. (2002) *J Neurochem.* 2002; 82(5):1179–1191. [PubMed: 12358765]
- 407.Taylor DL, Diemel LT, Pocock JM. Activation of microglial group III metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. (2003) *J Neurosci.* 2003; 23(6):2150–2160. [PubMed: 12657674]
- 408.Taylor RA, Sansing LH,. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. (2013) *Clin Dev Immunol* 2013:746068
- 409.Taylor, A. A., Fournier, C., Polak, M., Wang, L., Zach, N., Keymer, M., et al. Predicting disease progression in amyotrophic lateral sclerosis.(2016) *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 866–875. doi:10.1002/acn3.348
- 410.Terro F, Lesort M, Viader F, Ludolph A, Hugon J. Antioxidant drugs block in vitro the neurotoxicity of CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis. (1996) *NeuroReport* 1996;12:1970–72
- 411.Tetreault, N.A., Hakeem, A.Y., Jiang, S., Williams, B.A., Allman, E., Wold, B.J., Allman, J.M., Microglia in the cerebral cortex in autism. (2012) *J. Autism Dev. Disord.* 42,2569–2584.
- 412.Teyssou, E., Takeda, T., Lebon, V., Boillée, S., Doukouré, B., Bataillon, G., et al. Mutations in SQSTM1 encoding p62 in amyotrophic lateral sclerosis: genetics and neuropathology. (2013) *Acta Neuropathol.* 125, 511–522. doi: 10.1007/s00401-013-1090-0
- 413.Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification. (2011). *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):6845–53.
- 414.Tilleux S, Berger J, Hermans E,. Induction of astrogliosis by activated microglia is associated with a down-regulation of metabotropic glutamate receptor 5. (2007) *J Neuroimmunol* 189:23–30.
- 415.Timmerman R, Burm SM, Bajramovic JJ. An overview of in vitro methods to study microglia. (2018) *Front Cell Neurosci.* 2018;12:242
- 416.Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK, Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience.(2010) *PLo Biol* 8(11):e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>
- 417.Troost, D., van den Oord, J. J., de Jong, J. M., and Swaab, D. F. Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. (1989) *Clin. Neuropathol.* 8, 289–294
- 418.Tsuda, H., Han, S. M., Yang, Y., Tong, C., Lin, Y. Q., Mohan, K., et al. The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein VAPB is cleaved, secreted, and acts as a ligand for Eph receptors.(2008) *Cell* 133, 963–977. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.039
- 419.Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., Worley, P.F., Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins.(1999) *Neuron*23, 583–592.
- 420.Turner, B. J., and Talbot, K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated

- familial ALS.(2008) *Prog. Neurobiol.* 85, 94–134. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.01.001
421. Turolo, E., Furlan, R., Bianco, F., Matteoli, M., and Verderio, C. Microglial microvesicle secretion and intercellular signaling. (2012) *Front. Physiol.* 3:149. doi: 10.3389/fphys.2012.00149
422. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Kirkman NJ, Libbey JE, Wilcox KS, White HS, Fujinami RS. Innate but not Adaptive Immune Responses Contribute to Behavioral Seizures Following Viral Infection. (2010) *Epilepsia* 51, 454–464. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02390.x> [PubMed: 19845729]
423. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Patel DC, Wallis G, Dahle EJ, McElroy PB, Thomson KE, Tesi RJ, Szymkowski DE, West PJ, Smeal RM, Patel M, Fujinami RS, White HS, Wilcox KS. Hippocampal TNF α Signaling Contributes to Seizure Generation in an Infection-Induced Mouse Model of Limbic Epilepsy. (2017). *eNeuro* 4 <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0105-17.2017>
424. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Bertani I, Iori V, Trusel M, Maroso M, Foray C, Mantovani S, Tonini R, Vezzani A, Chiesa R., Inhibition of IL-1 β Signaling Normalizes NMDA-Dependent Neurotransmission and Reduces Seizure Susceptibility in a Mouse Model of Creutzfeldt–Jakob Disease. (2017) *J. Neurosci* 37, 10278–10289. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1301-17.2017> [PubMed: 28924012]
425. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Pauletti A, Terrone G, Shekh-Ahmad T, Salamone A, Ravizza T, Rizzi M, Pastore A, Pascente R, Liang L-P, Villa BR, Balosso S, Abramov AY, van Vliet EA, Del Giudice E, Aronica E, Antoine DJ, Patel M, Walker MC, Vezzani A., Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy (2017). *Brain J. Neurol* 140, 1885–1899. <https://doi.org/10.1093/brain/awx117>
426. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Vezzani A, Lang B, Aronica E., Immunity and Inflammation in Epilepsy. (2015) *Cold Spring Harb. Perspect. Med* 6, a022699 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022699> [PubMed: 26684336]
427. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Howe CL, LaFrance-Corey RG, Sundsbak RS, LaFrance SJ., Inflammatory monocytes damage the hippocampus during acute picornavirus infection of the brain. (2012) *J. Neuroinflammation* 9, 50 <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-50> [PubMed: 22405261]
428. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Libbey JE, Kennett NJ, Wilcox KS, White HS, Fujinami RS., Once Initiated, Viral Encephalitis-Induced Seizures are Consistent No Matter the Treatment or Lack of Interleukin-6. (2011a) *J. Neurovirol* 17, 496–499. <https://doi.org/10.1007/s13365-011-0050-5> [PubMed: 21833798]
429. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Loane DJ, Stoica BA, Pajooresh-Ganji A, Byrnes KR, Faden AI., Activation of Metabotropic Glutamate Receptor 5 Modulates Microglial Reactivity and Neurotoxicity by Inhibiting NADPH Oxidase. (2009) *J. Biol. Chem* 284, 15629–15639. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806139200> [PubMed: 19364772]
430. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Zhang Z-Y, Sun B-L, Liu J-K, Yang M-F, Li D-W, Fang J, Zhang S, Yuan Q-L, Huang S-L., Activation of mGluR5 Attenuates Microglial Activation and Neuronal Apoptosis in Early Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats. (2015) *Neurochem. Res* 40, 1121–1132. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1572-7> [PubMed: 25846008]
431. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Cosford NDP, Tehrani L, Roppe J, Schweiger E, Smith ND, Anderson J, Bristow L, Brodtkin J, Jiang X, McDonald I, Rao S, Washburn M, Varney MA., 3-[(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]-pyridine: a potent and highly selective metabotropic glutamate subtype 5 receptor antagonist with anxiolytic activity. (2003) *J. Med. Chem* 46, 204–206. <https://doi.org/10.1021/jm025570j> [PubMed: 12519057]
432. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Loane DJ, Stoica BA, Tchanchou F, Kumar A, Barrett JP, Akintola T, Xue F, Conn PJ, Faden AI., Novel mGluR5 Positive Allosteric Modulator Improves Functional Recovery, Attenuates Neurodegeneration, and Alters Microglial Polarization after Experimental Traumatic Brain Injury. (2014) *Neurotherapeutics* 11, 857–869. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0298-6> [PubMed: 25096154]
433. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Rodriguez AL, Grier MD, Jones CK, Herman EJ, Kane AS, Smith RL, Williams R, Zhou Y, Marlo JE, Days EL, Blatt TN, Jadhav S, Menon UN, Vinson PN, Rook JM, Stauffer SR, Niswender CM, Lindsley CW, Weaver CD, Conn PJ., Discovery of Novel Allosteric Modulators of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5 Reveals Chemical and Functional Diversity and In Vivo Activity in Rat Behavioral Models of Anxiolytic and Antipsychotic Activity. (2010) *Mol. Pharmacol* 78, 1105–1123. <https://doi.org/10.1124/mol.110.067207> [PubMed: 20923853]
434. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Kaltsonoudis E, Zikou AK, Voulgari PV, Konitsiotis S, Argyropoulou MI, Drosos AA., Neurological adverse events in patients receiving anti-TNF therapy: a prospective imaging and electrophysiological study. (2014) *Arthritis Res. Ther* 16, R125 <https://doi.org/10.1186/ar4582> [PubMed: 24938855]
435. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Solomon AJ, Spain RI, Kruer MC, Bourdette D, Inflammatory neurological disease in patients treated with tumor necrosis factor alpha inhibitors. (2011) *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 17, 1472–1487. <https://doi.org/10.1177/1352458511412996>

436. Tyler J. Hanak, Jane E. Libbey, Daniel J. Doty, Jordan T. Sim, Ana Beatriz DePaula-Silva, Robert S. Fujinami Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP., Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review (2008). *Pharmacol. Ther* 117, 244–279. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.10.001> [PubMed: 18155297]
437. Ueno M., Fujita Y., Tanaka T., Nakamura Y., Kikuta J., Ishii M., Yamashita T. // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. № 5.P. 543–551.
438. Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. (2013) *Nat. Neurosci.* 16, 543–551. doi: 10.1038/nn.3358
439. Ulland T.K., Y. Wang, M. Colonna, Regulation of microglial survival and proliferation in health and diseases, (2015) *Semin. Immunol.* 27, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.011>.
440. Um JW, Kaufman AC, Kostylev M, Heiss JK, Stagi M, Takahashi H, Kerrisk ME, Vortmeyer A, Wisniewski T, Koleske AJ, Gunther EC, Nygaard HB, Strittmatter SM., Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. (2013) *Neuron* 79:887–902
441. Van Den Bosch, L., Tilkin, P., Lemmens, G., and Robberecht, W. Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS (2002). *Neuroreport* 13, 1067–1070. doi:10.1097/00001756-200206120-00018
442. Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. (2009) *Science* 323, 1208–1211. doi: 10.1126/science.1165942
443. Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., Pardo, C.A., Neu-rogliol activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. (2005) *Ann. Neurol.* 57, 67–81
444. Venero JL, Santiago M, Tomas-Camardiel M, Matarredona ER, Cano J, Machado A. DCG-IV but not other group-II metabotropic receptor agonists induces microglial BDNF mRNA expression in the rat striatum: correlation with neuronal injury. (2002) *Neuroscience* 2002;113:857– 869.
445. Verderio, C., Muzio, L., Turola, E., Bergami, A., Novellino, L., Ruffini, F., et al. Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. (2012) *Ann. Neurol.* 72, 610–624. doi: 10.1002/ana.23627
446. Verpelli, C., Dvoretzkova, E., Vicidomini, C., Rossi, F., Chiappalone, M., Schoen, M., Di Stefano, B., Mantegazza, R., Broccoli, V., Bockers, T.M., Dityatev, A., Sala, C., Importance of Shank3 protein in regulating metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) expression and signaling at synapses (2011). *J. Biol. Chem.* 286,34839–34850.
447. Volonte C, S. Apolloni, C. Parisi, MicroRNAs: newcomers into the ALS picture, (2015) *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 14 , <https://doi.org/10.2174/1871527314666150116125506>
448. Volonté C., C. Parisi, S. Apolloni, New kid on the block: does histamine get along with inflammation in amyotrophic lateral sclerosis? (2015) *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 14, <https://doi.org/10.2174/1871527314666150225143921>.
449. Volonte C., S. Amadio, F. Cavaliere, N. D'Ambrosi, F. Vacca, G. Bernardi, Extracellular ATP and neurodegeneration, (2003) *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 2, <https://doi.org/10.2174/1568007033482643>
450. Volonté C., S. Amadio, N. D'Ambrosi, M. Colpi, G. Burnstock, P2 receptor web: complexity and fine-tuning, (2006) *Pharmacol. Ther.* 112, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.012>
451. Volonte C., S. Apolloni, S.D. Skaper, G. Burnstock, P2X7 receptors: channels, pores and more, (2012) *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 11, <https://doi.org/10.2174/187152712803581137>.
452. Wagner KR., Modeling intracerebral hemorrhage: glutamate, nuclear factor-kappa B signaling and cytokines. (2007) *Stroke* 38:753–758
453. Wakselman, S., Bechade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A., and Bessis, A. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. (2008) *J. Neurosci.* 28, 8138–8143. doi:10.1523/jneurosci.1006-08.2008
454. Wang DO, Kim SM, Zhao Y, Hwang H, Miura SK, Sossin WS, Martin KC., Synapse- and stimulus-specific local translation during long-term neuronal plasticity. (2009) *Science* 324(5934):1536–1540. <https://doi.org/10.1126/science.1173205>
455. Wang DO, Martin KC, Zukin RS., Spatially restricting gene expression by local translation at synapses. (2010) *Trends Neurosci* 33(4): 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.01.005>
456. Wang JW, Wang HD, Cong ZX, Zhang XS, Zhou XM, Zhang DD ., Activation of metabotropic glutamate receptor 5 reduces the secondary brain injury after traumatic brain injury in rats. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 430:1016–1021
457. Wang, Y., Duan, W., Wang, W., Di, W., Liu, Y., Liu, Y., et al. scAAV9- VEGF prolongs the survival of transgenic ALS mice by promoting activation of M2 microglia and the PI3K/Akt pathway. (2016) *Brain Res.* 1648, 1–10. doi: 10.1016/j.Brainres.2016.06.043
458. Warwick HK, Nahorski SR, Challiss RA. Group I metabotropic glutamate receptors, mGlu1a and mGlu5a, couple to cyclic AMP response element binding protein (CREB) through a common Ca²⁺- and protein kinase C-dependent pathway. (2005) *J Neurochem* 2005;93:232–245.
459. Wasserman JK, Zhu X, Schlichter LC., Evolution of the inflammatory response in the brain following intracerebral hemorrhage and effects of delayed minocycline treatment. (2007) *Brain Res* 1180:140–154
460. Wei, H., Chadman, K.K., McCloskey, D.P., Sheikh, A.M., Malik, M., Brown, W.T., Li, X., Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors. (2012) *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 831–842
461. Wekerle, H. Breaking ignorance: the case of the brain. (2006) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 305, 25–50. doi: 10.1007/3-540-29714-6_2
462. Whittmore E. R., Korotzer A. R., Etebari A., and Cotman C. W. Carbachol increases intracellular free calcium in cultured rat microglia. (1993) *Brain Res.* 621, 59–64

463. Wilson S, Raghupathi R, Saatman KE, MacKinnon MA, McIntosh TK, Graham DI: Continued in situ DNA fragmentation of microglia/macrophages in white matter weeks and months after traumatic brain injury. (2004) *J Neurotrauma*, 21:239-250.
464. Won, H., Lee, H.R., Gee, H.Y., Mah, W., Kim, J.I., Lee, J., Ha, S., Chung, C., Jung, E.S., Cho, Y.S., Park, S.G., Lee, J.S., Lee, K., Kim, D., Bae, Y.C., Kaang, B.K., Lee, M.G., Kim, E., Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. (2012) *Nature* 486,261–265.
465. Wu C.H., C. Fallini, N. Ticozzi, P.J. Keagle, P.C. Sapp, K. Piotrowska, P. Lowe, M. Koppers, D. McKenna-Yasek, D.M. Baron, J.E. Kost, P. Gonzalez-Perez, A.D. Fox, J. Adams, F. Taroni, C. Tiloca, A.L. Leclerc, S.C. Chafe, D. Mangroo, M.J. Moore, J.A. Zitzewitz, Z.-S. Xu, L.H. van den Berg, J.D. Wu J, Bie B, Naguib M., Epigenetic manipulation of brain derived neurotrophic factor improves memory deficiency induced by neonatal anesthesia in rats. (2016) *Anesthesiology* 124(3):624–640. <https://doi.org/10.1097/aln.0000000000000981>
466. Wu, C. H., Fallini, C., Ticozzi, N., Keagle, P. J., Sapp, P. C., Piotrowska, K., et al. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. (2012) *Nature* 488, 499–503. doi: 10.1038/nature11280
467. Xiao, Q., Zhao, W., Beers, D. R., Yen, A. A., Xie, W., Henkel, J. S., et al. Mutant SOD1G93A microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. (2007) *J. Neurochem.* 102, 2008–2019. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04677.x
468. Xu Q, Zhao Y, Zhou X, Luan J, Cui Y, Han J. Comparison of the extraction and determination of serum exosome and miRNA in serum and the detection of miR-27a-3p in serum exosome of ALS patients.(2018) *Intractable Rare Dis Res.* 2018;7(1):13–8.
469. Yakovlev AG, Faden AI. Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. (2001) *Mol Neurobiol*; 24:131–144. [PubMed: 11831549]
470. Yang, C., Danielson, E. W., Qiao, T., Metterville, J., Brown, R. H. Jr., Landers, J. E., et al. Mutant PFN1 causes ALS phenotypes and progressive motor neuron degeneration in mice by a gain of toxicity. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 113, E6209–E6218. doi: 10.1073/pnas.1605964113
471. Yiangou Y., P. Facer, P. Durrenberger, I.P. Chessell, A. Naylor, C. Bountra, R.R. Banati, P. Anand, COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. (2006) *BMC Neurol.* 6, <https://doi.org/10.1186/1471-2377-6-12>.
472. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforazzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. (2014) *Nat Neurosci* 17(3):400–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3641>
473. Zhang J, Malik A, Choi HB, Ko RW, Dissing-Olesen L, Macvicar BA., Microglial CR3 activation triggers long-term synaptic depression in the hippocampus via NADPH oxidase. (2014) *Neuron* 82(1): 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.043>
474. Zhang Z, Zhang Z, Lu H, Yang Q, Wu H, Wang J., Microglial polarization and inflammatory mediators after intracerebral hemorrhage. (2017) *Mol Neurobiol* 54:1874–1886
475. Zhao W, Xie W, Le W, Beers DR, He Y, Henkel JS, et al. Activated microglia initiate motor neuron injury by a nitric oxide and glutamate-mediated mechanism. (2004) *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(9):964–77.
476. Zhao, W., Beers, D. R., and Appel, S. H. Immune-mediated mechanisms in the pathoproduction of amyotrophic lateral sclerosis.(2013) *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 888–899. doi:10.1007/s11481-013-9489-x
477. Zhao, W., Beers, D. R., Bell, S., Wang, J., Wen, S., Baloh, R. H., et al. TDP-43 activates microglia through NF- κ B and NLRP3 inflammasome. (2015) *Exp. Neurol.* 273, 24–35. doi:10.1016/j.expneurol.2015.07.019
478. Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhang, W., Urushitani, M., Julien, J. P., et al. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury.(2010) *Glia* 58, 231–243. doi: 10.1002/glia.20919
479. Zhao, W., Beers, D. R., Hooten, K. G., Sieglaff, D. H., Zhang, A., Kalyana-Sundaram, S., et al. Characterization of gene expression phenotype in amyotrophic lateral sclerosis monocytes. (2017) *JAMA Neurol.* 74, 677–685. doi:10.1001/jamaneurol.2017.0357
480. Zhao, X., Xu, B., Bhattacharjee, A., Oldfield, C. M., Wientjes, F. B., Feldman, G. M., and Cathcart, M. K. (2005) *J. Leukoc. Biol.* 77, 414–420
481. Zhong, X., Li, H., Chang, Q., MeCP2 phosphorylation is required for modulating synaptic scaling through mGluR5. (2012) *J. Neurosci.* 32, 12841–12847
482. Zhu G., C.-J. Wu, Y. Zhao, J.D. Ashwell, Optineurin negatively regulates TNF α -induced NF- κ B activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP.(2007) *Curr. Biol.* 17, 1438–1443, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.041>
483. Zhu, S., Stavrovskaya, I. G., Drozda, M., Kim, B. Y., Ona, V., Li, M., et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice.(2002) *Nature* 417, 74–78. doi: 10.1038/417074a

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone senza le quali questo lavoro di tesi non si sarebbe mai realizzato.

La prima persona che voglio ringraziare è il Prof. Milanese per la pazienza, la disponibilità, la gentilezza e l'umanità che ha mostrato nei miei confronti, e per avermi dato la possibilità di svolgere questa tesi nel migliore dei modi.

Grazie a Mamma e Papà, colonne portanti della mia vita da sempre e per sempre, per l' Amore incondizionato, il sostegno, i sacrifici, le lacrime, i sorrisi, per ogni momento che avete vissuto insieme a me. Grazie per avermi insegnato che con l'umiltà, la volontà e lo spirito di sacrificio si può arrivare lontano, molto più lontano di quanto si possa immaginare.

Grazie ad Alessandro, per essere stato il mio faro nella notte, il braccio destro su cui ho sempre potuto contare, il mio miglior compagno di avventure.

Grazie a Nonno Michele, allo Zio Piero e alla Zia Barbara per la essere stati, da sempre, i miei sostenitori più grandi.

Grazie a Stella e Paolo, per il sostegno, l' affetto e la gioia che mi avete donato durante questi cinque faticosi anni.

Grazie agli amici di sempre, per avermi regalato momenti di leggerezza e gioia nei mesi di sessione e non solo.

Grazie a tutti i compagni di corso che hanno arricchito il mio cammino in questi cinque lunghi anni, vi porterò sempre nel cuore.

Grazie a me stessa, a quella bambina troppo introversa, sempre un passo dietro agli altri, per essersi presa la sua rivincita, per aver inseguito un sogno e averlo fatto diventare realtà.

Grazie a chi oggi non è più qui, ma è sempre ad un passo dal mio cuore.

Grazie, con il cuore pieno di Gratitudine.

Francesca