

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche

Tesi di Dottorato di Ricerca in

Biologia, Patologia e Igiene Ambientale in Medicina Veterinaria

XXII ciclo – Triennio 2006-07/2008-09

**“Il recettore GFR α 1 nell’encefalo di Zebrafish
(*Danio rerio*) adulto”**

Coordinatore:

Prof. Giuseppe Paino



Tutor:

Prof.ssa Luciana Castaldo

Dott.ssa Bruna Facello

INDICE

Capitolo 1. INTRODUZIONE	5
1.1 <i>Danio rerio</i>	6
1.1.1. Utilizzo dello zebrafish come sistema modello	9
1.2 Il cervello di zebrafish: una visione d'insieme	11
1.2.1 Telencefalo	12
1.2.2. Diencefalo (incluso il sinencefalo e il pretetto)	14
1.2.3. Mesencefalo	18
1.2.4. Romboencefalo (metencefalo e mielencefalo)	21
1.2.5. Midollo spinale	25
1.3 Neurogenesi adulta e rigenerazione neuronale nell'encefalo dei teleostei	26
	29
1.4. I fattori neurotrofici	
1.4.1. Famiglia delle neurotrofine	29
1.4.2. Famiglia delle citochine neuropoietiche	30
1.4.3. Famiglia del Glial cell line-derived neurotrophic factor	31
1.4.4. I recettori della famiglia del GDNF	33
1.4.5. Il segnale indotto dal GDNF richiede i glicosaminoglicani	38
1.4.6. Target terapeutici dei GFLs	38
Capitolo 2. MATERIALI & METODI	40
2.1 Immunocitochimica	41
2.1.1. Preparazione dei campioni	41
2.1.2 Reazione di immunocitochimica in singola marcatura	42
<u>Controlli per le reazioni di immucitochimica</u>	43

2.2 RT-PCR	44
2.2.1. Estrazione dell'RNA	44
2.2.2 Retrotrascrizione dell' RNA (Reazione First-strand)	44
2.2.3 Amplificazione del cDNA (Reazione Second-strand)	45
2.3 Ibridazione <i>in-situ</i>	46
2.3.1 Clonaggio di GFRalpha 1a e GFRalpha 1b	46
2.3.2 Elettroporazione	48
2.3.3 PCR colony	48
2.3.4 Estrazione di DNA plasmidico	49
<u>Minipreparazione</u>	49
<u>Maxipreparazione</u>	49
2.3.5 Trascrizione di ribosonde	50
2.3.6 Quantizzazione delle ribosonde mediante DOT-BLOT	52
2.3.7 Ibridazione <i>in-situ</i> su cervello in toto	53
Capitolo 3. RISULTATI	58
<hr/>	
3.1 RT-PCR	59
3.2 Ibridazione <i>in-situ</i>	60
3.3 Immunocitochimica	63
3.4 Controlli	76
Capitolo 4. DISCUSSIONE	77
<hr/>	
BIBLIOGRAFIA	86
<hr/>	

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1. *Danio rerio*

Il pesce zebra o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), internazionalmente noto anche con il nome inglese zebrafish, è un teleosteo d'acqua dolce appartenente alla Famiglia *Cyprinidae*, che include altre specie quali il Goldfish (*Carassius auratus*) e la Carpa (*Ciprinus carpio*). Precedentemente lo zebrafish è stato classificato come appartenente al genere *Brachydanio*, ma nella revisione tassonomica di Barman (1991) tutte le specie appartenenti a questo genere sono state riassegnate al genere *Danio*.

Classificazione

Regno:	Animalia
Phylum:	Chordata
Classe:	Actinopterygii
Ordine:	Cypriniformes
Famiglia:	Cyprinidae
Sottofamiglia:	Danioninae
Genere:	<i>Danio</i>
Specie:	<i>rerio</i>

Il *Danio rerio*, originario del sud-est asiatico (Pakistan, India, Bangladesh, Nepal e Myanmar), vive in torrenti, canali, fossati per l'irrigazione ed acquitrini; esso è comune anche nelle acque tranquille e stagnanti, specialmente nei campi di riso. Si nutre prevalentemente di vermi, mosche, piccoli crostacei ma anche larve di insetto, tanto che in alcune zone viene usato per il controllo delle zanzare (Barman, 1991).

Il corpo del *Danio rerio* è affusolato, più formoso nelle femmine che nei maschi, con una testa di piccole dimensioni, un muso appuntito ed una bocca leggermente inclinata, sulla quale sono presenti un paio di barbigli, muniti di sensori gustativi, che pendono ventralmente e che possono essere accompagnati da un secondo paio di barbigli rostrali.

Le dimensioni si attestano sui 4-6 cm (coda esclusa), i maschi raggiungono una lunghezza massima di 5-5,5cm, con uno spessore del corpo che non supera il centimetro. Della lunghezza totale del corpo solo il 10-15% è rappresentato dalla testa.

Il dorso è di colore olivastro con la presenza di una livrea mentre il ventre è bianco argenteo. I fianchi presentano un'alternanza tra decise linee orizzontali di colore oro e blu con l'aggiunta dell'argento nelle femmine, da cui deriva il nome zebrafish.

Lo zebrafish è dotato di una pinna dorsale, una caudale ed una anale nonché di pinne pari pettorali e pelviche. Tutte le sue pinne sono sostenute da raggi molli. Il numero dei raggi è il seguente: 10 nelle pinne pettorali; 7 nelle pelviche; 8 nella dorsale; 13 nell'anale e 23 nella caudale. Tali valori possono però presentare delle variazioni individuali. La pinna caudale e la pinna anale sono striate di bianco e di blu, la dorsale è blu orlata di bianco, le altre pinne sono olivastre. Inoltre la pinna dorsale e le pinne pelviche sono spostate posteriormente in modo da permettere una rapida accelerazione durante il nuoto.

Le mascelle dello zebrafish sono prive di denti. Sono presenti invece denti faringei, disposti su 2-3 file, sul V arco branchiale, che consentono di sminuzzare il cibo nella parte posteriore della cavità oro-faringea.



Fig. 1. Zebrafish adulto

La durata di vita è di circa cinque anni e producono intorno alle 200-300 uova in un singolo processo di accoppiamento.

Nel periodo riproduttivo la femmina sviluppa una forma notevolmente appesantita dalla presenza delle uova. Dopo un vivace corteggiamento costituito da insistenti inseguimenti della femmina da parte del maschio (a volte anche da parte di due o più maschi), si verifica l'espulsione all'unisono dei prodotti sessuali, sperma e uova, con la successiva fecondazione di quest'ultime tramite fecondazione esterna.

Lo sviluppo dello zebrafish è piuttosto rapido ed avviene ad una temperatura compresa tra i 26 e i 28°C, anche se la temperatura dell'acqua dei suoi habitat naturali, che risulta essere da leggermente acida a neutra o da tenera a leggermente dura, può variare tra 25 e i 32°C.

La prima divisione di segmentazione avviene dopo $\frac{3}{4}$ d'ora dalla fecondazione e nel giro di 24 ore dopo fecondazione (hpf) lo zebrafish già mostra caratteristiche morfologiche ben distinte. La semplice osservazione al microscopio permette di riconoscere gli occhi, gli orbitali, gli otoliti, i somiti, i dotti pronefrici, i precursori delle cellule del sangue, un sistema vascolare, i placidi olfattivi e l'epifisi. Inoltre utilizzando anticorpi o marker genetici è possibile evidenziare un sistema nervoso ben organizzato e definito seppur più semplice rispetto a quello dei mammiferi.

Nel giro di 48 hpf si potrà osservare una pompa cardiaca e la dinamica delle cellule del sangue. Utilizzando marcatori molecolari opportuni si inizieranno a distinguere diversi tipi di neuroni ed un apparato gastrointestinale in formazione che potrà essere osservato morfologicamente al quinto giorno.

1.1.1. Utilizzo dello zebrafish come sistema modello

Il pesce zebra sta assumendo un ruolo sempre più predominante in ambito scientifico come uno dei sistemi modello più importanti nella biologia dello sviluppo, riconosciuto come tale dal National Institute of Health (NIH). Infatti il suo impiego ha acquistato importanza non solo nella ricerca di base, ma anche negli studi comportamentali, nella patogenesi di alcuni batteri (Neely et al., 2002; Prouty et al., 2003), nelle neurodegenerazioni (Taylor et al., 2004), nella ricerca farmaceutica e in particolare nello studio di malattie ereditarie e congenite (Ernest et al., 2000).

I vantaggi dell'utilizzo dello zebrafish come organismo modello sono i seguenti:

- piccole dimensioni (3-6cm per l'adulto), che consentono di allevare fino a 10 individui per litro d'acqua;
- fecondazione esterna, che permette un agevole studio e manipolazione dell'uovo e dell'embrione [osservazione in toto dei primi stadi di sviluppo dei vertebrati, possibilità di microiniettare RNA (gain of function e dominant negative), DNA (transgenesi) e coloranti attivabili con il laser (lineage studies)];
- grande capacità proliferativa con un breve intervallo tra una generazione e l'altra;
- trasparenza dell'embrione che consente di effettuare studi di citochimica *in toto*, come ibridazione in situ e immunolocalizzazione, e di fisiologia cellulare *in vivo*, come calcium imaging e cell specific patch clamp;
- genoma completamente sequenziato, con la conseguente possibilità di utilizzare le tecnologie della biologia molecolare e cellulare al fine di indurre mutazioni puntiformi su singoli geni, isolare mutanti, effettuare il trapianto di cellule e ed eliminare selettivamente attività geniche specifiche.

La possibilità dell'utilizzo di mutanti chimicamente indotti e di ablazioni funzionali ha portato lo zebrafish ad assumere un ruolo sempre più rilevante come sistema modello per diverse patologie umane. In particolare, la ricerca in ambito cardiovascolare ha fornito importanti informazioni sullo sviluppo del cuore e sull'angiogenesi (Lawson & Weinstein, 2002). Inoltre lo zebrafish è stato utilizzato anche in studi sull'udito (come modello per la sordità umana; Whitfield, 2002) e in ricerche condotte sull'analisi di malattie neurodegenerative quali

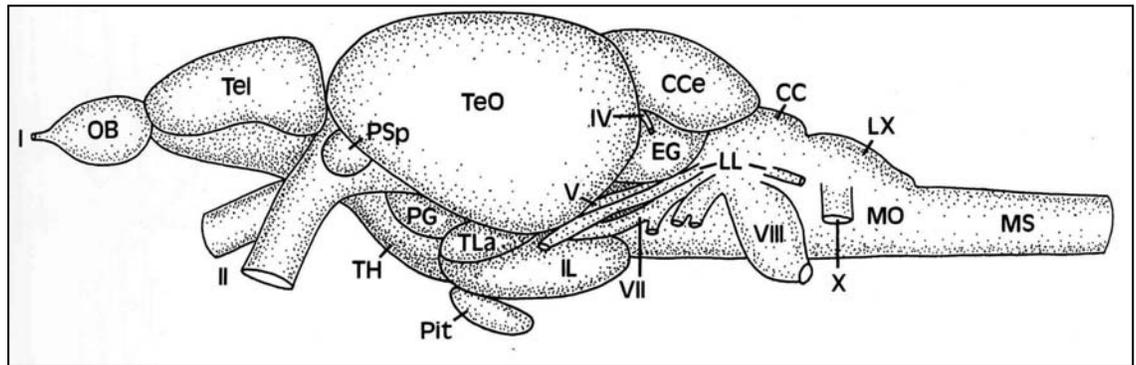
l'Alzheimer (Tomasiewicz et al., 2002), la distrofia muscolare di Duchenne e altre miopatie (Bassett & Currie, 2003).

Un ulteriore vantaggio è rappresentato dal fatto che l'allevamento dello zebrafish è più economico rispetto a quello del topo. Non solo i costi di mantenimento, ma anche le quantità di prodotto che possono essere utilizzate per effettuare le analisi, spiegano la sua forte diffusione nell'utilizzo a scopo di ricerca (Westerfield, 1999).

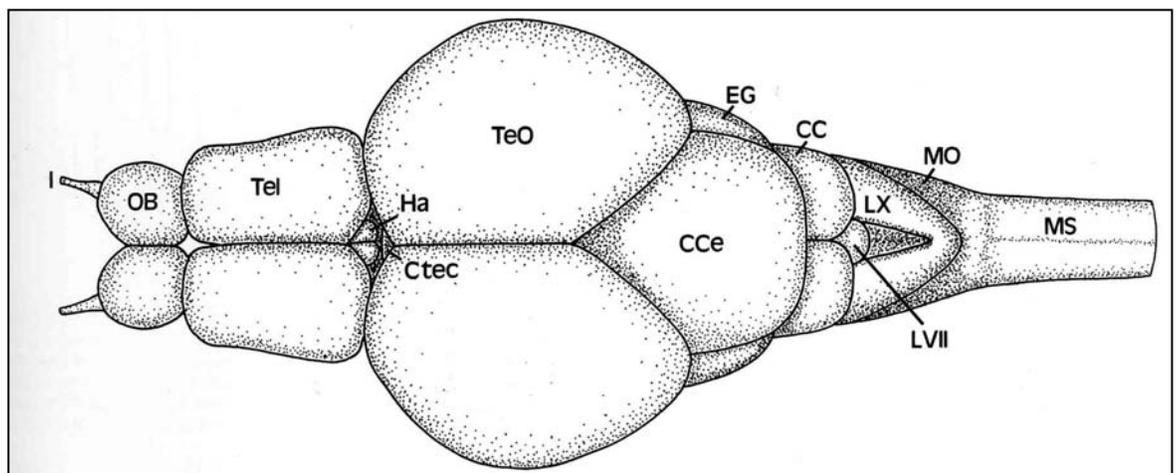
Ciò nonostante, l'utilizzo dello zebrafish come sistema modello presenta qualche svantaggio, ad esempio non dispone di metodi per effettuare il knock-out di geni tramite ricombinazione omologa e presenta una ridondanza del genoma dovuta alla probabile duplicazione genomica o subgenomica.

1.2. Il cervello di zebrafish: una visione d'insieme

In accordo con la classica suddivisione anatomica, il sistema nervoso centrale (SNC) dello zebrafish può essere ripartito, antero-posteriormente, in: telencefalo, diencefalo, mesencefalo, romboencefalo e midollo spinale. Come in tutti i teleostei, il cervello dello zebrafish è predominato dall'ampio tetto ottico del mesencefalo dorsale che riceve gli impulsi visivi primari. Inoltre nel romboencefalo sono presenti lobi vagali e facciali specifici dei ciprinidi, che ricevono impulsi gustativi dall'ampio numero di bottoni gustativi presenti in questi pesci (Wullimann et al., 1996).



**Fig. 2. Visione laterale dell'encefalo di zebrafish
(per le abbreviazioni vedi Tab. 2)**



**Fig. 3. Visione dorsale dell'encefalo di zebrafish adulto
(per le abbreviazioni vedi Tab. 2)**

1.2.1 Telencefalo

Nei teleostei, l'architettura del telencefalo (Tel) è profondamente diversa da quella degli altri gruppi di vertebrati (Nieuwenhuys & Meek, 1990) nei quali, gli emisferi telencefalici si sviluppano da un paio di evaginazioni ed ispessimenti della porzione più rostrale del tubo neuronale embrionale e ogni emisfero contiene un diverticolo laterale del ventricolo iniziale. Nei pesci Attinopterigi, ed in particolare nei teleostei (incluso lo zebrafish), la lamina del tetto del telencefalo embrionale si estende lateralmente ed in conseguenza le lamine alari pari, che formano le pareti degli emisferi, si espandono lateroventralmente con un processo chiamato eversione.

La porzione del telencefalo posta in posizione più rostrale è rappresentata dalla coppia di bulbi olfattori.

Bulbi olfattori

I bulbi olfattori (OB) formano una coppia di sporgenze adiacenti al restante telencefalo ed interconnesse con quest'ultimo attraverso due tratti secondari di fibre olfattorie: il tratto olfattorio laterale (LOT) e il tratto olfattorio mediale (MOT). Il tratto olfattorio laterale entra nell'area dorsale del telencefalo più rostralmente rispetto al tratto olfattorio mediale il cui ingresso avviene nella porzione ventrale e risulta essere più caudale.

Ogni bulbo olfattorio consiste di quattro lamine che, dalla periferia alla parte profonda, sono:

- lo strato delle fibre olfattorie primarie (POF), presente solo nella porzione rostro-ventrale dei bulbi;
- lo strato glomerulare (GL);
- lo strato cellulare esterno (ECL), incluse le grandi cellule mitrali efferenti i cui assoni formano gran parte del tratto olfattorio laterale e mediale;
- lo strato cellulare interno (ICL).

Un distinto strato di fibre olfattorie secondarie, presente in molti altri teleostei, rostrale alla formazione del tratto olfattorio laterale-mediale e compreso tra lo strato cellulare esterno e quello interno, non è evidente nello zebrafish (Wulliman et al., 1996).

Area ventrale del telencefalo

L'area ventrale telencefalica è divisa in nuclei, in posizione periventricolare, e quindi in contatto con il rivestimento ependimale mediano del ventricolo (i nuclei dorsali (Vd), ventrali (Vv), sopra commissurale (Vs) e post-commissurale (Vp) e nuclei che si sono allontanati in vario grado dal ventricolo (il nucleo centrale (Vc) e laterale (Vl), il nucleo intopeduncolare dorsale (ENd) e ventrale (ENv). Il nucleo periventricolare dorsale e ventrale è posto caudalmente alla commissura anteriore. Il nucleo dorsale è contiguo caudalmente con il nucleo sopra commissurale, che a sua volta è contiguo al nucleo post-commissurale. Un nucleo periventricolare chiamato Vn, in altri teleostei, non è presente nell'area telencefalica ventrale di zebrafish.

Nel telencefalo rostrale tra i nuclei migrati dell'area ventrale sono presenti il nucleo centrale commissurale (Vc) ed il nucleo laterale (Vl). Mentre il nucleo centrale è posto immediatamente lateralmente al nucleo dorsale, il nucleo laterale è migrato verso la periferia del cervello. Un distinto nucleo intermedio dell'area ventrale, descritto in altri teleostei come un'estensione laterale del nucleo post-commissurale, è assente nello zebrafish (Wulliman et al., 1996).

Area dorsale del telencefalo

Dorsalmente all'area ventrale del telencefalo sono situate le ampie masse cellulari dell'area dorsale del telencefalo (D). Una sottile tela coroidea che ricopre gran parte dell'area dorsale telencefalica racchiude la coppia dei ventricoli telencefalici. A partire dalla regione più rostro-caudale dell'area dorsale, quattro distinte masse cellulari, mediale (Dm), dorsale (Dd), laterale (Dl) e posteriore (Dp), circondano una zona centrale (Dc). Il solco ipsiloniforme separa l'area dorsale dalla mediale, mentre tra la zona mediale e la zona laterale dell'area dorsale non è presente un'apparente delimitazione.

Tratti telencefalici e commissure

La commissura anteriore è divisa in una porzione dorsale che giace ventralmente al nucleo sopra commissurale dell'area ventrale del telencefalo, ed una porzione ventrale che si poggia alla regione preottica dorsalmente. Nel telencefalo precommissurale, diversi fascicoli convergono rostro-caudalmente e tendono a fondersi tra di loro, formando il fascio

prosencefalico laterale (LFB). Questo è un tratto compatto situato lateralmente al fascio prosencefalico mediale (MFB) ed entrambi i tratti si estendono nel diencefalo.

Il tratto olfattorio mediale (MOT) entra ventralmente nell'area ventrale del telencefalo e decorre caudalmente, lateralmente al nucleo ventrale, a livello della commissura anteriore. Il tratto olfattorio laterale (LOT) entra nell'area dorsale del telencefalo più rostralmente e decorre lateralmente al margine ventrale della zona posteriore dell'area dorsale del telencefalo.

1.2.2. Diencefalo (incluso il sinencefalo e il pretetto)

Il diencefalo propriamente detto ha cinque divisioni principali che, nel cervello adulto, si distribuiscono secondo una successione dorsoventrale. La parte dorsale è l'epitalamo, le due parti laterali prendono il nome di talamo dorsale e ventrale; la parte ventrale comprende il tubercolo posteriore e l'ipotalamo. La cavità del diencefalo è il terzo ventricolo encefalico. Anche l'area preottica, regione intermedia tra telencefalo e diencefalo, spesso considerata come parte dell'ipotalamo, viene trattata come parte del diencefalo. Inoltre il sinencefalo, porzione intermedia tra il diencefalo dorsale e il mesencefalo, ed il pretetto vengono ascritti al diencefalo.

Area preottica

L'area preottica racchiude il ventricolo diencefalico più rostrale (DiV) e può essere suddiviso in una serie ventrale di nuclei preottici parvocellulari ed una serie dorsale di nuclei preottici magnocellulari. Il nucleo preottico parvocellulare anteriore (PPa) si estende rostralmente per posizionarsi ventralmente rispetto al telencefalo. Questo è sostituito nel diencefalo dal nucleo preottico parvocellulare posteriore (PPp). Il nucleo soprachiasmatico (SC) si trova in posizione ventro-laterale rispetto a quest'ultimo.

Dorsalmente al nucleo parvocellulare preottico posteriore emerge un nucleo magno cellulare preottico (PM), che è seguito più caudalmente dalla porzione gigantocellulare del nucleo preottico magno cellulare (PMg). Una porzione parvocellulare del nucleo preottico magnocellulare, come descritto nel goldfish (Braford & Northcutt, 1983) non è evidente dal punto di vista morfologico nello zebrafish.

Epitalamo

L'epitalamo consiste dei nuclei dorsale (Had) e ventrale (Hav) dell'abenula, e di due formazioni esterne dorsali, l'epifisi (E = organo pineale) e il sacco dorsale (SD).

Talamo dorsale

Il talamo dorsale emerge al di sotto della porzione caudale del nucleo abenulare ventrale e consiste di un nucleo anteriore (A) e due nuclei situati più caudalmente, il nucleo talamico posteriore dorsale (DP) ed il nucleo talamico posteriore centrale (CP).

Talamo ventrale

La porzione rostrale del talamo ventrale (VT), che si estende più caudalmente di quello dorsale, è posta sotto la porzione rostrale del nucleo abenulare. Il talamo ventrale è posto ventralmente al talamo dorsale solo nella sua estensione caudale.

Il talamo ventrale consiste di un nucleo intermedio (I), di un nucleo ventromediale (VM) e di un nucleo ventrolaterale (VL). Anche il nucleo rostro laterale (R) di Butler and Saidel (1991) è presente nello zebrafish.

Tubercolo posteriore

Come negli altri teleostei, nello zebrafish il tubercolo posteriore è più largo del talamo dorsale e ventrale. La sua porzione periventricolare consiste di due nuclei situati tra il talamo ventrale e l'ipotalamo, il nucleo periventricolare del tubercolo posteriore (TPp) e il nucleo tuberale posteriore (PTN), ed inoltre l'organo paraventricolare (PVO). I nuclei del tubercolo posteriore includono principalmente i nuclei preglomerulari, che sono, in sequenza dal tratto rostromediale a quello caudomediale, il nucleo preglomerulare anteriore, laterale, mediale, e caudale (PGa/PGl/PGm/PGc). Il nucleo (preglomerulare) gustativo terziario (TGN) è posizionato ventralmente al nucleo preglomerulare mediale. Ventrolateralmente al nucleo preglomerulare caudale si trova il corpo mamillare (CM), anch'esso parte del tubercolo posteriore. Nuclei addizionali del tubercolo posteriore sono considerati anche il nucleo talamico posteriore (P), il nucleo subglomeruloso (SG), e i tori laterali (TLa).

Ipotalamo

Come negli altri teleostei, l'ipotalamo dello zebrafish è di gran lunga la porzione più estesa dell'area diencefalica ed include una zona caudale, una dorsale e una ventrale. Mentre le zone ventrale e quella caudale formano gran parte della porzione tuberale mediale dell'ipotalamo (TH), la zona dorsale è ulteriormente estesa lateralmente ed include i lobi appaiati inferiori o laterali (IL) dell'ipotalamo. Questi sono separati dalla porzione tuberale dell'ipotalamo attraverso un profondo solco ventrale. Le tre zone ipotalamiche presentano primariamente masse cellulari periventricolari affiancate da nuclei migrati separati.

La zona ipotalamica ventrale con il nucleo periventricolare (Hv) si estende più rostralmente. Il nucleo tuberale anteriore (ATN) e il nucleo ipotalamico laterale (LH) sono situati lateralmente a questo. Più caudalmente, emerge la zona dorsale ipotalamica che forma i recessi ventricolari latero-caudali appaiati (LR) circondati da masse di cellule periventricolari (Hd). Presumibilmente migrati da queste masse cellulari periventricolari sono il nucleo diffuso (DIL) e il nucleo centrale (CIL) del lobo inferiore.

La zona caudale ipotalamica fuoriesce rostralmente come uno spesso nucleo periventricolare (Hv), che è situato ventralmente al nucleo tuberale posteriore del tubercolo posteriore. Più caudalmente, l'ipotalamo caudale consiste di recessi ventricolari posteriori appaiati (PR) circondati da nuclei periventricolari (Hc). L'ipofisi è ventralmente legata alla zona ipotalamica ventrale e caudale.

Nello zebrafish è assente un sacco vascoloso, visibile in molti altri teleostei, caudalmente all'ipofisi.

Sinencefalo

Seguendo le direttive di Braford e Northcutt (1983), il sinencefalo disegna una serie di strutture intermedie tra il diencefalo dorsale e il mesencefalo. Queste strutture, situate nelle vicinanze della commissura posteriore, includono il nucleo del fascicolo longitudinale mediale (NMLF), il pretetto periventricolare (PPd/PPv), il nucleo paracommissurale (PCN), e l'organo sottocommissurale (SCO).

Pretetto

Il pretetto è una delle regioni più variabili nel cervello dei teleostei (Wullimann et al., 1991). Seguendo la descrizione di Braford e Northcutt (1983), è possibile riconoscere un pretetto

periventricolare, uno centrale e uno superficiale. Il numero e la morfologia dei nuclei del pretetto superficiale e centrale nello zebrafish chiaramente rappresenta un pattern ridotto rispetto all'organizzazione del pretetto nei teleostei, in quanto il nucleo corticale come quello glomerulare sono assenti. Il pretetto superficiale è racchiuso nel tratto ottico ed include un nucleo parvocellulare (P_{Sp}) ed un nucleo magnocellulare (P_{Sm}). Il P_{Sm} è contiguo casualmente al nucleo pretettale posteriore (PO). Il nucleo pretettale centrale (CPN) si ritrova dorsalmente al P_{Sm} e al PO. Il nucleo pretettale accessorio (APN) è situato dorso-lateralmente al nucleo pretettale posteriore.

Qualche volta due nuclei addizionali sono considerati parte del pretetto: il nucleo ottico accessorio dorsale (DAO), ventralmente adiacente al P_{Sm} e al PO, e il nucleo ottico accessorio ventrale (VAO), situato più ventromedialmente. Il VAO è molto largo nello zebrafish a confronto con gli altri ciprinidi.

Tratti diencefalici e commissure

Iniziando nel telencefalo, entrambi i fasci prosencefalici, laterale e mediale, si estendono come tratti distinti nel diencefalo, quello laterale è dorsale all'area preglomerulare e quello mediale si avvicina al nucleo tuberale posteriore.

Ventralmente alla regione preottica anteriore, i nervi ottici (nervo ottico ON, II) interdigitano nel chiasmo ottico (CO) e raggiungono la zona contro laterale del cervello. Dietro il chiasma, le fibre ottiche sono convenzionalmente chiamate tratti ottici (OT), composti dal tratto ottico dorso mediale (DOT) e ventrolaterale (VOT). Il DOT corre dorsalmente lungo la superficie laterale delle regioni preottiche e talamiche verso il tetto ottico, mentre il VOT corre caudalmente lungo il margine ventrale del tetto ottico.

Il tratto pretetto-mammillare (TPM) origina nel nucleo pretettale magnocellulare superficiale e corre attraverso il nucleo pretettale posteriore per terminare nel corpo mammillare. I nuclei abenulari proiettano attraverso il fascicolo retroflesso (FR= tratto abenulo-interpeduncolare) al nucleo interpeduncolare (N_{In}; Villani et al., 1994).

La commissura abenulare corre attraverso i due nuclei abenulari dorsali.

Immediatamente caudalmente al chiasmo ottico si trova la larga commissura post-ottica (C_{pop}= commissura sopraottica). Le commissure minore e trasversale, nello zebrafish, non sono così chiaramente separate come nelle altre specie e sono incluse nella commissura post-

ottica. Ventralmente alla commissura post-ottica, la commissura orizzontale (Chor) attraversa la linea mediana nella zona ipotalamica ventrale.

I tratti che formano le commissure orizzontali decorrono caudalmente su ogni lato dell'encefalo, ventrale all'area preglomerulare, al disotto della quale queste girano prima dorsalmente per poi decorrere di nuovo rostralmente attraverso l'estremità anteriore del tetto ottico. Una terza commissura di encefalica, la commissura del tubercolo posteriore (Ctub; Herrick, 1948), si estende al nucleo puberale posteriore.

La commissura posteriore (Cpost) è situata nella regione precedentemente trattata come sinencefalo.

1.2.3. Mesencefalo

Il mesencefalo può essere considerato il centro principale del SNC dello zebrafish ed include, dorsalmente, il tetto ottico (multisensoriale), ventralmente i tori semicircolari e il tegmento.

Tetto ottico

La nomenclatura degli strati del tetto ottico è in accordo con la descrizione del tetto ottico fatta da Northcutt (1983) nel Carassio, un pesce appartenente alla Famiglia *Ciprinidae* come lo zebrafish.

Il tetto ottico (TeO) è la struttura più complessa del cervello di zebrafish. Questo può essere suddiviso in quindici strati raggruppati, dal ventricolo alla superficie esterna, in quattro zone: la zona grigia periventricolare (PGZ), la zona bianca profonda (DWZ), la zona centrale (CZ), e la zona superficiale grigia e bianca (SWGZ) (Fig. 4).

La zona grigia periventricolare è composta da 3 distinti strati:

I) uno strato ventricolare ependimale, organizzato in tre strati cellulari prevalentemente di taniciti con un corto processo apicale e con numerose ramificazioni ad angolo retto rispetto al processo apicale;

II) uno strato fascicolare, caratterizzato dalla presenza di neuroni, poco numerosi tra i quali corrono obliquamente fibre aggregate in fascicoli, che costituiscono la principale via tectale discendente ad ascendente;

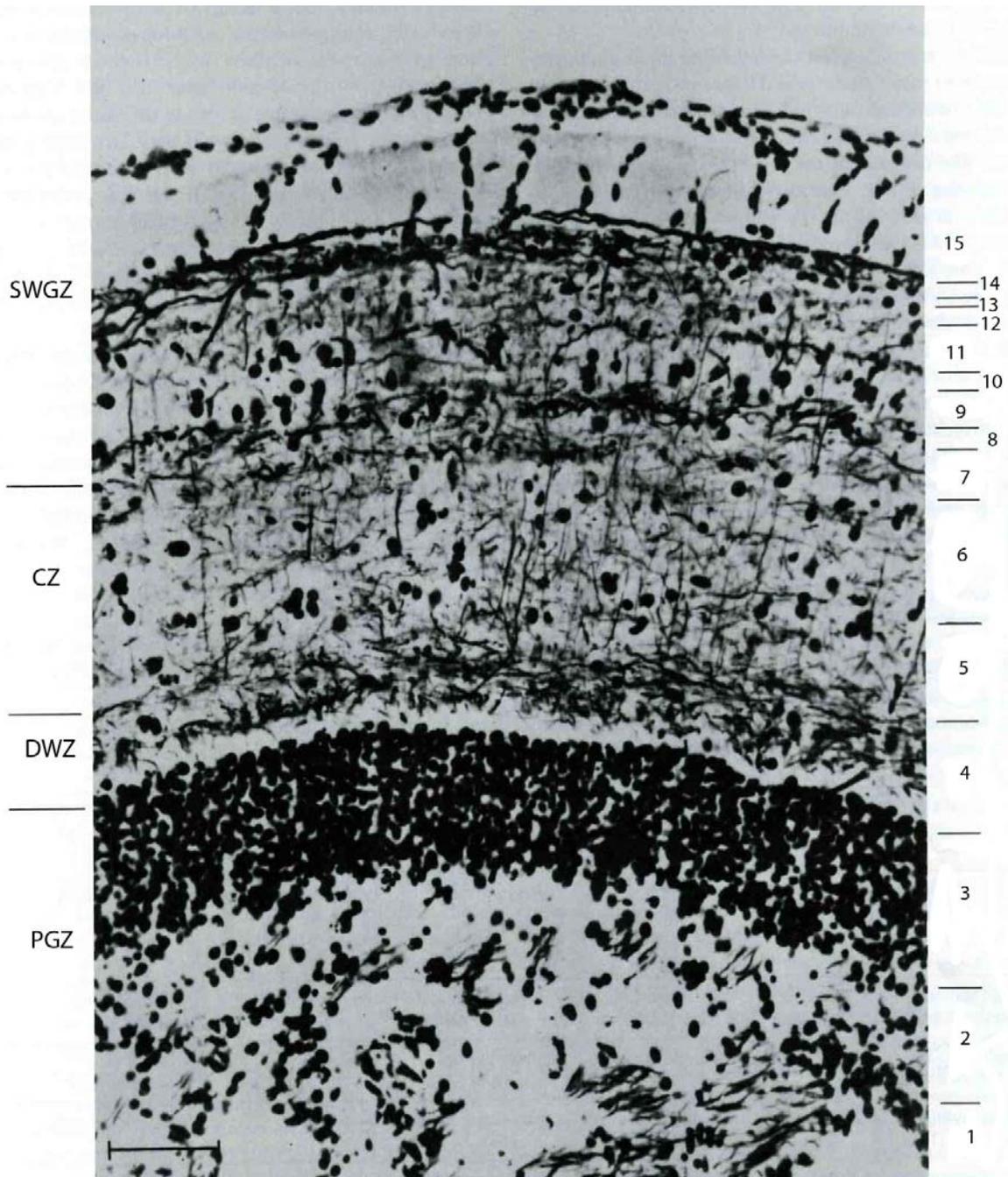


Fig. 4. Sezione trasversale del tetto ottico del Carassio, colorato attraverso il metodo Bodian. Sul lato sinistro sono indicate le quattro zone (PGZ: zona grigia periventricolare; DWZ: zona bianca profonda; CZ: zona centrale; SWGZ: zona superficiale bianca e grigia); sul lato destro sono raffigurati gli starti che compongono le singole zone. Barra d'ingrandimento = 50 μ m.

III) uno spesso strato di corpi cellulari periventricolari, costituito dal 96% dei neuroni del tetto che comprendono piccoli neuroni piriformi, grandi neuroni piriformi e rare forme di transizione. I piccoli neuroni piriformi, che sono i più numerosi, possiedono un singolo dendrite apicale che va a ramificarsi prevalentemente nella zona bianca e grigia superficiale, ma invia dendriti anche nella zona bianca profonda e/o nella zona centrale. I larghi neuroni piriformi, grandi 2/3 volte i piccoli neuroni, di solito espandono dendriti tra la zona bianca e centrale e terminano nella zona bianca e grigia superficiale. Il terzo tipo di neuroni, anch'essi di forma ovale, possiede uno o più dendriti che non raggiungono la zona bianca e grigia superficiale.

La zona bianca profonda, caratterizzata da un singolo strato (IV), è formata da fibre afferenti ed efferenti tettali e da neuroni sparsi che si possono distinguere in cellule piramidali e larghe cellule multipolari. Le cellule piramidali presentano dendriti che si ramificano nella zona bianca profonda e nella zona centrale; i neuroni multipolari, presenti in tutta la zona bianca profonda, irradiano lunghi dendriti in tutti i piani.

La zona centrale può essere suddivisa in 3 strati: uno strato profondo (V) ed uno superficiale (VII) che presentano un'alta densità di prolungamenti cellulari e fibre mieliniche; uno strato centrale (VI) con una concentrazione di fibre più bassa. I neuroni presenti sono per la maggior parte neuroni fusiformi bipolari anche se è possibile osservare neuroni piramidali e neuroni orizzontali multipolari che però sono più frequenti nella SWGZ.

La zona superficiale bianca e grigia è composta da 8 strati (dall' VIII al XV degli strati del tetto), alternati di fibre e corpi cellulari. Nello strato VIII, il più interno, si distinguono sia cellule che fibre in parte retiniche in parte di origine telencefalica. Lo strato IX è caratterizzato dalla presenza di numerosi corpi cellulari, comprendenti grandi neuroni fusiformi, piccole cellule bipolari o cellule piriformi invertite e neuroni orizzontali o "octopus", e da fibre retiniche. Nello strato X si distinguono le fibre retiniche che terminano sui dendriti delle cellule tettali. Lo strato XI contiene numerosi corpi neuronali come lo strato IX. Lo strato XII costituisce il più ampio strato di fibre retiniche che arrivano al tetto. Lo strato XIII presenta sempre un ampio numero di fibre derivanti dal diencefalo e dal telencefalo. Infine gli strati più esterni, XIV e XV, sono caratterizzati da assoni non mielinizzati provenienti da neuroni dei tori longitudinali, dai dendriti dei grandi neuroni piriformi e da ramificazioni delle cellule piriformi il cui corpo è situato nella CZ (Northcutt, 1983).

I tori longitudinali, situati nel ventricolo tettale mediale (TeV), risultano essere costituiti da cellule granulari in contatto con il tetto ottico. La commissura inter-tettale corre attraverso gli emisferi tettali.

Toro semicircolare

Il toro sensoriale semicircolare (TS) dei Ciprinidi è una struttura doppia che risulta essere costituita dal nucleo centrale (TSc) e dal nucleo ventro-laterale (TSvl). Il primo è correlato alla percezioni degli stimoli uditivi mentre il secondo è connesso con la meccanorecezione (Echteler, 1984; McCormick & Hernandez, 1996).

Tegmento

Il tegmento costituisce la porzione ventrale del mesencefalo ed ha un ruolo dominante nelle funzioni motorie. Esso infatti contiene molte strutture motorie, quali il nucleo del nervo oculomotore (NIII) e il nucleo del nervo trocleare (NIV), il nucleo parasimpatico di Edinger-Westphal (EW), il nucleo rosso (NR) e la porzione più rostrale della formazione reticolare superiore (SRF). Inoltre appartengono al tegmento anche il nucleo tegmentale rostrale ed il nucleo tegmentale dorsale (DTN/RT), il nucleo perilemnisciale (PL), il nucleo del lemnisco laterale (NLL), ed il nucleo interpeduncolare.

Il tegmento è delimitato rostralmente dal sinencefalo, dal talamo dorsale e dal tubercolo posteriore; ventralmente dell'ipotalamo; e dorsalmente dal toro semicircolare. Caudalmente il tegmento è contiguo con il midollo allungato senza una netta separazione dal punto di vista morfologico. Il nucleo interpeduncolare ed il nucleo del nervo trocleare sono spesso considerati i nuclei più caudali del tegmento.

1.2.4. Romboencefalo (metencefalo e mielencefalo)

Il romboencefalo viene spesso suddiviso in metencefalo rostrale e mielencefalo caudale. Con l'eccezione del cervelletto, la porzione ventrale del metencefalo può essere separata solo arbitrariamente dalla porzione mielencefalica più caudale, per cui è preferibile suddividere il romboencefalo in cervelletto e midollo allungato.

Cervelletto

Come in tutti i teleostei, il cervelletto dello zebrafish può essere suddiviso in tre regioni: corpo (CCe), valvola (Vam/Val) e lobo vestibololaterale (Fig. 5). In particolare, la valvola del cervelletto include una suddivisione mediale e due laterali, mentre il lobo vestibololaterale include il lobo mediale caudale (LCa) e le eminenze granulari.

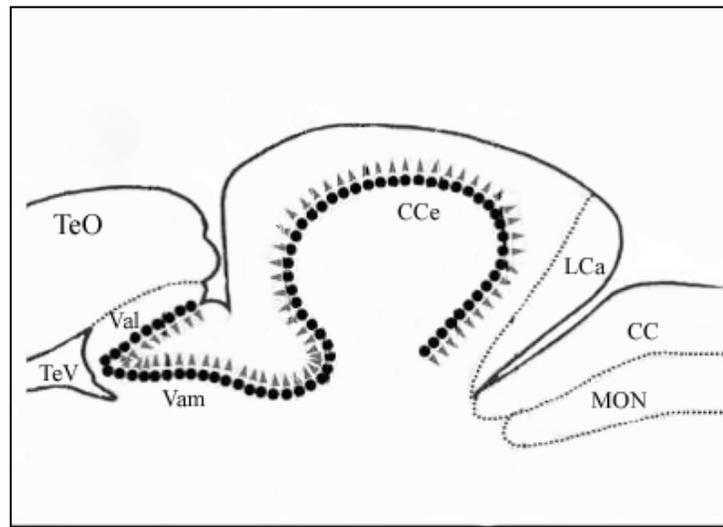


Fig. 5. Sezione sagittale del cervelletto

La struttura microscopica del cervelletto dello zebrafish differisce da quella degli altri vertebrati. Il confine tra lo strato molecolare e quello granulare non è ben definito, essendo alcune cellule dello strato granulare presenti sulla superficie della valvola e del corpo del cervelletto (Wulliman et al., 1996). I dendriti delle cellule di Purkinje si estendono in direzione della superficie del cervelletto e gli assoni invece di fuoriuscire dalla corteccia terminano localmente nelle vicinanze di neuroni efferenti (cellule euridendroidi) che sono gli equivalenti dei neuroni cerebellari nucleari presenti nei mammiferi (Meek et al., 1998). Infine il cervelletto dello zebrafish, come quello degli altri teleostei, mostra considerevoli capacità rigenerative (Zupanc, 2008).

Sebbene la valvola si estenda fino al ventricolo del tetto, le sue caratteristiche istologiche (presenza di uno strato granuloso e di uno molecolare, maggiore aggregazione tra le cellule del Purkinje e le cellule euridendroidi) e il suo contatto con il midollo allungato stabilito a livello caudale non lasciano dubbi sul fatto che questa sia parte integrante del cervelletto. Mentre sia il lobo vestibulolaterale che il corpo del cervelletto hanno un loro omologo negli altri vertebrati, la valvola del cervelletto è presente unicamente nei pesci Attinopterigi (Nieuwenhuys, 1967; Wulliman & Northcutt, 1988; 1989).

Midollo allungato

Nuclei motori e sensoriali primari

Il midollo allungato contiene i nuclei motori e sensoriali del nervo trigemino (V), abducente (VI), facciale (VII), ottavo (VIII), glossofaringeo (IX) e vago (X). I nervi anteriore e posteriore della linea laterale (ALLN/PLLN) sono separati dagli altri nervi craniali.

Due distinti nuclei motori del trigemino, sono posti uno dorsalmente al fascicolo longitudinale laterale (NVmd) e l'altro al margine ventro-laterale di questo fascicolo (NVmv). I nuclei sensoriali del trigemino descritti nello zebrafish (Puzdrowski, 1988) comprendono un nucleo più rostrale, il nucleo istmico sensoriale primario del trigemino (NVs) posto in posizione immediatamente caudale rispetto al nucleo gustativo secondario; un nucleo posto più caudalmente, a livello del margine medio-dorsale della radice discendente del trigemino (DV), è posto il nucleo sensoriale meno chiaramente delineato della radice discendente del trigemino (NDV); un terzo nucleo sensoriale del trigemino, il nucleo funicolare mediale (MFN), che emerge nella porzione terminale del midollo allungato.

Il nervo abducente ha due popolazioni di neuroni motori separate: il nucleo motorio rostrale e la sua radice (VIr) sono situati a livello della formazione reticolare superiore; il nucleo motorio caudale (NVic) con la sua radice (VIc) sono a livello della formazione reticolare intermedia. Le due radici, al di fuori del midollo allungato, si fondono e decorrono rostralmente.

La radice sensoriale del nervo facciale (VIIIs) entra nel tronco encefalico insieme al nervo anteriore della linea laterale si porta medialmente e caudalmente per terminare nel lobo facciale (LVII). Il nucleo motorio facciale (NVIIIm) è posto ventralmente alla radice sensoriale facciale e dorsalmente alla commissura ventrale romboencefalica e alla formazione reticolare intermedia.

Il nervo dell'ottavo (VIII) occupa, nel cervello dello zebrafish, un' estesa regione rostro-caudale. Cinque nuclei sensoriali primari ricevono le sue proiezioni: il nucleo anteriore, il nucleo magnocellulare, il nucleo discendente posteriore dell'ottavo, il nucleo tangenziale. I grandi neuroni del nucleo tangenziale (T) sono localizzati alla periferia del tronco encefalico, in una regione immediatamente ventrale alla porzione anteriore del nucleo dell'ottavo. Questi neuroni dalla colorazione densamente scura hanno un ampio nucleo ben distinto così come il nucleolo, e sono distribuiti in un'area di soli 100 μm . I neuroni leggermente più piccoli situati più caudalmente fanno parte del nucleo discendente dell'ottavo (DON), che è di gran lunga il sistema più grande dell'ottavo. Esso non è solamente esteso ventralmente e dorsalmente intorno alla radice dell'ottavo ma anche medialmente. La sua porzione più caudale a livello della radice del vago è nota come il nucleo posteriore dell'ottavo (PON). Il nucleo magnocellulare dell'ottavo (MaON) è posto tra il nucleo tangenziale e la porzione della radice facciale sensoriale che decorre trasversalmente. Rostralmente al nucleo magnocellulare dell'ottavo, il nucleo anteriore dell'ottavo (AON) si inarca dorsalmente intorno alla radice discendente del trigemino. Dorsalmente alle fibre arcuate interne, è presente un altro nucleo connesso all'ottavo, il nucleo secondario dell'ottavo (SO).

La radice del nervo glossofaringeo (IX) che è perifericamente in contatto con il primo arco branchiale, entra ventralmente rispetto al secondo tratto gustativo. Mentre i suoi nuclei sensoriali formano un'aggregazione cellulare (LIX) in posizione intermedia tra il lobo vagale e quello facciale, i suoi nuclei motori non formano un nucleo separato, ma sono contenuti nella colonna visceromotoria insieme ai neuroni motori del nervo vago (NXm). Il nervo vago, caratterizzato da un ampio diametro superficiale, innerva i rimanenti archi branchiali e trasporta le informazioni gustative che sono processate nel lobo vago (LX).

Nello zebrafish ci sono due nuclei sensoriali che risultano essere in relazione con i nervi della linea laterale: il nucleo ottavolaterale mediale ed il nucleo ottavolaterale caudale. L'esteso nucleo ottavolaterale mediale (MON) è posto nella porzione encefalica più dorsale sopra i nuclei dell'ottavo; esso è coperto da uno strato molecolare chiamato cresta cerebellare (CC). Il nucleo ottavolaterale caudale è più piccolo e si estende lateralmente al lobo vagale e al lobo facciale.

Formazione reticolare

La formazione reticolare romboencefalica può essere suddivisa in colonne laterali, mediali e colonna della linea mediana. Immediatamente in posizione caudale rispetto al nucleo interpeduncolare, la colonna della linea mediana include il nucleo superiore del rafe (SR) mentre il nucleo inferiore del rafe (IR) giace nella zona ventrale della linea mediana. La colonna mediale della formazione reticolare include il nucleo superiore, il nucleo inferiore ed il nucleo intermedio della formazione reticolare (SRF/IRF/IMRF). La colonna laterale della formazione reticolare include il nucleo reticolare laterale che proietta al cervelletto.

1.2.5. Midollo spinale

Il midollo spinale decorre dal foramen magnum del neurocranio per tutta la colonna vertebrale entro lo speco vertebrale delimitato dai processi neurali delle vertebre. In una sezione di midollo spinale di zebrafish, si può notare esternamente una zona “bianca” e più internamente una zona centrale “grigia” con la forma ad Y rovesciato. Al centro vi è il canale ependimale. Latero-dorsalmente e latero-ventralmente dal midollo spinale si dipartono le radici dei nervi spinali. La radice dorsale comprende fibre sensitive e una piccola componente visceromotrice. La radice ventrale comprende solo fibre motrici. Le radici dorsali e ventrali confluiscono in un nervo misto che successivamente si divide in un ramodorsale ed un ramo ventrale.

1.3 Neurogenesi adulta e rigenerazione neuronale nell'encefalo dei teleostei

Fino agli anni '90, il dogma che nuovi neuroni non si potessero formare nel cervello umano ha dominato gli studi riguardanti la neurologia ed ostacolato il progresso di nuove ricerche riguardanti la neurogenesi adulta. Infatti i neuroni erano considerati uno dei pochi tipi cellulari del corpo umano non in grado di andare incontro a riparazione dopo un insulto e che dopo le prime settimane di vita extra-uterina non era più in grado di rigenerarsi e di duplicarsi (Brain & Walton, 1969).

Le conoscenze in questo campo si sono ampliate a partire dal 1998 quando il gruppo di ricerca di Eriksson e Gage ha riportato la scoperta di nuovi neuroni nell'encefalo umano adulto (Eriksson et al., 1998). Infatti come è stato dimostrato da questo ed altri studi, la neurogenesi avviene in due aree differenti del cervello dei mammiferi, incluso quello dei primati. La prima area è localizzata nella porzione anteriore della zona sottoventricolare del ventricolo laterale, dalla quale i neuroni immaturi migrano attraverso un cosiddetto flusso migratorio rostrale nei bulbi olfattori (Luskin, 1993; Lois et al., 1996; Pencea et al., 2001; Sanai et al., 2004; Curtis et al., 2007). La seconda area è la zona sottogranulare del giro dentato, dal quale le nuove cellule migrano a breve distanza nello strato di cellule granulari dell'ippocampo (Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1999; Kornack & Rakic, 1999; Seri et al., 2001).

Tuttavia, la rigenerazione nel cervello adulto dei mammiferi è limitata poiché la maggior parte dei nuovi neuroni non si sviluppa ulteriormente e/o non sopravvive per un sufficiente periodo di tempo.

Il potenziale neurogenico va aumentando man mano che ci si sposta lungo la scala filogenetica dei Vertebrati. Nei pesci teleostei il potenziale di riparare il SNC è enorme ed include l'abilità di rigenerare sia gli assoni (rigenerazione assonale: Meyer et al., 1985; Becker et al., 1997; Doyle et al., 2001; Matsukawa et al., 2004) che i neuroni interi (rigenerazione neuronale: Zupanc & Ott, 1999; Cameron, 2000). Nello zebrafish, il tasso di proliferazione neuronale nel cervello è stato determinato attraverso l'iniezione intraperitoneale di un analogo della timidina, il 5-bromo-2'-deossipuridina (BrdU) seguita da un periodo di sopravvivenza di 30 minuti. Si è potuto verificare che approssimativamente 6000 neuroni sono nati nel periodo di 30 minuti, numero corrispondente a circa lo 0,06% della popolazione neuronale totale del cervello. Al contrario, il tasso di proliferazione neuronale nel

cervello di mammiferi adulti risulta essere almeno uno, se non due, ordini di grandezza inferiore.

Così come per l'encefalo dei mammiferi, nel cervello adulto dei teleostei la maggior parte delle cellule in mitosi si trovano, ad alte concentrazioni, in piccole e ben definite aree del cervello (zone di proliferazione). Un ampio numero di queste zone sono situate nelle vicinanze della superficie dei ventricoli. Numerosi studi hanno consentito di mappare diverse zone di proliferazione, e tra queste, attraverso analisi quantitative, il cervelletto è stato identificato come il sito di origine del maggior numero di cellule generato nel cervello adulto. Infatti, nello zebrafish, circa il 60% di cellule in fase S sono state visualizzate in diverse sottodivisioni cerebellari. In particolare, nel corpo e nelle valvole del cervelletto, il maggior numero di cellule è generato vicino alla linea mediana della regione dorsale e ventrale dello strato molecolare; inoltre cellule in mitosi sono state anche ritrovate nello strato granulare del lobo caudale mentre risultano essere assenti nell'eminenze granulari. Il restante 40% di cellule in proliferazione, è prodotto in varie regioni del telencefalo, diencefalo, mesencefalo e romboencefalo (Zupanc, 2008).

Per un'analisi comparativa con le aree dell'encefalo dei mammiferi in cui è possibile identificare la neurogenerazione (bulbi olfattori e ippocampo), due aree del cervello dello zebrafish, caratterizzate da neurogenesi, sono di grande interesse: i bulbi olfattori e la regione dorso-laterale del telencefalo. Nei bulbi olfattori è stato identificato lo 0.2% di tutte le cellule in mitosi ritrovate nel cervello adulto. Molte di queste cellule sono ripartite nello strato esterno (glomerulare), mentre solo poche sono situate nello strato cellulare interno. La regione dorso-laterale del telencefalo mostra il più ampio numero di cellule in fase S riscontrato nelle aree telencefaliche.

In parecchie aree del cervello, le nuove cellule nervose vengono fatte migrare, attraverso delle fibre gliali radiali, verso aree target specifiche dove queste si integrano con il network di cellule neuronali preesistenti. Approssimativamente la metà delle nuove cellule sopravvive per il resto della vita del pesce teleosteo, mentre l'altra metà va incontro a morte cellulare attraverso il meccanismo di apoptosi. La generazione di nuove cellule, insieme all'eliminazione di cellule danneggiate attraverso l'apoptosi, consente ai pesci teleostei una rapida e efficiente rigenerazione neuronale dopo lesioni cerebrali (Zupanc, 2008).

Analisi comparative hanno suggerito che le differenze presenti tra i teleostei ed i mammiferi nella crescita muscolare e nello sviluppo degli organi di senso rappresentano la chiave di

lettura che permette di spiegare le differenze che intercorrono nella neurogenesi adulta che si sono evolute durante lo sviluppo filogenetico delle due classi tassonomiche. Infatti nei mammiferi la crescita post-embrionale delle fibre muscolari è il risultato di un aumento in volume e non in numero delle singole fibre (Rowe & Goldspink, 1969), mentre nei pesci sia il numero di fibre totali che il volume cellulare di ogni singola fibra sono in continuo aumento (Weatherley & Gill, 1985; Koumans & Aster, 1995; Zimmerman & Lowery, 1999). Inoltre nello sviluppo degli organi di senso il continuo aumentare del numero degli elementi sensoriali nei pesci potrebbe portare alla generazione di nuovi neuroni coinvolti nel processo di recupero delle informazioni sensoriali. Questo potrebbe spiegare anche l'elevata percentuale di proliferazione presente nel cervelletto dei pesci teleostei, visto che, basandosi su studi anatomici, fisiologici e comportamentali, è stato evidenziato che il cervelletto gioca un ruolo fondamentale non solo nelle funzioni del controllo e del coordinamento dei movimenti ma anche nei processi sensoriali (Paulin, 1993; Bell et al., 1997).

1.4. I fattori neurotrofici

I fattori neurotrofici sono polipeptidi prodotti e rilasciati dal così detto “tessuto bersaglio”, ovvero tessuti innervati da popolazioni neuronali sensibili a questi fattori. Dalle terminazioni nervose i fattori neurotrofici raggiungono, tramite trasporto retrogrado, il corpo neuronale su cui esercitano un effetto trofico e di sopravvivenza durante lo sviluppo embrionale (Purves, 1986; Lindsay, 1996).

Il primo fattore neurotrofico ad essere scoperto è stato il nerve growth factor o fattore di crescita neuronale (NGF). L'NGF è una proteina segnale, costituita da 118 amminoacidi, coinvolta nello sviluppo del sistema nervoso dei vertebrati, scoperta negli anni 50 da Rita Levi Montalcini, che per circa trent'anni proseguì le sue ricerche su questa molecola proteica e sul suo meccanismo d'azione, per le quali nel 1986 è stata insignita del Premio Nobel per la medicina insieme allo statunitense Stanley Cohen.

Successivamente alla scoperta dell'NGF; altri fattori neurotrofici sono stati descritti e i loro effetti sono risultati notevolmente più ampi di quanto descritto inizialmente.

Molti dei fattori neurotrofici fanno parte di una delle seguenti tre famiglie: la famiglia delle neurotrofine; la famiglia delle citochine neuropoietiche e i ligandi della famiglia del glial cell-line derived neurotrophic factor.

1.4.1. Famiglia delle neurotrofine

Molti scienziati considerano il termine neurotrofina come un sinonimo di fattore neurotrofico, mentre altri, invece, riservano il termine “neurotrofina” per quattro fattori strutturalmente connessi fra loro: nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e la neurotrofina-4/5 (NT-4/5).

I fattori appartenenti a questa famiglia di proteine trasmettono il loro segnale all'interno della cellula grazie all'azione di due classi di recettori presenti sulla membrana plasmatica: il recettore a bassa affinità p75 e i recettori ad alta affinità “Trk”, appartenenti ai recettori tirosinchinasici. Attualmente sono noti tre recettori Trk: Trk A, Trk B e Trk C.

L' NGF risulta fondamentale per la sopravvivenza e il mantenimento dei neuroni del sistema nervoso simpatico e dei neuroni motori. L'NGF rilasciato dalle cellule target, si lega ed attiva

il suo recettore specifico, il TrkA, venendo, così, internalizzato nel neurone responsivo (Lewing & Barde, 1996)

Il BDNF, il cui recettore risulta essere il Trk B, sostiene la sopravvivenza in vitro di neuroni sensoriali derivati dalla cresta neuronale, ed è soprattutto espresso nel SNC.

L'NT-3 mostra una sequenza fortemente somigliante sia all'NGF che al BDNF e manifesta un alto grado di specificità regionale. E' espressa in un sottoinsieme di neuroni piramidali e granulari dell'ippocampo e trasmette il segnale all'interno della cellula grazie all'interazione con il recettore Trk C.

L'NT-4 fu isolato come molecola con la capacità di stimolare neuroni sensoriali in coltura. Subito dopo fu isolato un altro fattore nell'uomo e nel ratto: la neurotrofina-5 (NT-5). I seguito è stato dimostrato che la sequenza amminoacidica dell'NT-4 e dell'NT-5 risultano identiche e riflettono lo stesso gene. Il recettore specifico per queste due proteine è il Trk B.

Il recettore p75 è una glicoproteina, espressa in tessuti neuronali e non, che presenta nella regione extracellulare quattro domini ricchi di cisteine, fondamentali per l'interazione ligando-recettore, mentre la porzione intracellulare non ha funzioni enzimatiche conosciute. Tutte le neurotrofine sono capaci di creare un legame con il recettore p75, sebbene ogni fattore mostri la caratteristica di legarsi al p75 in modo leggermente differente (Chao & Hempstead, 1995).

1.4.2. Famiglia delle citochine neuropoietiche

A questa famiglia di fattori neurotrofici appartiene un ampio numero di proteine. I primi membri di questa famiglia ad essere scoperti furono il cholinergic differentiation factor (CDF; Yamamori et al., 1989), noto anche come leukemia inhibitory factor (LIF; Gearing et al., 1987), e il ciliary neurotrophic factor (CNTF; Alder et al., 1979). Queste due proteine dimostrano un'identica attività nella regolazione dell'espressione di neuropeptidi in colture cellulari di neuroni simpatici (Nawa et al., 1990) e nel supportare la sopravvivenza dei neuroni motori (Martinou et al., 1992).

Il CTNF è presente nelle cellule di Schwann (Friedman et al., 1992). La trasduzione del suo segnale all'interno della cellula avviene grazie al legame con tre differenti recettori di membrana: il recettore CNTFR α , il recettore gp130 e il recettore LIFR. Si ritiene che il CTNF

contenga tre zone di legame ognuna specifica per uno dei recettori. Queste zone sono separate l'una dall'altra sebbene l'interazione recettoriale con il fattore avvenga contemporaneamente per tutti e tre i recettori di membrana (Butte, 2001).

Il LIF è una citochina pleiotrofica che svolge differenti funzioni biologiche in diversi tessuti. Essa deve il suo nome alla sua capacità di inibire la proliferazione della linea cellulare mieloide leucemica inducendone la differenziazione, ma in realtà questo fattore regola la crescita e la differenziazione di diversi tipi cellulari quali le staminali embrionali, le cellule germinali primordiali, i neuroni periferici, gli osteoblasti, gli adipociti e le cellule endoteliali (Senturk & Arici, 1998).

Il LIF è una proteina di 180 amminoacidi, fortemente glicosilata che agisce in sinergia con altre citochine, particolarmente con l'IL-3. Il complesso recettoriale di questo fattore è composto da 2 glicoproteine transmembrana: la catena del LIFR α che è di 190 KDa e la catena β (gp 130).

Molti altri fattori appartengono alla famiglia delle citochine neuropoietiche tra i quali possono essere menzionati l'interleuchina-6 (IL-6; Rose & Bruce, 1991), l'oncostatina M (OSM; Rose & Bruce, 1991) e l'interleuchina 11 (IL-11; Yang & Yin, 1992).

1.3.3. Famiglia del Glial cell line-derived neurotrophic factor

Il Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) è un fattore neurotrofico che ha dato il nome alla famiglia dei ligandi del glial cell line-derived neurotrophic factor (GFLs), comprendente fattori che rivestono un ruolo cruciale nello sviluppo e nel funzionamento del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP) (Airaksinen, M.S. and Saarma M., 2002).

I GFLs comprendono quattro membri: il GDNF, la Neurturina (NRTN), la Persefina (PSPN) e l'Artemina (ARTN), proteine lontanamente analoghe ai membri della superfamiglia del transforming growth factor- β (TGF- β), coinvolte nella sopravvivenza, proliferazione e differenziazione di diverse popolazioni neuronali (Airaksinen & Saarma, 2002).

Il GDNF è il primo membro della famiglia dei ligandi GFLs ad essere stato caratterizzato nel 1993 dalla linea cellulare gliale B49 del ratto come fattore che per la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici del mesencefalo ventrale, ovvero di quei neuroni che vanno incontro a

degenerazione nel morbo di Parkinson (Lin et al., 1993). Sintetizzato prima come pre-pro-GDNF composto da 211 amminoacidi, successivamente viene trasformato nella forma matura di 134 amminoacidi grazie al taglio ad opera di una proteasi non ancora nota (Saarma & Sariola, 1999). Il GDNF possiede due siti di glicosilazione nella porzione N-terminale e sette residui di cisteina altamente conservati tra i membri della famiglia del TGF- β (Lin et al., 1993).

La seconda proteina, di questa famiglia di ligandi, ad essere stata descritta è la Neurturina, originariamente identificata come una proteina che promuoveva la sopravvivenza dei neuroni simpatici nel ratto (Kotzbauer et al., 1996). La pre-pro-NTN è composta da 195 amminoacidi, mentre la forma matura risulta essere composta da 100 amminoacidi con un'omologia di sequenza del 42% con il GDNF (Kotzbauer et al., 1996).

Il terzo fattore appartenente a questa famiglia è la Persefina. La pre-pro-PSPN è costituita da 156 amminoacidi mentre la PSPN matura contiene 96 amminoacidi e risulta essere mancante della porzione N-terminale rispetto al GDNF. La PSPN presenta identità di sequenza al GDNF e alla NTN per circa il 40% e anche questa come le altre due proteine presenta i sette residui di cisteine nella porzione N-terminale.

Il quarto ed ultimo elemento della famiglia è l'Artemina, una proteina di 113 amminoacidi con un'omologia di sequenza del 45% con la NTN e la PSPN, mentre solo del 36% con il GDNF (Saarma & Sariola, 1999), che conserva i sette residui di cisteina N-terminali.

Come il GDNF, così anche la NTN, la PSPN e l'ARTN, sono attivate come omodimeri, e quindi per promuovere la trasduzione del segnale all'interno della cellula sarà necessaria l'interazione di due molecole proteiche. Le attività biologiche di questi ligandi sono mediate da un complesso recettoriale che consiste di un componente ad alta-affinità legato alla membrana plasmatica attraverso una glicosil-fosfatidilinositolo ancorante (GPI), il recettore α della famiglia del GDNF (GFR α), ed un componente comune transmembrana, il recettore tirosinchinasico Ret (Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996) (Fig.6).

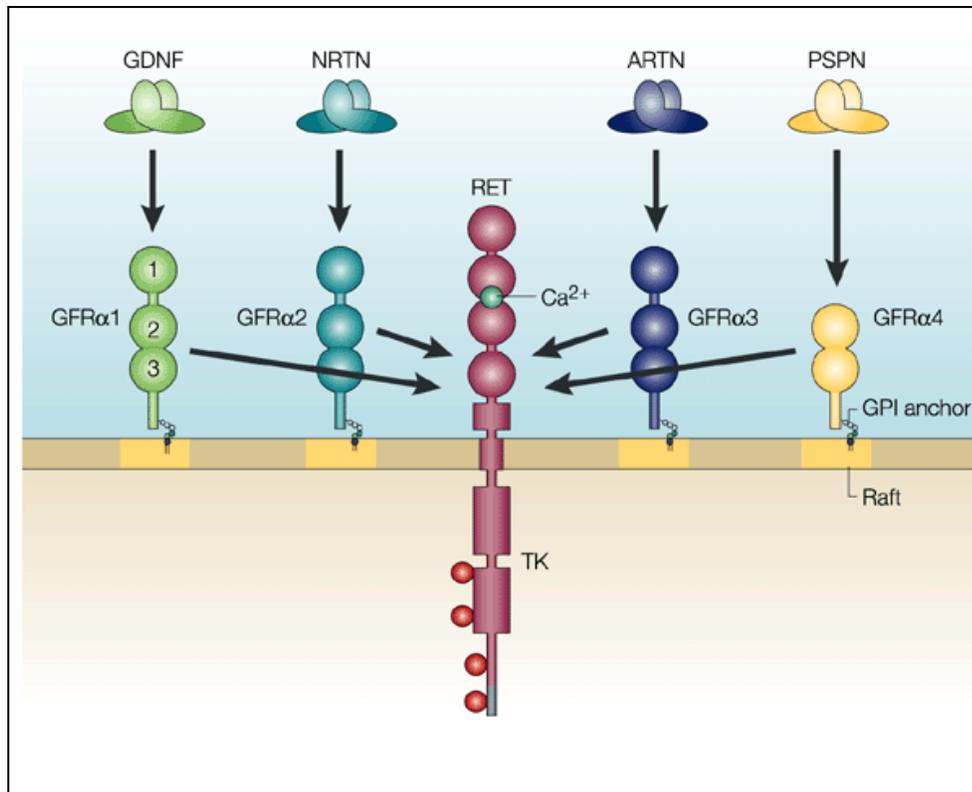


Fig. 6. Rappresentazione schematica dell'interazioni tra i ligandi della famiglia del GDNF ed i rispettivi recettori (Airaksinen & Saarma, 2002)

1.3.4. I recettori della famiglia del GDNF

Il recettore RET

Originariamente identificato come oncogene attivato dai riarrangiamenti del DNA nel 1985 (Takahashi et al., 1991), il proto-oncogene è stato individuato in diversi tessuti neuronali e non. Il proto-oncogene RET, localizzato sul cromosoma 10q11.2, codifica per una proteina transmembrana a passaggio-singolo, la proteina RET. Tale proteina, nella porzione extracellulare, contiene quattro domini caderina-like, uno dei quali lega degli ioni Ca^{2+} essenziali per l'attivazione del recettore RET ad opera dei GFLs, e nella porzione intracellulare contiene un tipico dominio tirosina chinasi (Kjaer & Ibanez, 2003).

Il recettore RET può essere alternativamente sottoposto a splicing, producendo tre isoforme, che differiscono solo nella loro porzione carbossi-terminale:

- RET 51, isoforma proteica lunga formata da 1114 amminoacidi;
- RET 43, isoforma proteica intermedia formata da 1106 amminoacidi;
- RET 9, isoforma proteica corta formata da 1072 amminoacidi.

Le isoforme proteiche più espresse sono RET 51 e RET 9 (Myers et al., 1995). Queste due isoforme presentano delle differenze dal punto di vista biochimico, in particolare nella sequenza di amminoacidi immediatamente a valle della tirosina Y1062. RET 9 ha 9 residui extra, mentre RET 51 è caratterizzato da un'estensione di 51 amminoacidi che presenta due siti di fosforilazione, Y1090 e Y1096. I processi di fosforilazione in queste due isoforme non risultano essere gli stessi. Infatti, in RET 9 si verifica frequentemente la fosforilazione dei residui di tirosina in posizione Y905 e Y1062, mentre per RET 51 il sito di tirosina maggiormente fosforilato è Y1015 (Tsui-Pierchala et al., 2002). Attraverso sperimentazioni su linee selezionate murine, che presentano selettivamente soltanto una delle isoforme, è stato dimostrato che solo il RET 9 è fondamentale per la normale morfogenesi del rene e per lo sviluppo del sistema nervoso enterico. Infatti, topi mancati dell'isoforma lunga del recettore sembrano essere normali, mentre topi mancati dell'isoforma corta hanno anomalie renali e aganglionosi enterica (de Graaf et al., 2001).

I recettori GFR α

Sono note 4 diverse subunità di recettori GFR α , ognuna delle quali lega preferenzialmente un differente membro della famiglia di GFLs (Baloh et al., 1998a; Buj-Bello et al., 1997; Jing et al., 1997; Klein et al., 1997; Masure et al., 2000; Naveilhan et al., 1998; Thompson et al., 1998; Trupp et al., 1998; Worby et al., 1998). GDNF, NRTN, ARTN e PSPN legano rispettivamente il recettore GFR α 1, GFR α 2, GFR α 3 e GFR α 4 (Fig. 6). Il GDNF lega preferenzialmente il GFR α 1 (Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996), ma in vitro può anche legare e mediare il segnale attraverso il co-recettore GFR α 2, la subunità α che lega preferenzialmente la neurturina (Baloh et al., 1997; Creedon et al., 1997; Sanicola et al., 1997).

I recettori GFR α 1, GFR α 2 e GFR α 3 sono caratterizzati dalla presenza di tre domini globulari ricchi di cisteine, mentre il recettore GFR α 4 è composto da solo due domini (Fig. 6).

Tutti e quattro i recettori GFR α sono proteine costituite da un dominio N-terminale idrofobico ed una regione C-terminale di circa venti amminoacidi, anch'essa idrofobica. L'assenza di un dominio idrofilico in posizione C-terminale è dovuta al fatto che queste proteine, normalmente, sono legate alla membrana plasmatica attraverso una GPI, in corrispondenza dei rafts lipidici, ma il clivaggio ad opera di una fosfatasi o proteasi sconosciuta può produrre le forme solubili di questi recettori (Airaksinen & Saarma, 2002).

Nel 2001 Shepherd e i suoi collaboratori hanno identificato e sequenziato, in embrioni di zebrafish, gli ortologi GFR α 1a e GFR α 1b, che codificano per proteine con un'alta similarità di sequenza (identità dell'87.7%) con gli omologhi di pollo, topo ed uomo. In particolare il GFR α 1a dello zebrafish presenta un'omologia dell'81.2%, 79.4% e 78.5%, mentre il GFR α 1b dell'80.8%, 78% e 78% con i geni omologhi GFR α 1 del pollo, del topo e dell'uomo rispettivamente.

Pathways di segnale mediati dal RET

Il complesso GFL-GFR α legandosi alla porzione extracellulare del recettore RET promuove l'attivazione del dominio tirosin-chinasico intracellulare.

In accordo con il modello originale, il GDNF in forma dimerica prima si lega alla forma dimerica o monomerica del GFR α 1, e dopo il complesso GDNF-GFR α 1 interagisce con due molecole del recettore RET, così inducendo la loro dimerizzazione e l'autofosforilazione dei residui di tirosina.

L'autofosforilazione della porzione intracellulare attiva diverse cascate di segnale che regolano la sopravvivenza cellulare, il differenziamento, la proliferazione, la migrazione, la chemiotassi, la ramificazione di abbozzi di organi (morfogenesi dei tessuti epiteliali ramificati), lo sviluppo delle terminazioni nervose e la plasticità sinaptica. Il pathway delle MAP chinasi potrebbe essere coinvolto nella ramificazione ureterale durante la nefrogenesi (Fisher et al., 2001), nella crescita del neurite e nella sopravvivenza neuronale (Kaplan & Miller, 2000).

Il pathway della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) è cruciale sia per la sopravvivenza neuronale che per lo sviluppo delle terminazioni nervose.

Il pathway della fosfolipasi $C\gamma$ (PLC- γ) regola il livello intracellulare degli ioni Ca^{2+} aumentando il livello di inositolo (1,4,5)-trifosfato.

Il segnale indotto dal GDNF causa un aumento anche delle chinasi della famiglia Src, che promuovono sviluppo delle terminazioni nervose, sopravvivenza neuronale e ramificazione ureterale (Airaksinen & Saarma, 2002). In molti casi i domini tirosinici Tyr905, Tyr1015, Tyr1062 e Tyr1096 del RET vengono fosforilati, ma dopo l'aumento dei livelli di AMP ciclico, anche la Ser696 viene fosforilata. La fosforilazione della proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA) della Ser696 è importante per l'attivazione Rac GDNF-indotta e per la formazione dei lamellipodia (Fukuda et al., 2002). Il recettore RET contiene altri residui tirosinici addizionali che sono fosforilati al momento del legame con i GFL (Tyr687, Tyr826 e Tyr1029), ma il ruolo di questi durante la trasduzione del segnale dei GFL rimane oscura.

NCAM è il secondo recettore di segnale dei GFLs

Un enigma sorto durante le ricerche svolte per analizzare il meccanismo di trasduzione del segnale da parte del GDNF è stato la diffusa espressione delle proteine $GFR\alpha$ in molti tessuti senza la co-espressione del recettore RET.

Il GDNF sicuramente segnala indipendentemente dal RET attraverso il $GFR\alpha 1$, infatti, in linee cellulari mancanti del recettore RET, il GDNF innesca ugualmente l'attivazione della famiglia delle Src chinasi, la fosforilazione dell' ERK/MAP chinasi, della PLC- γ e del fattore di trascrizione CREB e l'induzione di Fos (Poteryaev et al., 1999; Trupp et al., 1999).

In molte e diverse aree del sistema nervoso, i recettori $GFR\alpha$ sono altamente espressi dove il recettore RET è assente (Airaksinen & Saarma, 2002; Sariola & Saarma, 2003). Quindi, le discrepanze di espressione tra il recettore RET e i $GFR\alpha$ hanno indotto diversi gruppi di ricerca ad esplorare intensamente la possibilità dell'esistenza di recettori addizionali per i GFLs che segnalano cooperativamente con i recettori $GFR\alpha$ ma indipendentemente dal recettore RET.

Nel 2003, il recettore NCAM è stato identificato come un recettore di segnale alternativo per i GFLs (Paratcha et al., 2003). In assenza delle proteine $GFR\alpha$, i GFLs interagiscono con il recettore NCAM con una bassa affinità. Quando il recettore $GFR\alpha 1$ è associato al NCAM, il GDNF si lega al $p140^{NCAM}$ con alta affinità ed attiva nel citoplasma le chinasi Fyn Src-like e la focal adenosina chinasi FAK (Paratcha et al., 2003).

Una caratteristica distintiva del $GFR\alpha$ è la sua abilità di agire come regolatore negativo dell'interazione omofilica del recettore NCAM in assenza del GDNF (Paratcha & Ledda, 2008). Infatti, l'associazione del $GFR\alpha 1$ con il recettore NCAM inibisce l'adesione cellulare NCAM-mediata se il GDNF non è presente. L'abilità del $GFR\alpha 1$ di modulare l'adesione cellulare NCAM-mediata, anche in assenza del GDNF, suggerisce ruoli indipendenti per il complesso $GFR\alpha 1$ -NCAM e GDNF- $GFR\alpha 1$ -NCAM nella trasduzione del segnale (Sariola & Saarma, 2003).

Questi risultati indicano che i GFLs e i recettori $GFR\alpha$ interagiscono insieme o da soli con il recettore NCAM, usando differenti pathways di segnale per modulare comunicazioni intercellulari sia a corto- che a ampio-raggio, con la capacità di influenzare importanti processi biologici durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico (Paratcha & Ledda, 2008) (Sariola & Saarma M., 2003).

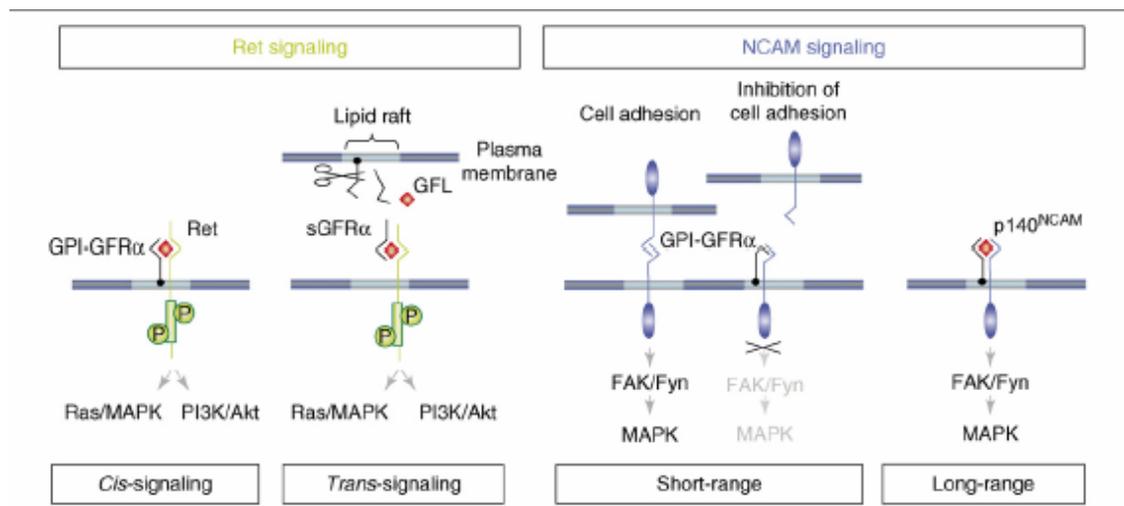


Fig. 7. Rappresentazione schematica della trasduzione del segnale ad opera dei GFLs attraverso il recettore RET e il recettore p140^{NCAM}

1.3.5. Il segnale indotto dal GDNF richiede i glicosaminoglicani.

Recenti dati indicano che il segnale indotto dal GDNF è più complesso di quanto si supponeva in origine. In particolare, si è visto che richiede la presenza dell'eparina solfato dei glicosaminoglicani in aggiunta ai noti GFR α 1 e RET (Barnett et al., 2002; Tanaka et al., 2002). Senza eparina solfato non avvengono la fosforilazione del RET GDNF-dipendente e la crescita assonale GDNF-indotta (Barnett et al., 2002). Perciò, è logico ipotizzare che l'eparina solfato dei proteoglicani, così come dei sindecani, concentra il GDNF a livello della membrana plasmatica nelle vicinanze del GFR α e del RET, e svolge un ruolo importante nella trasduzione del segnale ad opera del fattore neurotrofico.

Questa teoria è anche supportata dal fatto che concentrazioni molto alte di GDNF spesso attivano il recettore RET in cellule impoverite in superficie dell'eparina solfato (Barnett et al., 2002). Inoltre, topi mancati dell'eparina solfato 2-solfotransferasi, enzima essenziale nella sintesi dell'eparina solfato, mancano dei reni (Barnett et al., 2002). Questi topi hanno un fenotipo molto interessante; la gemma ureterale invade il mesenchima del metanefro ma non si verifica la ramificazione della gemma, che è un processo GDNF-dipendente. Come ulteriore dimostrazione del ruolo svolto dall'eparina solfato dei glicosaminoglicani nella trasduzione del segnale, l'analisi molecolare ha mostrato che questi topi non possono mantenere l'espressione del GDNF e del RET nei reni (Bullock et al., 1998).

1.3.6. Target terapeutici dei GFLs

Da quando la Dr.ssa Lin e i suoi collaboratori (1993) hanno isolato il GDNF e dimostrato che questo promuove la sopravvivenza e la differenziazione morfologica dei neuroni dopaminergici, molti laboratori hanno concentrato la loro attenzione sull'utilizzo del GDNF, dal punto di vista terapeutico, nel trattamento di varie patologie del SNC, incluso l'ictus (Kitagawa et al., 1998), lesioni del midollo spinale (Li et al., 1995), lesioni traumatiche a carico dell'encefalo (Kim et al., 2001) e malattie neurodegenerative come il morbo Parkinson (Tomac et al., 1995; Gash et al., 1996) e la sclerosi laterale amiotrofica (ALS; Sagot et al., 1996).

Studi condotti nei mammiferi hanno dimostrato che il GDNF, così come il BDNF (brain derived neurotrophic factor), viene sintetizzato nello striato, esercitando un effetto trofico sui

neuroni dopaminergici della sostanza nigra, area ventrale tegmentale, striato e nucleo accumbens (Glazner et al., 1998). Nel morbo di Parkinson si osserva una riduzione del GDNF nella sostanza nigra e del BDNF nello striato (Chauhan et al., 2001; Mogi et al., 2001). Queste considerazioni suggeriscono che i fattori neurotrofici ed i loro recettori contribuiscono al disordine del sistema dopaminergico sia nella malattia di Parkinson che nell'invecchiamento. Inoltre, topi eterozigoti per il $GFR\alpha 1$ hanno mostrato una precoce riduzione dell'attività motoria e dopaminergica della sostanza nigra e, ancora, una più elevata concentrazione di dopamina extracellulare (Zaman et al., 2008). In aggiunta, la somministrazione di GDNF in primati non umani riduce il danno neuronale dopaminergico associato a lesione acuta o all'invecchiamento (Zhang & Pardridge, 2008). Molti trials clinici, compiuti su animali da laboratorio, hanno dimostrato che questo fattore neurotrofico ha effetti neuro-protettivi e neuro-riparatori sui neuroni dopaminergici (Yasuhara et al., 2007).

Inoltre è stato descritto che il GDNF promuove la sopravvivenza dei motoneuroni centrali acquistando, così, un'importanza clinica per il trattamento dell'ASL (Henderson et al., 1994) e recenti risultati hanno messo in evidenza il ruolo svolto dal GDNF nel controllo della tossicodipendenza (Airavaara et al., 2004) e dell'alcolismo (He et al., 2005).

Non solo per il GDNF ma anche per gli altri ligandi della famiglia è stato analizzata la loro influenza nel trattamento delle patologie neurodegenerative. Infatti, ci sono studi che evidenziano il ruolo della Neurturina nella cura del morbo di Parkinson e dell'epilessia (Horger et al., 1998). La Neurturina, promuovendo la sopravvivenza dei neuroni colinergici del proencefalo basale (Golden et al., 2003) e dei motoneuroni spinali (Garcès et al., 2001), risulta avere anche un potenziale nel trattamento terapeutico dell'Alzheimer e dell'ASL. L'Artemina è utilizzata nel trattamento del dolore cronico (Gardell et al., 2003) mentre la Persefina, come la Neurturina, è coinvolta nella cura dell'Alzheimer (Golden et al., 2003) e nel trattamento dell'ictus (Tomac et al., 2002).

Capitolo 2

MATERIALI & METODI

2.1. Immunocitochimica

2.1.1 Preparazione dei campioni

Per l'indagine immunocitochimica sono stati utilizzati sei zebrafish adulti di entrambi i sessi e di età compresa tra i sei mesi ed un anno, prelevati dalla nostra colonia di animali. Tutti i protocolli sperimentali, utilizzati per questa tesi, sono stati condotti secondo le direttive europee dell'European Communities Council del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) ed approvati dai comitati istituzionali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Prima di procedere alla fissazione dei tessuti, gli zebrafish sono stati anestetizzati con 0,1 % di etil 3- aminobenzoate, metanosulfonate (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA). Dopo il taglio a livello del margine posteriore dell'opercolo per separare il corpo dalla testa, si è provveduto alla fissazione di quest'ultima attraverso immersione in liquido di Bouin (tab. I) per 24-48 ore a temperatura ambiente (t.a.). Quindi i campioni sono stati disidratati in una serie ascendente di alcool (dall'etanolo a 70° fino all'etanolo assoluto) ed immersi in metilbenzoato per 48 ore. Successivamente sono stati tenuti in benzene per 30 min a t.a., poi in una soluzione di benzene e paraffina con un rapporto 1 : 1 per 30 min. a 62°C ed infine in paraffina pura in stufa sottovuoto, sempre a 62°C, per consentire meglio la penetrazione della paraffina nel campione, con due cambi di 1 ora ciascuno. I campioni opportunamente orientati in blocchetti di paraffina sono stati lasciati a solidificare a t. a..

Successivamente i campioni così inclusi sono stati tagliati al microtomo per ottenere sezioni trasversali, sagittali ed orizzontali di 7 µm di spessore. Quest'ultime sono state montate su vetrini porta-oggetto, con albumina glicerinata e lasciate ad essiccare mediante incubazione in stufa a 37° per una notte. Alcune sezioni sono state colorate con ematossilina eosina e luxol fast blue al fine di ottenere informazioni generali sulla morfologia del cervello di zebrafish. Le altre sezioni sono state trattate con metodica di immunoistochimica secondo il Sistema EnVision in singola marcatura.

2.1.2 Reazione di immunocitochimica in singola marcatura

Sistema EnVision

Le reazioni di immunocitochimica in singola marcatura sono state eseguite usando il metodo EnVision + System-horseradish anti-perossidasi (HRP) (Dako, Santa Barbara, CA, USA, cod. K4002). Questo sistema si basa sull'utilizzo di un polimero HRP labelled coniugato con una IgG goat anti-rabbit.

Le sezioni, dopo essere state deparaffinate in xilolo e reidratate in serie discendente di etanolo (da 100° fino a 70°), sono state trattate con H₂O₂ per 20 min. a t.a., per bloccare le perossidasi endogene, e poi incubate in camera umida a 4°C per 24 ore con il seguente antisiero primario diretto contro il recettore GFR α 1. L'anticorpo policlonale utilizzato è stato ottenuto in coniglio ed è diretto contro gli amminoacidi 368-437 che mappano vicino all'estremità carbossi-terminale del GFR α 1 di origine umana (H-70, sc-10716; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). L'anti GFR α 1 è stato diluito con tampone salino fosfato (PBS) (pH 7.4) contenente lo 0.2% di TritonX-100, 0.1% di sieralbumina bovina e il 4% di siero normale di capra (NGS) (VECTOR Lab. Inc., Burlingame, CA, USA, cod. S1000), per evitare colorazione aspecifica di fondo. Le sezioni, lavate in PBS (tre lavaggi da 5 min. ognuno), sono state successivamente incubate con l'EnVision per 30 min. a t.a. Dopo ulteriori lavaggi in PBS, le sezioni sono state trattate con una soluzione fresca di 10 μ g di 3,3-tetraidroclore di diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA, cod. D5905) in 15 ml di Tris buffer a 0.5M a pH 7.6, contenente 1.5 ml di 0.03% H₂O₂, al fine di visualizzare i siti immunoreattivi. Si è scelto come cromogeno la DAB perché i vetrini colorati con tale cromogeno possono essere disidratati, montati con i metodi convenzionali e conservati a lungo, perché il prodotto di reazione colorato è insolubile in acqua o alcool.

Le colorazioni di immunocitochimica sono state fotografate con il microscopio Leica DM Ra2 (Leica Camera AG, Solms, Germany) collegato ad una camera Leica DC300 F. Le immagini ottenute sono state conservate in archivio Leica IM 1000.

Controlli per le reazioni di immunocitochimica

La specificità delle reazioni di immunocitochimica è stata testata con successive sostituzioni di ciascun componente della reazione, quali l'anticorpo primario, l'anticorpo secondario, En Vision con il PBS o il siero normale.

Controlli di adsorbimento sono stati effettuati incubando l'anticorpo per il GFR α 1 con l'antigene omologo (25 μ g/ml; GFR α 1 H-70, sc-10716; Santa Cruz Biotechnology) e gli antigeni eterologhi (50 μ g/ml; GFR α 2, sc-28953 P; GFR α 3, sc-28954 P; GFR α 4, sc-46987 P; Santa Cruz Biotechnology).

2.2 RT-PCR

2.2.1 Estrazione dell'RNA

L'RNA totale, a partire da cervelli di venti zebrafish adulti non fissati, è stato estratto attraverso il reagente TRIzol seguendo il protocollo raccomandato dalla ditta produttrice (Invitrogen). Brevemente, dopo una prima fase di omogenizzazione del tessuto (50-100 mg) in 1 ml di reagente TRIzol, con la rimozione del materiale insolubile dall'omogenato mediante centrifuga del campione a 4°C per 10 min. a 12,000 revolution per minuto (rpm), è stata eseguita la separazione che permette di concentrare l'RNA solo nella fase acquosa della soluzione (il volume di questa fase corrisponde al 60% del volume iniziale del reagente TRIzol utilizzato). Trasferita questa fase in un tubo sterile da 1.5 ml, è stata eseguita la precipitazione aggiungendo 0.5 ml di alcool isopropilico e centrifugando il campione per 15 min. a 4°C a 12,000 rpm. L'RNA così precipitato, invisibile prima della centrifuga, forma un pellet gelatinoso sul fondo della provetta. Una volta effettuati i lavaggi del precipitato con etanolo a 75%, il campione è stato risospeso in 100 µl di H₂O Rnasi-free o DEPC (1000 ml di H₂O distillata + 1 ml di dietilpirocarbonato allo 0.1%) e conservato a -80°C.

2.2.2 Retrotrascrizione dell' RNA (Reazione First-strand)

Gli RNA purificati sono stati utilizzati per realizzare la sintesi del primo filamento di cDNA con il kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” della Invitrogen secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

La sintesi del primo filamento di cDNA è stata effettuata su 3 µg di ciascun campione di RNA utilizzando 100 ng di esanucleotidi a sequenza casuale (*random examers*) in un volume finale di 20 µl. Per denaturare gli RNA, ciascun campione viene incubato a 65°C per 5 min. in presenza degli esanucleotidi (100ng/10µl) e dei desossiribonucleotidi (1mM) e successivamente incubato in ghiaccio per almeno 1 minuto. Ad ogni campione vengono quindi addizionati 9µl della miscela di reazione costituita da un tampone opportuno, MgCl₂, DTT e un inibitore di ribonucleasi. Si incuba questa miscela 2 min. a 25°C, si aggiunge ad ogni campione 1 µl (50 unità) di retrotrascrittasi SuperScript™II e quindi i campioni vengono incubati per ulteriori 10 min. a 25°C. In questo modo si permette l'*annealing* degli

oligonucleotidi a sequenza casuale sullo stampo di RNA. I campioni vengono quindi incubati prima per 50 min. a 42°C per effettuare la sintesi del cDNA e poi per 15 min. a 70° C per terminare la reazione. I campioni vengono infine trasferiti in ghiaccio, addizionati di RnasiH e incubati 20 min. a 37°C in modo da rimuovere l'RNA stampo. Dopo la retrotrascrizione i campioni possono essere conservati a -20°C.

2.2.3 Amplificazione del cDNA (Reazione Second-strand)

Per l'amplificazione dei frammenti specifici tramite PCR, sono stati sintetizzati primers sulla base della sequenza del cDNA del GFR α 1a [forward primer, 5'-ATGTTTATCGCCGCGATTACATCA -3', e reverse primer, 5'-TCAAGCAGTTGGGTCTCTCCTT -3', che amplificano un frammento di 800 paia di basi (bp)] e del GFR α 1b (forward primer, 5'-CGTACCAATGAGCCCTGAATA -3', e reverse primer, 5'-CAGCACCAAGTACCGCACTA -3', che amplificano un frammento di 760 bp).

La PCR è stata effettuata in un volume finale di 25 μ l contenenti TE buffer 10X (tab. I), 1.25 U di Taq DNA polymerase, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M di ogni dNTP, 0.4 μ M di ogni primer, and 1 μ l di cDNA templatato ottenuto attraverso la reazione di trascrizione inversa.

La miscela di reazione è stata sottoposta a 1 ciclo iniziale di denaturazione a 95°C. per 5 min.; 32 cicli di amplificazione, ciascuno di 1 minuto di denaturazione a 94°C., 1 minuto di annealing a 50°C., in accordo alla composizione dei primers, ed 1 minuto di estensione a 72°C.; 1 ciclo finale di estensione di 5 min. a 72°C.

I prodotti di PCR (10 μ l) sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% in tampone TAE 1X (Tris-acetato-EDTA; vedi tab. I) a 120 Volts per 20-30 min. Per evidenziare la presenza dei frammenti amplificati nell'agarosio in fase liquida sono stati aggiunti 3 μ l d'Etidio di Bromuro. Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato letto tramite lampada ad UV. Il rimanente della miscela è stato conservato a 4°C.

Come controllo positivo è stato amplificato, in tandem con i campioni sperimentali di RNA, l'mRNA del gene della *β -actina* espresso costitutivamente utilizzando una coppia di primers specifici (forward primer, 5' - CTGGGATGACATGGAGAAGA - 3' e reverse primer, 5' - CTTGATGTCACGCACGATTT - 3', che amplificano un frammento di 406 bp).

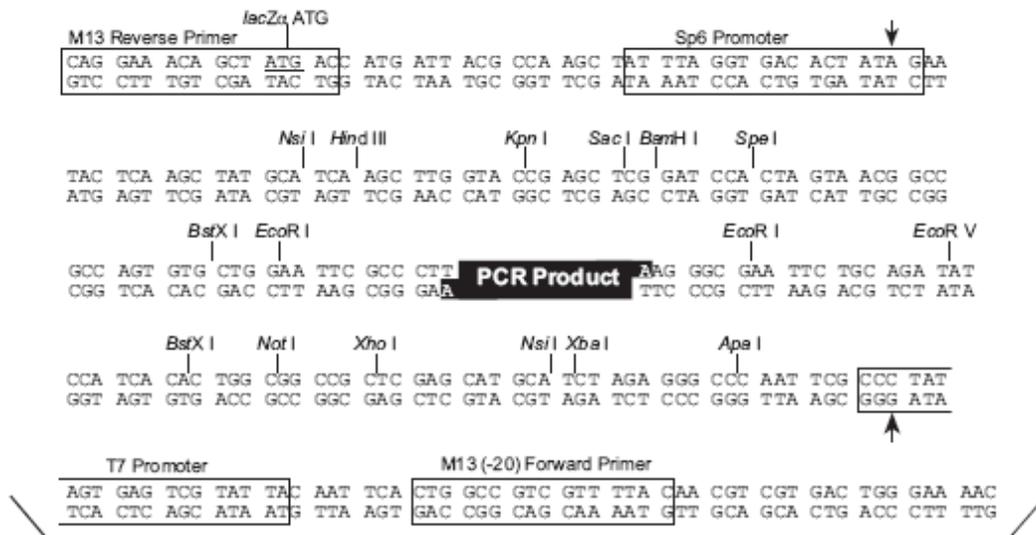
Come controllo negativo, sono state eseguite reazioni di PCR contenenti i singoli componenti della miscela precedentemente descritta (inclusi i primers specifici per GFR α 1a e GFR α 1b) ma mancanti del c-DNA templato.

2.3 Ibridazione *in situ*

2.3.1 Clonaggio di GFR α 1a e GFR α 1b

I prodotti di PCR del GFR α 1a (800 bp) e del GFR α 1b (760 bp) sono stati clonati nel vettore pCR[®]II-TOPO[®] (TOPO-TA Cloning[®] Kit Dual Promoter pCR[®]II-TOPO[®]; Invitrogen), che prevede il trattamento del DNA con polimerasi con attività adenilante in 3' (la PLATINUM *pfx* DNA polymerase ha attività 3' e 5' esonucleasica, perciò aggiunge e rimuove adenina). Per confermare la loro identità gli inserti sono stati sequenziati e confrontati con le sequenze specifiche presenti in GenBank.

Il clonaggio è stato effettuato in un volume finale di 8 μ l contenenti 1 μ l di TOPO Cloning, 2 μ l di prodotto PCR, 1 μ l di soluzione salina e 4 μ l di H₂O sterile, e la miscela di reazione è stata incubata a 37°C per 30 min..



Comments for pCR®II-TOPO®
3973 nucleotides

- LacZα* gene: bases 1-589
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- Sp6 promoter: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 269-383
- T7 promoter: bases 406-425
- M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
- f1 origin: bases 590-1027
- Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
- Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
- pUC origin: bases 3178-3851

Fig. 8. Mappa del plasmide pCR®II-TOPO®

2.3.2 Elettroporazione

Una volta preraffreddate le cuvette a -20°C , a queste è stata aggiunta la miscela composta da 50 μl di cellule competenti di *E.coli* “TOP” 10 e 2 μl della reazione TOPO-TA cloning. Quindi è stata eseguita l'elettroporazione. Questa consiste in una repentina scarica elettrica a 1.7 V operata in cuvette che racchiudono cellule batteriche competenti e molecole di DNA in una sospensione liquida. La scarica apre simultaneamente la membrana plasmatica in numerosi punti, provocando la formazioni di pori che consentono alle molecole di DNA di penetrare nella cellula batterica. Successivamente alla miscela sono stati addizionati 800 μl di brodo di coltura Luria-Bertani (LB) ed il tutto è stato incubato a 37°C in agitazione per 1 ora. Aliquote scalari da 5, 100 e 200 μl sono state piastrate su terreno solido (LB agarizzato) con l'aggiunta di Ampicillina, opportuno antibiotico di selezione nei confronti del quale il plasmide risulta essere resistente. Le piastre sono state incubate in stufa a 37°C per 16 ore.

2.3.3 PCR colony

La PCR colony consiste in una reazione di PCR che permette di discernere rapidamente le colonie batteriche che hanno incorporato il plasmide contenete l'inserto specifico attraverso la metodica di elettroporazione.

Per ogni colonia da analizzare è stata preparata una miscela di reazione composta dai seguenti reagenti: 5 μl di tampone di sintesi 10X (tab. I), 3 μl 25mM MgCl_2 , 1 μl di 10 mM dNTPs, 1 μl 20 μM di ciascun primer (la coppia di primers risulta essere specifica per l'inserto clonato), 0.2 μl di Taq polimerasi e 38 μl di H_2O DEPC per un volume finale di 50 μl .

La miscela di reazione, contenente le colonie, è stata sottoposta a 1 ciclo iniziale di denaturazione a 95°C . per 5 min.; 30 cicli di amplificazione, ciascuno di 1 minuto di denaturazione a 95°C ., 1 minuto di annealing a 50°C ., in accordo alla composizione dei primers, ed 1 minuto di estensione a 72°C .; 1 ciclo finale di estensione di 5 min. a 72°C . I prodotti di PCR (10 μl) sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% in tampone TAE 1X (Tris-acetato-EDTA; tab. I). Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato letto tramite lampada ad UV.

Individuate le colonie batteriche positive, è stata eseguita una mini preparazione di DNA plasmidico da inoculi corrispondenti preparati in precedenza in 4 ml di brodo di coltura LB (contente 0.1 µg/ml di ampicillina) incubati a 37°C per 16 ore, in agitatore.

Al termine del periodo di incubazione dai 4 ml del brodo di coltura LB, 3 ml vengono utilizzati per la minipreparazione e 1 ml per la maxipreparazione del DNA plasmidico.

2.3.4 Estrazione di DNA plasmidico

Minipreparazione

Per estrarre e purificare il DNA plasmidico in piccola scala dalle colture delle cellule batteriche competenti, è stato adoperato il QIAprep Spin Miniprep Kit seguendo il protocollo raccomandato dalla ditta produttrice (Qiagen).

3 ml provenienti dal brodo di coltura LB, sono stati centrifugati per 15 min. a 13000 rpm a 4°C, in modo da creare sul fondo della provetta il pellet di cellule batteriche. Successivamente, una volta allontanato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 250 µl di tampone P1 (tab. I) e 250 µl di tampone P2 (soluzione di lisi; tab. I). Quindi alla soluzione così ottenuta sono stati aggiunti 350 µl di tampone N3 (tab. I), che permette la precipitazione dei residui presenti nel campione (DNA cromosomico, proteine denaturate, detriti cellulari e SDS), separando così il DNA plasmidico che, essendo di piccole dimensioni, si rinatura e rimane sospeso in soluzione. Una volta recuperato, il surnatante è stato caricato su una colonnina cromatografica *QIAprep*, contenente una resina di silice con un'affinità selettiva per il DNA, e centrifugato per 1 minuto a 13000 rpm a 4°C. Per lavare la resina sono stati aggiunti ad ogni colonnina 750 µl di tampone PE e il tutto è stato nuovamente centrifugato sempre per 1 minuto a 13000 rpm a 4°C. Infine il DNA plasmidico è stato eluito aggiungendo 500 µl di H₂O sterile ed è stato conservato a -20°C.

Maxipreparazione

Per estrarre e purificare il DNA plasmidico in ampia scala, a partire dalle colture delle cellule batteriche competenti, è stato adoperato il QIAprep Spin Miniprep Kit seguendo il protocollo raccomandato dalla ditta produttrice (Qiagen).

A 1 ml del brodo di coltura LB, previamente diluito in glicerolo 1 : 1 e conservato a -80°, sono stati aggiunti 250 ml di LB liquido insieme a 250 µl di Ampicillina ed è stato incubato in

agitazione per 16 ore a 37°C. Quindi il terreno è stato centrifugato per 20 min. a 13000 rpm a 4°C e, una volta allontanato il surnatante, al pellet sono stati addizionati 12 ml di tampone P1 e 12 ml di tampone P2 (la composizione di P1 e P2 è la stessa delle soluzioni usate per la preparazione in piccola scala). La soluzione così ottenuta è stata fatta riposare per 5 min. a temperatura ambiente per poter far avvenire la reazione di lisi, che poi è stata fermata con l'aggiunta di 12 ml di tampone P3 (KOAc 3M pH 5,5), che risulta avere la stessa funzione del tampone N3 nella preparazione in piccola scala. Quindi il campione è stato centrifugato per 20 min. a 2500 rpm a 4°C. Il surnatante contenente il DNA plasmidico è stato caricato su una colonna cromatografica a scambio anionico QIAGEN tip-500, precedentemente equilibrata con 10 ml di soluzione QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, isopropanolo 15%, Triton X-100 0,15%) e la cui apertura è stata ricoperta da più strati di garza che fungono da filtro (il passaggio attraverso la colonna avviene per gravità.). Una volta filtrato il surnatante la resina della colonna cromatografica è stata lavata con il tampone QC (NaCl 1 M, MOPS 50 mM, isopropanolo 15%) con due passaggi da 30 min. ognuno. Il DNA plasmidico è stato eluito aggiungendo alla colonna 15 ml di tampone QF (NaCl 1,25 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,25, isopropanolo 15%). Il DNA è stato poi precipitato con 0,7 volumi di isopropanolo e sottoposto a centrifugazione a 10.000 rpm per 30 min.. Infine il *pellet* di DNA è stato lavato con etanolo al 70% e, dopo aver fatto evaporare l'alcool residuo, è stato risospeso in un volume opportuno di acqua.

2.3.5 Trascrizione di ribosonde

Le ribosonde a RNA coniugate con la Digossigenina per il recettore GFRalpha1a sono state sintetizzate a partire dai templati linearizzati con *Not I* (vedi schema ●) usando T3 RNA polimerasi per la sonda antisenso, e linearizzati con *Spe I* (vedi schema ■) usando T7 RNA polimerasi per la sonda senso.

Le ribosonde a RNA coniugate con la Digossigenina per il recettore GFRalpha1b sono state sintetizzate a partire dai templati linearizzati con *BamH I* (vedi schema *) usando T7 RNA polimerasi per la sonda antisenso, e linearizzati con *Not I* usando Sp6 RNA polimerasi per la sonda senso.

● Digestione con *Not I*

Reagenti	Concetrazone finale
Buffer H (Roche) 10X	1X
Enzima <i>Not I</i> (Roche) 10U/μl	1 U/1μg DNA

Incubare 3 h a 37°C

■ Digestione con *Spe I*

Reagenti	Concetrazone finale
Buffer H (Roche) 10X	1X
Enzima <i>Spe I</i> (Roche) 10U/μl	1 U/1μg DNA

Incubare 3 h a 37°C

* Digestione con *BamH I*

Reagenti	Concetrazone finale
Buffer B (Roche) 10X	1X
Enzima <i>BamH I</i> (Roche) 10U/μl	1 U/1μg DNA

Incubare 3 h a 37°C

I prodotti di linearizzazione, sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1% per verificare che la reazione sia avvenuta correttamente. Dopo aver aggiunto Proteinasi K (50 μg/ml) ed SDS all'1% per eliminare eventuali proteine contaminanti, le soluzioni sono state incubate a 45°C per 30 min. Quindi sono stati effettuati due passaggi di estrazione, il primo con fenolo/cloroformio/alcool isoamilico in rapporto 25 : 24 : 1 ed il secondo con cloroformio/alcool isoamilico in rapporto 24 : 1. La precipitazione del DNA plasmidico è stata ottenuta aggiungendo alle soluzioni sodio-acetato (0.3 M, pH 5.2) e 2.5 volumi di etanolo assoluto a -80°C per 30 min. Infine il *pellet* di DNA è stato lavato con etanolo al 70% e, dopo aver fatto evaporare l'alcool residuo, è stato risospeso in un volume opportuno di acqua.

A partire dai linearizzati le ribosonde sono state sintetizzate utilizzando il kit DIG-RNA “labeling” seguendo il protocollo raccomandato dalla ditta produttrice (Roche).

La trascrizione delle ribosonde è stata effettuata in un volume finale di 18 µl contenenti 1 µg di DNA plasmidico linearizzato, 2 µl di miscela di NTP 10X (tab. I), 2 µl di tampone di trascrizione 10X (tab. I), 1 µl di inibitore delle RNasi (20 U/µl). A questi sono stati aggiunti 2 µl di RNA polimerasi, che varia in base alla sonda da sintetizzare (T3 e T7 per GFRalpha1a; T7 ed SP6 per GFR alpha1b), ed H₂O DEPC per portare a volume. La miscela in un primo momento è stata incubata a 37°C per due ore per poi essere reincubata a 37°C per 10 min. dopo l’aggiunta di 2 µl di DNasi I (10 U/µl) nella reazione per eliminare il DNA stampo. Infine la reazione è stata bloccata aggiungendo 2 µl di EDTA 0.2 M pH 8 e conservata a -80°C.

2.3.6 Quantizzazione delle ribosonde mediante DOT-BLOT

Per poter quantizzare le ribosonde ottenute tramite il kit di trascrizione DIG-RNA “labeling” (Roche), è stato utilizzato il metodo DOT-BLOT che prevede lo spot su membrana di quantità scalari delle ribosonde da testare e di un campione di RNA controllo di riferimento. Una volta spottate le diluizioni scalari ed indotto il cross-link delle ribosonde sulla membrana, quest’ultima è stata lavata in tampone MBT (45 ml; tab. I) con l’aggiunta di Blocking solution al 10% (5 ml) in rapporto 5 : 1. Quindi la membrana è stata incubata con l’anticorpo anti-DIG (digossigenina) coniugato con la fosfatasi alcalina (AP) con una diluizione 1 : 5000 per un’ora a t.a. in agitazione. Dopo due lavaggi da 15 minuti ognuno in MBT (10-15 ml), le membrane sono state incubate in staining solution [10 ml di tampone AP (tab. I), 35 µl di NBT (100 mg/ml) e 35 µl di BCIP (50 mg/ml)] su ghiaccio al buio per 10 min.. Infine per bloccare la colorazione le membrane sono state lavate con acqua corrente ed asciugate con carta 3MM. Le concentrazioni delle ribosonde sono state calcolate confrontando le loro diluizioni con quelle del campione controllo di riferimento a concentrazione nota.

2.3.7 Ibridazione *in-situ* su cervello in toto

I cervelli estratti da dodici zebrafish di entrambi i sessi sono stati fissati in paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS per 16 ore a 4°C, lavati più volte (lavaggi da 10 min.) in PBS 1X e disidratati in metanolo a gradazioni crescenti, per poter essere conservati a -20°C prima di essere processati.

L'ibridazione *in-situ* sui cervelli estratti e fissati è stata eseguita seguendo il protocollo *maleico*.

Il primo giorno di ibridazione i cervelli sono stati reidratati con passaggi scalari da metanolo al 75% fino al 25% ed infine trasferiti in PBT 100% (tab. I). I campioni sono stati trattati per 20 min. in Proteinasi K (10 µg /ml in PBT), per denaturare le proteine e permettere meglio la penetrazione della sonda. La reazione indotta dalla Proteinasi K è stata bloccata sciacquando ripetutamente i cervelli in PBT. Quest'ultimi sono stati successivamente post-fissati in PFA al 4% in PBS per 20 min. a t.a. e sciacquati in PBT a t.a. (4 lavaggi da 5 min. ognuno). Quindi i campioni sono stati pre-ibridati per almeno un'ora nel tampone di pre-ibridazione (tab. I) alla temperatura richiesta dalla sonda che deve essere ibridata (65°C per GFRalpha1a e 62°C per GFRalpha1b). Successivamente alle soluzioni di pre-ibridazione sono stati aggiunti 200 ng di sonda, denaturata a 96°C per 10 min., ottenendo una soluzione di ibridazione in cui è stato incubato il campione alla temperatura di ibridazione, per 16 ore.

Il secondo giorno di reazione i cervelli sono stati lavati due volte per 30 min. in tampone di ibridazione, ed in successione in diluizioni scalari (75%, 50% and 25%) di tampone di ibridazione e 2X SSC con lavaggi da 5 min., in SSC 2X per 10 min. ed infine in SSC 0.2X per 30 min, alla temperatura richiesta dalla sonda. Successivamente, una volta che la temperatura della soluzione ha raggiunto la t.a., i cervelli sono stati lavati in 10mM piperazina-N,N'-bis (2-acido etanosulfonico) (PIPES) (pH 7.5), in cloruro di sodio 0.5 M (NaCl) per 10 min., due volte in MBT per 5 min.. Quindi i campioni sono stati incubati per almeno un'ora in MBT + il 2% Roche Blocking Reagent a t.a. e poi incubati in MBT + il 2% Roche Blocking Reagent fresco con l'anticorpo anti-digossigenina coniugato con la fosfatasi alcalina (AP-antiDIG) diluito 1 : 5000 a 4°C per 16 ore.

Il terzo giorno di reazione, dopo 4 lavaggi da 5 min. ognuno in MBT a t.a. in agitazione, un lavaggio in MBT+0.1% Tween-20 da 30 min. a t.a. ed un lavaggio in Tris-HCl pH 9.5 0.1M and 0.1% Tween-20 sempre da 30 min., ai campioni sono stati aggiunti 500 µl di NTMT (tab.

I) per 30 min per poi essere sostituiti dalla soluzione di colorazione, il BM Purple, un substrato cromogeno per la fosfatasi alcalina, seguendo il protocollo raccomandato dalla ditta produttrice (Roche Applied Science; Indianapolis, IN). L'attività del cromogeno è stata poi bloccata con un lavaggio di 10 min. in PBT 1X + EDTA 0.2 mM.

Successivamente i cervelli sono stati fissati in PFA al 4% in PBS 1X e conservati a -20°C.

Le colorazioni dell'ibridazione *in situ* sono state fotografate con il microscopio Stemi 200-C Zeiss collegato ad una macchina fotografica digitale Canon Power Shot A620.

La specificità delle reazioni di ibridazione *in-situ* è stata verificata utilizzando contemporaneamente alla sonda anti-senso anche la sonda senso sia per il recettore GRFalpha1a che per il recettore GFRalpha1b.

Tabella I

Soluzioni per l'immucitochimica

Liquido di Bouin

Soluzione acquosa satura di acido picrico 15ml

Formalina al 10% 5 ml

Acido acetico glaciale 1 ml

PBS (Tampone Fosfato Salino)

NaCl 200mM

KCl 3mM

Na₂PO₄ 10mM

KH₂PO₄ 2mM

Soluzioni per PCR

Tampone TAE 10X

Tris 48.4g

0.5M EDTA (pH 8.0) 20 ml

Acido acetico glaciale 11.42 ml

Tampone TE 10X

Tris-HCl (pH 8.0) 10mM

EDTA 1mM

Soluzioni per l'elettroporazione

LB: mezzo di Luria-Bertani (1lt)

Tryptone 10 g
Yeast Extract 5 g
NaCl (pH 7.2) 10 g
per terreno solido agar 1.5%

Soluzioni per PCR colonyTampone di sintesi

KCl 500 mM
Tris-HCl (pH 9.0) 100 mM,
Triton X 100 1.0 %

Soluzioni mini- e maxi-preparazioneTampone P1

Tris-HCl (pH 8) 50mM
EDTA 10Mm
RNasiA 100 mg/ml

Tampone P2

NaOH 0.2mM
SDS 1%

Tampone P3

Potassio Acetato (pH 4.8) 2.55M

Tampone QBT

NaCl 0.75M
MOPS pH 7 50Mm
Etanolo 15%
Triton X-100 0.15%

Tampone QC

NaCl 1M
MOPS (pH 7) 50Mm
Etanolo 15%

Tampone QF

NaCl 1.25 M
MOPS (pH 8.2) 50mM
Etanolo 15%

Soluzioni per la trascrizione delle ribosondeTampone di trascrizione

Tris-HCl (pH 8.0) 400mM

MgCl₂ 60mM

DTT 100mM

Spermidina 20mM

Soluzioni per la trascrizione e quantizzazione delle sondeTampone NTP (Nucleotidi Trifosfati)

ATP 10mM

CTP 10mM

GTP 10mM

UTP 6.5mM

DIG-UTP 3.5mM

MBT

Acido malico (pH 7.5) 0.1M

NaCl 0.1M

Tampone AP

NaCl 100mM

MgCl₂ 60mM

Tris-HCl (pH 9.5) 100mM

Blocking Solution

PBT 1X

sheep serum 2%

BSA 2mg/ml

Soluzioni per l'ibridazionePBT

PBS 1X

Tween-20 0.1%

Tampone di pre-ibridazione

Formammide 50%

SSC 1.3X

Yeast RNA 50 µg/ml

Eparina 100 µg/ml

Tween-20 0.2%

EDTA (pH 8.0) 5mM

CHAPS 0.5%

Tampone di ibridazione

Formammide 50%
SSC 1.3X
Yeast RNA 50 µg/ml
Eparina 100 µg/ml
Tween-20 0.2%
EDTA (pH 8.0) 5mM
CHAPS 0.5%
Sonda marcata con digossigenina 200ng/ml

NTMT

Tris-HCl (pH 9.5) 100mM
NaCl 100mM
MgCl₂ 50mM
Tween-20 1%
Portare a volume con H₂O

Capitolo 3

RISULTATI

3.1 RT-PCR

Trascritti dell'mRNA di GFR α 1a e GFR α 1b sono stati osservati negli estratti di cervello di zebrafish adulto attraverso una RT-PCR standard. Per GFR α 1a è stata amplificata una banda di 800 bp (Fig. 9) mentre per GFR α 1b è stata amplificata una banda di 760 bp (Fig. 10). L'identità nucleotidica dei frammenti amplificati per GFR α 1a e GFR α 1b (identità del 100% con la sequenza del GFR α 1a dello zebrafish identificata dal codice AF329854 per il primo frammento; identità del 100% con la sequenza del GFR α 1b dello zebrafish identificata dal codice AF329855 per il secondo frammento) è stata verificata attraverso analisi di BLASTN e di BLASTP sulla sequenza completa e non-ridondante presente in GenBank.

Inoltre come controllo positivo, sugli stessi campioni di cervello utilizzati per ricercare la presenza dei trascritti specifici, è stato amplificato anche un frammento di 406 bp dell'mRNA del gene della β -actin espresso costitutivamente (Fig. 9, 10).

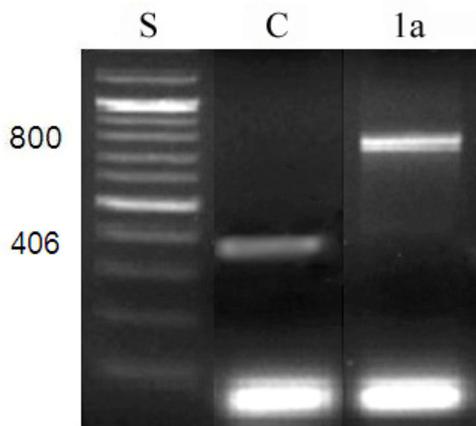


Fig. 9. Elettroforesi del prodotto di RT-PCR del gene GFR α 1a. (S) Marcatore di peso molecolare (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); (C) frammento di 406 bp del c-DNA della β actina; (1a) frammento specifico di 800 bp del c-DNA del gene GFR α 1a.

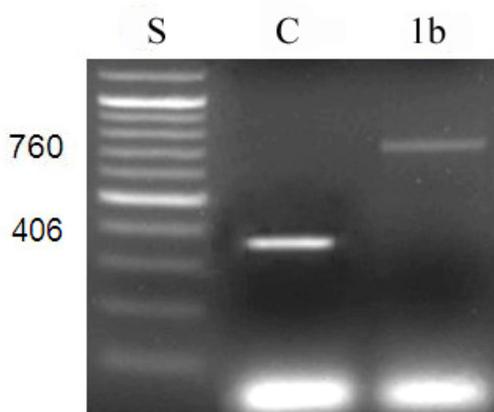


Fig. 10. Elettroforesi del prodotto di RT-PCR del gene GFR α 1b. (S) Marcatore di peso molecolare (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); (C) frammento di 406 bp del c-DNA della β actina; (1a) frammento specifico di 760 bp del c-DNA del gene GFR α 1b.

3.2 Ibridazione *in-situ*

Mediante studi di ibridazione *in-situ* è stato analizzato il livello di espressione degli mRNA dei due geni ortologhi, *GFR α 1a* e *GFR α 1b*, in cervelli di zebrafish adulto.

E' stato possibile evidenziare che entrambi i geni risultano essere ampiamente espressi nell'encefalo di zebrafish, con un'intensità di segnale variabile da dominio a dominio.

Nel telencefalo, una positività moderata a *GFR α 1a* e *GFR α 1b* è stata osservata nei bulbi olfattori (Fig. 11B, 12B). Nell'area dorsale telencefalica entrambi i geni risultano essere espressi con un'intensità marcata, in particolare il *GFR α 1a* presenta un'espressione ristretta alla zona dorso-mediale (Fig. 11A), mentre il *GFR α 1b* risulta essere espresso non solo nella zona dorsale (Fig. 12A), ma anche in quella laterale (Fig. 12B) e posteriore (Fig. 12A,B). Inoltre nell'area ventrale telencefalica, è stata evidenziata un'intensa positività al singolo ortologo *GFR α 1b* nella zona ventro-laterale (Fig. 12C).

Nel diencefalo, è stata rilevata un'alta intensità di segnale per entrambi i geni nella parte posteriore dell'area preottica (Fig. 11B, 12C) e nella zona ventrale e caudale dell'ipotalamo periventricolare (Fig. 11B, 12C,D). Inoltre nel nucleo diffuso del lobo inferiore dell'ipotalamo risulta essere espresso solo *GFR α 1a* (Fig. 11B), mentre *GFR α 1b* presenta positività nella zona dorsale dell'ipotalamo periventricolare (Fig. 12C, D).

Nel romboencefalo, entrambi gli mRNA sono espressi con un'intensità moderata nel lobo vago (Fig. 11A, 12A) e nell'oliva inferiore del midollo allungato (Fig. 11B, 12C), mentre solo l'ortologo *GFR α 1b* ha presentato positività, anche se abbastanza debole, nel cervelletto (Fig. 12A).

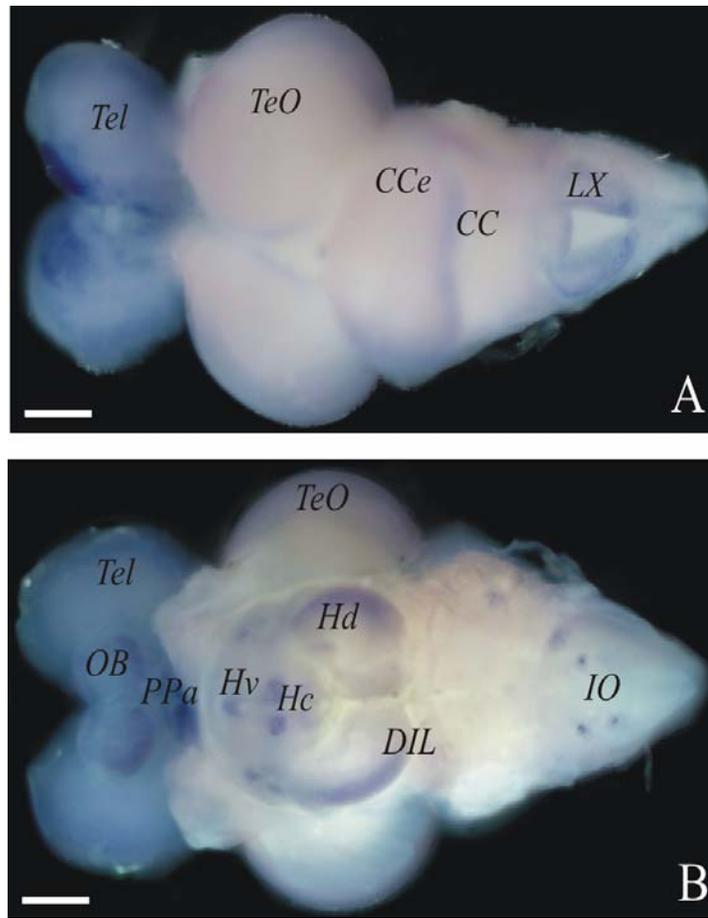


Fig.11. Ibridazione *in-situ* del gene *GFRa1a*.

A. Visione dorsale dell'encefalo. Espressione nell'area dorsale telencefalica (D) e nel lobo vago (LX).

B. Visione ventrale dell'encefalo. Espressione nei bulbi olfattori (OB), nella porzione anteriore dell'area preottica (PPa), nella zona caudale (Hc) e ventrale (Hv) dell'ipotalamo periventricolare, nel nucleo diffuso del lobo inferiore dell'ipotalamo (DIL) e nell'oliva infariore (IO) del midollo allungato.

Per le altre abbreviazioni vedere le Tab. 2. Barra degli ingrandimenti: 500 μ m.

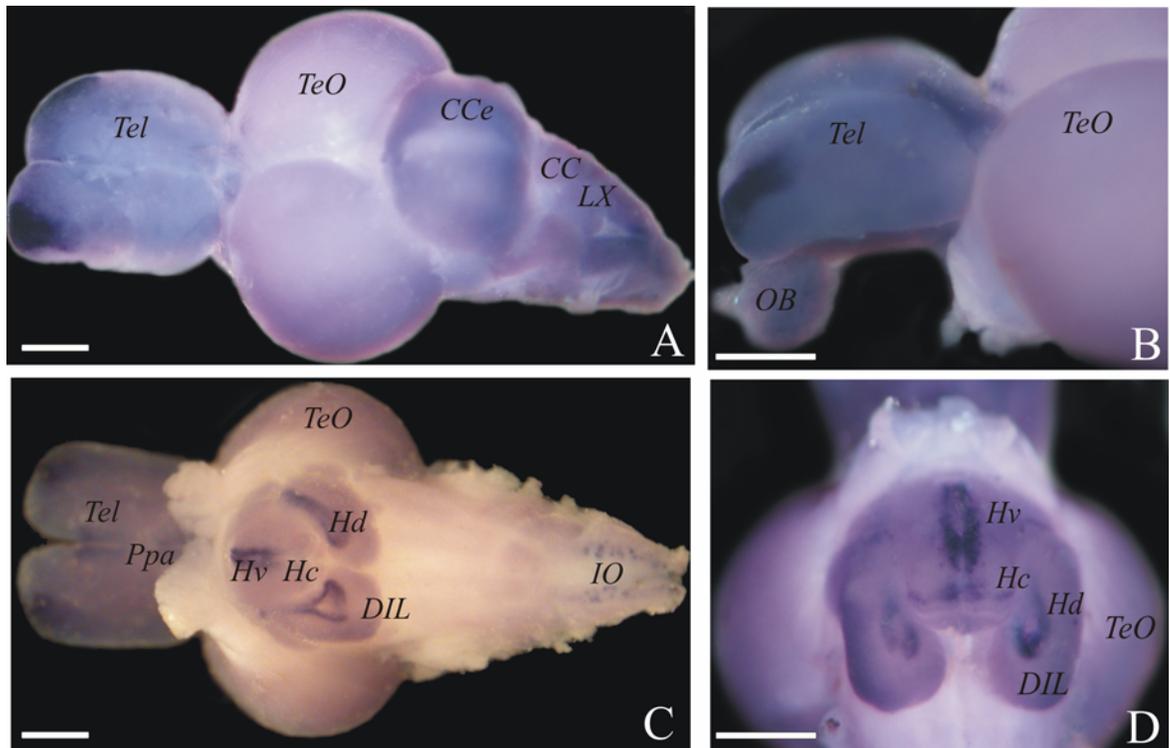


Fig. 12. Ibridazione in-situ del gene $GFR\alpha 1b$.

- A. Visione dorsale dell'encefalo. Espressione nell'area dorsale telencefalica (D), nel corpo del cervelletto (CCe) e nel lobo vago (LX).
- B. Visione dorso-laterale dell'encefalo. Espressione nei bulbi olfattori (OB) e nell'area dorsale telencefalica (D).
- C. Visione ventrale dell'encefalo. Espressione nell'area ventrale telencefalica (V), nella porzione anteriore dell'area preottica (PPa), nella zona cuadale (Hc), dorsale (Hd) e ventrale (Hv) dell'ipotalamo periventricolare e nell'oliva inferiore (IO) nel midollo allungato
- D. Visione ventrale dell'encefalo. Espressione nella zona cuadale (Hc), dorsale (Hd) e ventrale (Hv) dell'ipotalamo periventricolare.

Per le altre abbreviazioni vedere la Tab. 2. Scala d'ingrandimento: 500 μ m

3.3 Immunocitochimica

Immunoreattività (IR) al GFR α 1 è stata osservata in tutte le regioni dell'encefalo di zebrafish.

La descrizione del cervello si basa sull'atlante topografico di Wullimann et al. del 1996.

La distribuzione dei nuclei positivi, descritta cranio-caudalmente, è riassunta in Fig. 13 A-O. Nei nuclei positivi, i singoli neuroni possono presentare un'intensità variabile di reazione. Fibre positive all'antisiero GFR α 1 sono state osservate in diverse regioni dell'encefalo.

Telencefalo

Nei bulbi olfattori numerose cellule GFR α 1 positive sono state visualizzate nello strato cellulare esterno (Fig. 13A, 14A). Esse spesso risultano presentare dell'estensioni nello strato glomerulare.

Nella zona mediale, dorsale e posteriore dell'area dorsale telencefalica, sono stati evidenziati sia fibre che piccoli neuroni con scarso citoplasma, immunoreattivi al GFR α 1 (Fig. 13B-D, 14B). Nella zona dorsale e laterale, la positività risulta essere limitata principalmente a fibre dirette antero-posteriormente (Fig. 13B-D, 14C). Piccoli neuroni GFR α 1 positivi sono presenti anche nel nucleo postcommissurale dell'area ventrale telencefalica (Fig. 13D)

Diencefalo

Nell'area preottica, pochi neuroni GFR α 1 positivi sono stati osservati nella porzione anteriore e posteriore del nucleo preottico parvocellulare (Fig. 13C-E, 14D) e nel nucleo suprachiasmatico (Fig. 13E). Questi risultano di forma tondeggianti ed alcune volte mostrano un singolo processo.

Nel talamo dorsale sono risultati positivi alcuni neuroni tondeggianti del nucleo talamico anteriore (Fig. 13F), mentre nel talamo ventrale la positività è stata localizzata in neuroni del nucleo talamico ventrolaterale (Fig. 13E,F, 14D, 15A). Molti di questi neuroni presentano un singolo processo che si estende in direzione opposta rispetto al ventricolo diencefalico (Fig.

15A). Anche nel nucleo talamico ventromediale sono stati visualizzati pochi neuroni GFR α 1 positivi (Fig. 13E,F, 14D, 15A).

Nel tubercolo posteriore sono stati osservati rari neuroni piccoli e/o piriformi nel nucleo periventricolare (Fig. 13G).

Nella zona dorsale e caudale dell'ipotalamo periventricolare e nel nucleo diffuso del lobo inferiore dell'ipotalamo sono stati osservati numerosi neuroni GFR α 1 immunoreattivi (Fig. 13, H).

Nel sinencefalo, sono stati visualizzati alcuni neuroni tondeggianti e/o allungati GFR α 1 positivi nella porzione dorsale (Fig. 13G, 15C) e nella porzione ventrale (Fig. 13G) del nucleo pretettale periventricolare e nel nucleo del fascicolo mediale longitudinale (Fig.13K).

Infine, nella commissura posteriore (Fig. 13G,H, 15C) e nel tetto ottico sono state osservate fibre GFR α 1 positive. In particolare fibre del nervo ottico decorrono ventro-lateralmente al diencefalo attraverso il tetto ottico (Fig. 15B).

Mesencefalo

Ricordando che il tetto ottico dello zebrafish è diviso in 15 strati raggruppati in quattro maggiori zone (zona grigia periventricolare, zona bianca profonda, zona centrale e zona superficiale grigia bianca). Piccoli neuroni tondeggianti positivi sono stati visualizzati nello strato V e nello strato VI della zona centrale. Nella zona superficiale grigia e bianca, che consiste di una serie alternata di strati di fibre e corpi cellulari, neuroni GFR α 1 immunoreattivi sono stati visualizzati esclusivamente in un'area che comprende gli strati che vanno dallo strato XI allo strato XIV (Fig. 15D). Fibre GFR α 1 positive, entranti nel tetto ottico dalle pareti laterali del diencefalo, sono risultate localizzate in tre regioni precise: la prima nello strato IV, la seconda dallo strato VIII allo strato XII ed infine la terza nello strato XIV.

Nel tegmento, dorso-lateralmente in direzione della commissura posteriore, piccoli neuroni GFR α 1 positivi sono stati osservati nel nucleo mesencefalico del nervo del trigemino (Fig. 15C).

Romboencefalo

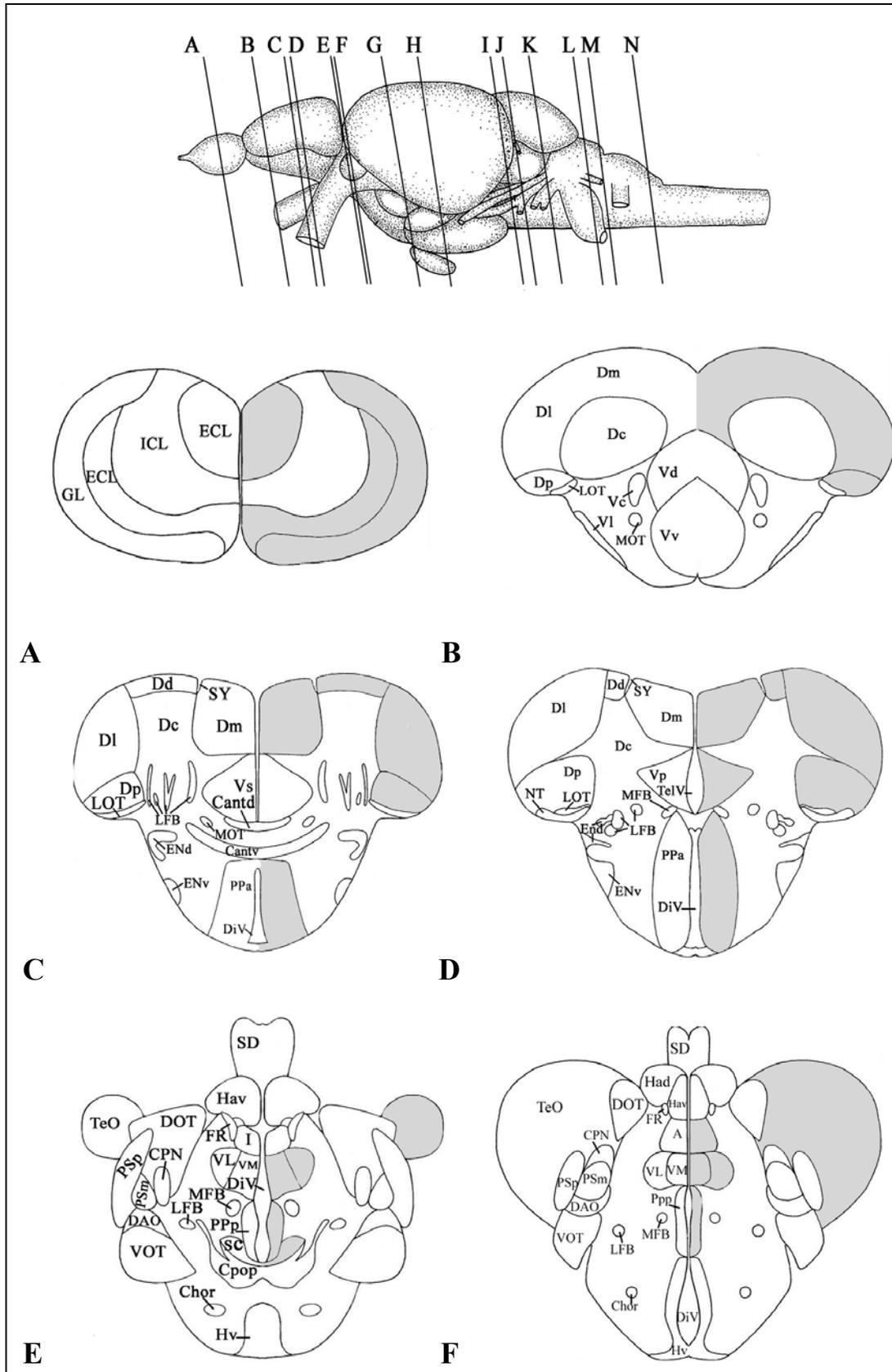
In tutte le suddivisioni del cervelletto, valvola del cervelletto (Fig. 13H, 16A, B), corpo (Fig.13 I-K,16C, D, E) e lobo vestibulolaterale (Fig. J,K), sono state visualizzate cellule del Purkinje intensamente GFR α 1 immunoreattive.

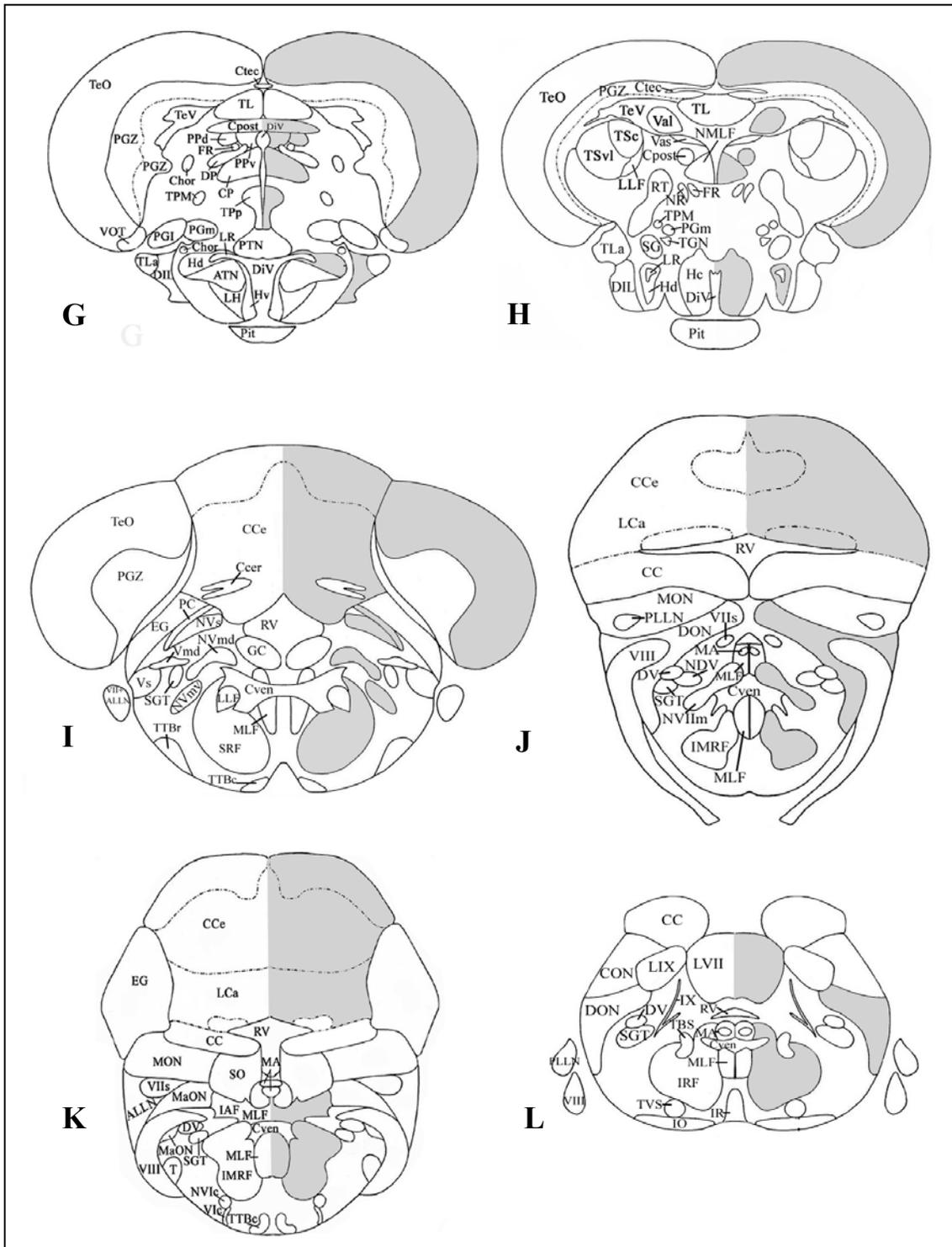
Nel midollo allungato, nel nucleo primario sensoriale del trigemino sono risultati GFR α 1positivi neuroni tondeggianti e/o piriformi. Questi presentano dei prolungamenti nella direzione opposta rispetto al ventricolo romboencefalico. Nella porzione dorsale e ventrale del nucleo motorio del trigemino sono stati osservati alcuni neuroni GFR α 1 immunoreattivi (Fig. 13I). Inoltre nel nucleo posteriore dell'ottavo sono risultati positivi neuroni piriformi e nel nucleo discendente dell'ottavo sono state visualizzate fibre GFR α 1 immunoreattive (Fig.13L).

Nella porzione ventrale del midollo allungato, sono stati visualizzati neuroni GFR α 1 positivi appartenenti alla formazione reticolare superiore, intermedia ed inferiore (Fig. 13 I-N, 17A-C) ed al nucleo motorio facciale (Fig.13 J, 17A-C). Questi risultano essere rotondeggianti con un singolo processo, oppure allungati nella forma.

Nel nucleo motorio del vago (Fig.13 M,N) e nel lobo vago (Fig.13 M,N) sono stati osservati alcuni piccoli neuroni con immunoreattività a GFR α 1.

Nel lobo facciale sono stati visualizzati neuroni GFR α 1 positivi, di forma allungata e con un fine processo citoplasmatico (Fig.13 L,M, 17D,E). Nel nucleo funicolare mediale alcuni neuroni allungati con processi diretti alla porzione interna del midollo allungato sono stati evidenziati immunoreattivi al GFR α 1 (Fig. 13N).





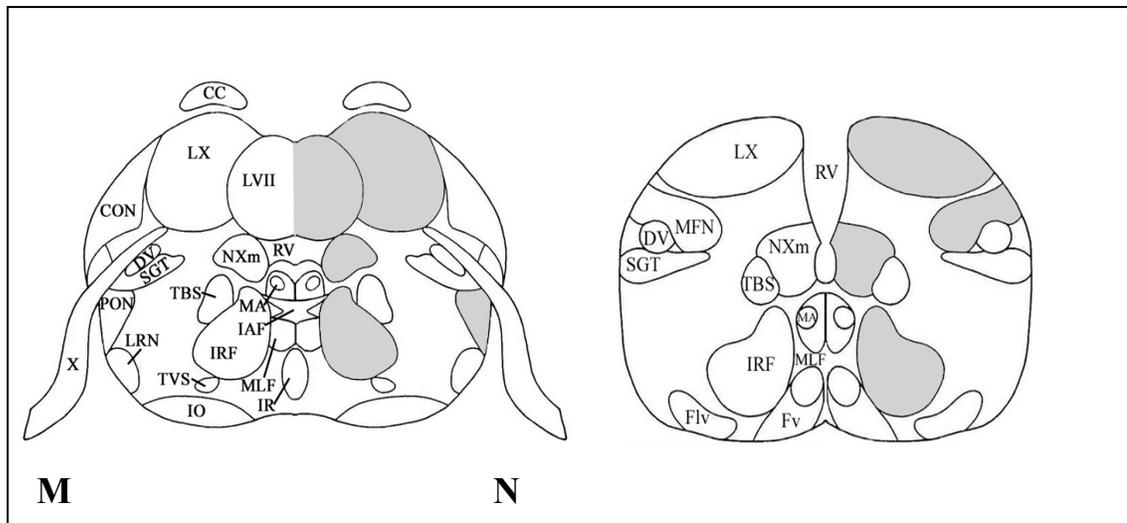


Fig. 13. Disegni schematici di sezioni trasversali dell'encefalo di zebrafish. Sulla sinistra delle singole immagini si osserva la struttura citoarchitettica dell'encefalo; sulla destra nelle aree grigie è rappresentata la distribuzione dei neuroni positivi al GFR α 1. Per le abbreviazioni vedere la Tab. 2. Scala d'ingrandimento: 200 μ m. Modificato da Wullmann et al., (1996).

Tabella II.

Lista delle abbreviazioni

- A: anterior thalamic nucleus
- ALLN: anterior lateral line nerve
- AON: anterior octaval nucleus
- ATN: anterior tuberal nucleus
- Cantd: anterior commissure, dorsal part
- Cantv: anterior commissure, ventral part
- CC: cerebellar crest
- CCe: cerebellar corpus
- Chor: horizontal commissure
- CIL: central nucleus of the inferior lobe
- CON: caudal octavolateralis nucleus
- CP: central posterior thalamic nucleus
- CPN: central pretectal nucleus
- Cpop: supraoptic commissure= postoptic commissure
- Cpost: posterior commissure
- Ctec: tectal commissure= intertectal commissure
- Cven: ventral rhombencephalic commissure
- D: dorsal telencephalic area
- DAO: dorsal accessory optic nucleus

Dc: central zone of dorsal telencephalic area
Dd: dorsal zone of dorsal telencephalic area
Dl: lateral zone of dorsal telencephalic area
DIL: diffuse nucleus of the inferior lobe
DiV: diencephalic ventricle
Dm: medial zone of dorsal telencephalic area
DON: descending octaval nucleus
DOT: dorsomedial optic tract
Dp: posterior zone of dorsal telencephalic area
DP: dorsal posteriothalamic nucleus
DV: descending trigeminal root
ECL: external cellular layer of olfactory bulb
EG: granular eminence
End: antopeduncular nucleus, dorsal part
ENv: entopeduncular nucleus, ventral part
EW: Edinger-Westphal nucleus
FR: habenulo-interpeduncular tract
GC: central gray
GL: glomerular layer of olfactory bulb
Had: dorsal habenular nucleus
Hav: ventral habenular nucleus
Hc: caudal zone of periventricular hypothalamus
Hd: dorsal zone of periventricular hypothalamus
Hv: ventral zone of periventricular hypothalamus
I: intermediate thalamic nucleus
IAF: inner arcuate fibres
ICL: internal cellular layer of olfactory bulb
IMRF: intermediate reticular formation
IO: inferior olive
IR: inferior raphe
IRF: inferior reticular formation
IX: glossopharyngeal nerve
LCa: caudal lobe of cerebellum
LFB: lateral forebrain bundle
LH: lateral hypothalamic nucleus
LLF: lateral longitudinal fascicle= lateral lemniscus
LOT: lateral olfactory tract
LR: lateral recess of diencephalic ventricle
LRN: lateral reticular nucleus
LVII: facial lobe
LX: vagal lobe
LIX: glossopharyngeal lobe
MA: Mauthner axon
MaON: magnocellular octaval nucleus
MFB: medial forebrain bundle
MFN: medial funicular nucleus
MLF: medial longitudinal fascicle
MNV: mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve

MON: medial octavolateralis nucleus
MOT: medial olfactory tract
NDV: nucleus descendens nervi trigemini
NMLF: nucleus of the medial longitudinal fascicle
NR: red nucleus
NT: nucleus taeniae
NVic: abducens nucleus, caudal part
NVmv: trigeminal motor nucleus, ventral part
NVs: primary sensory trigeminal nucleus
NVIIIm: nucleus motorius nervi facialis
NXm: vagal motor nucleus
OB: bulbus olfactorius
PC: posterior cerebellar tract
PGc: caudal preglomerular nucleus
PGI: lateral preglomerular nucleus
PGm: medial preglomerular nucleus
PGZ: periventricular gray zone of optic tectum
Pit: hypophysis= pituitary
PLLN: nervus linæ lateralis posterioris
PON: posterior octaval nucleus
PPa: parvocellular preoptic nucleus, anterior part
PPd: periventricular pretectal nucleus, dorsal part
PPp: parvocellular preoptic nucleus, posterior part
PPv: periventricular pretectal nucleus, ventral part
PR: posterior recess of diencephalic ventricle
PSm: magnocellular superficial pretectal nucleus
PSp: parvocellular superficial pretectal nucleus
PTN: posterior tuberal nucleus
RT:rostral tegmental nucleus
RV: rhombencephalic fourth ventricle
SC: suprachiasmatic nucleus
SD: dorsal sac
SG: subglomerular nucleus
SGT: secondary gustatory tract
SO: secondary octaval population
SRF: superior reticular formation
SY: ypsiloniform sulcus
T: tangential nucleus
TBS: bulbo-spinal tract
Tel: telencephalon
Tel V:telencephalic ventricles
TeO: optic tectum
TeV: tectal vantricle
TGN: tertiary gustatory nucleus
TL: longitudinal torus
TLa: lateral torus
TPM: pretecto-mammillary tract
TPp: periventricular nucleus of posterior tuberculum

TSc: central nucleus of semicircular torus
TSvl: ventrolateral nucleus of semicircular torus
TTBc: crossed tecto-bulbar tract
TTBr: direct tecto-bulbar tract
TVS: vestibulo-spinal tract
V: ventral telencephalic area
Val: lateral division of valvula cerebelli
Vas: vascular lacuna of area postrema
Vc: cantral nucleus of ventral telencephalic area
Vd: dorsal nucleus of ventral telencephalic area
Vir: rostral root of the abducens nerve
Vl: lateral nucleus of ventral telencephalic area
VL: ventrolateral thalamic nucleus
VM: ventromedial thalamic nucleus
Vmv: ventral motor root of the trigeminal nerve
VOT: ventrolateral optic tract
Vp: postcommissural nucleus of ventral telencephalic area
Vv: ventral nucleus of ventral telencephalic area
Vic: caudal root of the abducens nerve
VII: facial nerve
VIIs: sensory root of the facial nerve
VIII: octaval nerve
X: vagal nerve

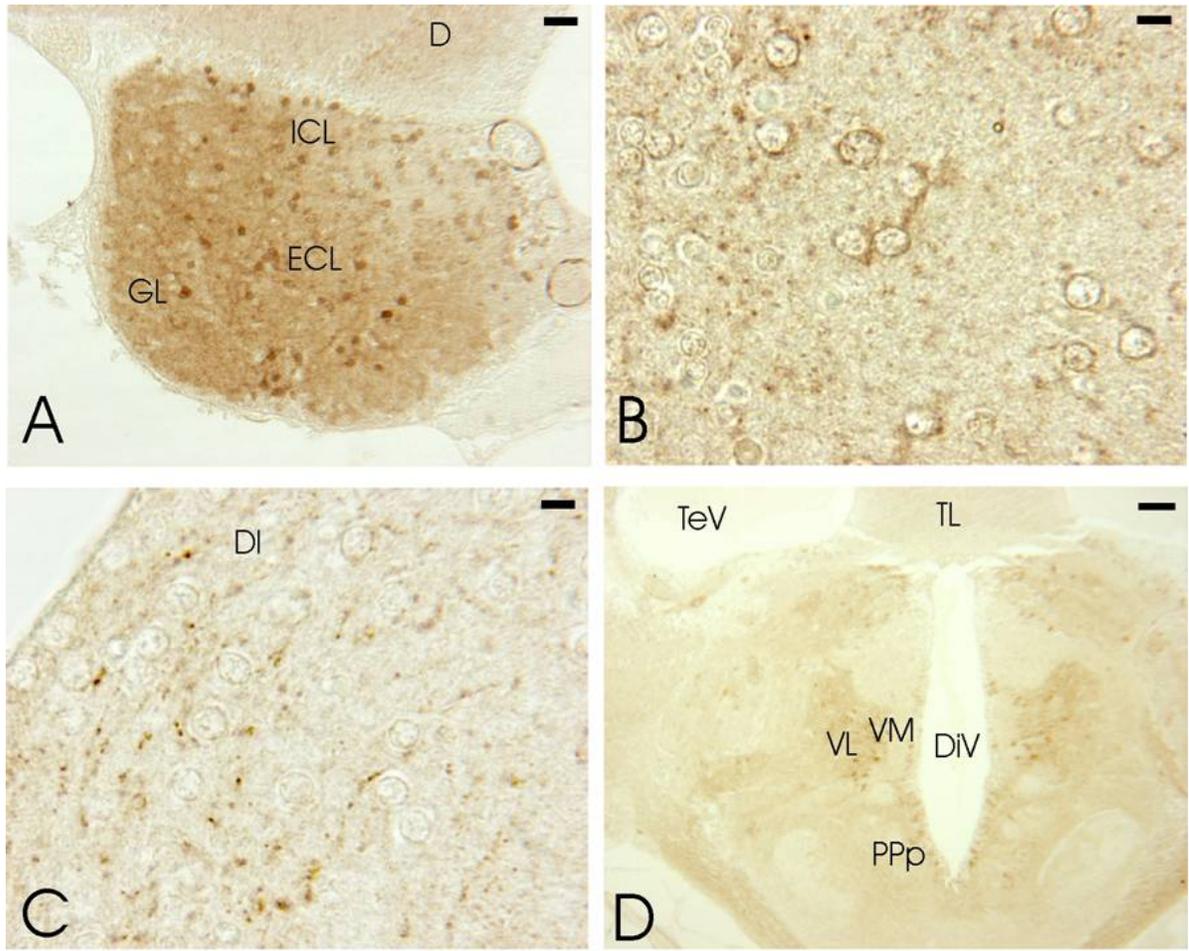


Fig. 14. Immunoreattività al GFR α 1 nel telencefalo e diencefalo (sezioni trasversali).

A. Neuroni positivi al GFR α 1 nello strato glomerulare (GL) e lo strato cellulare esterno dei bulbi olfattori (ECL).

B. Fibre e neuroni positivi nella zona dorso-mediale dell'area dorsale telencefalica.

C. Fibre positive nella zona dorso-laterale dell'area dorsale telencefalica.

D. IR nel nucleo preottico parvocellulare (porzione posteriore; PPp), nel nucleo talamico ventromediale (VM) e ventrolaterale (VL) del diencefalo.

Per le altre abbreviazioni vedere la Tab. 2. Scala d'ingrandimento = 50 μ m per D, 20 μ m per A, 10 μ m per B e C.

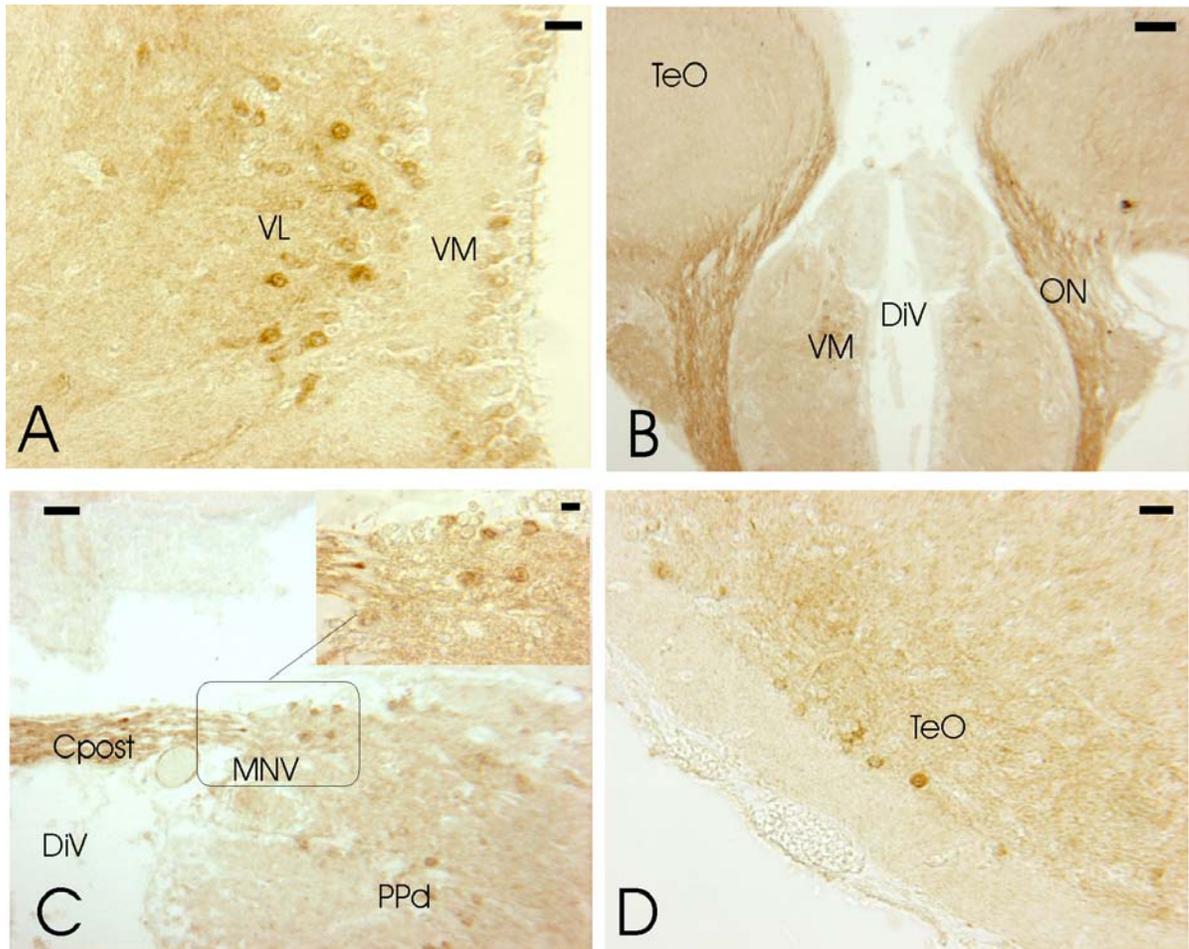


Fig. 15 Immunoreattività al $GFR\alpha 1$ nel diencefalo e mesencefalo (sezioni trasversali)

A. Positività del nucleo talamico ventromediale e ventrolaterale a maggiore ingrandimento.

B. Fibre positive che decorrono verso il tetto ottico e neuroni positivi nel nucleotalamico ventromediale.

C. Fibre positive nella commissura posteriore (Cpost); neuroni positivi nel nucleo mesencefalico del nervo del trigemino (MNV) e nella porzione dorsale del nucleo pretettale periventricolare (PPd). Nell'inserto la positività del nucleo mesencefalico del nervo del trigemino a maggiore ingrandimento.

D. Neuroni positivi nella zona superficiale bianca e grigia del tetto ottico.

Per le altre abbreviazioni vedere la Tab. 2. Scala d'ingrandimento = 50 μm per B, 20 μm per C e D, 10 μm per A e l'inserto.

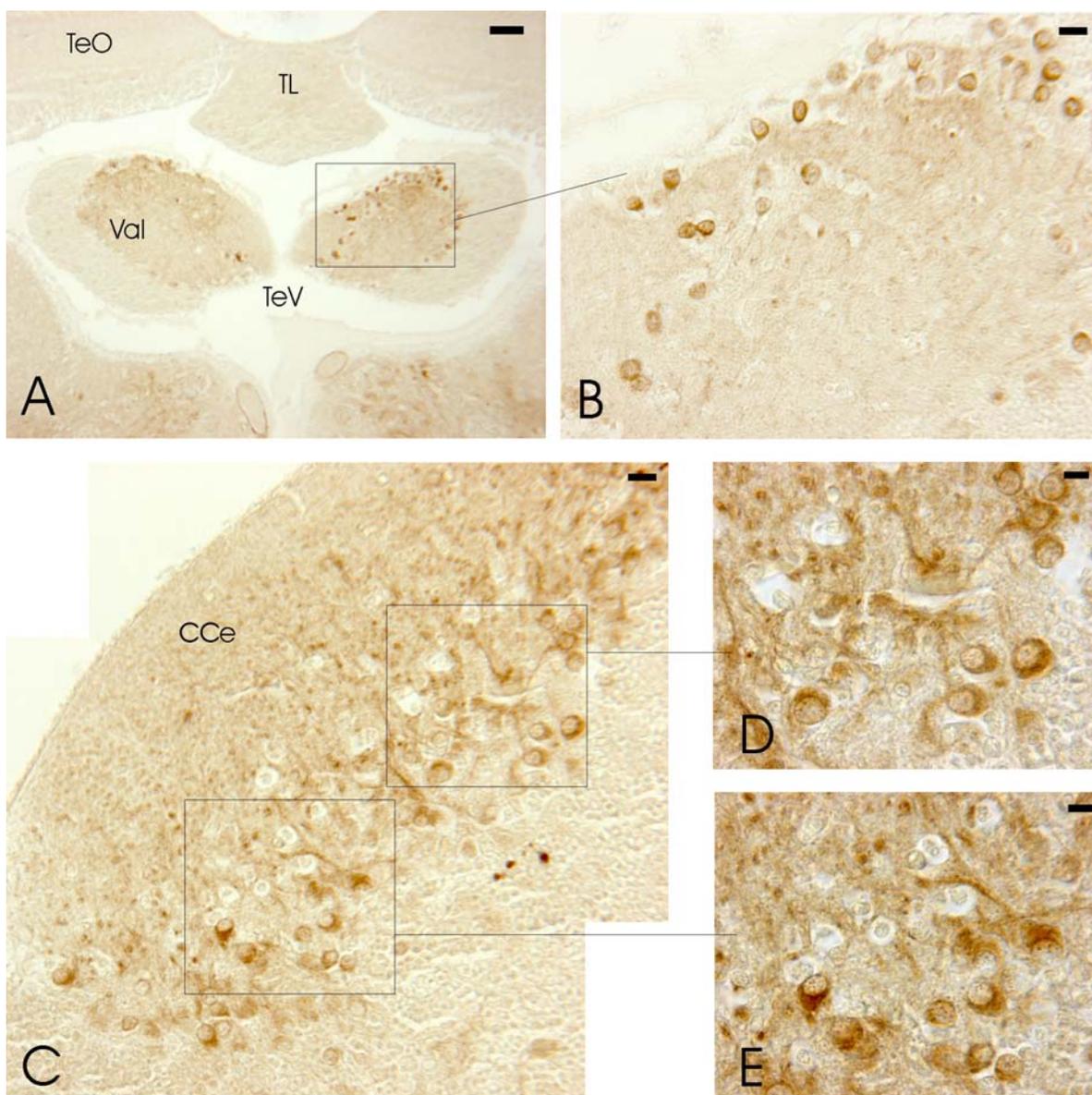


Fig. 16. Immunoreattività al GFR1 nel romboencefalo: cervelletto (sezioni trasversali).

A,B. Cellule del Purkinje e fibre positive nella valvola (Val) del cervelletto

C-E. Cellule del Purkinje e fibre positive nel corpo (CCe) del cervelletto

Per le altre abbreviazioni vedere la Tab. 2. Scala d'ingrandimento = 20 μ m per A, 10 μ m per B e C, 5 μ m per D e E.

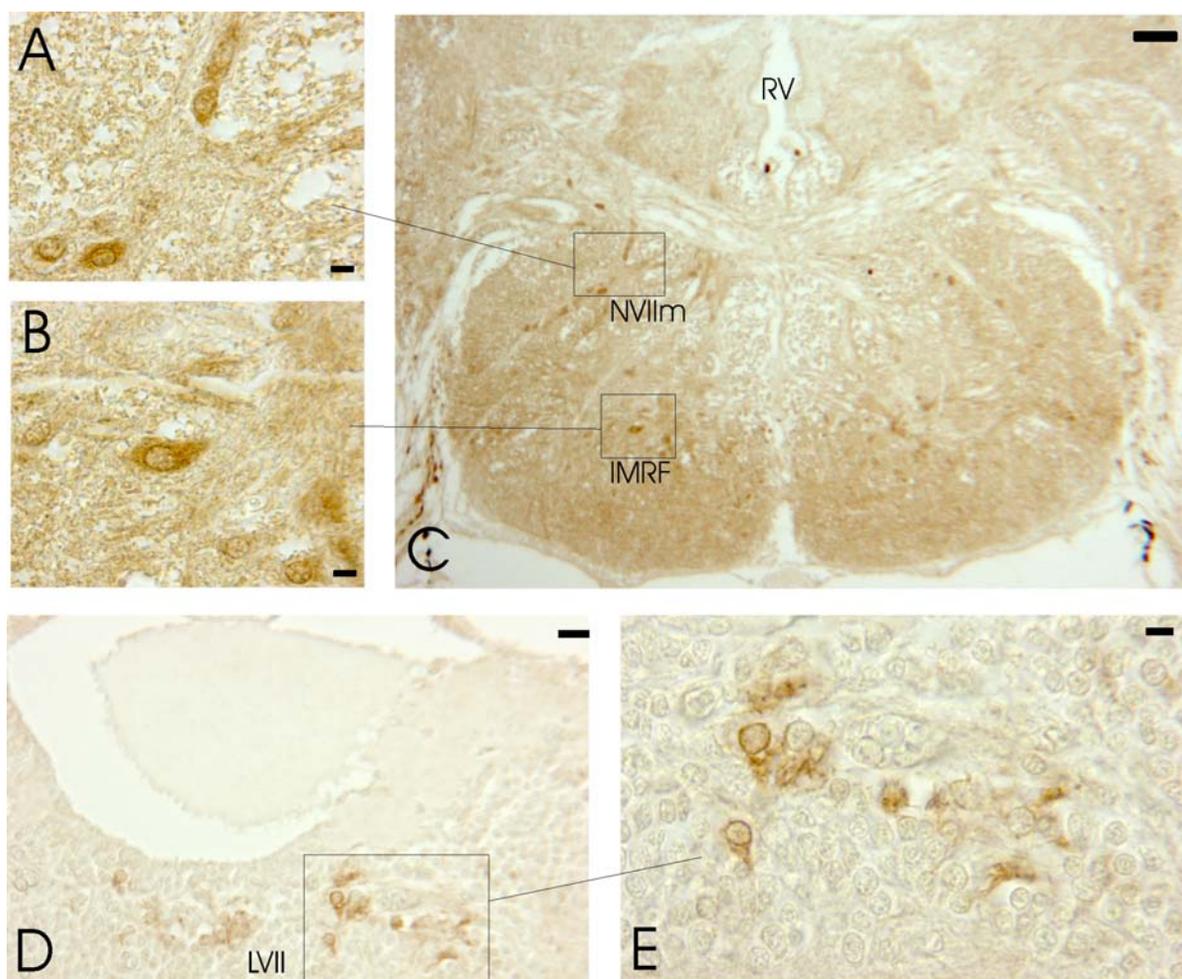


Fig. 17. Immunoreattività al GFR α 1 nel romboencefalo: midollo allungato (sezioni trasversali). A-C. Neuroni GFR α 1 positivi nel nucleo motorio facciale (NVIIIm) e nella formazione reticolare intermedia (IMRF).

D,E. Neuroni GFR α 1 positivi nel lobo facciale (LVII).

Per le altre abbreviazioni vedere la Tab. 2. Scala d'ingrandimento= 50 μ m per C, 10 μ m per D, 5 μ m per A, B e E.

3.4 Controlli

RT-PCR

Come controllo negativo per gli esperimenti di RT-PCR, sono state allestite reazioni contenenti tutti i componenti previsti dal protocollo dell'RT-PCR, inclusi i primers specifici per il cDNA di GFR α 1a e di GFR α 1b, ma mancanti del cDNA template. Queste reazioni hanno mostrato assenza di amplificati.

Ibridazione in-situ

La specificità degli esperimenti di ibridazione in-situ è stata verificata sostituendo le ribosonde anti-senso con le ribosonde senso per entrambi i geni ortologhi.

Immunocitochimica

Come controllo negativo per la reazione di immunocitochimica, l'anticorpo primario è stato sostituito con PBS, siero normale o anticorpo pre-adsorbito con l'antigene.

Come controllo positivo sono state effettuate sostituzioni dell'anticorpo primario con anticorpi adsorbiti con gli antigeni correlati. In questo caso non si è verificato alcun cambiamento nel risultato della reazione.

Capitolo 4

DISCUSSIONE

Discussione

Il cervello dello zebrafish, come già descritto nel paragrafo introduttivo riguardante la neurogenesi adulta e la rigenerazione neuronale nell'encefalo dei teleostei, presenta alcune interessanti peculiarità che fanno di questo un sistema modello emergente nello studio delle neuroscienze. In primo luogo, esso presenta un numero notevole, anche se relativo, di nuovi neuroni; in secondo luogo è noto che il numero di siti di proliferazione neuronale è di ordine di magnitudo di almeno una se non due volte più ampio nei teleostei che nei mammiferi; inoltre, è dotato della capacità di poter rigenerare tratti assonali, neuroni e glia (Zupanc 2008). Per questi motivi lo zebrafish, un nuovo sistema modello della ricerca biomedica per lo studio della genetica dello sviluppo, sta ora assumendo un ruolo rilevante anche come modello per la rigenerazione dell'encefalo (Becker and Becker 2008) e per le malattie neurodegenerative umane (Best e Alderton, 2008; Flinn et al 2008). Infatti a causa delle piccole dimensioni delle forme larvali, a tal punto che i test possono essere condotti nelle piastre da 96 pozzetti facendo crescere le larve in volumi di liquido molto ridotti (200 μ l), le analisi in vivo degli effetti dei composti tossici possono essere intraprese in stadi molto precoci. Questo rappresenta un notevole vantaggio dal punto di vista degli approcci terapeutici nelle malattie neurodegenerative, considerando che già le forme larvali, di questo pesce teleosteo, mostrano dei fenotipi comportamentali e neuropatologici che risultano in relazione con quelli osservati nell'uomo (Best e Alderton, 2008). Tuttavia è noto che nessun modello può perfettamente replicare tutti gli aspetti delle malattie dell'uomo, e questa considerazione è valida soprattutto per le malattie neurodegenerative. Infatti, non esistono in natura corrispondenti animali di malattie neurodegenerative, ed essendo poco definita la loro eziologia, risulta difficile riuscire a creare negli animali condizioni analoghe a quelle umane.

Per le caratteristiche ora descritte del cervello di zebrafish, durante i tre anni del corso di dottorato di ricerca in "Biologia, Patologia ed Igiene Ambientale in Medicina Veterinaria", con indirizzo in "Influenza dei fattori ambientali su sviluppo, benessere e sanità degli animali di interesse vetrinario", ho inteso analizzare la presenza e la distribuzione del recettore specifico per il fattore neurotrofico GDNF, il GFR α 1. Infatti, in letteratura si è visto che in numerose patologie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson, la Corea di Huntington, l'epilessia e l'ischemia, i ligandi della famiglia del GDNF, grazie alla loro attività trofica, sono sostanze candidate per possibili approcci terapeutici (Reeben et al 1998; Kitagawa et al

1999; Kokaia et al 1999; Arvidsson et al 2001; Chen et al 2001; Miyazaki et al 2002; Sarabi et al 2001b, 2003b; Gao et al 2003; Pineda et al 2007; Hong et al 2008). Quindi mi è sembrato di notevole interesse indagare il coinvolgimento del GDNF in un cervello con particolari proprietà proliferative e rigenerative e che attualmente sta assumendo una crescente valenza come modello per malattie neurodegenerative.

Gli studi precedenti riguardanti la distribuzione del recettore $GFR\alpha 1$ nell'encefalo sono stati condotti, in modo esteso, nell'uomo (Serra et al 2005; Quartu et al 2006, 2007), nel ratto (Nosrat et al 1997; Glazner et al 1998; Burazin and Gundlach 1999; Matsuo et al 2000) e nel topo (Golden et al 1998, 1999).

In particolare nell'uomo è stata investigata l'espressione del GDNF e del suo complesso recettoriale RET/ $GFR\alpha 1$ nel sistema sensoriale del trigemino, mentre nel tronco encefalico è stata analizzata l'espressione dei singoli recettori, nella vita pre- e post-natale ed in età adulta. Questi studi hanno rilevato, in primo luogo, un possibile coinvolgimento del GDNF nel trofismo dei neuroni sensoriali primari del trigemino dalla vita prenatale all'età adulta, ed hanno, in secondo luogo, suggerito un coinvolgimento del complesso recettoriale nella trasduzione del segnale di quei processi che, durante lo sviluppo, portano all'organizzazione di un discreto sistema neuronale del tronco encefalico e che, in età adulta, ne garantiscono una corretta attività funzionale ed un suo mantenimento (Quartu et al., 2006, 2007).

Nel topo studi condotti in embrioni e animali adulti, Golden e collaboratori hanno mostrato un diffuso pattern di espressione dei ligandi della famiglia del GDNF e dei loro recettori nell'encefalo, suggerendo un loro coinvolgimento nello sviluppo, a livello embrionale, e nel mantenimento, negli organismi adulti, di circuiti neuronali (Golden et al., 1998).

Nel ratto, Glazner e i suoi collaboratori nel 1998 hanno riportato dei dati riguardanti la distribuzione del co-recettore $GFR\alpha 1$ e del recettore RET nel sistema nervoso centrale, evidenziando una loro espressione in popolazioni neuronali coinvolte nelle funzioni motorie e fornendo così ulteriori conferme della possibile azione trofica svolta dal GDNF su questi neuroni motori. Inoltre avendo identificato un'espressione dell'mRNA del $GFR\alpha 1$ in diverse aree dell'encefalo in cui non risulta essere espresso anche l'mRNA del recettore RET, è stata ipotizzata una possibile trasduzione del segnale da parte del $GFR\alpha 1$ attraverso l'ausilio di altre molecole transmembranarie o l'utilizzo del co-recettore da parte di altri fattori neurotrofici che non prevedono la presenza del recettore RET sulla superficie della membrana plasmatica. Infine nel cervello di ratto, è stata ulteriormente investigata l'espressione del

singolo GFR α 1, individuando le popolazioni neuronali che risultano esprimere questo recettore (Sarabi et al 2000, 2001a, 2003a). In questi studi, l'espressione del recettore GFR α 1 è stata visualizzata in aree del cervello in cui sono localizzati i neuroni responsivi ai ligandi della famiglia del GDNF, coinvolgendo questi fattori nella regolazione di diversi pathway neuronali nel cervello di ratto adulto.

Nella presente ricerca, attraverso l'impiego di metodiche di RT-PCR, ibridazione *in situ* ed immunocitochimica è stata riportata la presenza e la distribuzione del recettore specifico per il GDNF, il GFR α 1, nell'encefalo di zebrafish adulto, essendo già stata investigata, in precedenti studi, la presenza e la distribuzione del fattore neurotrofico GDNF nell'encefalo in toto e del suo complesso recettoriale RET/GFR α 1 nelle cellule del Purkinje del cervelletto di questo teleosteo (Lucini et al., 2008; Facello et al., 2009). Mediante RT-PCR ed ibridazione *in situ* l'attenzione è stata focalizzata sull'analisi degli mRNA dei due geni ortologi *GFR α 1a* e *GFR α 1b*, mentre utilizzando la metodica di immunocitochimica ne è stata analizzata la distribuzione delle forme proteiche.

I prodotti di RT-PCR dei due geni ortologi *GFR α 1a* e *GFR α 1b*, ottenuti a partire da omogenati di cervello, sono stati clonati e sequenziati al fine di confermare la loro identità con i cDNA di *GFR α 1a* e *GFR α 1b* presenti in GenBank. Le sequenze nucleotidiche dei frammenti amplificati hanno presentato un'omologia di sequenza pari al 100% con le sequenze corrispondenti.

I risultati ottenuti attraverso le reazioni di ibridazione *in situ* hanno mostrato che la distribuzione degli mRNA dei geni ortologi di *GFR α 1* ha interessato tutte le regioni del cervello di zebrafish anche se è stato possibile rilevare una differente intensità di segnale da regione a regione. Considerando che i pattern di distribuzione degli mRNA sono risultati parzialmente sovrapposti nei diversi nuclei dell'encefalo di zebrafish risultati positivi, si può ipotizzare che i due geni *GFR α 1* esercitino ruoli distinti e tra loro complementari.

Per definire l'espressione del recettore GFR α 1 a livello proteico, sono state eseguite reazioni di immunocitochimica utilizzando un antisiero policlonale diretto verso una regione altamente conservata della sequenza del GFR α 1 umano. Questo antisiero riconosce entrambe le isoforme GFR α 1a e GFR α 1b presenti nello zebrafish, le quali risultano avere un'omologia di sequenza molto elevata con il GFR α 1 umano nella regione verso cui è diretto l'anticorpo.

Le regioni del cervello in cui è stata osservata la distribuzione degli mRNA dei geni ortologi, mediante reazione di ibridazione *in situ*, hanno mostrato anche immunoreattività nei confronti

dell'antisiero policlonale. Per di più, attraverso le reazioni di immunocitochimica è stata evidenziata positività al $GFR\alpha 1$ anche in nuclei più profondi e non superficiali che invece non hanno mostrato presenza di segnale nelle reazioni di ibridazione. Questo molto probabilmente si può imputare alla difficoltà di penetrazione a cui va incontro la ribosonda durante la reazione, anche se il cervello, prima di essere ibridato, viene sottoposto ad un trattamento con la Proteinasi K, che risulta essere indispensabile ma evidentemente non sufficiente (Smith et al., 2008). Molto probabilmente lo spessore del cervello non consente alla Proteinasi K di interagire con le strutture più profonde dell'encefalo ma solo con quelle più esterne, mentre un trattamento più prolungato potrebbe comportare un'alterazione di struttura del campione e conseguentemente ad una falsata lettura del segnale dovuta ad una mancata integrità del campione stesso.

La colorazione immunocitochimica è stata osservata esclusivamente nel citoplasma neuronale e nelle fibre. Molto probabilmente la localizzazione della positività a livello citoplasmatico può essere correlata alla capacità dell'anticorpo utilizzato di riconoscere sia la forma matura che quella immatura del recettore. Infatti, prima di essere espresso come forma matura sulla superficie cellulare, attraverso il legame ad opera di una GPI, la forma immatura del recettore viene trasportata all'interno della cellula attraverso il reticolo endoplasmatico. Anche in altri studi che hanno analizzato l'espressione del recettore $GFR\alpha 1$ nell'encefalo di mammiferi (Nosrat et al 1997; Glazner et al 1998; Golden et al 1998, 1999; Burazin and Gundlach 1999; Matsuo et al 2000; Sarabi et al 2000, 2001a, 2003a), è stata rilevata la positività in neuroni e solo occasionalmente in cellule gliali (Quartu et al 2007).

E' stata osservata immunoreattività al $GFR\alpha 1$ in tutte le regioni dell'encefalo di zebrafish adulto: telencefalo, diencefalo, mesencefalo e romboencefalo. Questa distribuzione, così diffusa, risulta essere in accordo con i dati ottenuti negli studi svolti nei mammiferi (Glazner et al 1998; Golden et al 1998, 1999; Burazin and Gundlach 1999; Matsuo et al 2000; Sarabi et al. 2003a; Quartu et al 2007).

In particolare, i geni ortologi *GFR $\alpha 1a$* e *GFR $\alpha 1b$* durante lo sviluppo embrionale dello zebrafish sono ampiamente espressi nel diencefalo dorsale e ventrale, nel mesencefalo ventrale e nel romboencefalo anteriore, mentre risulta esserci assenza di segnale nel telencefalo (Shepherd et al 2004).

Contrariamente, nel telencefalo dello zebrafish adulto è stata rilevata positività al $GFR\alpha 1$ nello strato cellulare esterno dei bulbi olfattori. Molto probabilmente le cellule risultate

positive possono essere identificate come cellule mitrali, osservando la morfologia e le dimensioni cellulari. Nei pesci, le cellule mitrali inviano i loro dendriti nello strato glomerulare dove stabiliscono un contatto sinaptico con le fibre olfattorie primarie (Laberge and Hara, 2001). Nei bulbi olfattori di zebrafish, le cellule positive al GFR α 1 estendono i loro prolungamenti cellulari nello strato glomerulare nel quale è stata precedentemente descritta immunopositività al GDNF (Lucini et al., 2008). Per questo motivo è possibile ipotizzare che le fibre olfattorie primarie, che sono risultate positive al GDNF, agiscono in modo paracrino sulle cellule mitrali attraverso il recettore specifico GFR α 1. Inoltre bisogna ricordare che, in uno studio condotto sui ratti, anche gli altri ligandi della famiglia del GDNF, con i corrispettivi recettori, sembrano essere coinvolti nella funzionalità del sistema olfattivo (Maroldt et al., 2005).

Nell'area dorsale telencefalica, in particolare nelle zone dorsale, laterale, mediale e posteriore, è stata evidenziata positività al GFR α 1 in neuroni e fibre. La zona laterale dell'area dorsale telencefalica sembra corrispondere ad un pallio mediale rovesciato e per questo motivo potrebbe essere considerata una regione omologa dell'ippocampo (Wullimann and Mueller 2004). E' interessante notare che il recettore GFR α 1 risulta essere espresso, insieme ai ligandi della famiglia del GDNF, sia in specifici sottoinsiemi di neuroni dell'ippocampo (Sarabi et al 2000, Serra et al 2005) sia in cellule gliali (Trupp et al 1997; Burazin and Gundlach 1999; Kokaia et al 1999; Serra et al 2002; Quartu et al 2005). Inoltre è ormai noto che la divisione più laterale del pallio dei teleostei (la zona posteriore dell'area dorsale telencefalica), in cui è stata evidenziata immunoreattività al GFR α 1 sia in neuroni che in fibre, riceve l'imput neuronale da un denso numero di fibre olfattorie secondarie, come si osserva nel pallio laterale dei tetrapodi (omologo della corteccia olfattoria) (Wullimann and Mueller 2004). I risultati riguardanti l'espressione del GFR α 1 e quelli ottenuti precedentemente per il fattore neurotrofico GDNF, per il quale è stata osservata positività nella zona mediale e laterale dell'area dorsale telencefalica (Lucini et al 2008), sono a sostegno dell'ipotesi di un meccanismo paracrino/autocrino, relazionato ad una possibile azione trofica, ad opera del GDNF sui neuroni della regione dorsale del pallio dello zebrafish.

Nella retina è stata evidenziata positività al GFR α 1 nello strato cellulare gangliare (dato non pubblicato). Le fibre del nervo ottico sono risultate intensamente immunoreattive all'antisiero policlonale utilizzato per il GFR α 1. Dopo l'ingresso nel tetto ottico, queste si vanno a localizzare nello strato IV della zona bianca profonda e negli strati VIII, XII e XIV della zona

superficiale bianca e grigia, gli strati del tetto ottico nei quali le fibre delle retina sono state precedentemente descritte nel goldfish (Meek 1983; Northcutt 1983). Inoltre nel tetto ottico sono stati visualizzati pochi neuroni GFR α 1 positivi, dato simile a quello evidenziato per il GDNF nella stessa area (Lucini et al 2008). Comunque il tetto ottico non risulta essere l'unico target delle fibre ottiche, infatti sono stati identificati, come ulteriori target primari, il nucleo del talamo anteriore ed il nucleo suprachiasmatico. In entrambi sono stati identificati neuroni immunoreattivi al GFR α 1, indicando perciò che il GDNF risulta essere coinvolto nel controllo della funzionalità di questi nuclei, per esempio nella generazione e nel controllo del ritmo circadiano (Butler and Saidel, 1991; Medina et al., 1993; Northcutt and Butler, 1993).

Positività al GFR α 1 è stata visualizzata, anche, in neuroni i cui dendriti raggiungono i campi talamici della retina (Schellart, 1990), come il nucleo talamico anteriore, ventro-laterale e ventro-mediale. E' interessante notare come in studi condotti sull'encefalo di mammiferi, neuroni positivi al GFR α 1 siano stati visualizzati nel collicolo superiore e nel nucleo genicolato laterale (Glazner et al 1998; Golden et al 1998; 1999; Burazin and Gundlach 1999; Quartu et al 2007), che possono essere considerati omologhi rispettivamente al tetto ottico e al nucleo talamico anteriore del cervello dei pesci.

Nell'area preottica, è stata osservata immunoreattività al GFR α 1 in neuroni del nucleo preottico parvocellulare anteriore e posteriore, nuclei in cui precedentemente è stata evidenziata positività al GDNF (Lucini et al 2008). Questi risultati permettono di ipotizzare in questi siti un possibile meccanismo autocrino/paracrino, con conseguente supporto trofico, ad opera del fattore neurotrofico.

Nel nucleo motorio e sensoriale del trigemino, sono stati identificati neuroni distintamente positivi al GFR α 1. Sulla base di tale positività si può ipotizzare un coinvolgimento del GDNF nella ricezione somatosensoriale e nella innervazione mandibolare, iomandibolare e dei muscoli degli archi branchiali. Allo stesso modo, il recettore GFR α 1 è risultato espresso in neuroni del trigemino del cervello umano (Quartu et al 2006).

Nel midollo allungato dell'encefalo di zebrafish, immunoreattività al GFR α 1 è stata osservata in neuroni del nucleo dell'ottavo discendente e posteriore, evidenziando una possibile implicazione del GDNF nei pathway sensoriali uditivi. Tale risultato è comparabile a quello ottenuto nei roditori nel nucleo vestibolare (Glazner et al., 1998; Golden et al., 1998; Matsuo et al., 2000) e nel nucleo cocleare (Trupp et al., 1997; Golden et al., 1998; Matsuo et al., 2000).

Sempre nel mielencefalo, positività al GFR α 1 è stata visualizzata in tutte e tre le componenti della colonna mediale della formazione reticolare. Questa localizzazione permette di ipotizzare un coinvolgimento del GDNF nelle complesse funzioni premotorie di questi neuroni, che presentano connessioni reciproche con il tetto ottico, il cervelletto ed il midollo spinale (Wulliman, 1998).

Inoltre immunoreattività al GFR α 1 è stata osservata in alcune delle aree in cui sono localizzati i neuroni dopaminergici (Rink and Wullimann 2001): area telencefalica ventrale (zona ventrale e laterale), porzione anteriore e posteriore del nucleo preottico parvocellulare, nucleo soprachiasmatico, nucleo talamico ventro-mediale e ventro-laterale, nucleo periventricolare del tubercolo posteriore, zona caudale, ventrale e dorsale dell'ipotalamo periventricolare. I neuroni dopaminergici nel tubercolo posteriore dell'area diencefalica ventrale rappresentano il sistema dopaminergico ascendente allo striato, paragonabile al sistema nigrostriatale umano (Rink and Wullimann 2001, 2002). Nei mammiferi, il recettore GFR α 1 è espresso in quelle aree del cervello in cui è possibile evidenziare i corpi delle cellule dopaminergiche, come la substantia nigra e l'area tegmentale ventrale, e le loro aree bersaglio, lo striato ed il nucleo accumbens (Glazner et al 1998; Perez-Navarro et al 1999; Matsuo et al 2000). Per questo motivo nello zebrafish, così come negli altri mammiferi, il GDNF sembra esercitare i suoi effetti neurotrofici sui neuroni dopaminergici. Disfunzioni del sistema dopaminergico caratterizzano malattie neurologiche, una per tutte il morbo di Parkinson, e l'invecchiamento. Nei pazienti affetti dal morbo di Parkinson, infatti, si osserva una riduzione dell'espressione del GDNF nella substantia nigra (Chauhan et al 2001; Mogi et al 2001), indicando quindi un possibile contributo dei fattori neurotrofici della famiglia del GDNF e dei loro rispettivi recettori nelle disfunzioni dopaminergiche associate ad uno stato patologico, e forse anche un loro interessamento nel normale invecchiamento. Inoltre ulteriori dati, in aggiunta a quelli precedentemente citati, raccolti in ratti e primati non-umani hanno messo in evidenza che una concentrazione più elevata del GDNF riduce i danni a carico dei neuroni dopaminergici associati a lesioni acute e all'invecchiamento (Bowenkamp et al 1995; Granholm et al 1997; Mandel et al 1997; Date et al 1998; Gash et al 1998; Kordower et al 2000; Ericson et al 2005). In conclusione, l'ampia espressione del recettore GFR α 1 nell'encefalo di zebrafish adulto suggerisce un coinvolgimento del fattore neurotrofico GDNF in diverse aree del sistema nervoso centrale, nelle quali questo svolge le proprie funzioni trofiche.

Dal momento che lo zebrafish costituisce un sistema modello emergente per lo studio di patologie neurodegenerative umane (Flinn et al 2008) e considerando che in letteratura sono presenti diversi studi che hanno evidenziato che l'espressione del recettore GFR α 1 risulta essere modulata dinamicamente ed in modo differenziale nel cervello adulto in conseguenza di insulti a carico dell'encefalo causati da crisi epilettiche (Reeben et al 1998; Kokaia et al 1999; Chen et al 2001; Gao et al 2003) ed anche da ischemie (Kitagawa et al 1999; Arvidsson et al 2001; Miyazaki et al 2002; Sarabi et al 2001b, 2003b), i dati riguardanti la distribuzione di questo recettore nell'encefalo di zebrafish adulto rappresentano un ulteriore contributo per studi futuri. Tali studi potrebbero essere volti all'approfondimento del meccanismo d'azione dei ligandi della famiglia del GDNF, ed eventualmente potrebbero poi coinvolgere queste proteine nel trattamento terapeutico di patologie neurodegenerative per le quali non è ancora conosciuta una linea guida di cura.

Bibliografia

Bibliografia

- Airaksinen MS, Saarma M. (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 3: 383-94.
- Airavaara M, Planken A, Gäddnäs H, Piepponen TP, Saarma M, Ahtee L. (2004) Increased extracellular dopamine concentrations and FosB/DeltaFosB expression in striatal brain areas of heterozygous GDNF knockout mice. *Eur J Neurosci.* 20: 2336-2344.
- Arvidsson A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Saarma M, Lindvall O. (2001) Stroke induces widespread changes of gene expression for glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors in the adult rat brain. *Neuroscience.* 106: 27-41.
- Baloh RH, Tansey MG, Golden JP, Creedon DJ, Heuckeroth RO, Keck CL, Zimonjic DB, Popescu NC, Johnson EM Jr, Milbrandt J. (1997) TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron.* 18: 793-802.
- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J. (1998) Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron.* 21: 1291-1302.
- Barman R.P. (1991) A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio* Hamilton-Buchanan (Pisces, Cyprinidae). *Rec. Zool. Surv. India Occas. Pap.* Vol. 137.
- Barnett MW, Fisher CE, Perona-Wright G, Davies JA. (2002) Signalling by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) requires heparan sulphate glycosaminoglycan. *J Cell Sci.* 115: 4495-4503.
- Bassett DI, Currie PD. (2003) The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet.*; 12 Spec No 2: R265-70.
- Becker CG, Becker T. (2008) Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restor Neurol Neurosci.* 26: 71-80.
- Becker T, Wullimann MF, Becher CG, Bernhardt RR, Schachner M. (1997) Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 377: 577-595.
- Bell C, Bodznick D, Montgomery J, Bastian J. (1997) The generation and subtraction of sensory expectations within cerebellum-like structures. *Brain Behav Evol.* 50: 17-31.

- Best JD, Alderton WK. (2008) Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 4: 567-576.
- Braford MR jr., Northcutt RG. (1983) Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. *In: Davis RE. Northcutt RG. (eds): Fish Neurobiology, Vol. 2 Higher Brain Areas and Functions.* Ann. Arbor: University of Michigan Press, 117-140.
- Brain WR, Walton JN. (1969) Brain's Diseases of the Nervous System, seventh ed. Oxford University Press, London.
- Buj-Bello A, Adu J, Piñón LG, Horton A, Thompson J, Rosenthal A, Chinchetru M, Buchman VL, Davies AM. (1997) Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature.* 387: 721-724.
- Bulloch K, Milner TA, Prasad A, Hsu M, Buzsaki G, McEwen BS. (1998) Induction of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in hippocampal neurons following ischemia: a putative regional modulator of the CNS injury/immune response. *Exp Neurol.* 150: 195-205.
- Burazin TC, Gundlach AL. (1999) Localization of GDNF/neurturin receptor (c-ret, GFRalpha-1 and alpha-2) mRNAs in postnatal rat brain: differential regional and temporal expression in hippocampus, cortex and cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res.* 73: 151-171.
- Butler AB, Saidel WM. (1991) Retinal projections in the freshwater butterfly fish, *Pantodon buchholzi* (Osteoglossoidei). I. Cytoarchitectonic analysis and primary visual pathways. *Brain Behav Evol.;* 38: 127-153.
- Butte MJ. (2001) Neurotrophic factor structures reveal clues to evolution, binding, specificity, and receptor activation. *Cell Mol Life Sci.* 58: 1003-1013.
- Cameron DA. (2000) Cellular proliferation and neurogenesis in the injured retina of adult zebrafish. *Vis. Neurosci.* 17: 789-797.
- Chao & Hempstead (1995) p75 and trk: e two receptor system. *Trends in Neuroscience.* 18: 321-326.
- Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM. (2001) Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat.* 21: 277-288.

- Chen ZY, Chai YF, Cao L, Lu CL, He C. (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rats. *Brain Res.* 902: 272-276.
- Creedon DJ, Tansey MG, Baloh RH, Osborne PA, Lampe PA, Fahrner TJ, Heuckeroth RO, Milbrandt J, Johnson EM Jr. (1997) Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 7018-7023.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelse C, Holtas S, van Roon-Mom WMC, Bjork-Eriksson T, Nordborg C et al. (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science.* 315: 1243-1249.
- De Graaf E, Srinivas S, Kilkenny C, D'Agati V, Mankoo BS, Costantini F, Pachnis V. (2001) Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes Dev.* 15: 2433-2444.
- Doyle LMF, Stafford PP, Roberts BL. (2001) Recovery of locomotion correlated with axonal regeneration after a complete spinal transection in the eel. *Neuroscience.* 107: 169-179.
- Echteler SM. (1984) Connections of the auditory midbrain in a teleost fish, *Cyprinus carpio*. *J Comp Neurol.*; 230: 536-551.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.*; 4: 1313-1317.
- Ernest S., Rauch G.J., Haffter P., Geisler R., Petit C., Nicolson T. (2000) Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness. *Hum. Mol. Genet.*; 9: 2189-2196.
- Facello B, Castaldo L, De Martino L, Lucini C. (2009) Glial cell line-derived neurotrophic factor in Purkinje cells of adult zebrafish: an autocrine mode of action? *Neurosci Lett.* 465: 133-137.
- Fisher CE, Michael L, Barnett MW, Davies JA. (2001) Erk MAP kinase regulates branching morphogenesis in the developing mouse kidney. *Development.* 128: 4329-4338.
- Flinn L, Bretaud S, Lo C, Ingham PW, Bandmann O. (2008) Zebrafish as a new animal model for movement disorders. *J Neurochem.* 106: 1991-1997.

- Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrisey D, McClain J, Wang DY, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, et al. (1992) Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron*. 9: 295-305.
- Fukuda T, Kiuchi K, Takahashi M. (2002) Novel mechanism of regulation of Rac activity and lamellipodia formation by RET tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 277: 19114-19121.
- Gao X, Wang J, Wei X. (2003) Expressions of GDNF, GDNFR alpha and Ret proteins in the brain of rats with seizures induced by pilocarpine. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 35: 296-298.
- Garcès A, Livet J, Grillet N, Henderson CE, Delapeyrière O. (2001) Responsiveness to neurturin of subpopulations of embryonic rat spinal motoneuron does not correlate with expression of GFR alpha 1 or GFR alpha 2. *Dev Dyn*. 220: 189-197.
- Gardell LR, Wang R, Ehrenfels C, Ossipov MH, Rossomando AJ, Miller S, Buckley C, Cai AK, Tse A, Foley SF, Gong B, Walus L, Carmillo P, Worley D, Huang C, Engber T, Pepinsky B, Cate RL, Vanderah TW, Lai J, Sah DW, Porreca F. (2003) Multiple actions of systemic artemin in experimental neuropathy. *Nat Med*. 9: 1383-1389.
- Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA. (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*. 380: 252-255.
- Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D. (1987) Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J*. 6: 3995-4002.
- Glazner GW, Mu X, Springer JE. (1998) Localization of glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha and c-ret mRNA in rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 391: 42-49.
- Golden JP, Baloh RH, Kotzbauer PT, Lampe PA, Osborne PA, Milbrandt J, Johnson EM Jr. (1998) Expression of neurturin, GDNF, and their receptors in the adult mouse CNS. *J Comp Neurol*. 398: 139-150.
- Golden JP, DeMaro JA, Osborne PA, Milbrandt J, Johnson EM Jr. (1999) Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp Neurol*. 158: 504-528.
- Golden JP, Milbrandt J, Johnson EM Jr. (2003) Neurturin and persephin promote the survival of embryonic basal forebrain cholinergic neurons in vitro. *Exp Neurol*. 184: 447-455.

- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. (1999) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5263-5267.
- Hamilton-Buchanan F. (1822) *An Account of the Fishes Found in the River Ganges and its Branches.* Edinburgh : Archibald Constable 405 pp. pls 1–39.
- He DY, McGough NN, Ravindranathan A, Jeanblanc J, Logrip ML, Phamluong K, Janak PH, Ron D. (2005) Glial cell line-derived neurotrophic factor mediates the desirable actions of the anti-addiction drug ibogaine against alcohol consumption. *J Neurosci.* 25: 619-628.
- Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vandlen RA, Simpson LC [corrected to Simmons L, et al. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science.* 266:1062-1064.
- Herrick CJ. (1948) *The brain of the Tiger Salamander Ambystoma tigrinum.* Chicago: University of Chicago Press.
- Hong M, Mukhida K, Mendez I. (2008) GDNF therapy for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother.* 8: 1125-1139.
- Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, Rosenblad C, Kirik D, Moffat B, Simmons L, Johnson E Jr, Milbrandt J, Rosenthal A, Bjorklund A, Vandlen RA, Hynes MA, Phillips HS. (1998) Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 18: 4929-4937.
- Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altmock BW, Fox GM. (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell.* 85: 1113-1124.
- Jing S, Yu Y, Fang M, Hu Z, Holst PL, Boone T, Delaney J, Schultz H, Zhou R, Fox GM. (1997) GFRalpha-2 and GFRalpha-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *J Biol Chem.* 272: 33111-33117.
- Kaplan DR, Miller FD. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 10: 381-391.
- Kim BT, Rao VL, Sailor KA, Bowen KK, Dempsey RJ. (2001) Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on hippocampal neurons after traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg.* 95: 674-679.

- Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, Koga N, Itoyama Y, Abe K. (1998) Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 29: 1417-1422.
- Kitagawa H, Sasaki C, Sakai K, Mori A, Mitsumoto Y, Mori T, Fukuchi Y, Setoguchi Y, Abe K. (1999) Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 19: 1336-1344.
- Kjaer S, Ibáñez CF. (2003) Identification of a surface for binding to the GDNF-GFR alpha 1 complex in the first cadherin-like domain of RET. *J Biol Chem*. 278: 47898-47904.
- Klein RD, Sherman D, Ho WH, Stone D, Bennett GL, Moffat B, Vandlen R, Simmons L, Gu Q, Hongo JA, Devaux B, Poulsen K, Armanini M, Nozaki C, Asai N, Goddard A, Phillips H, Henderson CE, Takahashi M, Rosenthal A. (1997) A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature*. 387: 717-721.
- Kokaia Z, Airaksinen MS, Nanobashvili A, Larsson E, Kujamäki E, Lindvall O, Saarma M. (1999) GDNF family ligands and receptors are differentially regulated after brain insults in the rat. *Eur J Neurosci*. 11: 1202-1216.
- Kornack DR, Rakic P. (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 5768-5773.
- Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM Jr, Milbrandt J. (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature*. 384: 467-470.
- Koumans JTM, Akster HA. (1995) Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol*. 110A: 3-20.
- Laberge F, Hara TJ. (2001) Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Res Brain Res Rev*. 36: 46-59.
- Lawson ND, Weinstein BM. (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol.*; 248: 307-318.
- Lewing GR & Barde YA. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annals Review of Neuroscience*. 19: 289-317

- Li L, Wu W, Lin LF, Lei M, Oppenheim RW, Houenou LJ. (1995) Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 9771-9775.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 260: 1130-1132.
- Lindsay RM. (1996) Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29. 351: 365-373.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271: 978-981.
- Lucini C, Maruccio L, Patruno M, Tafuri S, Staiano N, Mascarello F, Castaldo L. (2008) Glial cell line-derived neurotrophic factor expression in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Histol Histopathol.* 23: 251-261.
- Luskin MB. (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons form the forebrain subventricular zone. *Neuron.* 11: 173-189.
- Maroldt H, Kaplinovsky T, Cunningham AM. (2005) Immunohistochemical expression of two members of the GDNF family of growth factors and their receptors in the olfactory system. *J Neurocytol.* 34: 241-255.
- Martinou JC, Martinou I, Kato AC (1992) Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro. *Neuron.* 8: 737-44.
- Masure S, Cik M, Hoefnagel E, Nosrat CA, Van der Linden I, Scott R, Van Gompel P, Lesage AS, Verhasselt P, Ibáñez CF, Gordon RD. (2000) Mammalian GFRalpha -4, a divergent member of the GFRalpha family of coreceptors for glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands, is a receptor for the neurotrophic factor persephin. *J Biol Chem.* 275: 39427-39434.
- Matsukawa T, Arai K, Koriyama Y, Liu Z, Kato S. (2004) Axonal regeneration of fish optic nerve after injury. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 445-451.
- Matsuo A, Nakamura S, Akiguchi I. (2000) Immunohistochemical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha-1 in the rat brain: confirmation of expression in various neuronal systems. *Brain Res.* 859: 57-71.

- McCormick CA, Hernandez DV. (1996) Connections of octaval and lateral line nuclei of the medulla in the goldfish, including the cytoarchitecture of the secondary octaval population in goldfish and catfish. *Brain Behav Evol.*; 47: 113-37.
- Medina M, Reperant J, Ward R, Rio JP, Lemire M. (1993) The primary visual system of flatfish: an avolutionary perspective. *Anat. Embryol.* 187: 167-191.
- Meek J. (1983) Functional anatomy of the tectum mesencephali of the goldfish. An explorative analysis of the functional implications of the laminar structural organization of the tectum. *Brain Res.* 287: 247-297.
- Meyer RL, Sakurai K, Schauwecker E. (1985) Topography of regenerating optic fibers in goldfish traced with local wheat germ injections into retina: evidence for discontinuous microtopography in the retinotectal projection. *J. Comp. Neurol.* 239: 27-43.
- Miyazaki H, Nagashima K, Okuma Y, Nomura Y. (2002) Expression of Ret receptor tyrosine kinase after transient forebrain ischemia is modulated by glial cell line-derived neurotrophic factor in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 318: 1-4.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neurosci Lett.* 300: 179-181.
- Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. (1995) Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene.* 11: 2039-2045.
- Naveilhan P, Baudet C, Mikaels A, Shen L, Westphal H, Ernfors P. (1998) Expression and regulation of GFRalpha3, a glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 1295-1300.
- Nawa H, Sah DW. (1990) Different biological activities in conditioned media control the expression of a variety of neuropeptides in cultured sympathetic neurons. *Neuron.* 4: 279-87.
- Neely M.N., Pfeifer J.D., Caparon M. (2002) Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun.*;70: 3904-3914.
- Nieuwenhuys R, Meek J. (1990) The telencephalon of actinopterygian fishes. *In: Jones E.G., Peters A. (eds): Cerebral Cortex*, Vol. 8A. New York: Plenum Press, 31-73.
- Nieuwenhuys R. (1967) Comparative anatomy of olfactory centres and tracts. *Prog Brain Res.*; 23: 1-6.

- Northcutt RG, Butler AB. (1993) The diencephalons of the Pacific herring, *Clupea harengus*: retinofugal projections to the diencephalon and optic tectum. *J. Comp. Neurol.* 328: 547-561.
- Northcutt RG. (1983) Evolution of the optic tectum in ray-finned fishes. In: Davis RE, Northcutt RG. (eds.): *Fish Neurobiology, Vol.2 Higher Brain Areas and Functions*. Ann. Arbor: University of Michigan Press, 1-42.
- Nosrat CA, Tomac A, Hoffer BJ, Olson L. (1997) Cellular and developmental patterns of expression of Ret and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha mRNAs. *Exp Brain Res.* 115: 410-422.
- Paratcha G and Ledda F. (2008) GDNF and GFRa: a versatile molecular complex for developing neurons. *Trends in Neurosc.* 31: 384-391.
- Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF. (2003) The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell.* 113: 867-879.
- Paulin MG. (1993) The role of the cerebellum in motor control and perception. *Brain Behav Evol.* 41: 39-50.
- Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. (2001) Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp. Neurol.* 172: 1-16.
- Pineda JR, Rubio N, Akerud P, Urbán N, Badimon L, Arenas E, Alberch J, Blanco J, Canals JM. (2007) Neuroprotection by GDNF-secreting stem cells in a Huntington's disease model: optical neuroimage tracking of brain-grafted cells. *Gene Ther.* 14: 118-128.
- Poteryaev D, Titievsky A, Sun YF, Thomas-Crusells J, Lindahl M, Billaud M, Arumäe U, Saarma M. (1999) GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1. *FEBS Lett.* 463: 63-66.
- Prouty MG, Correa NE, Barker LP, Jagadeeswaran P, Klose KE. (2003) Zebrafish-*Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.*; 225: 177-182.
- Purves D, Hadley RD, Voyvodic JT. (1986) Dynamic changes in the dendritic geometry of individual neurons visualized over periods of up to three months in the superior cervical ganglion of living mice. *J Neurosci.* 6: 1051-60.

- Puzdrowski RL. (1988) Afferent projections of the trigeminal nerve in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Morphol.*; 198: 131-147.
- Quartu M, Serra MP, Boi M, Ferretti MT, Lai ML, Del Fiacco M. (2007) Tissue distribution of Ret, GFRalpha-1, GFRalpha-2 and GFRalpha-3 receptors in the human brainstem at fetal, neonatal and adult age. *Brain Res.* 1173: 36-52.
- Quartu M, Serra MP, Manca A, Mascia F, Follesa P, Del Fiacco M. (2005) Neurturin, persephin, and artemin in the human pre- and full-term newborn and adult hippocampus and fascia dentata. *Brain Res.* 1041: 157-166.
- Quartu M, Serra MP, Mascia F, Boi M, Lai ML, Spano A, Del Fiacco M. (2006) GDNF family ligand receptor components Ret and GFRalpha-1 in the human trigeminal ganglion and sensory nuclei. *Brain Res Bull.* 69: 393-403.
- Reeben M, Laurikainen A, Hiltunen JO, Castrén E, Saarma M. (1998) The messenger RNAs for both glial cell line-derived neurotrophic factor receptors, c-ret and GDNFRalpha, are induced in the rat brain in response to kainate-induced excitation. *Neuroscience.* 83: 151-159.
- Rose TM, Bruce AG. (1991) Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 8641-8645.
- Rowe RWD, Goldspink G. (1969) Muscle fibre growth in five different muscles in both sexes of mice. *J. Anat.* 104: 519-530.
- Saarma M, Sariola H. (1999) Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech.* 45: 292-302.
- Sagot Y, Tan SA, Hammang JP, Aebischer P, Kato AC. (1996) GDNF slows loss of motoneurons but not axonal degeneration or premature death of pmn/pmn mice. *J Neurosci.* 16: 2335-2341.
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Garcia-Verdugo JM et al. (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature.* 427: 740-744.
- Sanicola M, Hession C, Worley D, Carmillo P, Ehrenfels C, Walus L, Robinson S, Jaworski G, Wei H, Tizard R, Whitty A, Pepinsky RB, Cate RL. (1997) Glial cell line-derived

neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 6238-6243.

- Sarabi A, Chang CF, Wang Y, Hoffer BJ, Morales M. (2001a) Time course study of GFRalpha-1 expression in an animal model of stroke. *Exp Neurol.* 170: 283-289.
- Sarabi A, Chang CF, Wang Y, Hoffer BJ, Morales M. (2001b) Time course study of GFRalpha-1 expression in an animal model of stroke. *Exp Neurol.* 170: 283-289.
- Sarabi A, Chang CF, Wang Y, Tomac AC, Hoffer BJ, Morales M. (2003b) Differential expression of the cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor GFRalpha1 in heterozygous Gfralpha1 null-mutant mice after stroke. *Neurosci Lett.* 341: 241-245.
- Sarabi A, Hoffer BJ, Olson L, Morales M. (2000) GFRalpha-1 is expressed in parvalbumin GABAergic neurons in the hippocampus. *Brain Res.* 877: 262-270.
- Sarabi A, Hoffer BJ, Olson L, Morales M. (2003a) Glial cell line neurotrophic factor-family receptor alpha-1 is present in central neurons with distinct phenotypes. *Neuroscience.* 116: 261-273.
- Sariola H, Saarma M. (2003) Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci.* 116: 3855-3862.
- Schellart NAM. (1990) The visual pathways and central non-tectal processing. In: Douglas RH, Djamgoz MBA. (eds.): *The Visual System of Fish.* London: Chapman & Hall, 345-372.
- Senturk e Arici. (1998) Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol.* 39: 144-151.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 21: 7153-7160.
- Serra MP, Quartu M, Lai ML, Follesa P, Del Fiacco M. (2002) Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA in the human newborn and adult hippocampal formation. *Brain Res.* 928: 160-164.
- Serra MP, Quartu M, Mascia F, Manca A, Boi M, Pisu MG, Lai ML, Del Fiacco M. (2005) Ret, GFRalpha-1, GFRalpha-2 and GFRalpha-3 receptors in the human hippocampus and fascia dentata. *Int J Dev Neurosci.* 23: 425-438.
- Shepherd IT, Pietsch J, Elworthy S, Kelsh RN, Raible DW. (2004) Roles for GFRalpha1 receptors in zebrafish enteric nervous system development. *Development.* 131: 241-249.

- Smith A, Zhang J, Guay D, Quint E, Johnson A, Akimenko MA. (2008) Gene expression analysis on sections of zebrafish regenerating fins reveals limitations in the whole-mount in situ hybridization method. *Dev Dyn.* 237: 417-425.
- Takahashi M, Buma Y, Taniguchi M. (1991) Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells. *Oncogene.* 6: 297-301.
- Tanaka M, Xiao H, Kiuchi K. (2002) Heparin facilitates glial cell line-derived neurotrophic factor signal transduction. *Neuroreport.* 13: 1913-1916.
- Taylor MR, Hurley JB, Van Epps HA, Brockerhoff SE. (2004) A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 101: 4584-4589.
- Thompson J, Doxakis E, Piñón LG, Strachan P, Buj-Bello A, Wyatt S, Buchman VL, Davies AM. (1998) GFRalpha-4, a new GDNF family receptor. *Mol Cell Neurosci.* 11: 117-126.
- Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature.* 373: 335-339.
- Tomac AC, Agulnick AD, Haughey N, Chang CF, Zhang Y, Bäckman C, Morales M, Mattson MP, Wang Y, Westphal H, Hoffer BJ. (2002) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in Persephin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 :9521-9526.
- Tomasiewicz HG, Flaherty DB, Soria JP, Wood JG. (2002) Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. *J Neurosci Res.*; 70: 734-745.
- Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A. (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 382: 80-83.
- Trupp M, Raynoschek C, Belluardo N, Ibáñez CF. (1998) Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Neurosci.* 11: 47-63.
- Trupp M, Scott R, Whittemore SR, Ibáñez CF. (1999) Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem.* 274: 20885-20894.

- Tsui-Pierchala BA, Ahrens RC, Crowder RJ, Milbrandt J, Johnson EM Jr. (2002) The long and short isoforms of Ret function as independent signaling complexes. *J Biol Chem.* 277: 34618-34625.
- Villani L, Dipietrangelo L, Pallotti C, Pettazzoni P, Zironi I, Guarnieri T. (1994) Ultrastructural and immunohistochemical study of the telencephalo-habenulo-interpeduncular connections of the goldfish. *Brain Res. Bull.* 34: 1-5.
- Weatherley AH, Gill HS. (1985) Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia.* 41: 353-354.
- Westerfield M. (1999) The zebrafish book, A guide for the laboratory use of zebrafish, Istitute of neuroscience University of Oregon; Williman D.III H., Westerfield M., Zon L.I.: The zebrafish. Vol. 59.
- Whitfield TT. (2002) Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J Neurobiol.*; 53: 157-171.
- Worby CA, Vega QC, Chao HH, Seasholtz AF, Thompson RC, Dixon JE. (1998) Identification and characterization of GFRalpha-3, a novel Co-receptor belonging to the glial cell line-derived neurotrophic receptor family. *J Biol Chem.* 273: 3502-3508.
- Wullimann M.F., Rupp B., Reichert H. (1996) Neuroanatomy of the zebrafish brain. A topological atlas. Berlin: Birkhäuser Verlag.
- Wullimann MF, Meyer DL, Northcutt RG. (1991) The visually related posterior pretectal nucleus in the non-percomorph teleost *Osteoglossum bicirrhosum* projects to the hypothalamus: a DiI study. *J Comp Neurol.*; 312: 415-435.
- Wullimann MF, Mueller T. (2004) Identification and morphogenesis of the eminentia thalami in the zebrafish. *J Comp Neurol.* 471: 37-48.
- Wullimann MF, Northcutt RG. (1988) Connections of the corpus cerebelli in the green sunfish and the common goldfish: a comparison of perciform and cypriniform teleosts. *Brain Behav Evol.*; 32: 293-316.
- Wullimann MF, Northcutt RG. (1989) Afferent connections of the valvula cerebelli in two teleosts, the common goldfish and the green sunfish. *J Comp Neurol.*; 289: 554-567.
- Yamamori T, Fukada K, Aebersold R, Korsching S, Fann MJ, Patterson PH. (1989) The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science.* 246: 1412-6.

- Yang YC, Yin T. (1992) Interleukin-11 and its receptor. *Biofactors*. 4: 15-21.
- Yasuhara T, Shingo T, Date I. (2007) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for Parkinson's disease. *Acta Med Okayama*. 61: 51-56.
- Zaman V, Boger HA, Granholm AC, Rohrer B, Moore A, Buhusi M, Gerhardt GA, Hoffer BJ, Middaugh LD. (2008) The nigrostriatal dopamine system of aging GFRalpha-1 heterozygous mice: neurochemistry, morphology and behavior. *Eur J Neurosci*. 28: 1557-1568.
- Zhang Y, Pardridge WM. (2009) Near complete rescue of experimental Parkinson's disease with intravenous, non-viral GDNF gene therapy. *Pharm Res*. 26: 1059-1063.
- Zimmerman AM, Lowery MS. (1999) Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). *J. Exp. Zool*. 284: 299-308.
- Zupanc GKH, Ott R. (1999) Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced. *Exp. Neurol*. 160: 78-87.
- Zupanc GKH. (2008) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *J Physiol Paris*. 102: 357-373.