

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

**Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in
"Chimica e Tecnologia Farmaceutiche"**

Tesi di Laurea

" Il complemento come modulatore della trasmissione glutamatergica "

Relatrice:

Prof.ssa Anna Maria Pittaluga

Candidato:

Romina Gjomemo

Anno accademico 2023-2024

INDICE

1. Il sistema immunitario

2. Il sistema del complemento

2.1 cosa è il complemento

2.2. Le vie di attivazione del complemento.

2.2.1 La via Classica

2.2.2 La via alternativa

2.2.3- La via lectinica-

3. Interazione tra il sistema nervoso centrale ed il sistema immunitario

3.1 Il complemento nel sistema nervoso centrale:

3.2 C1q

3.3 C3

4. Il complemento come modulatore della trasmissione glutamatergica

5. Scopo della ricerca

6. Materiali e Metodi

6.1 Animali

6.2 Induzione dell'EAE e score clinico

6.3 Studi di rilascio

6.4 Western Blot

6.5 Calcoli ed analisi statistiche

7. Risultati e Discussione

7.1 A proposito di sinaptosomi e gliosomi

7.2 il complemento induce il rilascio di glutammato da sinaptosomi corticali: ruolo dei trasportatori GLT1/GLAST.

7.3 Ruolo del C1q e del C3 nell'effetto rilasciante indotto dal complemento in gliosomi e sinaptosomi corticali

7.4 il modello della Encefalomielite Autoimmune Sperimentale

7.5 Alterazioni della sinapsi tetrapartita nella corteccia di topi affetti da Encefalomielite Autoimmune Sperimentale.

7.6 variazioni della densità dei trasportatori GLT1 /GLAST in sinaptosomi e gliosomi isolati dalla corteccia di topi affetti da Encefalomielite Autoimmune Sperimentale.

8. Conclusioni

9. Figure e legende alle figure

10. Bibliografia

ACRONIMI

APC antigen presenting cell

BCA Bicinchoninic Acid

BEE barriera ematoencefalica

CD11b antigene di superficie cellulare della famiglia delle integrine

CD46 MCP - Membrane Cofactor Protein

CFA cryogenic fluids analyzer

DA/CD55 decay accelerating factor

DL-tBOA DL-threo- β -Benzyloxyaspartic acid

EAAT2 excitatory amino acid transporter

EAE Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

FACS Fluorescence-Activated Cell Sorting

GABA Gamma-Aminobutyric Acid

GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GFAP Glial Fibrillary Acidic Protein

GLAST e GLT1 carrier glutamatergici

GLAST glutamate aspartate transporter

GLT1 glutamate transporter 1

IFN interferon

MAC membrane attack complex

MASP: MBL associated serine proteases

MBL: mannose binding lectine

MBP myelin basic protein

MOG myelin oligodendrocyte glycoprotein

PLP proteolipid protein

PSD95 post synaptic density protein 95

RIPA RadioImmunoPrecipitation Assay buffer

SDS- PAGE Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SEM Scanning Electron Microscopy

SNAP25 Synaptosomal-Associated Protein

SNC: sistema nervoso centrale/ CNS centrale nervous system

SV2 synaptic vesicle protein 2

SYN sinapsins

TBS tris buffered saline

TEM Transmission Electron Microscopy

TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethane

1. Il sistema immunitario

L'immunologia rappresenta il ramo della scienza che ha per oggetto lo studio di tutti i fenomeni attinenti all'immunità. La funzione primaria del sistema immunitario è quella di proteggere l'organismo da antigeni mediante la sintesi di molecole altamente specializzate e specifiche. Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario è la capacità di distinguere tra le strutture che *non* costituiscono un pericolo e che dunque devono essere preservate ("*self*") e le strutture endogene o esogene potenzialmente nocive per l'organismo e che quindi devono essere rimosse (definite "*non self*"). La discriminazione tra *self* e *non self* avviene a livello molecolare ed è mediata da particolari strutture cellulari che consentono la presentazione ed il riconoscimento di particolari epitopi antigenici.

Il sistema immunitario è in grado di riconoscere i determinanti antigenici e di attivare nei confronti di un antigene una risposta specifica, che si manifesta con la produzione di anticorpi, ed aspecifica, che prevede l'attivazione di particolari popolazioni cellulari. Inoltre, il sistema immunitario deve mantenere memoria delle strutture di riconoscimento antigenico dimostrate efficaci nel rispondere a precedenti aggressioni che potrebbero ripresentarsi.

A seconda della modalità di riconoscimento dell'antigene si potranno distinguere due tipi di immunità: adattativa ed innata.

Immunità adattativa o specifica. Agisce in senso specifico e per questo assicura un alto livello di efficienza. Comprende mediatori chimici e cellulari responsabili di una risposta più potente e mirata rispetto alla risposta innata, virtualmente in grado di riconoscere qualsiasi forma di antigene. Ha memoria immunologica ma i tempi di risposta sono molto più lunghi rispetto all'immunità innata (circa 96 ore). L'immunità specifica è costituita prevalentemente da cellule della linea linfoide (della serie T e B) e da cellule accessorie. All'interno dell'immunità specifica distinguiamo un'immunità specifica umorale (mediata da anticorpi) ed un'immunità cellulo-mediata (mediata dai linfociti T).

Immunità innata o aspecifica. Comprende meccanismi di difesa non specifici presenti fin dalla nascita di un individuo, quindi preesistenti all'infezione. La caratteristica

fondamentale della risposta innata riguarda la capacità di attivarsi immediatamente rispetto ad un vasto numero di patogeni. La rapidità del riconoscimento e della risposta difensiva conseguente (0-96 ore) è dovuta al fatto che i meccanismi di riconoscimento sono presenti uniformemente su tutti i componenti dell'immunità innata e sono determinati a livello genetico senza alcun bisogno di processi maturativi come invece avviene nell'immunità adattativa. La componente cellulare dell'immunità innata comprende barriere chimico-fisiche (quali pelle, mucosa bronchiale, mucosa nasale, saliva e lacrime), alcune proteine ematiche (tra cui i componenti del sistema del complemento ed altri mediatori dell'infiammazione), cellule di derivazione mieloide (come ad esempio macrofagi, cellule dendritiche, mastociti, basofili), cellule di tipo linfoide (come cellule Natural Killer e linfociti) e numerose proteine di produzione endogena (quali citochine e chemochine)

Il sistema del complemento fa parte dell'immunità innata e rappresenta un elemento essenziale dei meccanismi di difesa umorali contro gli agenti infettivi.

2. Il sistema del complemento

2.1 Cosa è il complemento

Il sistema del complemento (C) è stato scoperto per la prima volta nella seconda metà del diciannovesimo secolo quando i biologi Paul Erlich, Jules Bordet e George Nuttall osservarono un'attività battericida del sangue contro il bacillo dell'antrace. Essi notarono che la funzione battericida veniva inattivata quando il sangue veniva riscaldato a 55 °C. Studi effettuati su porcellini d'india dimostrarono che nel siero di questi animali era presente un componente battericida termolabile, unitamente ad un componente termostabile (Bordet, 1895; Ehrlich and Morgenroth, 1899).

Nel 1920 vennero scoperti quattro componenti del complemento (C1, C2, C3 e C4) e ad ognuno di essi venne assegnato un numero in base all'ordine di scoperta. Nonostante l'ordine di scoperta non rappresentasse la sequenza di attivazione vera e propria del complemento, i nomi vennero mantenuti per non creare confusione (Cavaillon et al., 2020).

Il sistema del complemento è un elemento della risposta immunitaria innata ed adattativa, costituito da circa trenta proteine plasmatiche, circolanti in forma inattiva o presenti a livello delle membrane cellulari. In seguito all'attivazione che avviene grazie ad un fenomeno a cascata, il complemento svolge molteplici attività, tra cui le più importanti sono il riconoscimento e l'eliminazione di particelle estranee incluse cellule batteriche e virali.

Le proteine del complemento sono prodotte principalmente nel fegato, ma oggigiorno è stato dimostrato che possono essere sintetizzate anche da monociti, macrofagi circolanti nonché dal SNC (Schartz and Tenner, 2020). Le proteine circolanti e di membrana sono capaci di interagire reciprocamente, determinando l'attivazione di vie autocatalitiche che sono alla base di risposte cellulari dell'immunità innata ed adattativa.

L'attivazione a cascata dei suoi componenti solubili è alla base di attività biologiche che hanno finalità protettive e che si esplicano attraverso la rimozione degli agenti patogeni e facilitando la loro eliminazione e il loro controllo da parte di altri sistemi biologici cellulari. La funzione principale del complemento riguarda la citolisi della cellula bersaglio mediante formazione del Complesso di Attacco alla Membrana (MAC), un

immunocomplesso in grado di costituire un poro trans-membranario e causare morte della cellula per lisi osmotica. Il complemento è anche in grado di evocare l'attivazione delle cellule dell'immunità aspecifica come neutrofili e macrofagi, di modulare gli effetti di tipo pro-infiammatorio nelle fasi acute e croniche della risposta immunitaria, può causare opsonizzazione della superficie dei patogeni al fine di attivare e facilitare la loro fagocitosi e quindi rimuovere gli immunocomplessi circolanti. Inoltre, le molecole C3a, C4a e soprattutto C5a sono potenti anafilo-tossine, in grado di indurre la migrazione di fagociti, la degranolazione dei mastociti, il rilascio di sostanze vasoattive come istamina, prostaglandine e serotonina, le quali causano vasodilatazione e inducono reazioni di tipo infiammatorio come accade nello shock anafilattico. Una volta attivato, quindi, il sistema del complemento assume un ruolo centrale nell'amplificazione della flogosi, ma questo può culminare in un danno tissutale in caso di eccessiva attivazione: è stato infatti dimostrato come una disregolazione del sistema del complemento possa portare ad eventi patologici (Ehrnthaller et al., 2011).

La letteratura negli anni più recenti ha anche dimostrato il ruolo di questo sistema nell'omeostasi di organi incluso il SNC. Questa azione si sviluppa grazie al fatto che il complemento può riconoscere ed essere attivato da componenti cellulari o da cellule, quali ad esempio terminazioni nervose sofferenti in fase apoptotica, cellule danneggiate o aggregati proteici di proteine "misfolded" quali le proteine che caratterizzano lo sviluppo della patologia di Alzheimer o nel morbo di Parkinson (Cardozo et al., 2019; Michailidou et al., 2015).

La regolazione del complemento è determinata da proteine endogene e dipende dalla loro reciproca espressione, in quanto queste componenti sono in grado sia di promuovere che di silenziare l'attivazione della via del complemento. Nel caso l'equilibrio tra le componenti attivanti e inibenti sia alterato (ad esempio a causa di una over-espressione di una componente sull'altra) si osserva uno sbilanciamento dell'attività di questo sistema e in questo caso l'azione del complemento può a sua volta diventare patogenetica. Evidenze dimostrano infatti che un'eccessiva o alterata attivazione può causare danni tissutali in malattie come artrite reumatoide, sclerosi multipla o degenerazione maculare collegata all'età. In generale, non solo la iperproduzione di componenti del complemento è para-genetica, ma anche una loro ridotta sintesi. Per esempio, una insufficiente attività del complemento è stata proposta essere coinvolta in varie malattie autoimmuni, come il

Lupus eritematoso sistemico, ed in una maggiore suscettibilità allo sviluppo di infezioni. (Pickering et al., 2024)

Le proteine del complemento mediano le risposte infiammatorie tramite le anafilotossine C3a e C5a che sono chemio-attraenti per cellule del sistema immunitario. L'attivazione del complemento sviluppa una risposta umorale ed una maggior permeabilità vascolare che permette ai leucociti di raggiungere le cellule bersaglio da lisare o fagocitare. La chemiotassi è regolata dall'espressione di recettori CR1 e CR3 del complemento. Il complemento non presenta solo una funzione immunitaria, ma a livello del SNC regola anche il rimodellamento sinaptico durante lo sviluppo. In questo senso il ruolo centrale del complemento è stato proposto essere collegato all'insorgenza di neuropatologie caratterizzate dalla alterazione dei meccanismi di plasticità sinaptica e quindi correlabili a perdita di memoria ed deterioramento cognitivo, oltre a destrutturazione della normale attività sinaptica osservata in malattie come schizofrenia, encefalite post virale, depressione (Tenner et al., 2018).

2.2. Le vie di attivazione del complemento.

Le proteine plasmatiche del complemento sono proteasi che una volta attivate iniziano reazioni a cascata ed il rilascio di anafilotossine come C3a e C5a che reclutano cellule del sistema immunitario sul sito dell'infezione. L'attivazione può avvenire tramite tre vie principali: la via classica, la via alternativa, la via lectinica (Morgan et al.,2021).

Tutte e tre le vie includono C3 e portano in ultima istanza a frammenti più piccoli o alla formazione del complesso di attacco della membrana del patogeno bersaglio o che favoriscono l'eliminazione della sostanza legata. In particolare nel caso di patogeni, frammenti proteici del complemento si depositano sulla membrana di questo e lo opsonizzano in modo che venga riconosciuto e fagocitato dai macrofagi (Morgan et al.2021).

2.2.1 La via Classica

La via classica parte dal complesso C1 composto da C1q, due serina proteasi C1r e C1s, che si associano insieme in presenza di ioni calcio (G.J. Arlaud et al.,2002). C1q lega

antigeni IgG e IgM ed altri attivatori sulla superficie bersaglio (Y.H. Kang et al.,2009) cambia conformazione e porta all'attivazione di C1r e al clivaggio ed attivazione delle due C1s, una serina proteasi. (A.W. Dodds et al.,1978) (R.Wallis et al.,2010)

C1s dà origine a C3 convertasi, C4b2a, attivando C4 e C2. C3 convertasi attivato può depositare uno dei suoi frammenti più importanti, C3b, sulla superficie del patogeno tramite un legame covalente, che permette l'opsonizzazione e quindi il richiamo di cellule del sistema immunitario che riconoscono i recettori del C3 e fagocitano il patogeno. Altrimenti C3b può unirsi al complesso C4b2a e formare il complesso C4b3b2a, la C5 convertasi, che porta alla via finale. Una volta che C3b si lega alla superficie attiva la via alternativa che aumenta il deposito di C3b portando alla formazione di un vero cluster di C3b sul target. (M.V. Carroll, R.B. Sim et al.,2011)

2.2.2 La via alternativa

La via alternativa parte con l'attacco di piccoli nucleofili come acqua o ammoniaca del gruppo tioestereo del C3, con la formazione di C3(H₂O) che lega il fattore B e in seguito il fattore D che frammenta il C3(H₂O) in C3b e C3a. (Fromell et al., 2020). Una volta liberato C3b si deposita sulla superficie cellulare estranea, lega i fattori B e D e fa in modo che si attacchi la C3bBb convertasi che permette un continuo clivaggio di C3 e quindi un deposito sempre maggiore di C3b sulla membrana bersaglio.

Il fattore B si lega a C3b ed in seguito viene scisso dal fattore D, questo permette la formazione della C3 convertasi.

Il fattore H al contrario è un inibitore e previene l'eccessivo clivaggio di C3 e la successiva formazione di C3b. (Asavapanumas et al., 2021)

Componenti principali del complemento che interagiscono con il fattore C3 sono i fattori B e D, che sono proteasi plasmatiche attive circolanti nel sangue, ed il fattore H un regolatore proteico. La properdina o fattore P è un enhancer dell'attività del complemento, lega la convertasi C3bBb e ne permette un clivaggio del C3 per un periodo prolungato. (T.C. Farries et al.,1988) (D.T. Fearon 1975). La properdina è una proteina plasmatica coinvolta nella via alternativa che promuove l'attivazione del C3. La properdina inoltre ha altri compiti tra cui promuovere la formazione della C5 convertasi e legarsi alla

superficie dei patogeni bersagli, tutti meccanismi che in conclusione portano all'amplificazione delle vie del complemento.

Il fattore H è un inibitore del complemento e della via alternativa in particolare, le principali attività sono di legare altre cellule per proteggerle dall'attacco del C3b e di bloccare la formazione della C3 convertasi. Questi meccanismi potrebbero essere importanti in ambito terapeutico per l'inibizione del complemento nei processi patologici.

La mutazione del fattore H è coinvolta in molte patologie, in particolare nella via alternativa. Anche le alterazioni del fattore I e CD46, insieme al fattore H, portano ad un continuo clivaggio del C3 per mancanza di inibizione e quindi un iperattivazione del sistema.

Il C3 è uno dei componenti centrali del complemento e di tutte le vie di attivazione. Mutazioni genetiche che portano ad una carenza di C3 sono collegate a malattie renali, ed a suscettibilità ad infezioni. La deficienza di properdina invece risulta in una maggior sensibilità ad infezioni batteriche della famiglia delle Nesseria. (D. Spitzer et al., 2007)

2.2.3- La via lectinica

La via delle lectine può essere avviata da mannan-binding lectin (MBL), ficoline, e dalla collectina 11 (S. Hansen et al.,2010) che riconoscono e legano carboidrati esposti sulla superficie di un'ampia gamma di microrganismi potenzialmente pericolosi o cellule in fase apoptotica o necrotica (M. Matsushita.,2009) (G.J. Arlaud et al., 2007). Queste ultime sono molto meno abbondanti di C1q nel sangue quindi la via delle lectine ha una capacità di attivazione inferiore a quella della via classica. (Holmskov et al.,1994) (S. Hansen et al.,2010)

La MBL e le ficoline circolano nel siero complessate con serina proteasi, il complesso è chiamato MASPs. (W. Schwaeble et al., 2002). Le proteine MASP sono prodotte per splicing alternativo da un solo gene, e si differenziano a causa di domini proteasici diversi. (R. Wallis, R.B. Dodd., 2000)

Quando il complesso MASP_s incontra un bersaglio cambia conformazione attivando le proteine MASP, in particolare MASP₂ che attivata scinde C₄ e C₂ che andranno a loro volta a formare C_{4b}2a ovvero la C₃ convertasi che da inizio alla cascata del complemento vista nelle altre vie.

L'equilibrio tra inattivazione ed attivazione del complemento è controllato da fattori solubili o fattori associati alla membrana. I regolatori possono bloccare la cascata del complemento e quindi evitare danni causati da una iperattivazione, tra i vari meccanismi c'è la frammentazione di convertasi, l'inattivazione di componenti come C_{3a} e C₅, C_{4a} e C_{4b}.

Il C_{1q} ed il complesso MAC di attacco della membrana sono bersagli degli inibitori del complemento. Studi sui regolatori del complemento hanno dimostrato che la produzione di inibitori del C₁ da parte dei neuroni è necessaria per un normale sviluppo senza la presenza di disordini del linguaggio ed impedimenti cognitivi

3. Interazione tra il sistema nervoso centrale ed il sistema immunitario

Fino a pochi anni fa si riteneva che il sistema nervoso centrale (SNC) fosse un organo immunologicamente privilegiato o isolato e che non venisse quindi interessato dalle risposte immuni o da quelle infiammatorie a causa della presenza della barriera ematoencefalica (BEE) ad impedire il passaggio di sostanze dalla periferia al sistema nervoso centrale (Ransohoff et al., 2003) e a mantenere un ambiente costante, fondamentale per il normale sviluppo e funzionamento delle cellule nervose.

La BEE è costituita da cellule endoteliali dei capillari del SNC che sono strettamente adese tra loro per mezzo di giunzioni serrate. La funzione è quella di una interfaccia a permeabilità selettiva, in grado di permettere il passaggio di determinate sostanze ma non di altre (Bechmann et al., 2006). In genere solo composti liposolubili possono diffondere dalla periferia al liquido interstiziale dell'encefalo e del midollo spinale, e la diffusione è assicurata da un processo di diffusione attraverso le membrane delle cellule endoteliali. Al contrario, sostanze idrosolubili possono attraversare la parete capillare solo per mezzo di meccanismi di trasporto attivo o passivo. L'efficacia di queste barriere dipende dal mantenimento delle caratteristiche morfologiche e funzionali dei capillari cerebrali e dalle caratteristiche delle membrane delle cellule che formano la membrana stessa.

L'integrità della barriera viene influenzata dall'età dell'individuo e dallo sviluppo di stati patologici, come per esempio processi infiammatori, traumi o tumori. Alterando la permeabilità di membrana, traumi, infiammazione etc. possono modificare le caratteristiche delle membrane stesse e rendere possibili interazioni tra il sistema immunitario ed il SNC.

Si sottolinea con interesse che -l'interazione funzionale tra sistema immunitario periferico e SNC non dipende solo da stimoli periferici ma anche da segnali centrali che riverberano nella periferia ed attivano risposte. Ad esempio, l'osservazione che cellule gliali (microglia ed astrociti) residenti nel SNC fossero in grado di produrre citochine in grado a loro volta di reclutare e attivare le cellule del sistema immunitario (Takeshita e Ransohoff, 2012) portò ad ipotizzare che anche particolari condizioni centrali fossero in grado di assicurare la modifica della permeabilità della BEE e quindi di permettere la diffusione di sostanze e di cellule dalla periferia al SNC. Infatti, in risposta a tali segnali centrali si osservò che i monociti erano in grado di trans-migrare attraverso la BEE

arrivando a livello centrale, per partecipare assieme alla microglia, ai fenomeni di infiammazione, degenerazione e morte neuronale.

In linea con questa ipotesi nel 2012 Li e coll. dimostrarono che componenti classici dell'immunità innata erano in grado di partecipare al processo di neurodegenerazione. Ad esempio, il complemento risultò essere implicato nella degenerazione sinaptica tipica della malattia di Alzheimer.

L'impatto dell'attivazione immunitaria a livello del SNC è stato largamente studiato e documentato specialmente per quanto riguarda l'eziopatogenesi di malattie autoimmuni (Bhat e Steinman, 2009). Un esempio è dato dal lupus eritematoso sistemico, patologia in cui autoanticorpi periferici sono in grado di passare la BEE e contribuiscono a peggiorare le capacità cognitive (Bhat e Steinman, 2009).

La tesi che stabilisce che il SNC sia un organo immunologicamente privilegiato ha iniziato ad essere messa in discussione con l'osservazione che l'infiltrazione di cellule immunitarie a livello del SNC avveniva molto più comunemente di quanto ipotizzato e si arrivò a dimostrare che l'interazione neuro-immunitaria avvenisse anche in condizioni fisiologiche (Bechmann et al., 2006).

La permeabilità della BEE può risultare alterata da numerosi fattori, tra i quali infezioni, esposizione a tossine, e condizioni infiammatorie (van den Pol et al., 2009). Inoltre è stato recentemente dimostrato che, in individui sani, la permeabilità della BEE aumenta con l'età (Lucin and Wyss-Coray, 2009), consentendo quindi, in età senile, l'ingresso nel SNC a grandi proteine appartenenti al sistema immunitario, come gli anticorpi.

Oggi è però accettato che molecole "classicamente" appartenenti al sistema immunitario, come il complesso maggiore di istocompatibilità ed alcuni componenti della cascata del complemento, sono anche prodotte nel SNC e hanno un ruolo fondamentale in molti aspetti dello sviluppo e del controllo della funzione neuronale (Boulanger 2009, Shatz, 2009). Queste molecole sono presenti e prodotte sia a livello neuronale che a livello gliale e partecipano alla plasticità sinaptica.

Comprendere i meccanismi che portano alla produzione locale centrale di questi componenti potrebbe risultare fondamentale sia per lo studio sia per la comprensione dei

disturbi neurologici e psichiatrici su base infiammatoria, sia per lo sviluppo di nuove terapie.

3.1. Il complemento nel sistema nervoso centrale:

L'ipotesi che il sistema nervoso sia accessibile al sistema immune e in particolare accessibile al complemento periferico si è ulteriormente modificata negli anni più recenti ed oggi sappiamo che la maggior parte dei componenti del complemento non solo accede al SNC ma viene anche sintetizzata a livello nervoso da neuroni, astrociti e microglia (Veerhius et al., 2011) e che questo fenomeno aumenta con l'invecchiamento e durante i processi neurodegenerativi. (Shen Y et al 1997) (Singhrao et al., 1999) (Cribbs et al.,2012) (Carvalho et al 2022)

In particolare, la scoperta del coinvolgimento del complemento nella eliminazione e regolazione sinaptica durante lo sviluppo del SNC ha portato ad ipotizzare che il complemento potesse avere una funzione nei processi omeostatici e fisiologici centrali, oltre che in quelli associati a stati infiammatori.

Di seguito sono riassunte alcune evidenze che dimostrano la produzione e l'accumulo dei componenti C1q e C3 nei neuroni di diverse aree cerebrali.

3.2 C1q

Il C1q degli esseri umani è una proteina composta da sei subunità, ognuna composta da tre catene polipeptidiche, denominate A, B, C, per un totale di diciotto catene polipeptidiche. Le catene contengono una regione ricca di glicina e prolina simile al collagene sulla terminazione amminica, ed un dominio globulare sulla terminazione carbossilica. Le catene A e B sono legate da un ponte disolfuro. La catena C lega le varie subunità grazie ad un ponte disolfuro. (RR Porter et al.,1978) (K.B.M. Reid et al.,1976)

il C1q lega in particolare le regioni Fc di IgG e IgM, ma anche altri composti come acidi nucleici, cromatina, filamenti citoplasmatici e questo legame attiva la via classica.

C1q è una molecola antica con multiple funzioni, e in condizioni fisiologiche, in associazione ad alcune delle sue componenti, tra cui C1r e C1s, ha una attività neuroprotettiva e antiinfiammatoria, molto utile in seguito alla comparsa di lesioni. (Geo Z.,et al2014). Il C1q è prodotto durante lo sviluppo del sistema nervoso in determinate zone (Gialeli et al.,2018). In particolare, si è evidenziato che i macrofagi residenti della

microglia sono i principali produttori di C1q (Fonseca et al.,2017), mentre il C3 è prodotto dagli astrociti.

Recentemente vi sono prove che attestano il coinvolgimento di C1q anche nello sviluppo di processi patologici nel sistema nervoso centrale. Studi su modelli animali ed osservazioni cliniche hanno infatti confermato che la produzione centrale di molte proteine del complemento, tra cui il C1q, aumenta a seguito di infezioni, lesioni, problemi nello sviluppo ed in invecchiamento. (Lee JD et al.,2018 e 2019) (Jeanes et al.,2015) (Veerhuis et al., 2001). Il C1q è espresso eccessivamente in seguito a danni viene prodotto anche senza l'intervento delle proteasi C1r e C1s.

C1q è un segnale "eat me" ovvero si deposita sulla superficie del bersaglio e ne favorisce la fagocitosi tramite l'attivazione della via classica e una conseguente opsonizzazione. (Galvan et al.,2012)

Il C1q è responsabile dell'individuazione e della segnalazione delle sinapsi che devono essere eliminate dalla microglia e dagli astrociti. Per quello che riguarda la localizzazione neuronale di C1q, questo è espresso nei neuroni sia a livello della punta sinaptica sia a livello assonico e la sua espressione è controllata da altri organizzatori sinaptici tra cui le citochine (IL-1 α , IL-1 β , TNF) (Veerhuis et al., 2011). C1q nei neuroni è espresso durante lo sviluppo del SNC ed aumenta nelle terminazioni sinaptiche con l'invecchiamento (Stephan et al.,2013) (Werneburg et al., 2020) (Scott-Hewitt N.,et al2010). Risulta espresso sia in posizione presinaptica insieme alla sinaptobrevina di tipo 2 (SV2) (Michailidou I., et al 2015) (Györffy BA., et al 2018), che influenza l'esocitosi dei neurotrasmettitori, sia in posizione postsinaptica con la proteina post-sinaptic density 95 (PSD95), una proteina strutturale che interagisce con i recettori postsinaptici glutamatergici.

Si evidenzia come il C1q si esprima preferenzialmente a livello presinaptico anche nelle terminazioni sinaptiche che non hanno il partner postsinaptico. Questo indicherebbe una terminazione debole e quindi eliminabile dalla microglia. Il C1q porta al coinvolgimento di C3 (Gasque P., et al 2004) e al seguente reclutamento della microglia che esprime i recettori del C3 ovvero C3R e degli astrociti che portano all'eliminazione della sinapsi. Questo meccanismo diventa aberrante nel glaucoma.

Matsuda e colleghi (2009, 2011, 2016, 2017) studiarono l'organizzazione sinaptica nel cervelletto, dimostrando come le proteine C1q, tra cui Cbln1, siano in grado di accumularsi nella zona presinaptica nelle fibre parallele e localizzarsi con la proteina neurexina presinaptica controllando il corretto assemblaggio dei neuroni del Purkinje,

Il ruolo del Cbln1 sarebbe inoltre quello di controllare il corretto posizionamento del recettore kainato a livello postsinaptico (Yuzaki M., et al 2017) . Il C1q sembra avere queste funzioni non solo nel cervelletto, ma anche nell'ippocampo, dove l'mRNA che codifica per la famiglia delle proteine C1q è altamente espresso nelle cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo.

Michailidou e colleghi, 2015 dimostrarono che il marcatore presinaptico sinaptosina e la proteina C1q sono co-localizzati nell'ippocampo di pazienti con sclerosi multipla. In particolare, trovarono una enorme concentrazione di C1q e sinapsina (SYN) nelle aree CA1 e CA3, indipendentemente dalla presenza di regioni demielinizzanti. Le SYNs sono proteine che legano le vescicole presinaptiche e regolano la trasmissione sinaptica.

La presenza di C1q nella parte presinaptica dei sinaptosomi della corteccia dei topi invece è stata definitivamente dimostrata nel 2018. (Györfy BA., et al 2018) utilizzando la tecnica FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) combinata con l'analisi proteomica. Gli autori hanno studiato la distribuzione della proteina C1q nei sinaptosomi corticali e hanno scoperto che si accumula preferenzialmente nelle componenti presinaptiche. L'espressione di C1q aumenta durante l'invecchiamento agisce in collaborazione con marcatori apoptotici con la proteina fosfatidilserina. Questo è un fosfolipide della membrana che normalmente si trova rivolta verso il citoplasma invece in fase apoptotica trasloca nel versante extracellulare della membrana e qui si comporta da segnale "eat me".

La funzione di C1q a livello presinaptico è anche associata alla presenza e alla funzione di pentrossina neuronale (NPn), ed è stato dimostrato che l'associazione delle due è fondamentale per il meccanismo di eliminazione sinaptica (Kovacs RA., et al 2021)

Dagli studi è emersa, sempre nelle terminazioni presinaptiche, la presenza della proteina C4, che si ipotizza possa avere un ruolo nella eliminazione sinaptica insieme a C1q-NP.

La localizzazione presinaptica delle proteine C1q è stata confermata anche da Kaway e colleghi nel 2018. C1q è ampiamente espresso negli organi circumventricolari, dove la

sua densità aumenta notevolmente in seguito a una singola somministrazione di lipopolisaccaridi. Essi sono componenti della barriera esterna dei Gram negativi e a causa della loro attività endotossinica sono somministrati localmente per studiare la risposta immunitaria locale.

Infine, studi recenti hanno dimostrato la presenza di una immunoreattività di C1q nelle terminazioni nervose corticali isolate (sinaptosomi) di topi sani, che aumenta in condizioni patologiche associate a risposte autoimmuni (Olivero G., et al 2023).

3.3 C3

Tutte e tre le principali vie del complemento convergono su C3. Il C3 si frammenta a produrre l'opsonina C3B e l'anafilotossina C3a. Caratterizzato da una distribuzione ubiquitaria, la presenza di C3 a livello neuronale nei terminali sinaptici è stata comprovata con studi in vitro e di ibridazione in situ la presenza di C3d aumenta significativamente con il progredire della sclerosi multipla. (Michailidou I., et al 2015).

Per concludere, possiamo dire che il complesso di questi studi ha dimostrato come C1q e C3, oltre a promuovere il reclutamento della microglia tramite segnali C3R dipendenti, abbiano una diffusa localizzazione centrale con una distribuzione preferenziale a livello presinaptico. In genere, la produzione e concentrazione di C1q nel SNC aumenta con l'invecchiamento o in condizioni patologiche associate ad iperattivazione immunitaria e/o infiammazione, mentre la presenza di C3 è relativamente costante, indipendentemente dal livello di demielinizzazione e infiammazione in corso in diverse condizioni patologiche. Come avvenuto per C1q, l'espressione di C3 aumenta nei sinaptosomi ippocampali isolati da animali affetti da encefalite autoimmune EAE, a suggerire un suo coinvolgimento nei meccanismi neuropatici (Olivero G., et al 2024).

4 Il complemento come modulatore della trasmissione glutamatergica.

Negli ultimi dieci anni si sono accumulate evidenze che supportano la conclusione che il complemento possa anche agire come neuromodulatore e controllare l'efficacia della liberazione di glutammato in specifiche aree cerebrali.

Il primo lavoro che ha suggerito questa conclusione è in lavoro di Benoit and Tenner pubblicato nel 2011 che ha dimostrato come l'esposizione di colture primarie di neuroni a C1q determini una iper-regolazione del gene codificante per la proteina sintassina-3 (stx-3) che si mantiene nel tempo. Questo effetto era accompagnato da un aumento della capacità di interazione di questa proteina con la controparte Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa (SNAP25). La variazione della capacità di interazione permaneva nel tempo ma non era accompagnata da una variazione significativa della densità di SNAP25 che era mantenuta costante. Gli autori hanno discusso queste variazioni come un'aumentata resilienza dei neuroni a stimoli neurotossici, senza considerare che però questi dati sono predittivi anche di una aumentata capacità di rilascio di glutammato da queste cellule.

Poco tempo dopo, nel 2014, Perez-Alcazar e collaboratori dimostrarono che la delezione del gene codificante per la proteina C3 in topi determina alterazioni sinaptiche ippocampali che portano ad una ridotta capacità di apprendimento in questi animali. Questa ridotta capacità di apprendimento era accompagnata a livello cellulare da una ridotta capacità di rilascio nelle terminazioni nervose glutamatergiche nella regione Ca1 e CA3 dell'ippocampo.

Basandosi su queste prime osservazioni, a partire dal 2014, il gruppo diretto dalla Prof.ssa Anna Pittaluga ha svolto una ricerca mirata a valutare se e in che misura il complemento potesse comportarsi come un fine modulatore del rilascio di neurotrasmettitori da terminazioni nervose isolate.

I primi risultati pubblicati a partire dal 2014 hanno dimostrato che il complemento era in grado di favorire il rilascio di glutammato da terminazioni nervose isolate da diverse aree cerebrali (corteccia, midollo spinale, ippocampo) nei mammiferi e come questa capacità sia limitata alle terminazioni nervose glutamatergiche. Lo studio infatti dimostrò che il complemento non era in grado di modificare la liberazione di diversi trasmettitori inclusi

il GABA; la noradrenalina, la dopamina, l'acetilcolina. Si osservò che il rilascio di glutammato indotto dal complemento dipendeva da un meccanismo cellulare che portava alla inversione della funzione del carrier che veniva costretto a lavorare nella direzione opposta, mediando la liberazione del glutammato (Merega et al., 2014).

Nel loro insieme questi dati supportano la conclusione che il complemento si comporti come fine modulatore della liberazione di glutammato, aprendo quindi una nuova visione sui meccanismi di interazione tra il sistema immunitario e il SNC.

5. Scopo della ricerca

Durante il mio lavoro per la tesi sperimentale svolto presso il laboratorio diretto dalla Prof.ssa Pittaluga ho partecipato ad una ricerca dedicata ad approfondire le conoscenze sul ruolo del complemento come modulatore della liberazione di glutammato. Questo è un aspetto che è emerso di recente nella letteratura e necessita di approfondimenti per alcune peculiarità tra cui:

- i) La capacità del complemento di agire come modulatore della liberazione di neurotrasmettitori è limitata all'acido glutammico; dati pubblicati dimostrano che il complemento non è in grado di modificare la liberazione di altri neurotrasmettitori come GABA, noradrenalina, acetilcolina, serotonina. Questa osservazione è estremamente rilevante in quanto ad oggi non risultano altri modulatori dotati di tale specificità d'azione. Sarebbe importante confermare questo aspetto e valutare se la selettività rimanga anche in condizioni patologiche.
- ii) La capacità del complemento di modificare la liberazione di glutammato è stata evidenziata esponendo le terminazioni nervose isolate ad una diluizione elevata del complemento. Sarebbe opportuno valutare se condizioni associate a infiammazione centrale e /o patologie immuno-competenti possano modificare la risposta di queste particelle al complemento.
- iii) Risulta di interesse anche valutare se e in che misura vi sia un accumulo di proteine del complemento, specificamente di C1q e di C3 in terminazioni nervose isolate di topi affetti da patologia autoimmune.

6. Materiali e Metodi

6.1 Animali

Sono stati utilizzati topi di sesso femminile di specie C57BL/6J ottenuti da Charles River (Calco, Italy) e tenuti nello stabulario del Dipartimento di Farmacia, Sezione di Farmacologia e Tossicologia, Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Genova (autorizzazione n. 484 dell'8 giugno 2004). Quando indicato, i topi sono stati sacrificati mediante decapitazione, le cortecce sono state rapidamente rimosse e le terminazioni nervose (sinaptosomi) e i processi astrocitari (gliosomi) isolati e purificati sono stati preparati entro pochi minuti. Le procedure sperimentali sono in accordo con la Legislazione Europea (Direttiva 2010/63/EU per esperimenti sugli animali) e con le linee guida ARRIVE e sono state approvate dal Animal Subjects Review Board dell'Università di Genova e dal Ministero della Salute Italiano (DDL 26/2014 e legislazione precedente; protocollo n. 50/2011-B e 612/2015-PR).

In una serie di esperimenti, i topi utilizzati sono stati topi femmine controllo (non immunizzate). I sinaptosomi e i gliosomi corticali ottenuti sono stati utilizzati per studiare l'impatto del complemento sulla liberazione di glutammato in condizioni fisiologiche. In un'altra serie di esperimenti. I topi sono stati immunizzati per indurre l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) come descritto di seguito e poi sacrificati 21 ± 1 giorni dopo l'immunizzazione (21 ± 1 d.p.i.).

6.2 Induzione dell'EAE e score clinico

Per l'induzione dell'EAE i topi (femmine, di tipo C57BL/6J, 18-20 g, 56 ± 1 giorni di età) sono stati immunizzati secondo un protocollo standard (Zappia et al., 2005) con lievi modifiche. In sintesi, agli animali sono state effettuate iniezioni sottocutanee in due siti sul fianco ed uno vicino alla base della coda con una sospensione contenente adiuvante incompleto di Freund, 4 mg/ml di *Mycobacterium tuberculosis* (di tipo H37Ra) e 200 µg di proteina mielinica oligodendrocitica 35-55 (MOG)₃₅₋₅₅ (utilizzata come antigene) seguita da somministrazione intraperitoneale di 400 ng di tossina della Pertosse il giorno 0 e dopo 48 ore.

La valutazione della progressione della gravità della patologia è stata osservata giornalmente e valutata con l'attribuzione di un valore numerico compreso tra 0 e 5,

corrispondenti a:

0 = in salute;

1 = coda flaccida;

2 = atassia e/o paresi degli arti posteriori;

3 = paralisi degli arti posteriori e /o paresi di quelli anteriori;

4 = tetraparalisi;

5 = stato moribondo o morte.

I topi (MOG)_{35–55} (+) EAE sono stati sacrificati 22 ± 1 giorni dopo l'immunizzazione (d.p.i.). I controlli non immunizzati hanno ricevuto lo stesso trattamento in assenza di antigene della mielina [topi (MOG)_{35–55} (-)]. Sono stati presi tutti gli accorgimenti possibili per minimizzare la sofferenza degli animali e per utilizzarne il numero più basso necessario per ottenere risultati affidabili.

6.3 Studi di rilascio

I sinaptosomi ed i gliosomi purificati sono stati preparati omogeneizzando la corteccia, di topi sani, o di topi EAE e relativi controlli in 10 volumi di saccarosio 0.32 M, tamponato a pH 7.4 con Tris-(idrossimetil)-ammino metano [Tris, concentrazione finale 0.01 M] (Musante et al., 2011). L'omogenato è stato centrifugato a $1000 \times g$ per 5 minuti ed il surnatante è stato stratificato su un gradiente discontinuo di Percoll (2%, 6%, 10%, 20% v/v in saccarosio con tampone Tris) e centrifugato a $33.500 \times g$ per 5 minuti. Il percoll è una soluzione colloidale molto densa di silice ricoperta di PVP (polivinilpirrolidone). Lo strato tra il 10% e il 20% di Percoll è quello che contiene i sinaptosomi mentre lo strato tra il 2% e il 6% di Percoll è quello che contiene i gliosomi. Le due frazioni sono state raccolte e lavate mediante centrifuga. I pellet sinaptosomiali sono stati risospesi in una soluzione fisiologica la cui composizione è la seguente (mM): NaCl 140; KCl 3; MgSO₄ 1.2; CaCl₂ 1.2; NaH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 5; HEPES 10; glucosio 10; pH 7.2-7.4.

I sinaptosomi sono stati incubati per 15 minuti a 37 °C in un bagno di acqua rotante in presenza di [³H] D-aspartato, un tracciante radioattivo che si distribuisce nelle terminazioni nervose e nei processi astrocitari mimando l'acido glutammico. Questo tracciante può quindi essere utilizzato per mimare la distribuzione ed il rilascio dell'aminoacido endogeno.

Le particelle così marcate sono state poi stratificate su filtri microporosi sul fondo di

camere parallele in un Perfusore (Ugo Basile, Comerio, Varese, Italia; Di Prisco et al., 2012) e mantenuto a 37 °C. e superfuse in maniera continuata con soluzione fisiologica per 48 minuti alla velocità di 500 µL/min. I sinaptosomi ed i gliosomi sono quindi stati esposti per 90 secondi, a t = 39 minuti, ad una soluzione fisiologica con un'alta concentrazione di KCl (12 mM o 15 mM, a sostituire una equivalente quantità di NaCl) o al complemento (diverse diluizioni). Quando indicato le particelle sono state esposte a DL-tBOA (bloccante il carrier glutamatergico GLAST/ GLT1).

Inoltre, in alcuni esperimenti, sinaptosomi e gliosomi sono stati esposti in superfusione al complemento deprivato dei fattori di C1q e C3 per valutare il ruolo di queste proteine nel controllo del rilascio del glutammato.

Dopo lo stimolo, le particelle sono state superfuse fino alla fine dell'esperimento (t=48 min di superfusione) con la soluzione fisiologica. A partire dal tempo 36 minuti di superfusione sono state raccolte 4 di superfusato di 3 minuti ciascuna. Le frazioni raccolte sono state quantificate per il loro contenuto in radioattività in scintillazione liquida; il contenuto in radioattività è stato espresso come dpm /frazione.

Il contenuto di radioattivo in ogni singola frazione è stato espresso come “fractional efflux” cioè come percentuale della radioattività totale nei sinaptosomi calcolata all'inizio della frazione raccolta. Il rilascio del tracciante radioattivo causato dall'esposizione transiente allo stimolo (alto KCl oppure complemento) è stato calcolato sottraendo alla somma della 2° e della 3° frazione il contenuto nella 1° e nella 4° frazione; il valore è stato espresso come rilascio indotto dallo stimolo sopra la liberazione basale ed espresso come % del trizio totale.

6.4 Western Blot

I sinaptosomi e i gliosomi corticali dei topi controllo ed EAE sono stati lisati in un tampone RIPA modificato (10-mM Tris, pH 7,4, 150-mNaCl, 1-mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, inibitori delle proteasi) e il contenuto proteico è stato quantificato utilizzando il kit colorimetrico Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Cat# 23225, Waltham, MA, USA). I campioni sono stati bolliti per 5 minuti a 95°C in un buffer SDS-PAGE, separati mediante SDS-4-10% PAGE (20 µg per corsia) e trasferiti su membrana PVDF. Le membrane sono state bloccate per 1 ora a temperatura ambiente in

Tris-buffered saline-Tween (t-TBS: 20-mM Tris, pH 7.4, 150-mM NaCl, e 0.05% Tween 20), contenente il 5% (w/v) di latte non grasso disidratato, e poi testato con i seguenti anticorpi primari per una notte a 4°C: anti- β -tubulina III di topo (β -tub III, 1:500, Sigma-Merck Cat# T8660, RRID:AB_477590); anti-C1q di topo (1:50; Abcam Cat# ab71940, RRID:AB_10711046); anti-C3 di coniglio (1:1000; Abcam Cat# ab200999, RRID:AB_2924273); anti-CD11b di coniglio (1:1500, Abcam Cat# ab133357, RRID:AB_2650514); topo anti-excitatory amino acid transporter 1 (GLAST/EAAT1) (1:1000; Millipore Cat#MABN794, RRID:AB_2811303); anti-excitatory amino acid transporter 2 (GLT-1/EAAT2) di topo (1:1000; Millipore Cat# MAB2262, RRID:AB_10615610); anti-postsynaptic density protein 95 (PSD95) di coniglio (1:1500; Novus Cat# NBP1-40474, RRID:AB_2292879); anti-synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25) di topo (1:7000; Abcam Cat#ab24732, RRID:AB_448268); anti-proteina fibrillare acida (GFAP) di topo (1:5000; Sigma-Aldrich Cat# G3893, RRID:AB_477010); anti-GAPDH di coniglio (1:7000; Abcam Cat# ab181602, RRID:AB_2630358).

Dopo i lavaggi in t-TBS, le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con gli appositi anticorpi secondari legati alla perossidasi di rafano (1:10.000; anti-mouse [Sigma-Aldrich Cat# A9044, RRID:AB_258431]; anti-rabbit [Sigma-Aldrich Cat# A9169, RRID:AB_258434]). Gli immunoblots sono stati visualizzati con un sistema di rivelazione in western blotting a chemiluminescenza potenziata Immobilon Forte Western HRP substrate (Sigma-Merck, Cat# WBLUF0500, Darmstadt, Germania). Le immagini sono state acquisite con il sistema di acquisizione immagini Alliance LD6 (Uvitec, Cambridge, Regno Unito) e analizzate con il software UVI-1D (Uvitec).

6.5 Calcoli ed analisi statistiche

L'analisi della varianza è stata effettuata mediante ANOVA seguito dal test di Dunnett o da quello di Newman Keuls per l'analisi dei confronti multipli; i confronti diretti sono stati eseguiti tramite test di Student. I dati sono stati considerati significativi per $p < 0.05$ almeno.

7. Risultati e Discussione

7.1 A proposito di sinaptosomi e gliosomi

I gliosomi (**Figura 1 A**) sono specializzazioni astrocitarie isolate, generalmente utilizzate per analizzare il rilascio di glutammato da parte degli astrociti. Originano dalle terminazioni dei processi astrocitari che vengono staccati dal corpo cellulare e si richiudono a formare delle particelle sferoidali che mantengono tutte le caratteristiche delle cellule di origine. I sinaptosomi (**Figura 1 B**) sono terminazioni nervose isolate, generalmente utilizzate per analizzare il rilascio di neurotrasmettitori da parte dei neuroni presinaptici. Essi vengono ottenuti attraverso un processo che determina la frammentazione di tutti i corpi cellulari del tessuto cerebrale precedentemente isolato e il distacco delle terminazioni nervose dagli assoni, a cui segue la chiusura delle membrane cellulari, a formare delle strutture sferiche, i sinaptosomi per l'appunto.

I sinaptosomi hanno dimensioni comprese tra 1 e 1,5 μm e contengono al loro interno, ma anche sulla membrana, tutte le proteine e gli enzimi che caratterizzavano l'iniziale terminazione sinaptica. I gliosomi hanno diametro inferiore (0.6-0.8 μm) e contengono anche essi tutto il corredo che caratterizza le strutture astrocitarie da cui originano (**Figura 1 A e B**).

Sinaptosomi e gliosomi si mantengono vitali per qualche ora dopo l'omogeneizzazione; pertanto, vengono studiati per valutare fenomeni quali la sintesi, il rilascio, la presenza e la densità di proteine specifiche.

Benchè originino dallo stesso omogenato, la tecnica di isolamento su gradiente permette un buon livello di purificazione delle due frazioni, come indicato dal fatto che la frazione gliosomiale ha una chiara immunopositività per la proteina acida fibrillare gliale (GFAP), che è invece poco evidente nella frazione sinaptosomiale (**Figura 1B**). Al contrario, la frazione sinaptosomiale ha una elevata immunopositività per la proteina neuronale β -tubulina III, che è invece poco presente nella frazione gliosomiale (**Figura 1D**). Queste evidenze ci permettono di proporre i sinaptosomi e i gliosomi reciprocamente come un modello efficace di terminazioni nervose (i primi) e processi astrocitari (i secondi).

7.2 Il complemento induce il rilascio di glutammato da sinaptosomi corticali: ruolo dei trasportatori GLT1/GLAST.

In un lavoro pubblicato nel 2014, Anna Pittaluga e collaboratori (Merega et al., 2014) hanno dimostrato come il complemento sia in grado di indurre il rilascio di glutammato (misurato come liberazione di [³H]D-aspartato) da terminazioni nervose isolate di corteccia di topo. Si dimostrò che l'effetto rilasciante indotto dal complemento è strettamente dipendente dalla diluizione dello stesso. Esperimenti sono stati replicati per confermare il dato di allora (**Figura 2 A**). La liberazione di trizio è molto marcata, ma tende ad esaurirsi dopo la rimozione dello stimolo, che dopo 90 secondi viene sostituito dalla soluzione fisiologica di base, a suggerire che, benché massiccio, la risposta allo stimolo sia fisiologica e non determini la lisi delle particelle superfuse. Nel tentativo di definire il meccanismo coinvolto nella liberazione di glutammato, è stato valutato il coinvolgimento di diversi possibili eventi di rilascio, tra cui ad esempio meccanismi coinvolgenti la liberazione esocitotica di glutammato da vescicole con meccanismo calcio dipendente o l'attivazione di vie metaboliche dipendenti da proteine G associate a recettori del complemento (i recettori C5aR). I risultati di questi esperimenti non sono riportati in questa tesi ma escludono il coinvolgimento di questi meccanismi. Al contrario, si osservò che la liberazione di glutammato indotta dal complemento coinvolgeva i trasportatori di membrana per il glutammato GLT1 / GLAST, in quanto la concomitante presenza del bloccante questi trasportatori, il composto DL-t-BOA, era in grado di prevenire la liberazione di glutammato indotta dal complemento (**Figura 2B**).

Per omologia abbiamo studiato l'effetto del complemento anche in gliosomi corticali. Si è osservata una significativa capacità del complemento di indurre il rilascio di glutammato da queste particelle. L'effetto rilasciante indotto dal complemento si sviluppa in maniera diluizione dipendente, con una efficacia maggiore rispetto a quella osservata in sinaptosomi corticali e nuovamente l'attività rilasciante è prevenuta dalla presenza concomitante di DL-t-BOA a suggerire che anche in queste particelle il meccanismo di rilascio del glutammato dipende dai trasportatori di membrana del glutammato, che in presenza di complemento favoriscono il rilascio di glutammato lavorando in modalità "outward" (**Figura 3**).

7.3 Ruolo del C1q e del C3 nell'effetto rilasciante indotto dal complemento in gliosomi e sinaptosomi corticali.

Le osservazioni riassunte nella parte introduttiva di questa tesi dimostrano la localizzazione presinaptica delle proteine C1q e C3 del complemento ed il loro possibile coinvolgimento nel controllo del rilascio di glutammato a livello presinaptico. Sulla base di queste osservazioni, abbiamo quindi svolto degli esperimenti mirati a valutare se e in che misura queste due proteine avessero un ruolo fondamentale nell'attività rilasciante indotta dal complemento. A questo fine, nello stesso esperimento abbiamo confrontato l'effetto rilasciante causato dal complemento (diluizione 1:300) con quello indotto rispettivamente dal complemento deprivato della componente C1q (1:300) oppure con il complemento deprivato della componente C3 (1:300). Questi esperimenti sono stati svolti in gliosomi e sinaptosomi corticali di topo sano. I risultati sono riportati in **Figura 4** e mostrano chiaramente che la delezione delle due proteine annulla l'effetto rilasciante del complemento in entrambe le preparazioni tissutali. Si nota come la delezione sia del C1q che del C3 determini l'abolizione totale della capacità di rilascio del complemento a suggerire che:

- i) le componenti che hanno una preferenziale distribuzione presinaptica nel SNC sono anche quelle maggiormente responsabili del controllo mediato dal complemento sulla trasmissione glutamatergica
- ii) che le due componenti agiscono di concerto nel determinare la fuoriuscita di glutammato.

7.4 Il modello della Encefalomielite Autoimmune Sperimentale.

Sulla base dei dati ottenuti studiando l'effetto di diluizioni del complemento che possono avere un significato patologico, cioè possono essere presenti nel cervello di animali che sono affetti da una condizione infiammatoria e/o correlata a risposta immunitaria alterata, (Michailidou et al., 2015), abbiamo deciso di estendere il nostro studio ad un modello animale di patologia autoimmune, la sclerosi multipla.

Nei pazienti affetti da sclerosi multipla si osserva un aumento della produzione endogena di complemento, che accompagna l'infiammazione centrale, l'infiltrazione linfocitaria, la demielinizzazione e le alterazioni sinaptiche alla base dei sintomi clinici sviluppati dai pazienti.

Il modello animale sperimentale più utilizzato per studiare i sintomi infiammatori della

SM è quello dell'Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE, McCarthy et al., 2012; Gold et al., 2000), che di solito viene indotta nel topo (Gold et al., 2000).

L'EAE è una patologia autoimmune indotta attivando risposte immunitarie contro le proteine della mielina. Le caratteristiche sono infiammazione, infiltrazione linfocitaria e demielinizzazione predominanti a livello spinale e meno sviluppati nel cervello. EAE è un modello della sclerosi multipla che si sviluppa con decorso progressivo cronico.

Esistono due modi per indurre il modello EAE, che sono:

- i) *Immunizzazione attiva*: si effettua un'inoculazione una proteina specifica della mielina come la proteina basica della mielina (MBP), la glicoproteina mielinica oligodendrocitaria (MOG) o la proteina proteolipidica (PLP), seguita da un'inoculazione di Adjuvante Completo di Freund (CFA) e tossina della Pertosse (Pertussis toxin, PTx) (Smith, 1997). Quest'immunizzazione innesca, a livello degli organi linfoidi secondari, l'attivazione dei linfociti T contro il componente proteico della mielina somministrato. Una volta differenziati i linfociti T iniziano a migrare verso il SNC, attraversando la BEE sfruttando un meccanismo integrina-mediato. Nel SNC, i linfociti T vengono attivati dalle cellule presentanti l'antigene (APC) e iniziano la produzione di citochine pro-infiammatorie (IFN) e chemochine con lo scopo di reclutare macrofagi e neutrofilii. L'azione combinata di questi eventi causa la distruzione della mielina e la comparsa di lesioni assonali.
- ii) *Immunizzazione passiva*: prevede l'inoculo di linfociti T propagati in vitro e trasferiti all'animale, in virtù del ruolo rilevante di tali cellule nell'insorgenza della malattia (Gold et al., 2000). Tale modello si applica generalmente ai modelli murini (Gold et al., 1997).

Nel laboratorio dove ho svolto la tesi sperimentale è a disposizione il modello di immunizzazione attiva e su questo modello abbiamo svolto degli esperimenti per verificare se e in che misura il sistema del complemento è alterato alla fase acuta della malattia, quando gli animali sviluppano la gravità clinica maggiore.

Topi Femmina di 8 settimane sono state immunizzate come descritto nella sezione dei Metodi e abbiamo controllato la sintomatologia clinica giornalmente, definendola sulla base della scala di gravità riportata sempre nella sezione dei Metodi.

La **Figura 5 A** riporta l'andamento della gravità clinica in 12 topi EAE immunizzati in

diversi periodi: si può osservare una manifestazione di sintomi clinici a partire dal decimo giorno dopo l'immunizzazione e la gravità della patologia aumenta nel tempo per raggiungere un valore massimo al giorno di immunizzazione 19-21. La curva della gravità clinica è coerente con quella ottenuta in studi precedenti. La gravità massima ottenuta (gravità ≥ 2) non ha raggiunto livelli tali da dovere intervenire per impedire la sofferenza nell'animale.

7.5 Alterazioni della sinapsi tetrapartita nella corteccia di topi affetti da Encefalomielite Autoimmune Sperimentale.

Gli animali che soffrono di EAE sviluppano alterazioni strutturali e funzionali della sinapsi tetrapartita, l'unità funzionale più semplice che assicura e mantiene la connessione sinaptica nel SNC. La sinapsi tetrapartita include il neurone presinaptico, il neurone postsinaptico, gli astrociti e la microglia che avvolgono e supportano la sinapsi neuronale (**Figura 5B**). Per valutare se e in che misura le diverse componenti di questa unità possano avere sviluppato delle modifiche strutturali abbiamo svolto un'analisi del profilo proteomico di lisati di corteccia di topo EAE confrontando i risultati con quelli ottenuti da animali non -immunizzati [MOG(-)].

In particolare, abbiamo valutato la densità delle seguenti proteine che sono considerate marker dei diversi componenti cellulari della sinapsi tetrapartita:

la proteina acida fibrillare astrocitaria (GFAP)

la proteina CD11b, marker microgliale

la proteina SNAP25, coinvolta nel meccanismo di esocitosi vescicolare, qui utilizzata come marker presinaptico

la proteina della densità postsinaptica a peso 95 kDa (PSD95), marker della membrana postsinaptica.

La densità di queste proteine è stata analizzata svolgendo l'analisi western blot e quantificando la immunofluorescenza della banda riconosciuta da anticorpi specifici per quelle proteine. In tutte le analisi abbiamo anche quantificato l'enzima gliceroaldeide-3-fosfatasi deidrogenasi (GAPDH) utilizzata come standard interno. La densità delle

diverse proteine è stata espressa come rapporto con la quantità di GAPDH nella membrana (proteina / GAPDH) e le variazioni nella corteccia di topo EAE sono state espresse come rapporto tra il valore di $[\text{proteina} / \text{GAPDH}]_{\text{EAE}}$ e $[\text{proteina} / \text{GAPDH}]_{\text{controllo}}$.

La **Figura 5** (immagini da **C** a **F**) riporta immagini esemplificative di western blot relative alle 4 proteine in topi EAE e topi controllo. Le immagini sono rappresentative di analisi svolte in diversi giorni su tessuti ottenuti da animali diversi. La **Figura 5 G** riporta i dati relativi alla quantificazione della variazione della densità delle proteine in topi EAE espresse come % di variazione rispetto al rispettivo contenuto in topi controllo. La **Figura 5 G** evidenzia come nella corteccia di animali EAE si osservi un aumento significativo della densità delle proteine GFP e CD11b, a suggerire lo sviluppo di astrocitosi e microgliosi diffusa in questa regione cerebrale. La **Figura 5 G** evidenzia inoltre che non vi è una variazione significativa della densità della proteina SNAP25, a suggerire che non vi siano variazioni sostanziali nella componente neuronale presinaptica a livello corticale. Al contrario, la densità della proteina postsinaptica PSD95 è significativamente aumentata, a suggerire una de-sincronizzazione della funzione sinaptica. Possiamo infatti ipotizzare che l'aumentata densità di questa proteina possa rispecchiare la necessità di aumentare la distribuzione e quindi la sensibilità funzionale della parte postsinaptica nei confronti di una parte presinaptica che è noto essere ipofunzionante nella corteccia di topi EAE. L'ipotesi è riassunta nella Figura 5 B, che sottolinea lo sviluppo di astrocitosi, microgliosi e di contatti postsinaptici nella unità quadripartita semplice.

7.5 Variazioni della densità delle componenti C1q e C3 in sinaptosomi e gliosomi isolati dalla corteccia di topi affetti da Encefalomielite Autoimmune Sperimentale.

Lo studio è quindi proseguito cercando di valutare se, contemporaneamente alle alterazioni della sinapsi tetrapartita, si sviluppassero a livello corticale anche variazioni significative della densità delle proteine del complemento a localizzazione presinaptica astrocitaria, le componenti C1q e C3.

L'analisi è stata eseguita anche in questo caso con tecnica western blot, ma si è focalizzata su lisati di sinaptosomi e di gliosomi isolati contemporaneamente dalla corteccia di topo EAE alla fase acuta della malattia (**Figura 6 A e B**). La densità della immunopositività per C1q e C3 in questi preparati è stata normalizzata sul contenuto di GAPDH e le

variazioni rispetto all'animale sano sono state espresse come percentuale di variazione rispetto al controllo posto a 100 (**Figura 6 C e D**).

L'analisi dei bot ha evidenziato un incremento significativo della densità di C1q e di C3 sia nelle particelle gliali che nelle terminazioni nervose isolate, coerentemente con i dati in letteratura discussi nell'Introduzione.

Possiamo quindi concludere che nel topo EAE alla fase acuta della malattia vi è un accumulo / iper-espressione delle due componenti del complemento che possono quindi influenzare l'efficienza e la struttura della sinapsi tetrapartita, avendo quindi un ruolo in quelle alterazioni strutturali/ funzionali/ sinaptiche alla base della sintomatologia centrale sviluppata dai topi EAE.

7.6 Variazioni della densità dei trasportatori GLT1 /GLAST in sinaptosomi e gliosomi isolati dalla corteccia di topi affetti da Encefalomielite Autoimmune Sperimentale.

Parallelamente alla analisi della possibile variazione delle densità dei componenti del complemento, abbiamo anche analizzato se e in che misura la densità delle proteine dei trasportatori del glutammato GLAST e GLT1 fossero anche esse alterate. Ci siamo focalizzate su queste proteine perché rappresentano i trasportatori che preferibilmente sono coinvolti nella ricaptazione e nel rilascio carrier-mediato di glutammato in terminazioni nervose (GLT1) e in processi astrocitari (GLAST).

Anche in questo caso lo studio è stato fatto applicando la tecnica di western blot in lisati di sinaptosomi (**Figura 7 A e B**) e di gliosomi (**Figura 7 C e D**) corticali di topi EAE e di topi controllo. Le variazioni della densità in topi EAE sono state espresse come prima descritto, normalizzando prima la densità di ogni proteina verso GAPDH e poi valutando la variazione in % rispetto agli animali controllo. In questo caso abbiamo valutato la variazione della densità dei trasportatori nel corso della malattia, scegliendo tre diverse fasi nel progresso della patologia e cioè prima dell'insorgenza di sintomi (7 giorni dopo 'immunizzazione, d.p.i.), all'insorgere dei primi sintomi (14 d.p.i.) e alla fase acuta della malattia (21 d.p.i.).

L'analisi ha dimostrato una riduzione della densità del trasportatore GLT1 in lisati sinaptosomiali, che diventa significativo alla fase acuta della malattia. Parallelamente, si è osservato una iper-espressione del trasportatore GLAST a livello gliosomiale, anche esso significativo alla fase acuta della malattia.

Considerato il ruolo fondamentale dei trasportatori nel determinare il rilascio di glutammato indotto da complemento, possiamo ipotizzare che queste variazioni possano anche influenzare questo parametro funzionale, creando uno squilibrio nel cross-talk funzionale tra astrociti e neuroni nella sinapsi tetra-partita, che potrebbe essere funzionale e prodromico allo sviluppo della sinaptopatia che caratterizza il decorso della sclerosi multipla.

8. Conclusioni

I dati descritti in questa tesi suggeriscono un ruolo fondamentale del complemento nelle alterazioni sinaptiche che si sviluppano nel corso della EAE e che potrebbero essere coinvolte nei meccanismi sinaptotattici osservati in pazienti affetti da sclerosi multipla.

In particolare, i dati descritti in questa tesi:

- i) confermano il ruolo del complemento come controllore della liberazione di glutammato da terminazioni nervose corticali, effetto rilasciante che coinvolge l'inversione del carrier che in questo caso favorisce l'uscita dell'aminoacido eccitatorio;
- ii) dimostrano che il complemento con meccanismo simile è anche in grado di indurre la liberazione di glutammato da processi astrocitari corticali, sempre attraverso un meccanismo che comporta l'inversione del carrier;
- iii) evidenziano il ruolo fondamentale di C1q e di C3 nel ruolo del complemento come controllore della liberazione di glutammato da terminazioni nervose e processi astrocitari corticali;
- iv) confermano lo sviluppo di alterazioni strutturali patologiche nella sinapsi tetrapartita corticale con segni evidenti di astrocitosi, microgliosi ed alterazioni nella sinapsi funzionale.
- v) Dimostrano un accumulo significativo delle proteine C1q e C3 nei sinaptosomi e gliosomi corticali di topi EAE allo stadio acuto della malattia;
- vi) Evidenziano anche una alterazione della densità dei trasportatori GLAST e GLT1 rispettivamente nei gliosomi e nei sinaptosomi corticale che potrebbero indicare alterazioni nella capacità di rilascio di glutammato indotto da complemento in queste strutture.

Nel loro complesso, i dati di questo studio aumentano la conoscenza del ruolo del complemento come modulatore della trasmissione centrale e suggeriscono nuovi bersagli farmacologici per la cura della SM.

9. Figure e legende alle figure

Figura 1

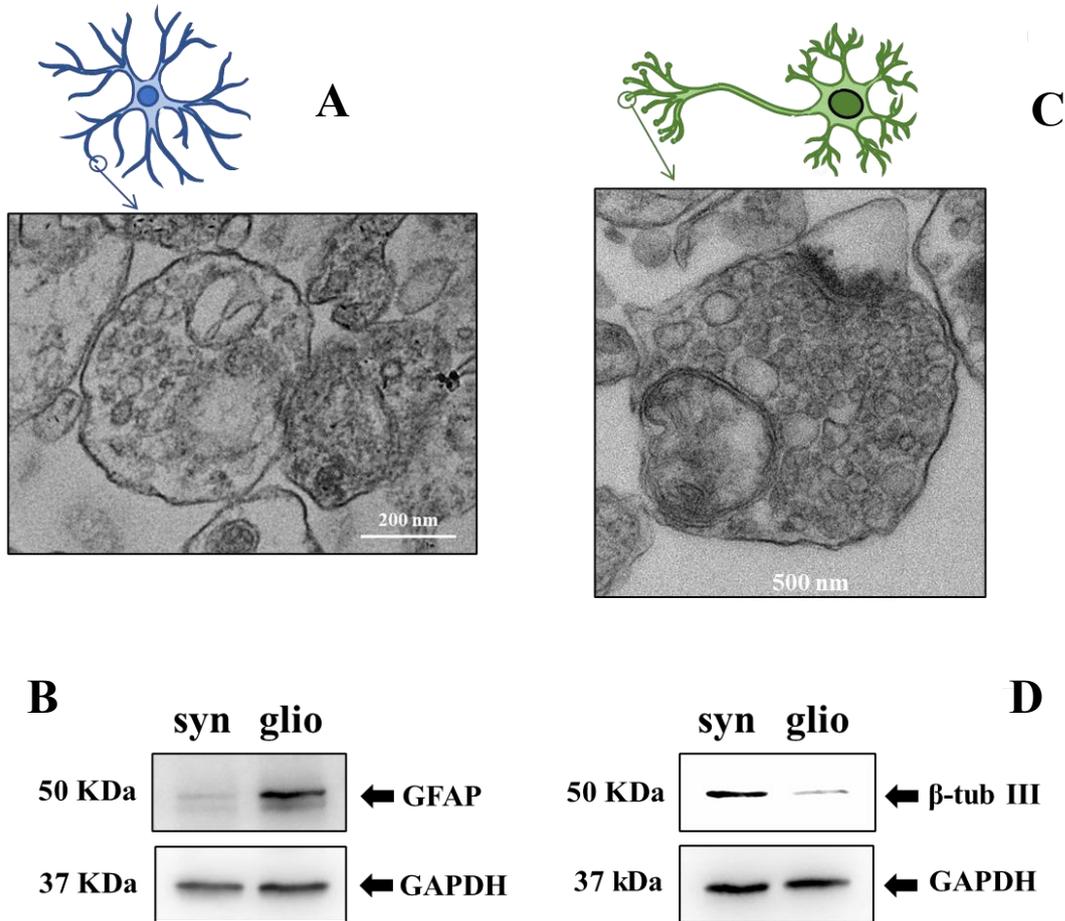


Figura 1. Sinaptosomi e gliosomi: microscopia elettronica e analisi western blot. **(A)** immagine di un astrocita e la specializzazione da cui originano i gliosomi, e analisi ultrastrutturale di un gliosoma mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). L'immagine è rappresentativa dell'analisi TEM di n= 5 diverse preparazioni di gliosomi. **(C)** L' immagine mostra un neurone con evidenziati i terminali nervosi da cui provengono i sinaptosomi e l'analisi ultrastrutturale dei sinaptosomi mediante TEM.

L'immagine è rappresentativa di n=5 diverse preparazioni di sinaptosomi. **(B e D)** Analisi Western blot di GFAP (n=5) e β -tub III (n=5) in sinaptosomi corticali (syn, 20 μ g / lane) e gliosomi (glio, 20 μ g / lane) di topi controllo. La GAPDH è stata utilizzata come standard interno.

Figura 2

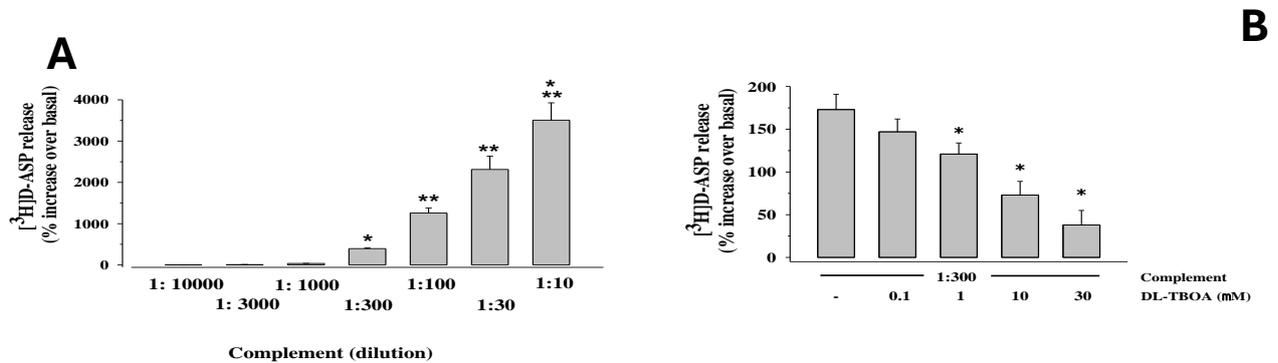


Figura 2. Il complemento aumenta il rilascio spontaneo di pre-loaded [³H]D-aspártato da sinaptosomi corticali di topo: impatto del DL-tBOA.

(A) Effetto del complemento (diluizione da 1:10 a 1:10000) in sinaptosomi isolati da corteccie di topi sani. I dati rappresentano le medie \pm SEM di n = 5-8 esperimenti eseguiti in triplicato (tre camere di superfusione per ciascuna condizione sperimentale). * p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001 (B) Effetto del complemento (diluizione 1:300) in assenza o in presenza di DL-tBOA (concentrazioni: 0.1-1-10-30 μ M) in sinaptosomi isolati da corteccie di topi sani. I dati rappresentano le medie \pm SEM di n = 5-8 esperimenti eseguiti in triplicato (tre camere di superfusione per ciascuna condizione sperimentale). * p < 0,05 vs rilascio di trizio evocato dal complemento 1:300, dai sinaptosomi corticali.

Figura 3

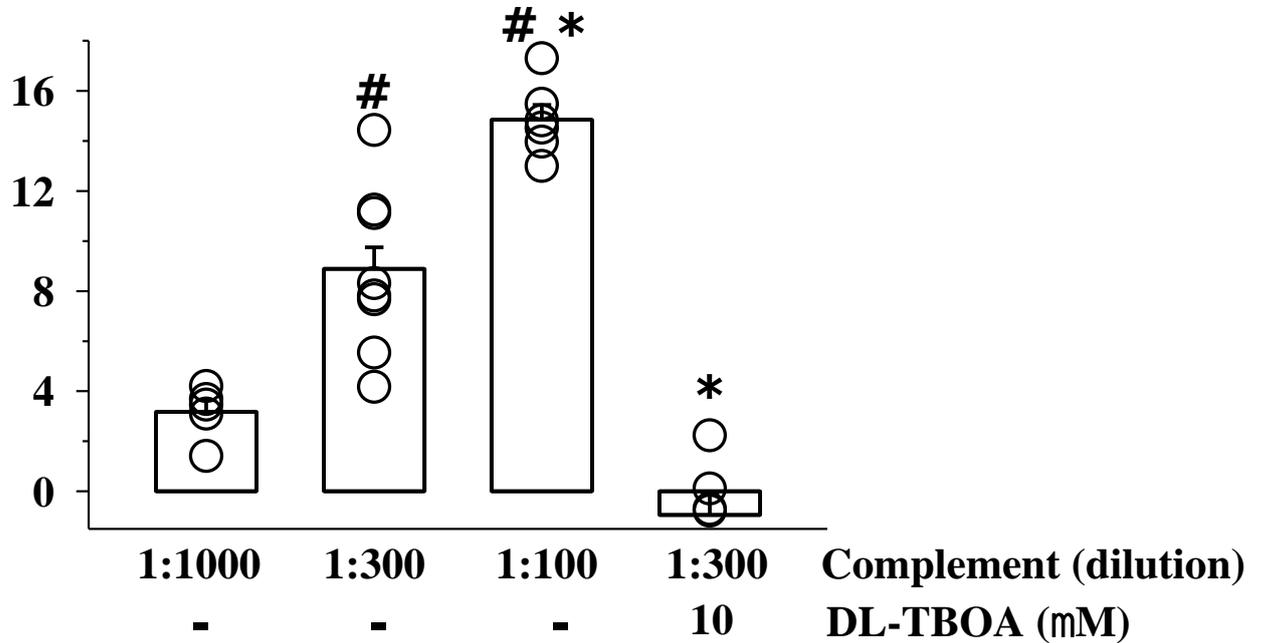


Figura 3. Effetto del complemento in assenza o in presenza di DL-tBOA (10 μ M) in gliosomi isolati da cortecce di topi sani.

Effetto del complemento (diluizione da 1:100 a 1:1000) in assenza o in presenza di DL-tBOA (10 μ M) in gliosomi isolati da cortecce di topi sani. I dati rappresentano le medie \pm SEM di $n = 5-8$ esperimenti eseguiti in triplicato (tre camere di superfusione per ciascuna condizione sperimentale). # $p < 0,05$ vs rilascio di trizio evocato dal complemento 1:1000, dai gliosomi corticali; * $p < 0,05$ vs rilascio di trizio evocato dal complemento 1:300, dai gliosomi corticali.

Figura 4

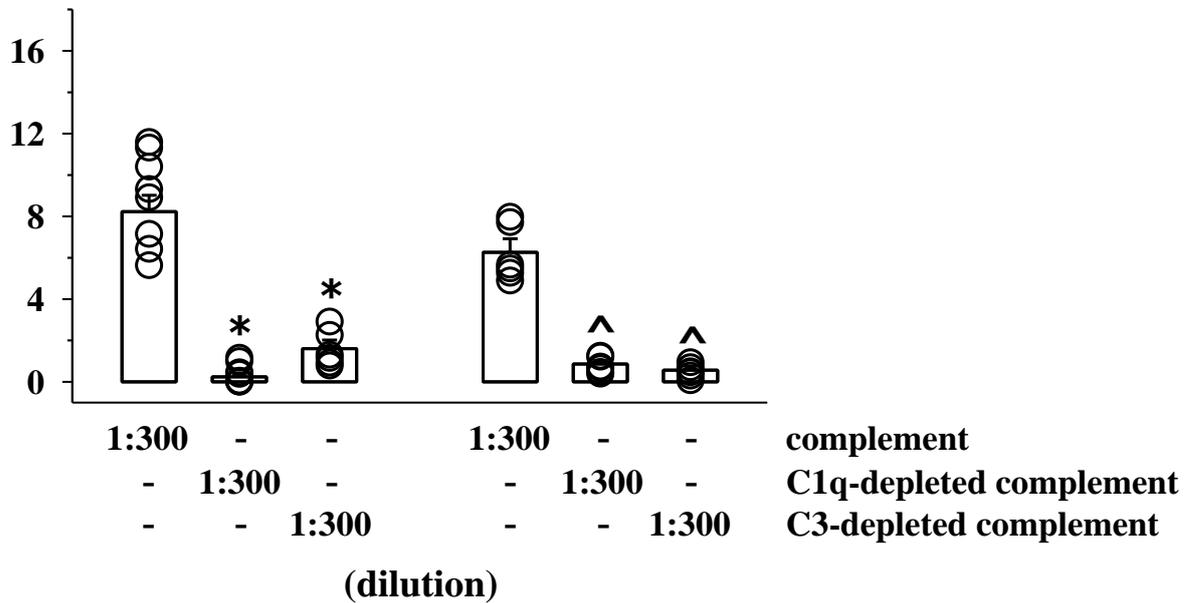


Figura 4. Effetti del complemento (diluizione 1:300) del complemento privato di C1q (diluizione 1:300) e del complemento privato di C3 (diluizione 1:300) sul rilascio di [³H] D-Asp dai gliosomi e dai sinaptosomi corticali di topi sani.

Il rilascio è stato calcolato come aumento percentuale rispetto al rilascio basale ed è espresso come overflow indotto (%). I dati sono la media \pm SEM di n = 5-8 esperimenti eseguiti in triplicato (tre camere di superfusione per ogni condizione sperimentale). * p < 0,05 vs 1:300 rilascio di trizio evocato dal complemento da gliosomi corticali; ^ p < 0,05 vs rilascio di trizio evocato da 1:300 complemento dai sinaptosomi corticali.

Figura 5

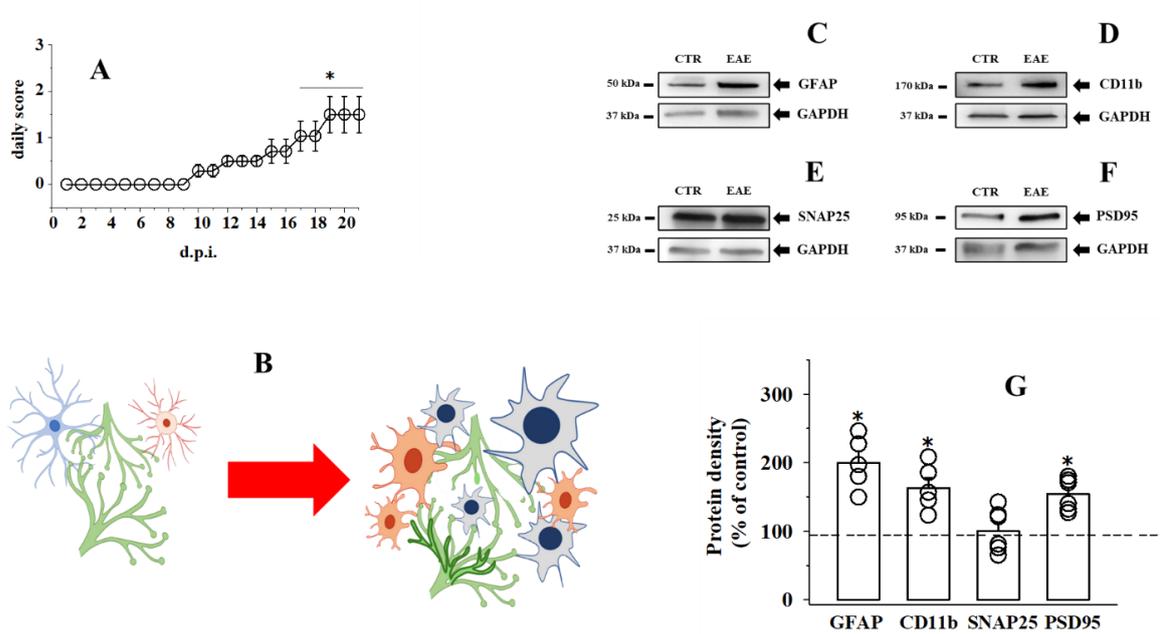


Figura 5. Score clinico e adattamento sinaptico nella corteccia di topi EAE nella fase acuta della malattia.

(A) Score clinico dei topi EAE. I topi sono stati immunizzati come descritto nella sezione “Materiali e Metodi” e la gravità dei sintomi clinici è stata monitorata quotidianamente a partire dal 1 d.p.i. fino al sacrificio dei topi EAE a 21 ± 1 d.p.i. I dati sono la media \pm S.E.M. di 10 animali immunizzati in tempi diversi scelti a caso tra tutti i topi EAE dedicati allo studio. * $p < 0,05$ rispetto al punteggio clinico a 1 d.p.i. **(B-E)** Analisi Western blot di GFAP (B, $n=5$), CD11b (C, $n=5$), SNAP25 (D, $n=7$) e PSD95 (D, $n=6$) in omogenati corticali di animali controllo non immunizzati (CTR) e di topi EAE allo stadio acuto della malattia. La GAPDH è stata utilizzata come standard interno. **(F)** Quantificazione dei cambiamenti nelle densità delle proteine GFAP, CD11b, SNAP25 e PSD95 negli omogenati corticali di topi EAE rispetto ai controlli. La densità delle proteine è stata espressa come rapporto proteine/GAPDH; le variazioni nei topi EAE sono state espresse come percentuale delle proteine/GAPDH nei topi di controllo. * $p < 0,05$ rispetto ai rispettivi controlli.

Figura 6

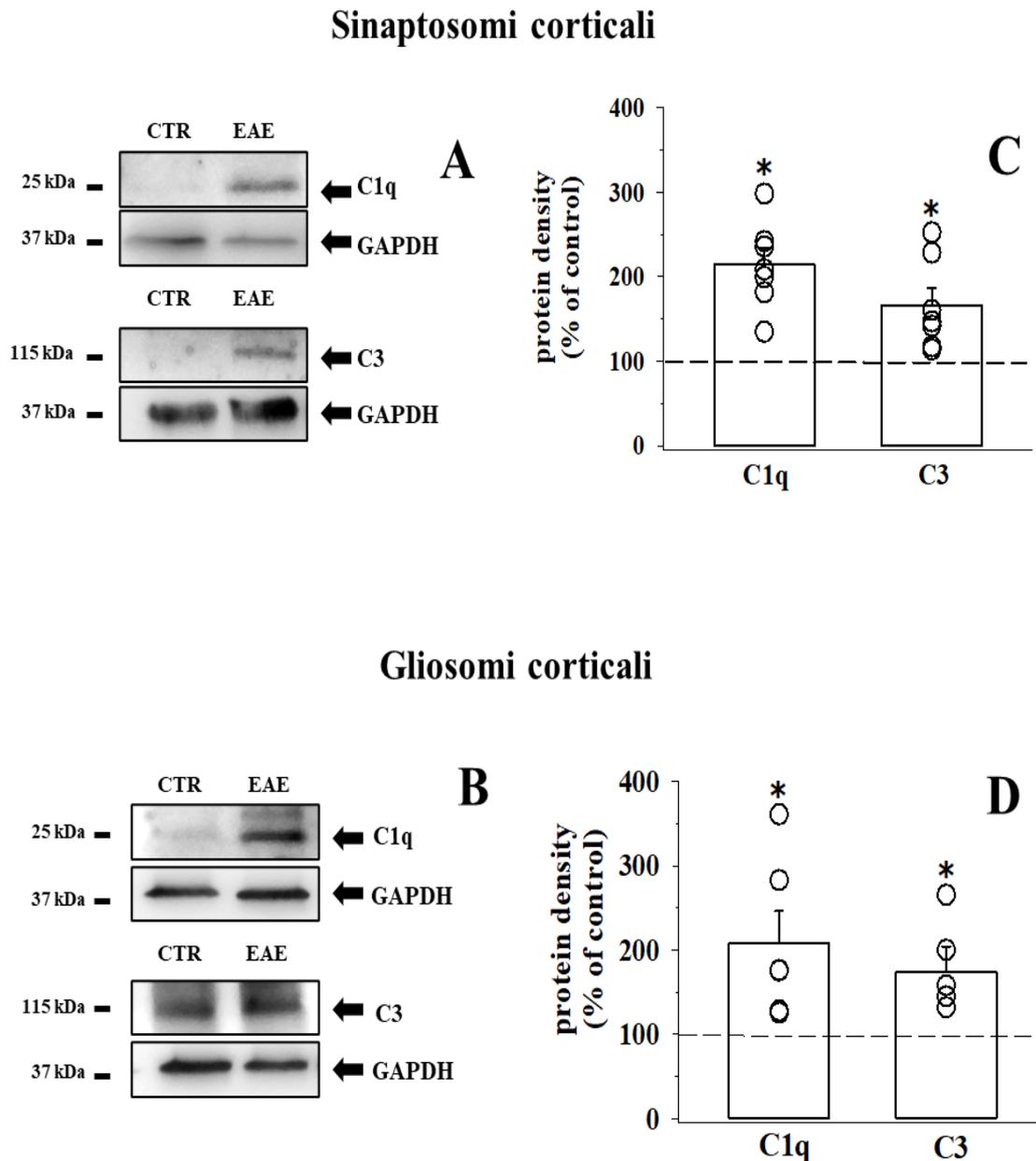


Figura 6. Cambiamenti nella densità delle proteine C1q e C3 nei sinaptosomi corticali e nei gliosomi corticali di topi di controllo e topi EAE alla fase acuta della malattia.

La figura mostra immagini rappresentative dell'immunopositività di C1q e C3 nei lisati di sinaptosomi (A) e gliosomiali (B) corticali di animali di controllo non immunizzati (CTR) e di topi EAE a 21 ± 1 d.p.i. La GAPDH è stata utilizzata come controllo interno. Le immagini sono rappresentative dell'analisi di: (C) $n=7$ (C1q) e $n=7$ (C3) lisati sinaptosomiali; (D) $n=6$ (C1q) e $n=5$ (C3) lisati gliosomiali. La densità delle proteine è stata espressa come rapporto proteine/GAPDH; le variazioni nei topi EAE sono state espresse come percentuale delle proteine/GAPDH nei topi di controllo. * $p<0,05$ vs i

rispettivi controlli.

Figura 7

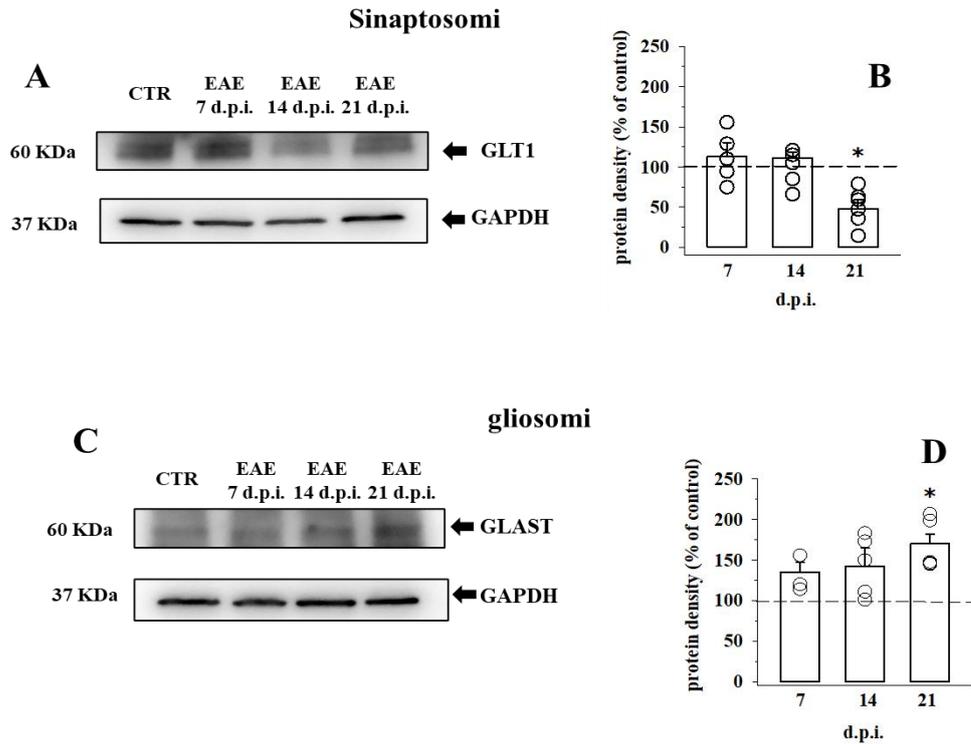


Figura 7. Variazione della densità delle proteine GLT-1 in sinaptosomi corticali e di GLAST in gliosomi corticali di topi di controllo e topi EAE a differenti stadi della malattia (7,14, 21 d.p.i).

(A) Immagini rappresentative dell'immunopositività di GLT-1 (EAAT2) in lisati sinaptosomiali corticali di topi di controllo non immunizzati (CTR) e di topi EAE a diversi stadi della malattia (come indicato) e (B) quantificazione delle variazioni relative rispetto ai controlli. (C) Immagini rappresentative dell'immunopositività di GLAST (EAAT1) in lisati gliosomiali corticali di topi di controllo non immunizzati (CTR) e di topi EAE a diversi stadi della malattia (come indicato) e (D) quantificazione delle variazioni relative rispetto ai controlli. La GAPDH è stata utilizzata come standard interno. Le immagini sono rappresentative di n= 7 diversi preparati sinaptosomiali e gliosomiali analizzati in giorni diversi. La densità delle proteine è stata espressa come rapporto proteine/GAPDH; le variazioni nei topi EAE sono state espresse come percentuale delle proteine/GAPDH nei topi di controllo. * p<0,05 almeno rispetto ai rispettivi controlli.

10.BIBLIOGRAFIA

Arlaud GJ, Barlow PN, Gaboriaud C, Gros P, Narayana SV. Deciphering complement mechanisms: the contributions of structural biology. *Mol Immunol.* 2007 Sep;44(16):3809-22. doi: 10.1016/j.molimm.2007.06.147. PMID: 17768099.

Arlaud GJ, Gaboriaud C, Thielens NM, Rossi V. Structural biology of C1. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):1001-6. doi: 10.1042/bst0301001. PMID: 12440961.

Asavapanumas N, Tradtrantip L, Verkman AS. Targeting the complement system in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Expert Opin Biol Ther.* 2021 Aug;21(8):1073-1086. doi: 10.1080/14712598.2021.1884223. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33513036; PMCID: PMC8316261.

Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 2007 Jan;28(1):5-11. doi: 10.1016/j.it.2006.11.007. Epub 2006 Nov 30. PMID: 17140851.

Bhat R, Steinman L. Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. *Neuron.* 2009 Oct 15;64(1):123-32. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.015. Erratum in: *Neuron.* 2009 Nov 25;64(4):590. Erratum in: *Neuron.* 2009 Oct 29;64(2):292. PMID: 19840554.

Bohlson SS, Tenner AJ. Complement in the Brain: Contributions to Neuroprotection, Neuronal Plasticity, and Neuroinflammation. *Annu Rev Immunol.* 2023 Apr 26;41:431-452. doi: 10.1146/annurev-immunol-101921-035639. Epub 2023 Feb 7. PMID: 36750318.

Bonfiglio T, Olivero G, Merega E, Di Prisco S, Padolecchia C, Grilli M, Milanese M, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Bonanno G, Marchi M, Pittaluga A. Prophylactic versus Therapeutic Fingolimod: Restoration of Presynaptic Defects in Mice Suffering from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One.* 2017 Jan 26;12(1):e0170825. doi: 10.1371/journal.pone.0170825. Erratum in: *PLoS One.* 2023 Oct 3;18(10):e0292584. doi: 10.1371/journal.pone.0292584. PMID: 28125677; PMCID: PMC5268435.

Boulangier LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron*. 2009 Oct 15;64(1):93-109. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.001. PMID: 19840552.

Cardozo PL, de Lima IBQ, Maciel EMA, Silva NC, Dobransky T, Ribeiro FM. Synaptic Elimination in Neurological Disorders. *Curr Neuropharmacol*. 2019;17(11):1071-1095. doi: 10.2174/1570159X17666190603170511. PMID: 31161981; PMCID: PMC7052824.

Carroll MV, Sim RB. Complement in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Sep 16;63(12):965-75. doi: 10.1016/j.addr.2011.06.005. Epub 2011 Jun 16. PMID: 21704094.

Carvalho K, Schartz ND, Balderrama-Gutierrez G, Liang HY, Chu SH, Selvan P, Gomez-Arboledas A, Petrisko TJ, Fonseca MI, Mortazavi A, Tenner AJ. Modulation of C5a-C5aR1 signaling alters the dynamics of AD progression. *J Neuroinflammation*. 2022 Jul 11;19(1):178. doi: 10.1186/s12974-022-02539-2. PMID: 35820938; PMCID: PMC9277945.

Cavaillon JM, Sansonetti P, Goldman M. 100th Anniversary of Jules Bordet's Nobel Prize: Tribute to a Founding Father of Immunology. *Front Immunol*. 2019 Sep 11;10:2114. doi: 10.3389/fimmu.2019.02114. PMID: 31572361; PMCID: PMC6749103.

Cavaillon JM, Sansonetti P, Goldman M. Jules Bordet, un homme de conviction - Centenaire de l'attribution de son prix Nobel [Jules Bordet, a man of conviction. Centenary of his Nobel Prize]. *Med Sci (Paris)*. 2020 Aug-Sep;36(8-9):803-809. French. doi: 10.1051/medsci/2020135. Epub 2020 Aug 21. PMID: 32821055.

Chen CB, Wallis R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J Biol Chem*. 2004 Jun 18;279(25):26058-65. doi: 10.1074/jbc.M401318200. Epub 2004 Apr 1. PMID: 15060079.

Cong Q, Soteris BM, Huo A, Li Y, Tenner AJ, Sia GM. C1q and SRPX2 regulate microglia mediated synapse elimination during early development in the visual thalamus but not the visual cortex. *Glia*. 2022 Mar;70(3):451-465. doi: 10.1002/glia.24114. Epub 2021 Nov 11. PMID: 34762332; PMCID: PMC8732326.

Cong Q, Soteris BM, Wollet M, Kim JH, Sia GM. The endogenous neuronal complement inhibitor SRPX2 protects against complement-mediated synapse elimination during

development. *Nat Neurosci.* 2020 Sep;23(9):1067-1078. doi: 10.1038/s41593-020-0672-0. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32661396; PMCID: PMC7483802.

Coulthard LG, Hawksworth OA, Woodruff TM. Complement: The Emerging Architect of the Developing Brain. *Trends Neurosci.* 2018 Jun;41(6):373-384. doi: 10.1016/j.tins.2018.03.009. Epub 2018 Mar 29. PMID: 29606485.

Cribbs DH, Berchtold NC, Perreau V, Coleman PD, Rogers J, Tenner AJ, Cotman CW. Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J Neuroinflammation.* 2012 Jul 23;9:179. doi: 10.1186/1742-2094-9-179. PMID: 22824372; PMCID: PMC3419089.

de Córdoba SR, de Jorge EG. Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol.* 2008 Jan;151(1):1-13. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03552.x. PMID: 18081690; PMCID: PMC2276932.

Dodds AW, Sim RB, Porter RR, Kerr MA. Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregates. *Biochem J.* 1978 Nov 1;175(2):383-90. doi: 10.1042/bj1750383. PMID: 743203; PMCID: PMC1186083.

Ehrlich P, Morgenroth J. Zur theorie der lysenwirkun. *Berlin Klin Wchrs* 1899; 36: 6.

Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med.* 2011 Mar-Apr;17(3-4):317-29. doi: 10.2119/molmed.2010.00149. Epub 2010 Oct 29. PMID: 21046060; PMCID: PMC3060978.

Escudero-Esparza A, Kalchishkova N, Kurbasic E, Jiang WG, Blom AM. The novel complement inhibitor human CUB and Sushi multiple domains 1 (CSMD1) protein promotes factor I-mediated degradation of C4b and C3b and inhibits the membrane attack complex assembly. *FASEB J.* 2013 Dec;27(12):5083-93. doi: 10.1096/fj.13-230706. Epub 2013 Aug 20. PMID: 23964079.

Farries TC, Lachmann PJ, Harrison RA. Analysis of the interaction between properdin and factor B, components of the alternative-pathway C3 convertase of complement. *Biochem J.* 1988 Aug 1;253(3):667-75. doi: 10.1042/bj2530667. PMID: 3140783; PMCID: PMC1149358.

Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med.* 1975 Oct 1;142(4):856-63. doi: 10.1084/jem.142.4.856. PMID: 1185108; PMCID: PMC2189935.

Fearon DT. The complement system and adaptive immunity. *Semin Immunol.* 1998 Oct;10(5):355-61. doi: 10.1006/smim.1998.0137. PMID: 9799710.

Fonseca MI, Chu SH, Hernandez MX, Fang MJ, Modarresi L, Selvan P, MacGregor GR, Tenner AJ. Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *J Neuroinflammation.* 2017 Mar 6;14(1):48. doi: 10.1186/s12974-017-0814-9. PMID: 28264694; PMCID: PMC5340039.

Fromell K, Adler A, Åman A, Manivel VA, Huang S, Dührkop C, Sandholm K, Ekdahl KN, Nilsson B. Assessment of the Role of C3(H₂O) in the Alternative Pathway. *Front Immunol.* 2020 Mar 31;11:530. doi: 10.3389/fimmu.2020.00530. PMID: 32296436; PMCID: PMC7136553.

Galvan MD, Greenlee-Wacker MC, Bohlson SS. C1q and phagocytosis: the perfect complement to a good meal. *J Leukoc Biol.* 2012 Sep;92(3):489-97. doi: 10.1189/jlb.0212099. Epub 2012 Jun 19. PMID: 22715140.

Gao Z, Li M, Ma J, Zhang S. An amphioxus gC1q protein binds human IgG and initiates the classical pathway: Implications for a C1q-mediated complement system in the basal chordate. *Eur J Immunol.* 2014 Dec;44(12):3680-95. doi: 10.1002/eji.201444734. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25174509.

Garred P, Tenner AJ, Mollnes TE. Therapeutic Targeting of the Complement System: From Rare Diseases to Pandemics. *Pharmacol Rev.* 2021 Apr;73(2):792-827. doi: 10.1124/pharmrev.120.000072. PMID: 33687995; PMCID: PMC7956994.

Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol.* 2004 Nov;41(11):1089-98. doi: 10.1016/j.molimm.2004.06.011. PMID: 15476920.

Gialeli C, Gungor B, Blom AM. Novel potential inhibitors of complement system and their roles in complement regulation and beyond. *Mol Immunol*. 2018 Oct;102:73-83. doi: 10.1016/j.molimm.2018.05.023. Epub 2018 Jun 7. PMID: 30217334.

Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today*. 2000 Feb;6(2):88-91. doi: 10.1016/s1357-4310(99)01639-1. PMID: 10652482.

Györfy BA, Kun J, Török G, Bulyáki É, Borhegyi Z, Gulyássy P, Kis V, Szocsics P, Micsonai A, Matkó J, Drahos L, Juhász G, Kékesi KA, Kardos J. Local apoptotic-like mechanisms underlie complement-mediated synaptic pruning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 12;115(24):6303-6308. doi: 10.1073/pnas.1722613115. Epub 2018 May 29. PMID: 29844190; PMCID: PMC6004452.

Habib N, McCabe C, Medina S, Varshavsky M, Kitsberg D, Dvir-Szternfeld R, Green G, Dionne D, Nguyen L, Marshall JL, Chen F, Zhang F, Kaplan T, Regev A, Schwartz M. Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nat Neurosci*. 2020 Jun;23(6):701-706. doi: 10.1038/s41593-020-0624-8. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32341542; PMCID: PMC9262034.

Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A, Jonasson M, Skjoedt MO, Nielsen O, Hartshorn K, Jørgensen TJ, Skjødt K, Holmskov U. Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol*. 2010 Nov 15;185(10):6096-104. doi: 10.4049/jimmunol.1002185. Epub 2010 Oct 18. PMID: 20956340.

Holmquist E, Okroj M, Nodin B, Jirström K, Blom AM. Sushi domain-containing protein 4 (SUSD4) inhibits complement by disrupting the formation of the classical C3 convertase. *FASEB J*. 2013 Jun;27(6):2355-66. doi: 10.1096/fj.12-222042. Epub 2013 Mar 12. PMID: 23482636.

Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today*. 1994 Feb;15(2):67-74. doi: 10.1016/0167-5699(94)90136-8. PMID: 8155265.

Jeanes A, Coulthard LG, Mantovani S, Markham K, Woodruff TM. Co-ordinated expression of innate immune molecules during mouse neurulation. *Mol Immunol*. 2015 Dec;68(2 Pt A):253-60. doi: 10.1016/j.molimm.2015.09.004. Epub 2015 Sep 14. PMID: 26383831.

Kang YH, Tan LA, Carroll MV, Gentle ME, Sim RB. Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathways. *Adv Exp Med Biol*. 2009;653:117-28. doi: 10.1007/978-1-4419-0901-5_8. PMID: 19799115.

Kanmogne M, Klein RS. Neuroprotective versus Neuroinflammatory Roles of Complement: From Development to Disease. *Trends Neurosci*. 2021 Feb;44(2):97-109. doi: 10.1016/j.tins.2020.10.003. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33190930; PMCID: PMC8610101.

Kanmogne M, Klein RS. Neuroprotective versus Neuroinflammatory Roles of Complement: From Development to Disease. *Trends Neurosci*. 2021 Feb;44(2):97-109. doi: 10.1016/j.tins.2020.10.003. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33190930; PMCID: PMC8610101.

Kawai Y, Kawabata C, Sakaguchi M, Tamura T. Protection of Baculovirus Vectors Expressing Complement Regulatory Proteins against Serum Complement Attack. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(10):1600-1605. doi: 10.1248/bpb.b18-00451. PMID: 30270330.

Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 2013 Jan 9;77(1):10-8. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.023. PMID: 23312512.

Kovács RÁ, Vadászi H, Bulyáki É, Török G, Tóth V, Mátyás D, Kun J, Hunyadi-Gulyás É, Fedor FZ, Csincsi Á, Medzihradzky K, Homolya L, Juhász G, Kékesi KA, Józsi M, Györfly BA, Kardos J. Identification of Neuronal Pentraxins as Synaptic Binding Partners of C1q and the Involvement of NP1 in Synaptic Pruning in Adult Mice. *Front Immunol*. 2021 Feb 8;11:599771. doi: 10.3389/fimmu.2020.599771. PMID: 33628204; PMCID: PMC7897678.

Lee JD, Coulthard LG, Woodruff TM. Complement dysregulation in the central nervous system during development and disease. *Semin Immunol*. 2019 Oct;45:101340. doi: 10.1016/j.smim.2019.101340. Epub 2019 Nov 7. PMID: 31708347.

Lee JD, Levin SC, Willis EF, Li R, Woodruff TM, Noakes PG. Complement components are upregulated and correlate with disease progression in the TDP-43^{Q331K} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2018 Jun 1;15(1):171. doi: 10.1186/s12974-018-1217-2. PMID: 29859100; PMCID: PMC5984816.

Li M, Hale JS, Rich JN, Ransohoff RM, Lathia JD. Chemokine CXCL12 in neurodegenerative diseases: an SOS signal for stem cell-based repair. *Trends Neurosci*. 2012 Oct;35(10):619-28. doi: 10.1016/j.tins.2012.06.003. Epub 2012 Jul 10. PMID: 22784557; PMCID: PMC3461091.

Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*. 2009 Oct 15;64(1):110-22. doi: 10.1016/j.neuron.2009.08.039. PMID: 19840553; PMCID: PMC2834890.

Matsuda K, Budisantoso T, Mitakidis N, Sugaya Y, Miura E, Kakegawa W, Yamasaki M, Konno K, Uchigashima M, Abe M, Watanabe I, Kano M, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M. Transsynaptic Modulation of Kainate Receptor Functions by C1q-like Proteins. *Neuron*. 2016 May 18;90(4):752-67. doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.001. Epub 2016 Apr 28. PMID: 27133466.

Matsuda K, Kondo T, Iijima T, Matsuda S, Watanabe M, Yuzaki M. Cbln1 binds to specific postsynaptic sites at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the cerebellum. *Eur J Neurosci*. 2009 Feb;29(4):707-17. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06639.x. Epub 2009 Feb 5. PMID: 19200061.

Matsuda K, Yuzaki M. Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions. *Eur J Neurosci*. 2011 Apr;33(8):1447-61. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07638.x. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21410790.

Matsuda K. Synapse organization and modulation via C1q family proteins and their receptors in the central nervous system. *Neurosci Res*. 2017 Mar;116:46-53. doi: 10.1016/j.neures.2016.11.004. Epub 2016 Nov 12. PMID: 27845167.

Matsushita M. Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity. *J Innate Immun.* 2010;2(1):24-32. doi: 10.1159/000228160. Epub 2009 Jul 24. PMID: 20375620.

McCarthy DP, Richards MH, Miller SD. Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Biol.* 2012;900:381-401. doi: 10.1007/978-1-60761-720-4_19. PMID: 22933080; PMCID: PMC3583382.

Michailidou I, Willems JG, Kooi EJ, van Eden C, Gold SM, Geurts JJ, Baas F, Huitinga I, Ramaglia V. Complement C1q-C3-associated synaptic changes in multiple sclerosis hippocampus. *Ann Neurol.* 2015 Jun;77(6):1007-26. doi: 10.1002/ana.24398. Epub 2015 May 11. PMID: 25727254.

Morgan BP, Gommerman JL, Ramaglia V. An "Outside-In" and "Inside-Out" Consideration of Complement in the Multiple Sclerosis Brain: Lessons From Development and Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci.* 2021 Jan 7;14:600656. doi: 10.3389/fncel.2020.600656. PMID: 33488361; PMCID: PMC7817777.

NELSON DS, NELSON RA Jr. On the mechanism of immune-adherence. I. Differentiation from acid-adhesion of bacteria to erythrocytes. *Yale J Biol Med.* 1959 Feb;31(4):185-200. PMID: 13636258; PMCID: PMC2603972.

Olivero G, Taddeucci A, Vallarino G, Trebesova H, Roggeri A, Gagliani MC, Cortese K, Grilli M, Pittaluga A. Complement tunes glutamate release and supports synaptic impairments in an animal model of multiple sclerosis. *Br J Pharmacol.* 2024 Jun;181(12):1812-1828. doi: 10.1111/bph.16328. Epub 2024 Feb 18. PMID: 38369641.

Perez-Alcazar M, Daborg J, Stokowska A, Wasling P, Björefeldt A, Kalm M, Zetterberg H, Carlström KE, Blomgren K, Ekdahl CT, Hanse E, Pekna M. Altered cognitive performance and synaptic function in the hippocampus of mice lacking C3. *Exp Neurol.* 2014 Mar;253:154-64. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.12.013. Epub 2013 Dec 28. PMID: 24378428.

Pickering MC, Botto M. Canonical and noncanonical functions of complement in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*. 2024 Jul;54(7):e2350918. doi: 10.1002/eji.202350918. Epub 2024 Apr 17. PMID: 38629181.

Porter RR, Reid KB. The biochemistry of complement. *Nature*. 1978 Oct 26;275(5682):699-704. doi: 10.1038/275699a0. PMID: 703835.

Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):569-81. doi: 10.1038/nri1130. PMID: 12876559.

Reid KB, Porter RR. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem J*. 1976 Apr 1;155(1):19-23. doi: 10.1042/bj1550019. PMID: 938474; PMCID: PMC1172797.

Reid KB, Porter RR. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem J*. 1976 Apr 1;155(1):19-23. doi: 10.1042/bj1550019. PMID: 938474; PMCID: PMC1172797.

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 2012 May 24;74(4):691-705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026. PMID: 22632727; PMCID: PMC3528177.

Schartz ND, Tenner AJ. The good, the bad, and the opportunities of the complement system in neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*. 2020 Nov 25;17(1):354. doi: 10.1186/s12974-020-02024-8. PMID: 33239010; PMCID: PMC7690210.

Schwaeble W, Dahl MR, Thiel S, Stover C, Jensenius JC. The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MASP19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology*. 2002 Sep;205(4-5):455-66. doi: 10.1078/0171-2985-00146. PMID: 12396007.

Scott-Hewitt N, Perrucci F, Morini R, Erreni M, Mahoney M, Witkowska A, Carey A, Faggiani E, Schuetz LT, Mason S, Tamborini M, Bizzotto M, Passoni L, Filipello F, Jahn R, Stevens B, Matteoli M. Local externalization of phosphatidylserine mediates

developmental synaptic pruning by microglia. *EMBO J.* 2020 Aug 17;39(16):e105380. doi: 10.15252/embj.2020105380. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32657463; PMCID: PMC7429741.

Shatz CJ. MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron.* 2009 Oct 15;64(1):40-5. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.044. PMID: 19840547; PMCID: PMC2773547.

Shen Y, Li R, McGeer EG, McGeer PL. Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain. *Brain Res.* 1997 Sep 26;769(2):391-5. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00850-0. PMID: 9374212.

Shi Q, Colodner KJ, Matousek SB, Merry K, Hong S, Kenison JE, Frost JL, Le KX, Li S, Dodart JC, Caldarone BJ, Stevens B, Lemere CA. Complement C3-Deficient Mice Fail to Display Age-Related Hippocampal Decline. *J Neurosci.* 2015 Sep 23;35(38):13029-42. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1698-15.2015. PMID: 26400934; PMCID: PMC6605437.

Sia GM, Clem RL, Huganir RL. The human language-associated gene SRPX2 regulates synapse formation and vocalization in mice. *Science.* 2013 Nov 22;342(6161):987-91. doi: 10.1126/science.1245079. Epub 2013 Oct 31. PMID: 24179158; PMCID: PMC3903157.

Singhrao SK, Neal JW, Rushmere NK, Morgan BP, Gasque P. Differential expression of individual complement regulators in the brain and choroid plexus. *Lab Invest.* 1999 Oct;79(10):1247-59. PMID: 10532588.

Smith T, Hewson AK, Kingsley CI, Leonard JP, Cuzner ML. Interleukin-12 induces relapse in experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Am J Pathol.* 1997 Jun;150(6):1909-17. PMID: 9176384; PMCID: PMC1858331.

Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol.* 2007 Aug 15;179(4):2600-8. doi: 10.4049/jimmunol.179.4.2600. PMID: 17675523.

Stephan AH, Madison DV, Mateos JM, Fraser DA, Lovelett EA, Coutellier L, Kim L, Tsai HH, Huang EJ, Rowitch DH, Berns DS, Tenner AJ, Shamloo M, Barres BA. A dramatic increase of C1q protein in the CNS during normal aging. *J Neurosci.* 2013 Aug

14;33(33):13460-74. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1333-13.2013. PMID: 23946404; PMCID: PMC3742932.

Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1164-78. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.036. PMID: 18083105.

Takeshita Y, Ransohoff RM. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev*. 2012 Jul;248(1):228-39. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01127.x. PMID: 22725965; PMCID: PMC3383666.

Tenner AJ, Stevens B, Woodruff TM. New tricks for an ancient system: Physiological and pathological roles of complement in the CNS. *Mol Immunol*. 2018 Oct;102:3-13. doi: 10.1016/j.molimm.2018.06.264. Epub 2018 Jun 27. PMID: 29958698; PMCID: PMC6478444.

van den Pol AN, Ozduman K, Wollmann G, Ho WS, Simon I, Yao Y, Rose JK, Ghosh P. Viral strategies for studying the brain, including a replication-restricted self-amplifying delta-G vesicular stomatitis virus that rapidly expresses transgenes in brain and can generate a multicolor golgi-like expression. *J Comp Neurol*. 2009 Oct 20;516(6):456-81. doi: 10.1002/cne.22131. PMID: 19672982; PMCID: PMC2919849.

Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol*. 1999 Nov;160(1):289-99. doi: 10.1006/exnr.1999.7199. PMID: 10630213.

Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ. Complement in the brain. *Mol Immunol*. 2011 Aug;48(14):1592-603. doi: 10.1016/j.molimm.2011.04.003. Epub 2011 May 4. PMID: 21546088; PMCID: PMC3142281.

Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaeble WJ, Keeble AH. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology*.

2010;215(1):1-11. doi: 10.1016/j.imbio.2009.08.006. Epub 2009 Sep 27. PMID: 19783065; PMCID: PMC2824237.

Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, Exiga M, Vadisiute A, Raggioli A, Schertel A, Schwab Y, Gross CT. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun*. 2018 Mar 26;9(1):1228. doi: 10.1038/s41467-018-03566-5. PMID: 29581545; PMCID: PMC5964317.

Welsh CA, Stephany CÉ, Sapp RW, Stevens B. Ocular Dominance Plasticity in Binocular Primary Visual Cortex Does Not Require C1q. *J Neurosci*. 2020 Jan 22;40(4):769-783. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1011-19.2019. Epub 2019 Dec 4. PMID: 31801811; PMCID: PMC6975301.

Werneburg S, Jung J, Kunjamma RB, Ha SK, Luciano NJ, Willis CM, Gao G, Biscola NP, Havton LA, Crocker SJ, Popko B, Reich DS, Schafer DP. Targeted Complement Inhibition at Synapses Prevents Microglial Synaptic Engulfment and Synapse Loss in Demyelinating Disease. *Immunity*. 2020 Jan 14;52(1):167-182.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2019.12.004. Epub 2019 Dec 26. PMID: 31883839; PMCID: PMC6996144.

Yuzaki M. The C1q complement family of synaptic organizers: not just complementary. *Curr Opin Neurobiol*. 2017 Aug;45:9-15. doi: 10.1016/j.conb.2017.02.002. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28219683.

Zhu H, Meissner LE, Byrnes C, Tuymetova G, Tiffit CJ, Proia RL. The Complement Regulator *Susd4* Influences Nervous-System Function and Neuronal Morphology in Mice. *iScience*. 2020 Mar 27;23(3):100957. doi: 10.1016/j.isci.2020.100957. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32179479; PMCID: PMC7075988.