



Università degli Studi di Napoli
Federico II

Tesi di Dottorato di Ricerca
in Biologia Avanzata
XVIII° ciclo

**Meccanismi molecolari che sottendono allo sviluppo dei
neuroni dopaminergici mesencefalici: ruolo del recettore
nucleare Nurr1.**

Autore:

Floriana Volpicelli

Correlatore:

Dott. Umberto di Porzio

Coordinatore:

Ch.ma Prof. Silvana Filosa

Tutore:

Ch.mo Prof. Catello Polito

Anno accademico 2004/2005

SOMMARIO

4

1. INTRODUZIONE

1.1.	Il sistema dopaminergico mesencefalico.	7
1.1.1.	I nuclei e le vie dopaminergiche mesencefaliche.	9
1.1.2.	Metabolismo della dopamina.	11
1.2.	Sviluppo embrionale del sistema dopaminergico.	13
1.2.1.	La nascita dei neuroni dopaminergici mesencefalici	13
1.2.2.	Induzione e determinazione dei neuroni dopaminergici	14
1.2.3.	Espressione genica durante lo sviluppo dei neuroni dopaminergici	20
1.2.4.	Maturazione e mantenimento della funzione dopaminergica	25
1.3.	Scopo del lavoro di tesi.	31

2. MATERIALI E METODI

2.1.	Animali e dissezioni.	33
2.2.	Culture cellulari.	33
2.3.	Purificazione della proteina Sonic Hedgehog ricombinante (SHH-N).	35
2.4.	Estrazione RNA e trascrizione inversa.	35
2.5.	Utilizzo di microgriglie a sonde oligonucleotidiche (microarrays).	38
2.6.	RT-PCR semiquantitativa.	45
2.7.	Real time RT-PCR.	49
2.8.	Analisi dell'espressione proteica mediante western blot.	51
2.9.	Saggio della ricattura della dopamina ad alta affinità.	52
2.10.	Analisi immunocitochimica.	53

3. RISULTATI

3.1	Culture dopaminergiche mesencefaliche espanse.	55
3.1.1	Preparazione delle colture.	55
3.1.2	Caratterizzazione delle colture mesDA espanse.	58
3.2.	Modulazione dell'espressione genica di Nurr1 in neuroni dopaminergici mesencefalici.	64
3.2.1	Espressione genica di <i>Nurr1</i> durante lo sviluppo mesencefalico: studi <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	64
3.2.2.	La depolarizzazione stimola l'espressione genica di Nurr1 in neuroni embrionali DA.	66
3.3.	Utilizzo di microarrays per lo studio dei geni modulati dalla depolarizzazione.	69
3.3.1.	Raggruppamento dei trascritti filtrati dall'analisi dei dati ottenuti dalla scansione dei microarrays.	82
3.3.2.	Organizzazione gerarchica dei fattori di trascrizione attivati.	85
3.4.	Validazione delle analisi bioinformatiche mediante RT-PCR.	87
3.5.	Trasduzione del segnale.	90

4. DISCUSSIONE	94
-----------------------	----

5. CONCLUSIONI	103
-----------------------	-----

6. BIBLIOGRAFIA	105
------------------------	-----

7. INDICE DELLE ABBREVIAZIONI	120
8. RINGRAZIAMENTI	122

SOMMARIO

Il progetto di ricerca alla base della tesi di dottorato è centrato sullo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'acquisizione di uno specifico fenotipo neuronale, quello dei neuroni dopaminergici (DA) mesencefalici e sullo studio del recettore nucleare Nurr1, la cui funzione è indispensabile per il differenziamento DA nel mesencefalo.

I circuiti formati dai neuroni DA costituiscono la via nigro-striatale e la via meso-cortico-limbica nel cervello dei mammiferi. Queste vie nervose sono fondamentali per l'omeostasi dell'organismo poiché regolano il controllo motorio, i meccanismi di ricompensa (cioè meccanismi che mediano il comportamento associato al piacere) e la modulazione degli stati affettivi ed emotivi. Disfunzioni di questi due sistemi per alterazione del neurone presinaptico dopaminergico sono coinvolte in gravi malattie neurologiche e psichiatriche (Morbo di Parkinson, Schizofrenia, ADHD o deficit d'attenzione ed iperattività, Distonia Dopa-responsiva, ecc.). I neuroni mesDA sono in numero relativamente piccolo (poche decine o centinaia di migliaia nei roditori e nei primati, rispettivamente). Pertanto per lo studio dei meccanismi differenziativi condotto in gran parte in coltura e per le potenziali applicazioni in terapia rigenerativa volta alla sostituzione di neuroni DA degenerati con neuroni neoformati, la generazione di un numero elevato di neuroni DA *in vitro* è stato un primo obiettivo perseguito in questo lavoro di tesi.

Utilizzando le conoscenze dei meccanismi molecolari che determinano il fenotipo DA *in vivo* durante lo sviluppo embrionale ho messo a punto un metodo per ottenere neuroni DA *in vitro* mediante l'azione di mitogeni e di specifiche molecole induttive, partendo da un numero esiguo di neuroblasti mesencefalici. La somministrazione di bFGF a cellule mes embrionali in mezzo privo di siero stimola la proliferazione dei neuroblasti e l'aggiunta di Sonic hedgehog (SHH) e di FGF8 incrementa di più di cinque volte il numero di neuroni dopaminergici, caratterizzati in base alla presenza di marcatori specifici sia mediante tecniche di biologia molecolare (PCR, immunoblots, ecc) che mediante tecniche di immunocistochimica, utilizzando anticorpi contro l'enzima biosintetico chiave di tutte le catecolamine, la tirosina

idrossilasi (TH). Gli effetti di SHH esogeno sono specifici infatti vengono aboliti da anticorpi anti-SHH aggiunti alle colture.

Queste colture, definite “espanse”, sono ricche in neuroni nestina-positivi (il filamento intermedio del citoscheletro dei neuroblasti ancora immaturi), ma presentano anche neuroni differenziati, in particolare sono ricche in neuroni TH⁺, mentre le cellule neurali non neuronali, glia, sono praticamente assenti. L’aggiunta di acido ascorbico (Vit.C) alle colture espande determina un’ulteriore arricchimento in neuroni DA (da 5 a 7 volte). Nel corso del lavoro è stato utilizzato questo sistema sperimentale per analizzare l’espressione differenziale di geni con un ruolo chiave nell’induzione, maturazione e mantenimento del fenotipo DA.

Essenziali per il differenziamento di questi neuroni dopaminergici sono alcuni fattori di trascrizione, in particolare *Pitx3*, codificato da un omeogene, e *Nurr1*, un recettore nucleare della superfamiglia dei recettori steroidei-tiroidei.

Durante il lavoro di tesi ho dimostrato che l’espressione di *Nurr1* è temporalmente regolata durante lo sviluppo embrionale del mesencefalo: i livelli del trascritto mostrano un picco corrispondente alla fase di differenziamento dei neuroni DA nel mesencefalo ventrale (E13-15 nel ratto). In colture primarie di mesencefalo di roditori, *Nurr1* segue un profilo di espressione temporale comparabile a quello osservato *in vivo*.

Dopo aver stabilito queste condizioni di coltura e definito il profilo di espressione di *Nurr1* il lavoro di tesi è stato incentrato allo studio di potenziali geni target di *Nurr1*. L’espressione di questo gene, e i livelli di proteina, aumentano considerevolmente, ed in maniera transiente, quando i neuroni DA vengono depolarizzati (mimando così l’attività elettrica del neurone).

Questo paradigma sperimentale è stato utilizzato per identificare, mediante un approccio “genome wide” geni target di *Nurr1* che potessero essere implicati nel differenziamento dei neuroni mesDA e nel loro mantenimento dopo lo sviluppo.

A questo scopo è stato utilizzato il sistema affymetrix, che permette di analizzare l’espressione genica su tutto il trascrittoma e individuare variazioni di espressione di geni specifici mediante ibridazione su sonde oligonucleotidiche ad alta densità su microarrays. Sono stati condotti esperimenti con RNA estratti dalle colture primarie depolarizzate e non (controlli). Analisi bioinformatiche e stringenti analisi statistiche hanno permesso di focalizzare l’attenzione su un numero di geni d’interesse la cui espressione varia in seguito a depolarizzazione, e specificatamente alcuni fattori di

trascrizione e neurotrofici, *Egr1*, *Atf3*, *Tieg*, *RAR α* , *Junb*, *Pten* e *Bdnf*. Questi esperimenti hanno permesso di stabilire una gerarchia temporale delle variazioni geniche causate dalla depolarizzazione. Sono stati così individuati alcuni geni i cui prodotti attivano la trascrizione di *Nurr1*, e altri che vengono modulati in seguito all'attivazione di *Nurr1*. I dati dei microarrays sono stati validati mediante PCR (sia RT che real-time). Allo scopo di identificare il network genico a monte ed a valle dell'attivazione di *Nurr1* sono stati condotti esperimenti di interferenza di vie di segnalazione intracellulare che regolano *Nurr1*. Questa strategia ha permesso di accertare che l'attivazione di *Nurr1* in seguito a depolarizzazione è calcio, MAP-chinasi e PKA indipendente. Ciò ci ha permesso di individuare alcuni geni che sono sulla stessa via di segnalazione di *Nurr1* MAP-chinasi indipendente, come *Egr1* e *Bdnf*. Questo studio quindi, mediante approcci sperimentali di colture cellulari, incremento di specifiche sottopopolazioni di neuroni dopaminergici, studi d'espressione genica, interferenza con i segnali intracellulari e spegnimento di geni d'interesse mediante RNA interference (in corso), fornisce importanti informazioni sui meccanismi che determinano il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni mesDA. Tali studi potranno avere importanti ricadute sullo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, sia rigenerative che farmacologiche, per la cura delle malattie che coinvolgono il sistema dopaminergico.

Parole chiavi: dopamina, bFGF, Sonic hedgehog, *Nurr1*, microarrays.

1. INTRODUZIONE

1.1. Il sistema dopaminergico mesencefalico.

Nel sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi i neuroni dopaminergici (DA) mesencefalici (mes) costituiscono la maggiore risorsa di dopamina, un neurotrasmettitore implicato in disordini mentali e neurologici. I neuroni che rilasciano DA sono anatomicamente e funzionalmente eterogenei, localizzati nel telencefalo, [*bulbi olfattivi* (Denis-Donini et al., 1984, 1999) e *retina* (Djamgoz et Wagner., 1992)], nel diencefalo [*nucleo arcuato ipotalamico* (area A12, Pilgrim et al., 1999) e *nucleo talamico sub-parafascicolare* (area 13, Takada, 1993)], e nel mesencefalo dove sono raggruppati in tre nuclei: *retro rubrico* (area A8), *substantia nigra* (SN, area A9) ed *area tegmentale ventrale* (VTA, area A10; Nelson et al., 1996; Lindvall et al., 1984). La SN è anatomicamente distinta in una parte detta *pars compacta*, dove sono localizzati principalmente i corpi cellulari DA, ed una detta *pars reticulata*, dove si sfoccano i dendriti DA e risiedono i *somata* dei neuroni GABAergici.

Il sistema dopaminergico mesencefalico (mesDA) è coinvolto in molteplici funzioni fisiologiche tra cui: il controllo motorio, la modulazione degli stati affettivi ed emotivi, i meccanismi di ricompensa ed alcune funzioni cognitive superiori.

Storicamente il riconoscimento della DA come un'importante neurotrasmettitore risale agli anni cinquanta-sessanta. Infatti, Von Euler e Lishajko nel 1957 e Bertler e Rosengrens nel 1959 dimostrarono che la DA era attiva di per sè e non era un mero intermediario nella sintesi della noradrenalina e dell'adrenalina. In quegli stessi anni Carlsson, Ehringer e Hornykiewicz dimostrarono che causa del morbo di Parkinson (PD) è la perdita della DA nello striato (Carlsson, 1959; Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Questa scoperta portò ad un nuovo approccio terapeutico, il trattamento con L-3,4 diidrossifenilalanina (L-DOPA; Barbeau et al., 1962; Cotzias 1968). Nella metà degli anni sessanta il gruppo svedese che faceva capo a Carlsson, Dahlstrom e Fuxe dimostrò che la DA striatale e limbica proveniva da neuroni localizzati nel mesencefalo ventrale (Andén et al., 1964, 1966; Dahlstrom and Fuxe, 1964). Infine, ancora in quegli anni venne dimostrato che l'aloiperidolo, un'antagonista dei recettori

DA, era capace di alleviare i sintomi psicotici in pazienti schizofrenici, aprendo così la via a quella che fu chiamata “l’ipotesi dopaminergica della schizofrenia”, ipotesi ancora valida oggi (Wagner et al., 1966).

La SN e la VTA sono costituiti da poche decine di migliaia di neuroni DA nei roditori e qualche centinaio di migliaia nei primati, un numero molto esiguo considerando che i neuroni totali nell’encefalo sono centinaia di miliardi. Diverse patologie neurologiche e psichiatriche sono correlate ad alterazioni dei sistemi mesDA, alcune delle quali colpiscono individui nel periodo infantile, adolescenziale e giovanile e nell’età avanzata. Tra le sindromi che hanno alla base una disfunzione dei sistemi DA annoveriamo, oltre ai già citati PD e schizofrenia, il disturbo da deficit dell’attenzione e da iperattività (ADHD), la distonia DOPA-sensibile ad esordio infantile, alcune forme di tossicodipendenza ed alcune forme di corea (movimenti repentini casuali degli arti e dei muscoli della faccia).

Nel SNC dei vertebrati tre grandi circuiti neurali sono controllati dai neuroni mesDA i cui corpi cellulari risiedono nella SN e nella VTA: la via nigrostriatale, la via mesocorticolimbica e la via mesolimbica. Essi presiedono a funzioni fisiologiche di fondamentale importanza per il controllo del movimento e dei comportamenti sociali ed affettivi.

La via tubero-infundibulare.

Un ulteriore importante sistema DA ad ampio spettro di azione è quello tubero-infundibulare, che si origina nel nucleo arcuato dell’ipotalamo e le cui terminazioni liberano DA nel circolo portale ipofisario. Questa via è coinvolta nel controllo della secrezione ormonale della ghiandola ipofisaria, in particolare della prolattina.

Il sistema DA retinico.

La retina contiene una definita popolazione di neuroni che producono DA e sono attivati per esposizione alla luce (che aumenta il metabolismo della DA e attiva l’enzima biosintetico tirosina idrossilasi, TH) e relativamente quiescenti al buio. Essa è sintetizzata nelle cellule amacrine (o in quelle interplexiformi, a seconda delle specie), interneuroni che trasmettono i segnali dei fotorecettori alle cellule gangliari.

La DA nei bulbi olfattivi.

La DA è sintetizzata negli interneuroni DA periglomerulari, che vengono generati per tutta la vita ed originano da una specifica nicchia, il “flusso migratorio rostrale” o “rostral migratory stream”.

1.1.1. I nuclei e le vie dopaminergiche mesencefaliche.

La via nigrostriatale.

Nei roditori, gli assoni DA della SN stabiliscono collegamenti sinaptici con il principale nucleo della base, lo striato (corrispondente al nucleo *caudato-putamen* dell'uomo) e danno origine alla via ascendente nigrostriatale. I nuclei della base presiedono al controllo del movimento ma, a differenza di tutte le altre componenti dei sistemi motori, non hanno connessioni afferenti ed efferenti dirette con il midollo spinale (Kandel et al., 2000). La via nigrostriatale fa parte del sistema extrapiramidale (responsabile del coordinamento ed integrazione di vari aspetti del comportamento motorio e dei movimenti del corpo) e presiede al controllo dei movimenti e del tono muscolare attraverso le efferenze striatali. Come già detto, nell'uomo la degenerazione di questa via causa il morbo di Parkinson, che ha un'incidenza prevalente nell'età avanzata ed è caratterizzato da tremore, rigidità muscolare, difficoltà ad iniziare o a completare movimenti abituali, instabilità posturale e mancanza dell'espressione facciale, sintomi descritti dal celebre neurologo inglese James Parkinson nel suo saggio sulla "Paralisi agitante" del 1817 (Jenner et al., 1992). Trapianti di neuroni mesDA fetali in modelli animali ed in pazienti PD sono in grado di riparare il danno e ripristinare la funzione DA (Zuddas et al 1990, Costantini et al., 1999, Bjorklund et Lindvall, 2000) (Fig. 1).

Le vie mesocorticolimbica e mesolimbica.

Gli assoni DA originati nella VTA innervano prevalentemente specifiche aree corticali (corteccia prefrontale mediale, giro del cingolo, area entorinale) e strutture del sistema limbico (il nucleo *accumbens*, il tubercolo olfattorio, l'amigdala, la corteccia piriforme). Queste due vie, largamente sovrapposte, sono coinvolte nel controllo dell'umore, dell'affetto, delle emozioni e nei comportamenti sociali (Schultz, 1997; Williams et Goldman-Rakic, 1998). Disturbi in questo sistema sono associati con la schizofrenia, con stati allucinatori, con sindromi depressive (Egan et Weinberger, 1997), con sindromi da dipendenza da alcune droghe d'abuso e con l'ADHD (Castellanos et Tannock, 2002).

La DA mesocorticale influenza anche le interazioni tra la corteccia prefrontale e l'area visiva, ed in particolare lo sviluppo della memoria visiva (Williams et Goldman-Rakic, 1995; Tang et al., 1997).

La distinzione di queste tre vie DA non va considerata in modo rigido, dal momento che esistono riconosciute sovrapposizioni di fibre dell'una e dell'altra via. Questo dato ha importanti implicazioni cliniche poiché lesioni di una via comportano anche disturbi nelle altre funzioni mesDA.

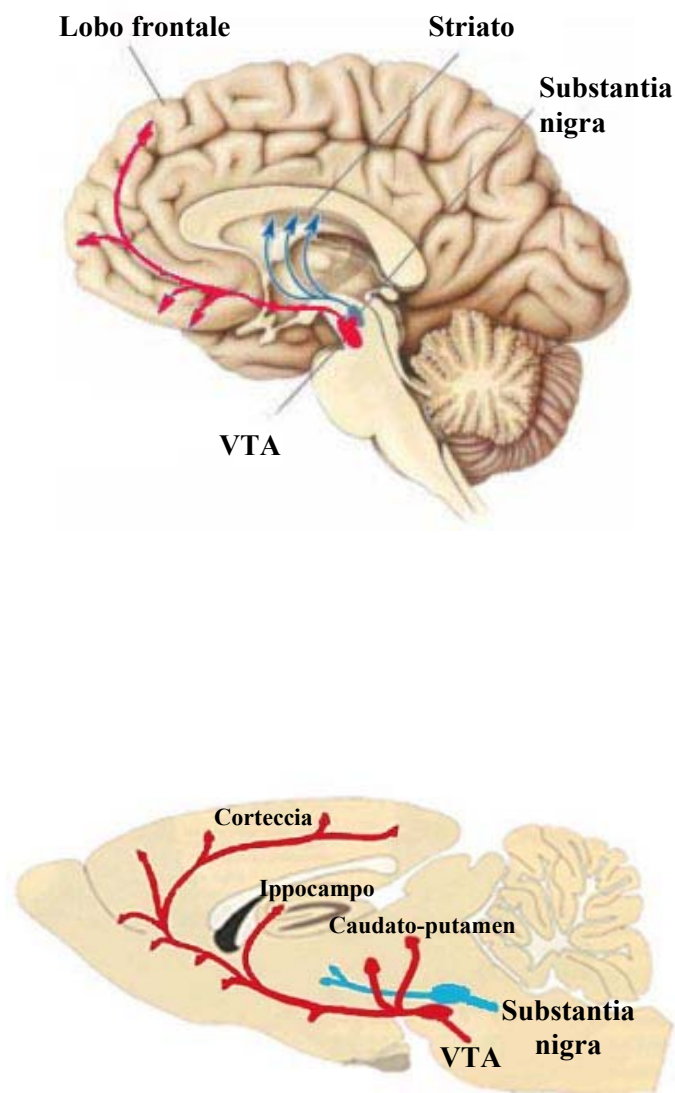


Fig.1 Le vie dopaminergiche mesencefaliche: in uomo (in alto) e nei roditori (in basso) in sezione sagittale

1.1.2. Metabolismo della dopamina.

La DA è sintetizzata nel soma e nelle terminazioni nervose a partire dalla tirosina che è convertita in levodopa (L-DOPA) dalla tirosina idrossilasi (TH), l'enzima limitante della catena biosintetica delle catecolamine (dopamina, noradrenalina ed adrenalina). La TH, presente solo in cellule adrenergiche, è un substrato per la proteina chinasi adenosinmonofosfato ciclico (cAMP)-dipendente (PKA) che la fosforila aumentandone l'attività idrossilasica. A sua volta la L-DOPA viene convertita in DA dall'enzima decarbossilasi degli aminoacidi aromatici (AADC), che ha distribuzione ubiquitaria nel SNC. Come già accennato, questa scoperta fu alla base della terapia orale per il PD con alte dosi di L-DOPA, possibile proprio perché la AADC è presente in molti tipi di cellule e quindi la L-DOPA può essere metabolizzata in DA anche in cellule non DA residue ed alleviare così i sintomi parkinsoniani.

La DA viene sintetizzata nel citoplasma e successivamente accumulata all'interno delle vescicole sinaptiche, mediante il trasportatore vescicolare delle monoammine (VMAT2). In seguito all'impulso nervoso, le vescicole sinaptiche si fondono con la membrana sinaptica e la DA viene rilasciata nella fessura sinaptica dove si può legare ai cinque differenti tipi di recettori postsinaptici noti come recettori DA (DAR 1-5). Tali recettori fanno parte della famiglia dei recettori accoppiati a proteine G con struttura a sette domini transmembranari (TM). I DAR sono raggruppati in due famiglie: il gruppo dei DAR 1 (D1, D5) ed il gruppo dei DAR2 (D2, D3, D4). I due gruppi DAR presentano sostanziali differenze tra loro: le regioni codificanti per i geni D1 e D5 non contengono introni, presenti invece nei geni codificanti per i tre membri della famiglia D2; i recettori di tipo DAR1 provocano un aumento di cAMP, quelli DAR2 una sua diminuzione; i segnali intracellulari attivati dai DAR sono numerosi, tra questi sono ben caratterizzati quelli mediati dalla via di trasduzione cAMP/PKA e dalla modulazione dei livelli di Ca^{2+} intracellulari. Ligandi selettivi discriminano tra le due famiglie dei DAR e tra i vari sottotipi recettoriali (Vallone et al., 1999). Ad esempio, la clozapina, un farmaco altamente efficace nel trattamento di alcuni sintomi schizofrenici particolarmente resistenti ad altri farmaci, mostra la più alta affinità per il recettore D4, espresso principalmente nella corteccia prefrontale e nell'amigdala. I vari DAR hanno distribuzione cellulare ed anatomica specifica, anche se fortemente sovrapponibile. I DAR sono anche presenti sui neuroni DA e fungono da autorecettori (D2 e D3). Questi ultimi sono del sottotipo

D2, e sono distribuiti sui corpi cellulari, sui dendriti e sulle terminazioni assonali DA. Gli autorecettori DA localizzati sulle terminazioni assonali sembrano modulare la sintesi ed il rilascio di DA, mentre quelli localizzati sui corpi cellulari e sui dendriti sembrano modulare l'intensità dell'impulso elettrico (Koeltzow et al., 1998). La DA liberata alla sinapsi viene metabolizzata in acido omovanillico mediante l'azione della catecol-O-metil transferasi (COMT), oppure può essere degradata ad acido acetico 3,4 diidrofenile (DOPAC) dalla monoamino ossidasi (MAO). La DA citoplasmatica può essere metabolizzata in DOPAC ad opera della MAO di membrana mitocondriale.

La DA rilasciata viene ricaptata dalle terminazioni dopaminergiche mediante il trasportatore ad alta affinità della DA (DAT). Il gene DAT è espresso unicamente nei neuroni DA, esso è un membro di una famiglia multigenica i cui componenti codificano per i trasportatori dei neurotrasmettitori sodio/cloruro dipendenti, che hanno una struttura caratterizzata da 12 domini transmembranari. DAT è anche il sito d'azione di alcune droghe d'abuso, come cocaina ed anfetamina (Amara et Arriza, 1993). Inoltre, DAT trasporta all'interno dei neuroni DA una neurotossina selettiva per i neuroni DA, l'1-metil-4-fenilpiridinico (MPP⁺), catabolita dell'1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropirridina (MPTP), (Schinelli et al., 1988). In topi mutanti nulli per DAT si evidenzia una iperlocomozione spontanea causata dall'aumentata persistenza di DA nella fessura sinaptica, ed un'insensibilità al trattamento con cocaina ed anfetamina (Giros et al., 1996). (Fig. 2)

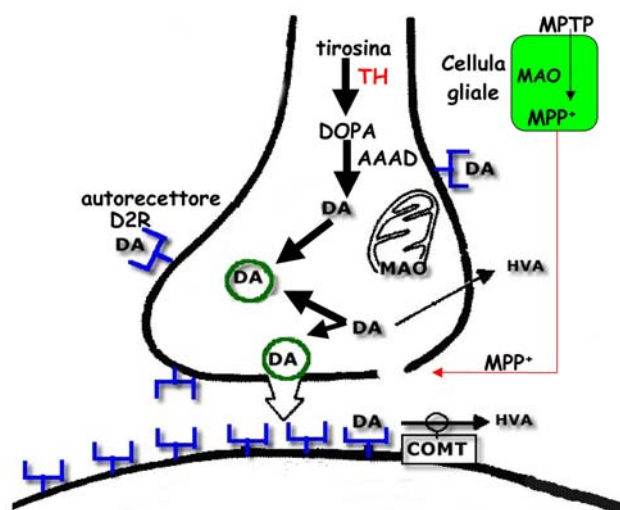


Fig.2 Il metabolismo della dopamina.

TH= Tirosina idrossilasi; DOPA= L-3,4-diidrossifenilalanina; AADC= enzima decarbossilasi degli L-aminoacidi aromatici ; MAO= Monoamino-ossidasi; DA= dopamina; DAT= trasportatore della DA; D1R= recettore dopaminergico; D2R= autorecettore dopaminergico; COMT= Catecol-O-metil transferasi; HVA= acido omovanillico; MPTP= 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetraidropirridina; MPP⁺= 1-metil-4-fenilpiridinico.

1.2. Sviluppo embrionale del sistema dopaminergico.

La specificità fenotipica dei diversi neuroni nei vari distretti cerebrali si acquisisce attraverso una serie di eventi in sequenza spazio-temporale specifica e l'espressione del programma genico intrinseco ad ogni neurone è modulata da fattori epigenetici come fattori solubili, interazioni con le altre cellule o con proteine della matrice extracellulare ed attività elettrica.

Gran parte degli studi sullo sviluppo dei neuroni mesDA sono stati condotti utilizzando roditori da laboratorio. Infatti in questi ultimi lo sviluppo dei neuroni mesDA è altamente comparabile a quello dei primati, sebbene la cronologia sia diversa nelle differenti specie.

Si è giunti all'identificazione di alcuni geni (e dei loro prodotti) e del ruolo da essi svolto nel differenziamento dei neuroni mesDA grazie allo sviluppo di tecniche di colture cellulari, di biologia molecolare, di immunoistochimica, manipolazioni geniche in animali transgenici, tra le quali l'uso di mutanti nulli ("knock out").

1.2.1. La nascita dei neuroni dopaminergici mesencefalici.

I neuroni mesDA sono generati precocemente durante la neurogenesi, in prossimità della giunzione mesencefalo–romboencefalica (Voorn et al., 1988) e successivamente in direzione ventrale verso le loro posizioni definitive nella flessura mesencefalica (la SN, la VTA e il campo retrorubrale) (di Porzio et al., 1990).

Mediante analisi di immunocitochimica, è stato possibile dimostrare che cellule TH⁺ sono presenti nel mes di topo già verso il nono giorno dello sviluppo embrionale (E9) (di Porzio et al., 1990). Poiché TH è un marcatore molecolare di tutti i neuroni catecolaminergici, le cellule TH⁺ sono considerate precursori dei neuroni DA nel mes, dei neuroni noradrenergici nel ponte e dei neuroni adrenergici nel *midollo allungato* (o bulbo) ventrale. Cellule TH⁺ ad E10 appaiono in migrazione dall'ependima periventricolare al mes ventrale. Quindi in questo caso la scelta del neurotrasmettitore utilizzato può avvenire prima della localizzazione definitiva dei neuroni, ed è indipendente dai contatti regionali specifici (di Porzio et al., 1990).

In accordo con questi dati, l'mRNA della *TH* è stato rilevato negli embrioni di topo già ad E8.5 (Zhou et al., 1995). Ad E10 il numero di neuroni TH⁺ aumenta e ad E10-E11 la loro distribuzione ricorda i gruppi di cellule A9 e A10 del topo adulto,

sebbene solo ad E13 essi appaiono come due aree separate (di Porzio et al., 1990). Nel ratto, sia le cellule TH⁺ (Voorn et al., 1988; Fiszman et al., 1991) sia l'mRNA della *TH* (Perrone Capano et al., 1994) possono essere identificati già ad E12. È possibile che nel ratto l'espressione di *TH* inizi in uno stadio ancora più precoce, ma l'identificazione e la dissezione del mes prima di E12 è tecnicamente difficile.

Intorno a E15-E16 le prime fibre DA raggiungono lo striato e la DA può già essere rilasciata dalle terminazioni sinaptiche in questo nucleo (Fiszman et al., 1991). La sequenza degli eventi di sviluppo dei neuroni DA è simile nell'uomo e nel topo. La durata del periodo di sviluppo è, tuttavia, significativamente protratta nell'uomo: le cellule TH⁺ appaiono nel mes ventrale a circa 6.5 settimane di sviluppo fetale vicino alla zona ventricolare; la loro migrazione ventrale inizia a 6.7 settimane e i neuriti TH⁺ sono identificabili nel *putamen* già a 9 settimane (Freeman et al., 1991).

1.2.2. Induzione e determinazione dei neuroni dopaminergici.

Lo sviluppo di un organismo è da considerarsi come un *continuum* dove ogni processo è determinato ed influenzato dal precedente ed, a sua volta, è causa del successivo. Così il processo di formazione del sistema nervoso (SN) ha inizio già nelle prime fasi della vita embrionale (gastrulazione). Infatti, è durante la gastrulazione che si formano i tre foglietti embrionali, l'endoderma, il mesoderma e l'ectoderma dai quali deriveranno i vari tessuti dell'organismo. In particolare, è il contatto fisico della parte dorsale dell'ectoderma con una regione sottostante del mesoderma (blastoporo negli invertebrati o nodo primitivo di Hensen negli organismi superiori) che fornisce a questa parte dell'ectoderma il segnale "induttivo" perché diventi SN primordiale. Questa regione è conosciuta anche con il termine di "organizzatore di Spemann", dal nome dell'embriologo dell'Università di Friburgo, e premio Nobel, che insieme alla sua allieva Hilde Mangold descrisse questo fenomeno nel 1924.

Successivamente, l'ectoderma indotto a differenziare in SN, va incontro ad una serie di cambiamenti morfologico-strutturali, che porteranno alla formazione del tubo neurale (neurulazione), struttura dalla quale deriverà il SNC, composto dal cervello e dal midollo spinale. Le cellule posizionate all'esterno del tubo neurale genereranno l'epidermide e le cellule situate nella regione di giunzione fra tubo neurale ed epidermide, denominate cresta neurale, le quali migrando in periferia, formeranno

neuroni e glia del SN periferico ed intestinale, le cartilagini ed ossa della faccia, le cellule pigmentate della cute, i melanociti.

Durante il differenziamento del tubo neurale, l'estremità rostrale si espande in tre vescicole: il *Prosencephalon* che a sua volta poi formerà altre due vescicole dalle quali origineranno telencefalo e diencefalo, mesencefalo e rombencefalo in ognuno dei quali si ha la generazione di specifiche cellule neurali (Jessell, 2000; Rubenstein, 1998; Lumsden et Krumlauf, 1996). Questi eventi sono controllati da segnali induttivi e dipendono dall'abilità di risposta delle cellule bersaglio. I centri induttori operanti lungo l'asse antero-posteriore e dorso-ventrale del tubo neurale sono l'organizzatore dell'istmo, al confine tra mesencefalo e rombencefalo, la lamina del pavimento e la notocorda (questa di origine mesodermica). Le intersezioni dei segnali emessi da questi centri determina il corretto posizionamento dei precursori neuronali, che sono in grado di "interpretarli" e di "attivare" un processo di differenziamento cellulare diverso in base al segnale ricevuto.

La lamina del pavimento, Sonic hedgehog ed i suoi segnali intracellulari.

I neuroni DA compaiono per la prima volta nelle vicinanze della lamina del pavimento e si differenziano in seguito al contatto con questa struttura (Hynes et Rosenthal, 1999; Patten et Placzek, 2002).

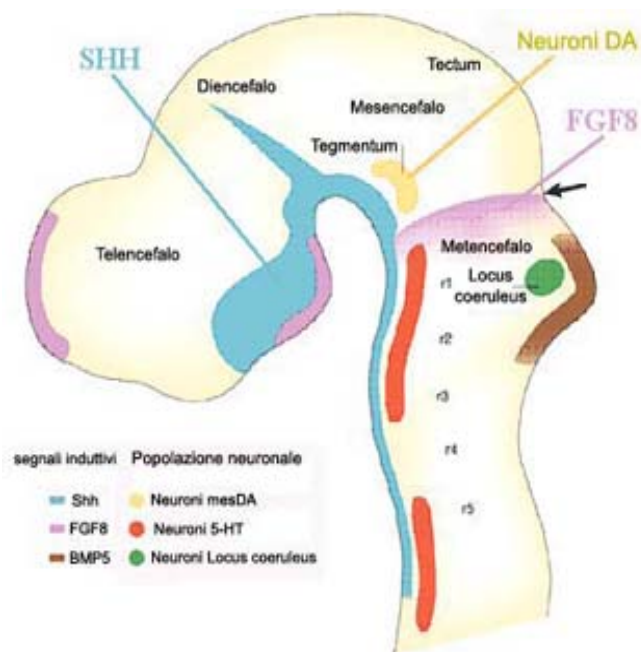


Fig. 3 Specificazione dei neuroni catecolaminergici e serotonergici rispetto alle importanti molecole segnali.

In embrioni di ratto, sono stati identificati neuroni TH⁺ in stretta vicinanza con le cellule della lamina del pavimento. Anche studi *in vitro* hanno dimostrato che la lamina del pavimento può indurre i neuroni DA. Espianti di mes a E9, da cui è stata rimossa la presunta lamina del pavimento, coltivati *in vitro* per cinque giorni con la lamina del pavimento di midollo spinale E12 o di mes sono in grado di indurre neuroni DA mentre non si generano neuroni DA se coltivati in cocoltura con tessuto controllo. L'effettore molecolare rilasciato dalla lamina del pavimento è la proteina *Sonic Hedgehog* (SHH) (Hynes et Rosenthal, 1999). SHH è un morfogeno implicato nella definizione e nella crescita di vari tessuti in insetti e vertebrati, (Ingham et McMahon, 2001). Tra le varie funzioni in cui è coinvolto SHH, vi sono il meccanismo di crescita del tubo neurale e l'induzione di diverse classi di neuroni a localizzazione ventrale, tra cui i neuroni DA mesencefalici (Britto et al., 2002; Ho et Scott, 2002; Machold et Fishell, 2002; Hynes et Rosenthal, 1999) e i motoneuroni spinali, in modo concentrazione-dipendente. Nel corso dello sviluppo SHH agirà anche nello sviluppo dell'encefalo dorsale e del cervello. Più tardi esso potrà attivare anche un programma tumorale. La proteina è sintetizzata a partire da un precursore di 45 kDa, che mediante un taglio autoproteolitico libera un prodotto carbossi-terminale (SHH-C), che diffonde liberamente, e un frammento ammino-terminale di circa 20kDa (SHH-N); questo rimane associato alla superficie cellulare grazie al legame con una molecola di colesterolo (Porter et al., 1996) che è fondamentale inoltre nel mediare la sua azione a breve e lungo raggio (Lewis et al., 2001). Solo il prodotto SHH-N è implicato nei segnali induttivi mediati dalla lamina del pavimento sia in *Drosophila melanogaster* (Porter et al., 1995) che nei vertebrati (Roelink et al., 1995). Sia cellule ingegnerizzate a produrre e rilasciare il peptide SHH-N, sia SHH-N ricombinante, sono in grado di indurre lo sviluppo dei neuroni DA in colture di espianti di mes di ratto, riproducendo l'effetto delle cellule della lamina del pavimento con modalità dose dipendente (Hynes et Rosenthal, 1999). Inoltre, le alterazioni che aumentano l'attività della PKA (enzima in grado di antagonizzare il meccanismo di trasduzione del segnale hedgehog) possono bloccare l'induzione dei neuroni DA da parte delle cellule della lamina del pavimento (Hynes et Rosenthal, 1999). *In vivo* l'induzione dei neuroni DA si verifica solo quando i neuroblasti sono esposti a sufficienti concentrazioni di SHH-N, nelle immediate vicinanze o in diretto contatto con le cellule della lamina del pavimento. Sebbene questi esperimenti dimostrino che il peptide SHH-N, derivato dalla lamina del pavimento e dalla

notocorda, è necessario e sufficiente a indurre i neuroni DA, ed altri tipi di cellule neuronali, lungo l'asse D-V del tubo neurale, non è ancora chiaro, invece, il suo meccanismo d'azione. Recentemente è stato dimostrato che SHH-N possiede proprietà neurotrofiche e svolge un ruolo neuroprotettivo per i neuroni DA *in vitro*, inoltre è capace di incrementare la sopravvivenza di questi neuroni in colture di mesoencefalo e proteggerle contro gli effetti neurotossici dell'MPP⁺ (Lai et al., 2003; Matsuura et al., 2001). SHH è un fattore neurodifferenziativo secreto che si lega al suo recettore, Patched 1 (Ptc1), con 12 domini transmembrana e in questo modo libera Smoothed (Smo), una proteina con 7 domini TM (Stone et al., 1996; Taipale et al., 2002).

In assenza di SHH, Ptc1 inibisce Smo e quindi le vie intracellulari di trasduzione del segnale, che conducono all'attivazione dei mediatori di trascrizione *Gli-1*, *Gli-2*, *Gli-3* sono bloccate. Le proteine Gli sono fosforilate dalla PKA, e tagliate dal proteosoma con la formazione di una forma tronca che entra nel nucleo e reprime la trascrizione Gli-dipendente di geni bersaglio. Quando SHH si lega a Ptc1, le proteine Gli (e forse altri possibili partners per ora sconosciuti) formano proteine Gli attivatori labili, che entrano nel nucleo e attivano geni bersaglio. Va detto che SHH attiva la trascrizione di Ptc1, che, se overespresso, attenua la risposta a SHH impedendone il legame a Ptc1 del complesso recettoriale.

Se Smo viene costitutivamente attivato, mima le azioni di SHH nel tubo neurale, ed attiva l'espressione dei geni ventrali (*HNF3beta*, *patched*, *Nkx2.2*, *netrina-1*), sopprime quella dei geni dorsali (*Pax-3*, *Gli-3*, *Efrina A5*) ed induce la formazione di neuroni ventrali DA, neuroni serotoninergici (5-HT), motoneuroni ventrolaterali (individuabili precocemente per l'espressione dei geni codificanti per *Islet-1*, *Islet-2*, *HB9*) ed interneuroni (*Engrailed-1*, *CHX10+*) (Hynes et al., 2000). La specificità d'azione di questo peptide sui precursori neuronali dipende dalla posizione di questi ultimi, spazialmente definita lungo l'asse A-P, e dalla modalità con cui SHH-N esercita il suo effetto induttivo (contatto diretto e concentrazioni nanomolari nel caso dei neuroni DA; segnale diffusibile e concentrazioni dalle 10 alle 20 volte inferiori nel caso dei motoneuroni) (Ericson et al., 1995; Briscoe et Ericson, 2001).

Abbiamo visto che la segnalazione di SHH in ultima analisi va ricondotta all'azione dei fattori di trascrizione che legano zinco *Gli-1*, *Gli-2*, *Gli-3*, (Koebernick et Pieler, 2002). *Gli1* è altamente espresso in cellule vicine alla fonte di segnale di SHH. Studi recenti hanno dimostrato che la sola espressione neuronale del fattore di trascrizione

Gli1, ottenuta mediante l'utilizzo di un promotore neuronale tubulina-specifico, ha un effetto neuroprotettivo in modelli animali di morbo di Parkinson (Suwelack et al., 2004).

Gli2 risulta essere ampiamente espresso nelle cellule che rispondono al segnale di SHH, per la cui trasduzione solo *Gli2* è richiesto (Bai et al., 2002). Quest'ultimo è un complesso fattore trascrizionale che ha sia un dominio di attivazione (C-terminale) che un dominio di repressione (N-terminale). In colture cellulari e in topi transgenici la delezione del dominio di repressione N-terminale di *Gli2*, converte la proteina in un attivatore forte, inducendo l'attivazione dei geni bersaglio di SHH, come *HNF3*, nel tubo neurale dorsale, in modo da mimare gli effetti di SHH. Questi dati suggeriscono che, in assenza del segnale di SHH, l'attività biologica di *Gli2* è soppressa dal suo dominio N-terminale. Un meccanismo d'azione simile è stato trovato anche in *Gli3*, ma non in *Gli1*. Probabilmente in seguito al segnale di SHH le proteine *Gli2* e *Gli3* vengono attivate nelle cellule ventrali ed inducono la successiva attivazione della trascrizione dei loro geni bersaglio, incluso *Gli1* (Sasaki et al., 1999).

I fattori induttivi della famiglia FGF

Il gradiente formato da SHH lungo l'asse D-V, quindi, è necessario per indurre il fenotipo DA, ma non sufficiente perché occorre un segnale anche lungo l'asse A-P (Ye et al., 1998). Il gradiente di SHH si interseca con quello formato lungo l'asse A-P da un altro fattore induttivo extracellulare, FGF8, prodotto nell'istmo, la zona di confine tra mes e rombencefalo anteriore (Wurst et Bally-Cuif, 2001). L'intersecazione di questi due morfogeni stabilisce una griglia epigenetica che permette la localizzazione dei neuroni DA nel mesencefalo ventrale: neuroni DA possono essere indotti ectopicamente in una regione dove normalmente mancano FGF8 e SHH, in seguito alla somministrazione esogena di questi due fattori. L'induzione viene meno quando l'azione di uno dei due fattori viene a mancare. Quando un terzo segnale, FGF4, che è espresso nella stria primitiva (una regione adiacente alla piastra neurale posteriore), precede l'azione di FGF8 e SHH, si forma un centro induttore nel romboencefalo per i neuroni 5-HT. Se FGF4 è aggiunto ad espianti di mes ventrale, che contengono FGF8 e SHH endogeno, vengono indotti neuroni 5-HT ectopici (Ye et al., 1998). L'induzione dei neuroni 5-HT da parte di FGF4 avviene solo se quest'ultimo è aggiunto al tessuto entro una precisa fase di sviluppo (cioè prima dello stadio di dieci somiti). Questi risultati indicano quindi che

FGF8 e FGF4 hanno differenti funzioni e sono richiesti a differenti tempi per lo sviluppo dei neuroni 5-HT.

Recenti studi *in vitro* hanno dimostrato che è possibile generare neuroni DA e 5-HT da cellule staminali embrionali (ES), derivate dalla massa cellulare interna della blastocisti in sviluppo. L'azione combinata di SHH, di FGF8 e dell'acido ascorbico (AA) incrementa il numero di neuroni TH⁺, derivati da cellule ES (Lee et al., 2000). Come si vedrà in seguito, nel mio lavoro di tesi ho dimostrato che il trattamento combinato di SHH/FGF8, dopo aver indotto proliferazione di neuroblasti di mesencefalo *in vitro* con il fattore basico di crescita dei fibroblasti (bFGF), porta ad un aumento di circa tre volte del numero di cellule TH⁺ (Volpicelli et al., 2004b). L'applicazione di un singolo fattore determina un incremento significativamente minore rispetto a quando si aggiungono i due fattori insieme.

Recentemente è stato riportato che le proteine Otx1 e Otx2 controllano, in modo dose-dipendente, la posizione dei domini di espressione di SHH e di FGF8 (fig. 3). Otx2 nel mesencefalo ventrale blocca il differenziamento dei neuroni serotonergici (Puelles, 2004).

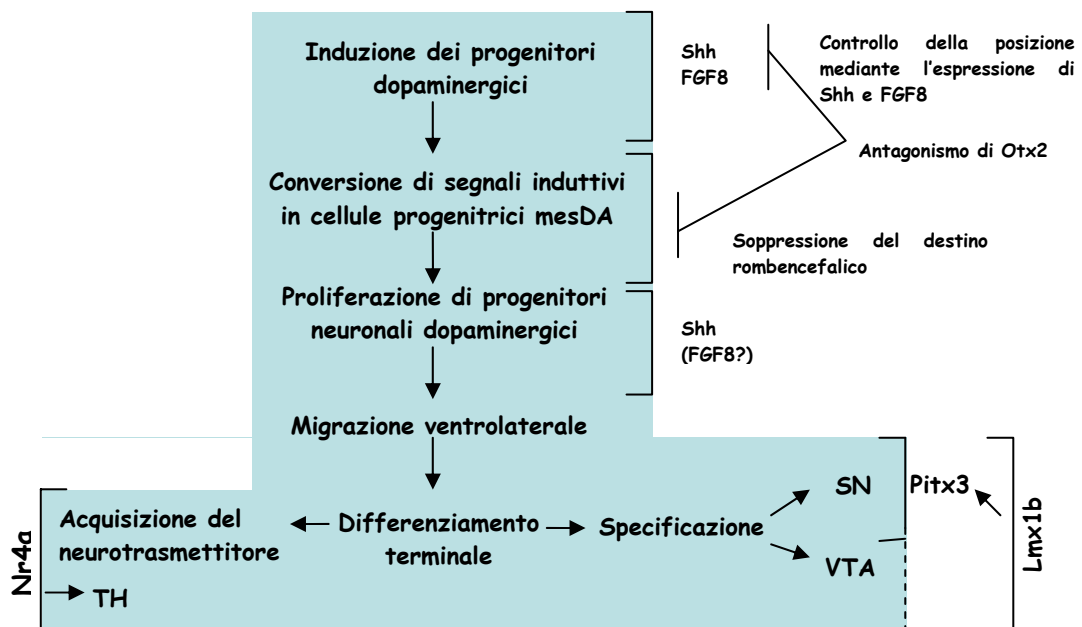


Fig. 3 Stadi di sviluppo e cascata genica che controlla l'induzione e il destino dei progenitori mesDA.

SHH e FGF8 sono richiesti per modulare la proliferazione dei progenitori neuronali, prima della loro migrazione ventrale e della differenziazione in termini di neurotrasmettitore (es. l'azione di TH) e per la successiva formazione della sottopopolazione presente nella SN e VTA.

1.2.3. Espressione genica durante lo sviluppo dei neuroni dopaminergici.

Sebbene sia ampiamente dimostrato che le molecole segnali SHH e FGF8 controllano l'identità e la posizione dei progenitori neuronali DA (Hynes et Rosenthal 1999; Ye et al., 1998), non è ancora pienamente conosciuto il successivo passaggio, la differenziazione. Risultati recenti stanno evidenziando che fattori di trascrizione come Pitx3 (o il suo omologo nel ratto Ptx3) e Nurr1 (o Nr4a2) hanno una particolare rilevanza.

La cascata genica che controlla il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni mesDA.

Nurr1. Nella specificazione dei neuroni mesDA sono coinvolti vari fattori trascrizionali. Nurr1 (anche noto come Nr4a2) è un membro della superfamiglia dei recettori per gli ormoni steroidei-tiroidei, è espresso prevalentemente nel SNC, principalmente nel sistema limbico e nel mes ventrale e, a bassi livelli, nel diencefalo e nei bulbi olfattivi (Zetterstrom et al., 1997). Nel topo, l'mRNA per *Nurr1* compare nei neuroblasti mesencefalici ad E10.5*, un giorno prima della comparsa di *TH*, e la sua espressione persiste nei neuroni DA maturi nell'adulto. Come si vedrà in seguito, nel mio lavoro di tesi ho dimostrato che l'espressione genica di *Nurr1* mostra un incremento di dieci volte tra E13 ed E15, un momento cruciale per la maturazione e l'organizzazione della SN e della VTA (Volpicelli et al., 2004a). Topi mutanti nulli per *Nurr1* mostrano agenesi dei neuroni mesDA, come è dimostrato dall'assenza di diversi marcatori delle cellule DA nel mes (*TH*, *AHD2*, l'enzima che converte l'acido retinoico, e il recettore tirosin-chinasico *c-Ret*); e conseguente mancanza di innervazione DA dello striato (Zetterstrom et al., 1997). I topi che non esprimono *Nurr1* nascono con una frequenza normale, ma muoiono entro i primi due giorni

* Alcune discrepanze nella datazione dei vari momenti dello sviluppo dei neuroni DA dipendono da un diverso conteggio della data di inizio della gestazione. Nei roditori l'avvenuto accoppiamento può essere diagnosticato mediante l'identificazione di un tappo vaginale presente nelle prime ore successive all'accoppiamento. Il momento del rinvenimento di questo elemento diagnostico, generalmente al mattino, viene considerato da alcuni tempo 0, da altri tempo di gestazione 0.5 giorni e da altri ancora 1 giorno. Nel nostro laboratorio il giorno del rinvenimento del tappo vaginale viene considerato giorno 0.

dopo la nascita e mancano dei neuroni DA sia nella SN che nella VTA. Analisi degli embrioni mutanti per *Nurr1* rivelano che l'espressione di *TH* può essere evidenziata agli stadi embrionali precoci per essere perduta subito dopo, e che un altro importante fattore di trascrizione "dopaminergico", *Pitx3* è espresso normalmente almeno fino ad E15, poi i neuroni DA muoio, probabilmente per l'incremento dell'apoptosi (Saucedo-Cardenas et al., 1998; Zetterstrom et al., 1997). E' ormai noto che *Nurr1* regola l'espressione di vari geni "dopaminergici" come la *TH*, il trasportatore per la dopamina *DAT* (Sacchetti et al., 2001) e il trasportatore vescicolare delle monoammine *VMAT2* (Smits et al., 2003). *Nurr1* nella forma di monomero può legarsi al DNA come tutti i fattori di trascrizione, ma può anche formare eterodimeri con uno dei principali recettori per l'acido retinoico (RXR), ed attiva la trascrizione in risposta al legame con l'acido retinoico in forma 9-cis (Perlman et al., 1995; Forman et al., 1995). È stata inoltre caratterizzata la regione necessaria per l'interazione tra *Nurr1* e RXR, e attraverso mutagenesi sito-specifica si è potuto distinguere l'attività di dimero da quella di monomero. (Aarnisalo et al., 2002; Sacchetti et al., 2002). *Nurr1* determina l'attivazione dell'espressione del gene che codifica per *TH* mediante il legame ad un elemento responsivo nella regione del promotore necessaria per l'espressione mesencefalica (Iwawaki et al., 2000). È stato provato che l'iperespressione di *Nurr1* in precursori neuronali ippocampali induce all'espressione genica di *TH*; questa attivazione è mediata da un meccanismo indipendente dai recettori per l'acido retinoico (Sakurada et al., 1999). Trasfettando *Nurr1* in linee di cellule staminali neurali immortalizzate o in cellule staminali embrionali (ES) si può ottenere un'induzione del fenotipo DA (Wagner et al., 1999; Chung et al., 2002).

Sembra inoltre che *Nurr1* possa promuovere la sopravvivenza dei neuroni DA attraverso l'attivazione dell'espressione di alcuni fattori neurotrofici.

L'espressione del gene *Nurr1* viene incrementata rapidamente da stimoli diversi, come l'attività elettrica, sia in linee cellulari che nel cervello adulto (Law et al., 1992; Xing et al., 1997). Risultati da me ottenuti nel corso del mio dottorato mostrano che l'espressione di *Nurr1* è plastica e può essere regolata positivamente dalla depolarizzazione, almeno *in vitro* (Volpicelli et al., 2004a). *Nurr1* sembra quindi giocare un ruolo fondamentale nella differenziazione, nella maturazione e nel mantenimento dei circuiti neuronali DA mesencefalici .

Pitx3 controlla lo sviluppo dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra*.

Il gene *Pitx3* è un omeogene appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione *Pitx*. Nel cervello, è espresso selettivamente nei neuroni DA mesencefalici ad E11 e la sua espressione si mantiene anche nel cervello adulto (Ye et al., 1998; Smidt et al., 1997). La sua espressione è concomitante con l'espressione di *TH*. Recentemente è stato dimostrato un ruolo importante di *Pitx3* nello sviluppo dei neuroni mesDA (van den Munckhof et al., 2003; Nunes et al., 2003; Hwang et al., 2003; Smidt et al., 2004), utilizzando il mutante murino afachico (ak), cui manca appunto l'espressione di *Pitx3* e può essere considerato un mutante nullo (Rieger et al. 2001). Nei mutanti ak i neuroni TH⁺ della VTA sono poco colpiti, mentre si ha agenesi di quelli della SN e i livelli di DA nello striato dorso-laterale sono drasticamente ridotti rispetto ai topi selvatici, mentre i neuroni TH⁺ rimanenti mostrano una normale espressione di *Nurr1*.

Pitx3 sembra importante per l'espressione del gene che codifica per l'aldeide deidrogenasi (*AHD2*). Infatti se si trapiantano nello striato cellule staminali embrionali (ES) che iperesprimono *Pitx3*, aumenta il numero di neuroni DA che esprimono *AHD2* sebbene il numero di neuroni DA totali resti inalterato. Se invece si trapiantano cellule ES che iperesprimono *Nurr1*, il numero di neuroni DA che esprimono *AHD2* non cambia, ma aumenta significativamente il numero totale dei neuroni DA (Chung et al., 2005).

Questi dati insieme con quelli dei mutanti ak suggeriscono che *Pitx3* è richiesto per la formazione della SN e per la specificazione e/o sopravvivenza di una sottopopolazione di neuroni mesDA. Quindi, il differenziamento di ristrette sottopopolazioni mesDA può essere sotto il controllo di differenti fattori, oppure le diverse sottopopolazioni possono rispondere agli stessi fattori in modo differente (Simeone, 2005) e *Pitx3* e *Nurr1* possono controllare differenti aspetti del differenziamento dei neuroni mesDA.

Lmx1b. *Lmx1b*, un fattore di trascrizione che possiede un omeodominio LIM, è espresso nella *substantia nigra pars compacta* e nella VTA ad E7.5, prima dell'espressione di *Nurr1* e di *Pitx3* e la sua espressione si mantiene per tutta la vita. Ad E16 l'espressione di *Lmx1b* si estende anteriormente dalla regione mesDA all'area ventrale ipotalamica. Posteriormente la sua espressione si sposta dorsalmente nel romboencefalo e si estende nella parte dorsale del midollo spinale. Questo

spostamento dorsale dell'espressione sembra coincidere con la posizione della giunzione mesencefalo-romboencefalica (Smidt et al., 2000). I topi mutanti nulli per *Lmx1b* mancano dei neuroni DA negli stadi tardivi della gestazione e smettono di attivare l'espressione di *Pitx3*, mentre l'espressione iniziale di TH e di Nurr1 non è influenzata, inoltre, nei mutanti ak e in quelli per Nurr1 l'espressione di *Lmx1b* è normale nelle cellule TH⁺, ciò suggerisce che *Lmx1b* è coinvolto nell'attivazione di *Pitx3* nei neuroni mesDA, mentre *Nurr1* è coinvolto nel differenziamento terminale mediante il controllo dell'espressione dei neurotrasmettitori (fig. 3). Il differenziamento terminale del sistema mesDA, quindi, richiede due vie di segnalazione separate che convergono per stabilire gli aspetti funzionali dei neuroni mesDA differenziati. Inoltre, siccome *Pitx3* è richiesto solo per la specificazione della SN, è ipotizzabile che *Lmx1b* attivi l'espressione di *Pitx3* nella SN, e nella VTA l'espressione di fattori differenziativi VTA-specifici (Simeone, 2005).

Una volta che i neuroni mes hanno acquisito la specificazione DA, un gruppo di geni coinvolti nella maturazione del fenotipo DA vero e proprio viene attivato prima che si stabilisca la neurotrasmissione DA. Il gene codificante la TH, l'enzima limitante nella biosintesi delle catecolamine, viene espresso precocemente, anche se non si conosce ancora bene il meccanismo mediante il quale viene regolata la sua espressione a questi stadi. La TH precocemente espressa è funzionale, infatti la DA viene accumulata nei neuroni del mes ventrale dopo la loro iniziale differenziazione, quando non è ancora stata stabilita la neurotrasmissione (Fiszman et al., 1991). A stadi più avanzati dello sviluppo del SNC, la regolazione di TH ha luogo a livello trascrizionale, traduzionale e di modulazione dell'attività enzimatica mediante regolazione allosterica e fosforilazione (Kumer et Vrana, 1996). Ancora prima che la neurotrasmissione DA sia funzionale, i neuroni DA esprimono autorecettori, che appartengono alla classe D2R (Schambra et al., 1994; Koeltzow et al., 1998). Mediante studi di ibridazione *in situ* è stato dimostrato che gli autorecettori compaiono nel mes di ratto intorno a E13-E14, due giorni dopo la comparsa di TH, e successivamente il loro numero aumenta (Sales et al., 1989), in accordo con la loro funzione di regolazione del rilascio della DA e quindi di regolazione della neurotrasmissione DA.

Come la TH, anche *VMAT2* è espresso a stadi precoci nel mes di ratto (E12) (Perrone-Capano et al., 1994). *VMAT2* appartiene alla famiglia dei trasportatori vescicolari dei neurotrasmettitori e trasporta le monoammine nelle vescicole

sinaptiche “dense” in neuroni aminergici (catecolaminergici e serotonergici), usando un gradiente elettrochimico generato da una pompa protonica ATPasica vescicolare (Liu et Edwards, 1997). L’accumulo di DA nelle vescicole mediato da *VMAT2* è indispensabile per la neurotrasmissione DA. Topi mutanti nulli per *VMAT2* sono iperattivi, muoiono pochi giorni dopo la nascita e mostrano un diminuito accumulo nelle vescicole e disregolazione del rilascio di monoammine. È ipotizzabile che in questo caso il rilascio di DA all’esterno del neurone possa essere mediato da DAT, quest’ultimo infatti può, in determinate condizioni, invertire il flusso per trasportare la DA dal citoplasma all’esterno. Topi adulti eterozigoti per *VMAT2* sono più suscettibili all’effetto neurotossico dell’MPTP, suggerendo che il sequestro della neurotossina MPP⁺ nelle vescicole, mediato da VMAT2, può giocare un ruolo importante nell’attenuazione della tossicità *in vivo* (Gainetdinov et al., 1998); inoltre **VMAT2** sembra anche coinvolto nella tossicità iatrogena da L-DOPA (Reveron et al., 2002). Un ruolo indiretto di VMAT2 consiste nel liberare il citoplasma dalla DA libera, impedendo così la rapida ossidazione del neurotrasmettitore e la conseguente produzione di radicali liberi tossici.

E’ interessante notare che mentre una gran parte dei geni che sottendono a importanti funzioni della neurotrasmissione DA sono espressi in fasi precoci del differenziamento mesencefalico, il gene *DAT*, che codifica per il trasportatore citoplasmatico della DA, viene espresso solo parecchio più tardi, indicando che fino ad allora non vi è vera neurotrasmissione DA. La fine regolazione di questa dipende infatti a una corte di altri segnali, alcuni derivanti dalle cellule bersaglio, come si vedrà più sotto, nella sezione che tratta del ruolo delle cellule striatali nello sviluppo dei neuroni mesDA.

Un altro gene espresso solo nei neuroni mesDA, e non in altri neuroni DA del SNC, è l’aldeide deidrogenasi (*AHD2*), l’enzima che genera l’acido retinoico. Questo enzima è espresso precocemente durante lo sviluppo. Nel topo compare un giorno dopo TH ed è prevalentemente localizzato nei corpi cellulari dei neuroni della SN localizzati nella *pars compacta* dei nuclei A9 e nelle loro proiezioni che si accrescono verso lo striato. Nell’adulto è presente negli assoni e nei terminali del sistema nigrostriatale e mesolimbico (McCaffery et Drager, 1994). Esso quindi rappresenta un marcatore specifico aggiuntivo dei neuroni DA. La sintesi dell’acido retinoico da parte di AHD2 potrebbe svolgere un ruolo importante nello sviluppo dei neuroni DA, dal momento che RXR può eterodimerizzare con Nurr1.

Poco dopo l'acquisizione del fenotipo DA, i neuroni mesDA esprimono il proto-oncogene c-Ret, e il gene GFR α 1. Questi geni codificano per le componenti di un complesso multirecettoriale che interagisce con il GDNF (fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali, che appartiene alla superfamiglia dei fattori TGF- β), il fattore trofico più efficace per i neuroni mesDA *in vitro* e per i motoneuroni spinali (Airaksinen et Saarma, 2002). Ret appartiene alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici ed è il componente responsabile della segnalazione intracellulare del complesso recettoriale. Il recettore GFR α 1 è ancorato alla superficie cellulare mediante il legame glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI) ed è la subunità recettoriale che media il legame per il GDNF nel complesso trimetrico con Ret. Gli mRNA di queste subunità recettoriali sono espressi nei neuroni DA dei nuclei A9 ed A10 del mes a partire da E12.5 del ratto (Nosrat et al., 1997). GFR α 1 fa parte di una famiglia multigenica che comprende altri tre membri anch'essi corecettori di Ret, che legano gli altri ligandi della famiglia del GDNF (neurturina, persefina ed artemina). Durante lo sviluppo dei neuroni DA sono espressi anche recettori per varie neurotrofine che *in vitro* agiscono come fattori "dopaminotropici": trkB, il recettore ad alta affinità per il fattore neurotrofico derivato dal cervello (Bdnf) e la neurotrofina 4/5 (NT4/5), e trkC, il recettore ad alta affinità per la neurotrofina 3 (NT3). Tuttavia il loro ruolo *in vivo* rimane ancora poco chiaro.

1.2.4. Maturazione e mantenimento della funzione dopaminergica.

Come per gli altri fenotipi neuronali è possibile che anche i neuroni DA, una volta differenziatisi, necessitino di altre informazioni e fattori per completare la loro maturazione fenotipica e per la loro sopravvivenza (Engele et Bayatti, 1999). L'attivazione dei geni coinvolti nella neurotrasmissione DA ha luogo in differenti momenti nello sviluppo sotto il controllo di vari fattori ambientali, che portano alla predestinazione precoce dei neuroblasti DA. È plausibile che fattori trofici derivati dalle cellule bersaglio, interazioni mediate dalla glia, azioni paracrine o autocrine siano necessari per la maturazione, la sopravvivenza o il mantenimento dei neuroni DA postmitotici. Nel corso di questi ultimi anni sono stati ampiamente studiati i possibili fattori "dopaminotropici" e il loro ruolo nella patogenesi e nel potenziale trattamento delle malattie neurologiche associate alla DA (Engele et Bayatti, 1999; Bradford et al., 1999). In molti laboratori sono stati condotti esperimenti volti alla

ricerca di fattori dopaminotropici, utilizzando colture di neuroni embrionali mesencefalici di ratto e utilizzando indici di sopravvivenza e differenziamento dei neuroni DA (attività e immunoreattività per TH, livelli di DA, ricattura o “uptake” ad alta affinità della DA), nonché modelli animali con lesioni sperimentali e mutanti nulli.

L'azione dei fattori di crescita e di quelli neurotrofici sullo sviluppo dei neuroni dopaminergici mesencefalici.

Tra i peptidi che promuovono la sopravvivenza e/o la maturazione dei neuroni embrionali DA vi sono il fattore basico di crescita dei fibroblasti (bFGF), il fattore di crescita epidermico (EGF) (Knusel et al., 1990), il Bdnf la NT 4/5 (Meyer et al., 2001), il GDNF ed altri membri della famiglia (Airaksinen and Saarna, 2002) e i fattori TGF β 1,-2,-3.

FGF2, conosciuto anche come bFGF, è un fattore mitogeno per i precursori neurali in colture di cellule dissociate da mes ventrale di ratto ad E12. Questo fattore è capace di protrarre i tempi di divisione mitotica per diversi giorni *in vitro*, ritardando la differenziazione terminale ed incrementando il numero dei neuroblasti che si differenziano successivamente (Bouvier e Mytilineou, 1995; Volpicelli et al., 2004b). Studi recenti suggeriscono che questa azione richieda il contatto cellula-cellula mediato dalle giunzioni serrate dei neuroni (SiuYi Leung et al., 2001). Molti studi sono stati condotti sugli effetti dei fattori trofici e di crescita sulle colture di neuroni DA postmitotici di embrioni di ratto, mentre poche informazioni si hanno sul loro ruolo nella genesi dei neuroni DA. È stato dimostrato che il bFGF e l'EGF promuovono la sopravvivenza dei neuroni DA indirettamente, attraverso gli astrociti (Engele et Bohn, 1991). Quindi, non tutti i fattori di crescita implicati agiscono direttamente e/o selettivamente sui neuroni DA.

È noto che il Bdnf aumenta la sopravvivenza dei neuroni mesDA, il differenziamento, ed è implicato nella plasticità sinaptica. *In vitro* e *in vivo*, Bdnf protegge i neuroni DA dagli effetti tossici dell'MPTP e della 6'-OHDA (Murer et al., 2001). Studi recenti condotti su topi mutanti nulli per Bdnf hanno evidenziato che tra P14 e P21 si sviluppa un numero minore di dendriti nella *substantia nigra*, suggerendo che Bdnf gioca un ruolo nella maturazione fenotipica ma non sulla nascita o sopravvivenza dei neuroni DA (Baker et al., 2005).

Queste funzioni sono completamente sovrapponibili con quelle di altri fattori, incluso GDNF e le proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs), che sono anche note

aumentare il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni DA (Feng et al. 1999; Zuch et al., 2004).

Il GDNF promuove la sopravvivenza e il differenziamento morfologico dei neuroni DA in colture di mes di embrioni di ratto ed aumenta il recupero ad alta affinità della DA; questi effetti sono specifici poiché il GDNF non aumenta il numero totale dei neuroni o di astrociti e non influenza i neuroni GABAergici e 5-HT presenti nella stessa coltura (Feng et al., 1999).

Durante lo sviluppo del sistema nervoso e durante la vita adulta, sono espresse due isoforme del fattore di crescita delle cellule trasformanti β , TGF2 β e TGF3 β , che sono coinvolti nella sopravvivenza delle cellule neuronali. Studi precedenti avevano dimostrato che i TGF β s promuovono la sopravvivenza dei neuroni DA *in vitro* (Krieglstein et al., 1995), aumentando la crescita dei neuriti e mostrando una potenza simile a quella del GDNF nel favorire la sopravvivenza dei neuroni DA di embrioni di ratto in coltura (Poulsen et al., 1994). Studi recenti hanno dimostrato che TGF β promuove la sopravvivenza dei neuroni mesDA agendo in cooperazione con SHH e FGF8 (Roussa et al., 2004).

Tuttavia, i dati ottenuti *in vitro* sui diversi fattori di crescita non sempre sono stati confermati da studi *in vivo*. Infatti, topi transgenici privi di recettori ad alta affinità per il BDNF, la NT-4/5 o il GDNF non mostrano diminuzione del numero dei neuroni mesencefalici DA (Klein et al., 1993; Enomoto et al., 1998). Tuttavia, in modelli sperimentali di lesioni della via nigrostriatale la somministrazione esogena di GDNF nell'adulto esercita un effetto protettivo sui neuroni mesDA. È stato inoltre dimostrato a livello biochimico, istologico e comportamentale che il sistema nigrostriatale del topo adulto può essere protetto *in vivo* dagli effetti tossici della neurotossina dopaminergica MPTP, mediante somministrazione intracerebrali di GDNF (Tomac et al., 1995). Quest'ultimo esercita anche un effetto riparatore e rigenerativo se somministrato nelle adiacenze della SN nel ratto, prevenendo la degenerazione dei neuroni DA in seguito alla resezione sperimentale dei loro assoni (Beck et al., 1995). Queste osservazioni hanno aperto interessanti prospettive terapeutiche per il trattamento del morbo di Parkinson, già in via di sperimentazione su pazienti negli U.S.A. (Georgievska et al., 2002, Grondin et Gash, 1998; Kordower et al., 2000).

Generazione di neuroni dopaminergici da cellule staminali e precursori neuronali.

In seguito alla scoperta di cellule staminali negli embrioni e nel SNC adulto (McKay, 1997; Temple et Buylla, 1999), sono state utilizzate un gran numero di citochine e di fattori di crescita per espandere la popolazione di precursori neuronali DA *in vitro* (Ling et al., 1998; Engele e Bayatti, 1999).

Nonostante i sorprendenti risultati clinici ottenuti nella terapia cellulare del morbo di Parkinson (Bjorklund et Lindvall, 2000; Bjorklund et al., 2002), la carenza di disponibilità di neuroni per il trapianto e i problemi di natura bioetica nell'utilizzo di embrioni a scopo terapeutico, hanno reso più impellente l'utilizzo di cellule staminali, linee cellulari (Haas et Wree, 2002) e precursori neurali, stimolando un crescente numero di lavori volti alla comprensione dei meccanismi che presiedono alla differenziazione terminale DA in questi sistemi. Recentemente, sono stati messi a punto protocolli alternativi per la generazione di neuroni DA da cellule ES. Il gruppo di Lee ha dimostrato che la somministrazione di SHH, FGF8 e bFGF, induce differenziamento DA in circa il 34% delle cellule ES trattate (Lee et al., 2000). Un'altra strategia utilizzata per differenziare cellule ES in neuroni DA è quella di realizzare coculture con linee cellulari derivate dal midollo osseo. Tramite questa tecnica il 16% della popolazione cellulare totale differenzia in neuroni DA (Kawasaki et al., 2000). Come già accennato precedentemente, anche la sovraespressione di *Nurr1*, in coniugazione con il fattore derivato dagli astrociti mesencefalici di tipo 1, induce il differenziamento DA in una linea cellulare di cellule staminali neurali multipotenti immortalizzate, derivate dal cervelletto di topo, previa esposizione a fattori diffusibili, non ancora identificati, rilasciati nel mezzo di coltura dagli astrociti mesencefalici (ma non di altri distretti cerebrali; Wagner et al., 1999). Un lavoro più recente ha messo in discussione la necessità di ulteriori segnali per il differenziamento DA dimostrando che la sola sovraespressione del gene *Nurr1* in cellule staminali embrionali (ES), può essere necessaria e sufficiente ad incrementare in maniera significativa la maturazione cellulare verso il fenotipo DA (Chung et al., 2002). Questi risultati evidenziano il ruolo cruciale di *Nurr1* nella determinazione del fenotipo DA.

Infine, nell'intento di produrre neuroni DA sono state utilizzate anche linee cellulari di progenitori mesencefalici di origine embrionale. In questo sistema cellulare fattori che agiscono nel differenziamento di cellule ematopoietiche (interleuchina 11,

interleuchina 1, LIF, GDNF) agiscono anche come fattori che stimolano l'espressione di geni del differenziamento neuronale catecolaminergico, quali TH (Carvey et al., 2001).

L'insieme di questi nuovi approcci sperimentali ha aperto la possibilità di generare un numero illimitato di neuroni DA che potrebbero essere utilizzati per trapianti in pazienti con il morbo di Parkinson.

Il ruolo delle cellule bersaglio nello sviluppo dei neuroni mesDA.

Analizzando l'espressione di vari geni e delle loro funzioni durante lo sviluppo embrionale del mes è stato dimostrato che la sintesi, il deposito e la ricattura ad alta affinità della DA si sviluppano in modo asincrono (Prochiantz et al., 1979; di Porzio et al., 1980; Perrone Capano and di Porzio, 1996). Nelle cellule acutamente dissociate da mes ventrale di embrioni di ratto la DA è misurabile già ad E12.5 e la sua concentrazione aumenta bruscamente a E16, arrivando a "plateau" prima della nascita. Nello striato di ratto, la DA è individuabile per la prima volta a E16, suggerendo che le fibre nigrali DA raggiungono i loro tessuti bersaglio a questa età embrionale (Fiszman et al., 1991). Ciò è in accordo con i dati morfologici che mostrano l'arrivo dei primi assoni TH⁺ e AHD2⁺ allo striato in questa età (Berger et al., 1982; McCaffery et al., 1994). Mentre sintesi ed accumulo di DA hanno già luogo precocemente, la ricattura ad alta affinità del neurotrasmettitore, fenomeno essenziale per la neurotrasmissione DA vera e propria, *in vivo* si riscontra solo a partire da E16, e aumenta bruscamente fino ad E18, raggiungendo il plateau prima della nascita (Fiszman et al., 1991). Dunque l'inizio della ricattura della DA e il suo successivo incremento sembrano essere concomitanti all'arrivo delle prime fibre DA allo striato.

Studi *in vitro* suggeriscono che le cellule bersaglio dello striato possono aumentare la maturazione dei neuroni DA, effetti che richiedono il contatto fisico tra i neuroni mesencefalici e quelli striatali (Prochiantz et al., 1979; di Porzio et al., 1980). *In vitro* la trascrizione del gene DAT e il numero dei siti di ricattura aumentano selettivamente nei neuroni mesDA dei roditori allo stadio E13 dopo cocoltura con cellule striatali da E16 (Daguet et al., 1980; Perrone Capano et al., 1996). Al contrario l'espressione di *DAT* non è modulata dall'influenza striatale se si usano colture di neuroni mesencefalici più maturi (E16) (Perrone Capano et al., 1996). Queste osservazioni suggeriscono che i neuroni mesDA rispondono alle influenze delle cellule bersaglio solo in una ristretta finestra temporale. La sovraregolazione

dei livelli di mRNA di *DAT*, mediata da cellule striatali, sembra richiedere la diretta interazione cellulare, dato che ciò non si verifica se le cellule mesencefaliche e striatali sono separate da una barriera porosa, che impedisce il contatto cellulare diretto (Perrone Capano et al., 1996). È importante notare che gli effetti della cocoltura con lo striato sull'mRNA di *DAT* svolgono un ruolo importante nei primi tre giorni *in vitro*, mentre gli effetti sulla funzione di DAT (per l'aumento dei siti di ricattura) sono più efficienti dopo otto giorni *in vitro* (Prochiantz et al., 1979; di Porzio et al., 1980).

In sintesi, l'espressione del gene *DAT* nello sviluppo dei neuroni mesDA è condizionata da uno specifico ambiente cellulare e probabilmente richiede continui stimoli mediati da specifiche e dirette interazioni cellulari con le cellule bersaglio striatali.

Nella SN, i neuroni DA appaiono altamente polarizzati, i corpi cellulari addensati nella *pars compacta* con gli assoni diretti rostralmente verso i gangli basali e verso la corteccia frontale ed i dendriti confinati caudalmente nella *pars reticulata*. L'acquisizione della polarità dei neuroni DA può essere regolata dalle interazioni tra neurone e glia (Denis-Donini et al., 1984,1999).

Recenti lavori hanno iniziato a far luce sui segnali molecolari che definiscono le proiezioni topografiche delle afferenze nigrostriatali e mesolimbiche (Yue et al., 1999). Il recettore efrina-B1 (*EphB1*) e il suo ligando efrina-B2 sono le molecole che stabiliscono tali interazioni. I recettori *EphB1* sono prevalentemente espressi nella SN, mentre la loro espressione è bassa nel *caudato-putamen*; al contrario, l'espressione del ligando *efrina-B2* è bassa nella VTA, ma è espressa ad alti livelli nel sistema limbico. L'*efrina-B2*, *in vitro*, può inibire la crescita neuritica e indurre la degenerazione dei neuroni della SN, ma non dei neuroni VTA (Yue et al., 1999). Dunque, questa interazione ligando-recettore può contribuire alla stabilizzazione o all'inibizione del riconoscimento tra elementi presinaptici e neuroni postsinaptici, con conseguente incremento dello sviluppo neuritico, della sopravvivenza o della morte dei neuroni DA (Yue et al., 1999).L'espressione delle *EphB1* è regolata positivamente dalla DA stessa come è stato recentemente dimostrato (Halladay et al., 2000).

1.3. Scopo del lavoro di tesi

Alla luce delle attuali conoscenze, il progetto di ricerca alla base della tesi di dottorato è stato centrato sullo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'acquisizione di uno specifico fenotipo neuronale, quello dei neuroni dopaminergici mesencefalici e sullo studio del recettore nucleare *Nurr1*, essenziale per lo sviluppo dei neuroni mesDA. Nonostante i circuiti neuronali DA abbiano un'importanza fisiologica e clinica i meccanismi cellulari e molecolari che sono alla base dello sviluppo dei neuroni DA, sono ancora in gran parte poco conosciuti. Utilizzando le conoscenze dei meccanismi molecolari che determinano il fenotipo DA *in vivo* durante lo sviluppo embrionale ho messo a punto un metodo che permette di generare neuroni DA *in vitro* mediante l'azione di mitogeni (bFGF) e di specifiche molecole induttive (SHH, FGF8 e acido ascorbico). Mediante la specifica combinazione di questi fattori è stato possibile ottenere colture primarie da mesencefalo ventrale di ratto “*espanso*”, arricchite in neuroni DA. Mediante l'utilizzo di questo sistema sperimentale è stato possibile analizzare l'espressione differenziale di geni con un ruolo chiave nell'induzione, maturazione e mantenimento del fenotipo DA. Essenziali per il differenziamento di questi neuroni dopaminergici sono alcuni fattori di trascrizione, in particolare *Pitx3*, codificato da un omeogene, e *Nurr1*, un recettore nucleare della superfamiglia dei recettori steroidei-tiroidei. Il secondo obiettivo posto è stato quello di identificare alcuni dei fattori di trascrizione coinvolti nella sua regolazione di *Nurr1* e la loro possibile gerarchia di attivazione. Per identificare alcuni dei geni che sono presumibilmente regolati da *Nurr1* è stata effettuata una stimolazione delle colture *espanso* mediante depolarizzazione, paradigma sperimentale che mima l'attività elettrica del neurone e causa un aumento rapido e transitorio di geni immediati precoci (*immediate early gene*), tra i quali *Nurr1*. L'espressione di questo gene, e i livelli di proteina, aumentano considerevolmente, ed in maniera transiente, quando i neuroni DA vengono depolarizzati. Questo paradigma sperimentale è stato utilizzato per identificare, mediante un approccio “genome wide” geni target di *Nurr1* che potessero essere implicati nel differenziamento dei neuroni mesDA e nel loro mantenimento dopo lo sviluppo. A questo scopo è stato utilizzato il sistema affymetrix, che permette di analizzare l'espressione genica su tutto il trascrittoma e

individuare variazioni di espressione di geni specifici su sonde oligonucleotidiche ad alta densità su microarrays. Sono stati condotti esperimenti di ibridazione con cRNA estratti dalle colture primarie depolarizzate e non (controlli). Analisi bioinformatiche e analisi statistiche stringenti hanno permesso di focalizzare l'attenzione su un numero di geni d'interesse la cui espressione varia in seguito a depolarizzazione, e specificatamente alcuni fattori di trascrizione e neurotrofici, *Egr1*, *Atf3*, *Tieg*, *RAR α* , *Junb*, *Pten* e *Bdnf*. Questi esperimenti hanno permesso di stabilire una gerarchia temporale delle variazioni geniche causate dalla depolarizzazione. Sono stati così individuati alcuni geni i cui prodotti attivano la trascrizione di *Nurr1*, e altri che vengono modulati in seguito all'attivazione di *Nurr1*. I dati dei microarrays sono stati validati mediante PCR (sia RT che real-time). Allo scopo di identificare il network genico a monte ed a valle dell'attivazione di *Nurr1* sono stati condotti esperimenti di interferenza di vie di segnalazione intracellulare che regolano *Nurr1*. Questa strategia ha permesso di individuare alcuni geni che sono sulla stessa via di segnalazione di *Nurr1* MAP-chinasi indipendente, come *Egr1* e *BDNF*. Questo studio quindi, mediante approcci sperimentali di colture cellulari, incremento di specifiche sottopopolazioni di neuroni dopaminergici, studi d'espressione genica, interferenza con i segnali intracellulari e spegnimento di geni d'interesse mediante RNA interference (in corso), ha fornito importanti informazioni sui meccanismi che determinano il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni mesDA. Tali studi potranno avere importanti ricadute sullo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, sia rigenerative che farmacologiche, per la cura delle malattie che coinvolgono il sistema dopaminergico.

2. MATERIALI E METODI.

2.1. Animali e dissezioni.

Sono utilizzati embrioni di ratti Sprague-Dawley CD1 (Charles-River, Italia) a vari tempi di gestazione. La data di gestazione viene calcolata in base all'inseminazione, confermata dalla presenza di tappo vaginale nelle ore successive al coito, che è considerata come tempo E0. Lo stadio di maturazione fetale viene determinato sia dall'età embrionale che dalla distanza cranio-sacrale: ad esempio 7-9 mm ad E13 (di Porzio et al., 1980). Le madri sono state sacrificate per asfissia in CO₂ in accordo con le direttive della Società Italiana per le Neuroscienze e la legge italiana. Gli embrioni vengono prelevati dall'utero in condizioni sterili, che vengono mantenute per tutta la preparazione. Le aree encefaliche di interesse sono dissezionate sotto controllo stereoscopico in soluzione tampone di fosfato di sodio (PBS) senza calcio e magnesio, con aggiunta di glucosio 33 mM. Le coordinate per il prelievo dei tessuti sono determinate secondo gli indici dell'atlante "A Stereotaxic atlas of the developing rat brain" (Sherwood et al., 1970) e Photografic Atlas of the rat brain (Kruger et al., 1995). L'area ventrale del mesencefalo delimitata dal circolo arterioso del Willis, viene prelevata per la preparazione di tessuti per colture primarie.

2.2. Colture cellulari.

Colture primarie di mesencefalo.

Le aree cerebrali sezionate vengono dissociate in cellule singole mediante dissociazione meccanica e le cellule messe in coltura, come da protocolli del laboratorio (Prochiantz et al 1979, di Porzio et al 1980, Fiszman et al 1991). Il mes embrionale, sezionato sotto controllo stereoscopico come già detto, viene trasferito in un tubo da centrifuga da 15 ml, lo si lascia sedimentare e si aspira il PBS in eccesso. Quindi si procede alla dissociazione del tessuto che può essere meccanica o enzimatica in base all'età dell'embrione. Allo stadio E12, lo stadio più adatto alla preparazione di colture cosiddette "espanse" (si veda più sotto), si esegue dissociazione meccanica: il tessuto viene risospeso nel terreno di coltura con

l'aggiunta di DNasi 0.01% (Sigma, Milano, Italia) e dissociato in cellule isolate pipettando più volte con una pipetta Pasteur affilata alla fiamma. La sospensione cellulare viene centrifugata a 99g [(700 r.p.m. in centrifuga 5810 (Eppendorf, Hamburg, Germany))] per 5 minuti.

Si risospende il pellet in terreno di coltura, si calcola la concentrazione delle cellule contando nell'emocitometro un'aliquota della sospensione cellulare opportunamente diluita, in mezzo con aggiunta di Trypan blue (TB, Sigma), un colorante non-vitale che penetra solo nelle cellule morte. Le cellule TB negative sono vitali.

Precedentemente si è proceduto alla preparazione delle piastre in cui crescere le cellule: le piastre da 35-60 mm di diametro o multiwells con pozzetti da 10-35 mm diametro sono incubate con 15 µg/ml di poly-D-Lysina (Sigma) in soluzione acquosa per 1 ora a 37°C e lavate tre volte con acqua sterile prima dell'uso.

Culture standard: la preparazione di cellule avviene come descritto sopra. Le cellule sono piastrate ad una densità di 125.000 cellule/cm² in Neural Basal Medium (NBM, Invitrogen, Milano, Italia), L-glutammina (0,5mM, Sigma), 7,5% di siero fetale bovino (FBS, HyClone laboratories Inc., Milano, Italia), 5% di siero di cavallo (HS, Euroclone, Milano, Italia); dopo 3 giorni *in vitro* viene aggiunto 5µM di citosina β-D arabinofuranosio (AraC, Sigma), per inibire la proliferazione di cellule non-neuronali.

Culture espansive: le cellule vengono "piastrate" a bassa densità (18.000/cm²) in terreno senza siero in NBM (Invitrogen), contenente il supplemento B27 (Invitrogen), con supplemento del fattore mitogeno bFGF (20 ng/ml, Sigma), del frammento N-terminale della proteina SHH (50 ng/ml) e del fattore di crescita dei fibroblasti 8 (10ng/ml FGF8, Sigma). Metà del terreno viene cambiato ogni tre giorni con supplemento di bFGF, SHH e FGF8. Al sesto giorno il terreno viene cambiato come sopra senza l'aggiunta dei fattori mitogeno e morfogeno (Volpicelli et al 2004a, 2004b) e con l'aggiunta di acido ascorbico (200µM AA, Sigma)

Depolarizzazione: a 9 giorni *in vitro* (DIV) le colture sono sottoposte a stimolazione mediante depolarizzazione aggiungendo al mezzo di crescita 56 mM di KCl e 10mM CaCl₂ per 2h, successivamente il KCl è diluito mediante cambi successivi di metà del terreno con terreno a normale concentrazione di KCl (5mM) e le cellule vengono mantenute in coltura per vari tempi (Volpicelli et al 2004a). In alternativa è stata utilizzata 10µM di veratrina (Sigma), con o in assenza del suo inibitore tetrodossina (TTX, 5µM, Sigma). Gli esperimenti di depolarizzazione sono stati ripetuti usando

almeno 20 differenti preparazioni di colture mesDA espanse.

Inibitori utilizzati: l'inibitore della chinasi 1/2 (ERK), U0126 (Calbiochem, Milano, Italia) e l'inibitore della protein chinasi A (PKA), H89 (Calbiochem), viene utilizzato ad una concentrazione di 10 μ M in dimetilsolfossido (DMSO); l' ω -conotossina (Sigma) e la nimodipina bloccano i canali calcio e sono utilizzati ad una concentrazione di 1 μ M e 1,5 μ M; i depositi di calcio intracellulari sono depletati dalla taspigargina (Sigma) ad una concentrazione di 1 μ M, mentre il calcio extracellulare è bloccato da 200 μ M di EGTA (Sigma). I trasportatori di membrana della dopamina, delle norepinefrine e della serotonina sono inibiti, rispettivamente, mediante il GBR-12909 (Sigma), la reboxetina (Pharmacia Upjohn, Milano, Italia) e la fluoxetina idrocloride (Pharmacia) ad una concentrazione di 100 μ M per il GBR-12909 e di 10nM per reboxetina e fluoxetina; la sintesi proteica è inibita mediante la cicloesimide (Sigma, 30' di preincubazione seguita da 2h di incubazione con o senza KCl) ad una concentrazione di 50 μ M.

Prima della depolarizzazione per tutti gli inibitori viene effettuata una pre-incubazione di 1h.

2.3 Purificazione della proteina Sonic Hedgehog ricombinante (SHH-N).

Trasformazione batterica con il plasmide pGEX-N.

Un ceppo di cellule competenti di E. coli, BL21, è stato trasformato con il plasmide pGEXN (gentilmente offertoci da P. Beachy, John Hopkin University, Baltimora MD USA) che esprime il frammento N-terminale della proteina SHH di topo, legata alla glutatione-S-transferasi (GST) e con un sito di taglio per la trombina. Per la trasformazione si utilizza 100ng di DNA plasmidico. Le cellule con il DNA plasmidico vengono lasciate per 30min in ghiaccio, successivamente tenute per 90sec a 42°C e rapidamente trasferite in ghiaccio per 2min. Si portano al volume di 1ml con LB e si lasciano in agitazione per 45min a 37°C.

Purificazione della proteina SHH-N ricombinante.

Le cellule BL21 trasformate con SHH-N ricombinante di topo vengono indotte con 0.6 mM IPTG (Isopropil-B-D-thiogalactopiranoside) e lasciate in incubazione a 37°C per 2 ore. Successivamente le cellule sono risospese in circa 30ml di PBS, 1mM

DTT, 0.2mM PMSF, e incubate in ghiaccio per 20min con 500µg/ml di lisozima. La sospensione cellulare viene sonicata in ghiaccio per 2min (5cicli: 45sec in sonicazione, 60sec di pausa).

Successivamente le cellule sono centrifugate a 15.000 rpm per 20min a 4°C; viene prelevato il sovrantante ed è aggiunta una sospensione al 50% di glutatione sefarosio (Pharmacia) equilibrata in PBS, in modo da legare la GST, ed è lasciata in agitazione per tutta la notte a 4°C. Per tagliare la proteina fusa e rimuovere la GST viene aggiunta per 1hr una massa di trombina (Sigma) equivalente all'1% della proteina fusa in 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 2,5mM CaCl₂. La proteina rilasciata dalle biglie viene fatta adsorbire a 150µl di antitrombina III (Sigma) e ad una sospensione al 50% di eparina agarosio equilibrata in 150mM NaCl, 50mM Tris, pH 7.4, 1mM DTT, per 20min a 4°C. La proteina viene eluita dalla colonnina cromatografica con 550mM NaCl in PBS, 1mM DTT, 10% glicerina.

La concentrazione di SHH ricombinante è determinata mediante il saggio Bradford (Bio-Rad). Il prodotto di SHH è verificato mediante gel di poliacrilammide in SDS e successiva colorazione con Comassie blue, indicando una purezza maggiore del 95%. La proteina purificata è aliquotata e conservata a -80°C.

2.4. Estrazione dell'RNA e trascrizione inversa.

L'estrazione dell'RNA totale dal mes ventrale viene eseguita utilizzando il kit TRI-REAGENT (Sigma). L'estrazione da TRI-REAGENT si basa sul metodo classico di estrazione di RNA totale di Chomczynski e Sacchi (1987) che associa fenolo e guanidina tiocianato in una soluzione mono-fasica per facilitare l'inibizione immediata dell'attività RNasica. Il TRI-REAGENT consente l'estrazione simultanea di DNA, RNA e proteine sia da tessuti che da cellule e permette di lavorare agevolmente con più campioni. In seguito all'omogenizzazione in TRI-REAGENT, viene aggiunto cloroformio (0.2ml di cloroformio per ml) che permette di separare l'omogenato in una fase acquosa contenente RNA ed una fase organica contenente proteine; il DNA si trova nell'interfase.

I tessuti omogeneizzati in TRI-REAGENT possono essere processati immediatamente o conservati a -80°C. In questo ultimo caso essi vanno scongelati e lasciati poi riposare per 5min a temperatura ambiente (TA) per permettere la dissociazione dei complessi nucleoproteici. Dopo l'aggiunta di cloroformio (come

sopra), il campione viene agitato vigorosamente e lasciato a TA per 10min. i campioni sono poi centrifugati per 15min a 12000g [13000 r.p.m. in centrifuga 5415 D (Eppendorf)] a 4°C.

A seguito della centrifugazione la miscela si separa in una fase inferiore rossa (fenolo-cloroformio), un'interfase e una fase acquosa superiore. L'RNA si trova esclusivamente nella fase acquosa che va quindi prelevata accuratamente e trasferita in un nuovo tubo.

L'RNA viene concentrato mediante precipitazione aggiungendo 0.5ml di isopropanolo per ml di TRI-REAGENT e 5µl di glicogeno 5mg/ml per ciascun campione (Ambion, Inc. , Milano, Italia) in modo da rendere visibile il pellet; attendere 10 minuti a TA e centrifugare per 15min a 12000g a 4°C.

Il sovrantante viene aspirato e il sedimento ("o pellet") "lavato" con 1ml di etanolo 70% (1 ml di ETOH/ml di TRI-REAGENT) centrifugando a 12000g per 15min a 4°C. Il sovrantante è aspirato e il "pellet" viene lasciato asciugare all'aria.

L'RNA viene poi risospeso in un piccolo volume di H₂O sterile. La concentrazione di RNA è misurata allo spettrofotometro in base all'assorbimento della luce ultravioletta a 260nm (1 Densità Ottica (OD) = 40µg di RNA).

Per eliminare gli eventuali residui di DNA contaminante viene effettuato un trattamento con DNAsi.

Trattamento con DNasi.

Al campione di RNA viene aggiunto, in quantità pari a 1/10 del volume in cui è risospeso l'RNA, una soluzione concentrata 10 volte contenente 100mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ , e 2 unità di DNAsi non contenente Rnasi (Ambion, Inc.). Questa miscela di reazione viene incubata a 37°C per 30min. Per inattivare ed eliminare la DNAsi, che interferirebbe con le successive reazioni, vengono aggiunti 5µl di resina (DNase Inactivation reagent, Ambion, Inc.) a ciascun campione. I campioni sono incubati per 2min a TA ed successivamente centrifugati a 12000g [13000 r.p.m. in centrifuga 5415 D (Eppendorf)] per 1min. L'RNA si trova nel "pellet".

La quantità di RNA recuperata è di nuovo misurata spettrofotometricamente, generalmente il recupero è del 50% rispetto alla quantità iniziale di RNA non trattato con DNAsi. L'integrità dell'RNA viene verificata mediante elettroforesi in gel di agarosio 1% contenente bromuro di etidio (1µg/ml). Quest'ultimo si intercala negli acidi nucleici ed è fluorescente quando viene eccitato alla lunghezza d'onda di 300

nm. La presenza di due bande discrete corrispondenti agli RNA ribosomali di 28S e 18S, indica che il campione non ha subito nessuna apprezzabile degradazione.

Trascrizione inversa.

Dopo il trattamento con DNAsi e sua eliminazione si procede alla retrotrascrizione di ciascun campione: 2µg di RNA sono trasferiti in tubo Eppendorf da 0.2 ml, e sottoposti ad un ciclo di reazioni che porta alla sintesi del cDNA.

I campioni di RNA sono incubati a 65°C per 5 min e poi raffreddati rapidamente fino a raggiungere una temperatura di 4°C; questo trattamento elimina gli aggregati e le strutture secondarie dell'RNA che potrebbero interferire con la sintesi del cDNA.

La miscela di reazione (in un volume finale di 20µl) contiene, oltre all'RNA trattato con DNAsi, 500 mM Tris-HCl pH 8,3, 30 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 50 mM DTT, 6 µM di esanucleotidi casuali (New England Biolabs Inc., Milano, Italia), 20 unità di RNAsina (Ambion, Inc.) e 200 unità di trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (M-MLV, New England Biolabs Inc.). Il campione è incubato in apparato a controllo termico ciclico ("thermal cycler") a 42°C per 60 min, portato a 95°C per 5 min ed infine a 4°C. Il trattamento a 95°C denatura gli ibridi RNA-cDNA ed inattiva l'enzima. Dopo il trattamento denaturante, la miscela di reazione viene portata a 100µl con H₂O sterile, centrifugata e conservata a -20°C per il successivo utilizzo.

2.5. Utilizzo di microgriglie a sonde oligonucleotidiche ("microarrays") prodotti da Affymetrix.

Sistema Affymetrix.

I microarray Affymetrix (Santa Clara, CA, U.S.A.) rappresentano un ottimo strumento per valutare il livello di espressione genica del trascrittoma *in toto* (sistema "genome-wide"). La piattaforma di microarray affymetrix utilizza sonde di oligonucleotidi 25-meri sintetizzati direttamente sulla superficie dell'array per mezzo della tecnica di fotolitografia. Ogni gene è rappresentato da una serie di oligonucleotidi variabili da 11 a 20, (nell'array utilizzato ve ne sono 11) presenti in circa 10⁷ copie per cella, disegnati su segmenti differenti della sequenza di mRNA a partire dal 3' (sito di polyA) fino a 600 basi a monte.

Il microarray è costituito da "Perfect Match Cell" (PM), ovvero celle contenenti sonde che si appaiano perfettamente col trascritto e da "MisMatch Cell" (MM) cioè

celle contenenti un controllo negativo rappresentato dalla stessa sequenza fatta eccezione che per la 13° base in cui viene inserita una mutazione. Una PM con la rispettiva MM costituiscono un “Probe Pair”.

L’insieme degli 11 “Probe Pair” rappresentanti un determinato trascritto viene detto “Probe Set”. Nel caso in cui il tratto a monte della coda di polyA di un determinato trascritto contenga sequenze molto ripetute è possibile che vi siano altri “Probe Set” disegnati su altre sequenze dello stesso trascritto.

Il “chipset” RAE (Rat Expression microarray) 230 è costituito di due “microarrays”, detti A e B, in cui sono rappresentati rispettivamente geni noti, e trascritti non ancora annotati del genoma di *Rattus norvegicus*. Nell’esperimento effettuato è stato utilizzato solo il “microarray” A. Le sequenze delle sonde sono state disegnate sul riferimento delle sequenze annotate nella banca dati di UniGene, versione 230, distribuita nella primavera del 2003.

Strategie per ridurre la variabilità negli esperimenti di microarray.

Nell’esperimento con “microarray” sui quali sono stati ibridati trascritti estratti da colture di neuroni mesDA, si è presentato il problema della variabilità causata dalla provenienza dei campioni da animali diversi.

Infatti la quantità di RNA iniziale necessario per questo esperimento richiede l’utilizzo di colture cellulari ottenute da mes di molte decine di embrioni, chiaramente non generati da un’unica ratte gravida. Nell’intento di limitare questo problema è stato seguito lo schema descritto nella figura 4.

Per ogni punto sperimentale sono state sacrificate 4 ratte gravide e tutti gli embrioni prelevati sono stati suddivisi in tre gruppi; quindi le cellule dissociate dai mes degli embrioni di ogni singolo gruppo sono state piastrate in duplicato, e l’RNA ottenuto dai tre gruppi (ogni gruppo proviene da un duplicato) è stato ibridato su un diverso “microarray”.

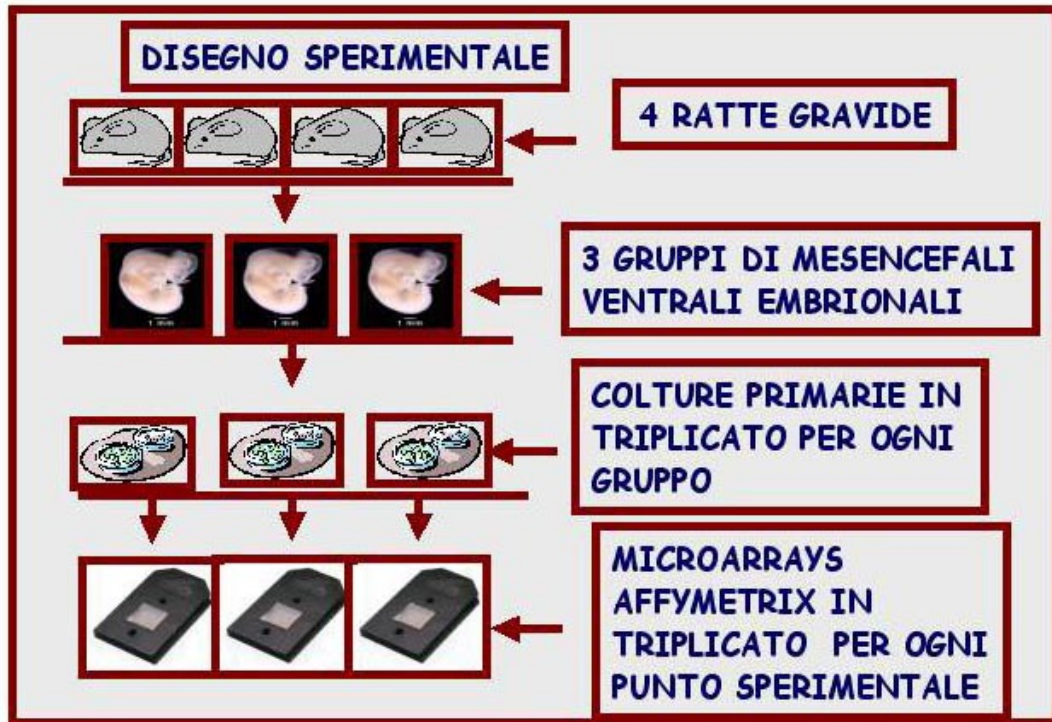


Fig. 4 Schema del disegno sperimentale utilizzato per la preparazione dei campioni ibridati sui microarrays.

Preparazione dei campioni per gli array.

Per la preparazione dei campioni da ibridizzare sui “microarray” si è seguita la procedura indicata nel manuale Affymetrix (schematizzata nella fig. 5).

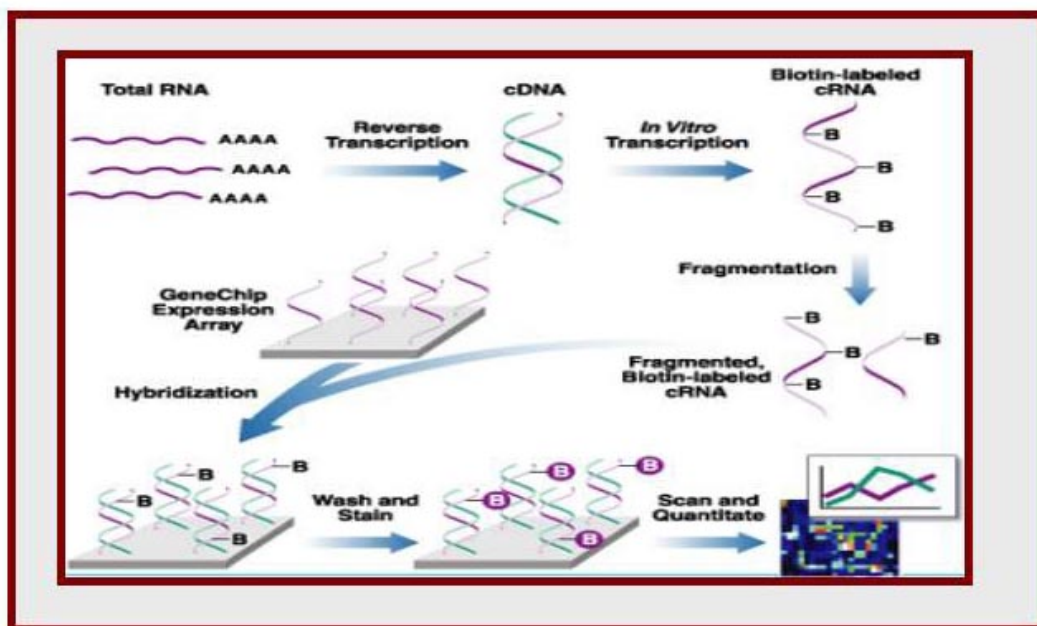


Fig. 5 Schema della preparazione dei cRNA utilizzati per ibridare i microarrays.

Estrazione e purificazione dell'RNA.

In seguito all'estrazione dell'RNA (effettuata come riportato sopra) dalle colture mes espanse, si verifica l'integrità della preparazione con un gel denaturante: per ogni campione vengono caricati 300ng di RNA (preventivamente riscaldati a 65°C per 10 min., e poi posti a 4°) su un gel d'agarosio all'1% in MOPS buffer [acido 3-(N-morpholino) propan sulfonico, acido acetico 80mM, EDTA 10mM, pH 7] senza bromuro d'etidio. Nei 12µl caricati per ogni campione si aggiunge una soluzione denaturante contenente del colorante 3X (formamide, formaldeide 37%, blu di bromofenolo (BBF), MOPS, bromuro d'etidio 10µg/ml). I campioni di RNA totale sono poi trattati con DNAsi come descritto precedentemente e purificati con il kit Qiagen "RNAasy Mini Protocol for RNA cleanup":

si aggiunge β-mercaptoetanolo all'RLT buffer (in rapporto 1:100) prima dell'uso. Si corregge il volume dei campioni a 100µl con acqua sterile purificata da RNAasi. Si aggiungono 350µl di RLT buffer + β-mercaptoetanolo ad ogni campione e si agita. Si aggiungono 250µl di etanolo 100% per diluire l'RNA e si mescola pipettando. I campioni (700µl) vengono caricati su mini colonna RNAeasy in tubi da 2ml e centrifugati a 9300 g [10000 r.p.m. in centrifuga 5415 D (Eppendorf)] per 15 secondi. Si allontana l'eluato e si trasferiscono le mini colonne RNAeasy in nuovi tubi da 2ml. Si aggiungono 500µl di RPE buffer alla colonna e si centrifuga a 9300 g per 2 minuti. Le mini colonne RNAeasy vengono trasferite in un tubo da 2ml e centrifugate a 12000g per 1 minuto.

Per eluire l'RNA, le mini colonne RNAeasy vengono trasferite in tubi da 1,5ml, si aggiungono 30µl di acqua sterile purificata da RNAasi, direttamente sulla membrana della colonna e si centrifuga a 9300 g per 1 minuto (l'operazione va eseguita due volte). Quindi si misura la concentrazione dell'RNA dei singoli campioni allo spettrofotometro e si procede alla sintesi del cDNA

Sintesi del primo filamento di cDNA.

Si prelevano 9µg per campione e si portano a 10µl con acqua sterile purificata da RNAasi. Si aggiunge 1µl di (dT)24-meri (Celbio, Milano, Italia) come innesco e si incuba a 70° per 10 minuti, per denaturare le strutture secondarie dell'RNA, quindi si centrifuga brevemente e si pone in ghiaccio. Successivamente si aggiunge ad ogni campione la seguente soluzione:

4µl di cDNA buffer 5X per il primo filamento (Invitrogen)

2µl di DTT 0,1 M (Invitrogen)

1µl di dNTP mix 10mM (Invitrogen)

si agita e si incuba a 42° per 2 minuti.

Si aggiungono 2µl di Super Script II RT (Invitrogen), si agita e si incuba a 42° per 1 ora.

Sintesi del secondo filamento di cDNA.

Una volta sintetizzato il primo filamento di cDNA si procede alla sintesi del secondo filamento: si pone la reazione di sintesi del primo filamento in ghiaccio, si centrifuga brevemente e si aggiunge la seguente soluzione ad ogni campione:

H₂O trattata con DEPC 91µl (Invitrogen)

buffer 5X per il secondo filamento 30µl (Invitrogen)

3µl miscela di dNTP 10 mM (Invitrogen)

1µl E. coli DNA ligasi 10 u/µl (Invitrogen)

4µl E. coli DNAPol I 10 u/µl (Invitrogen)

1µl E. coli RNasi H 2 u/µl (Invitrogen)

si agita, si centrifuga brevemente e si incuba a 16° per 2 ore.

Si aggiungono 2µl (10u) di DNA polimerasi T4 (Invitrogen) e si incuba a 16° per 5 minuti. Si aggiungono 10µl di EDTA 0,5 M per inattivare la reazione.

Purificazione del cDNA a doppio filamento.

A questo punto si prosegue con la purificazione del cDNA a doppio filamento tramite l'utilizzo del kit Affymetrix "GeneChip Sample Cleanup Module": si trasferisce il cDNA a doppio filamento sintetizzato in tubi da 1,5ml e si aggiungono 600µl di "buffer per legare il cDNA" ai 162µl di cDNA e si agita su vortex per 3 secondi. Si aggiungono 500µl di campione alla colonna "cDNA clean up spin" posta in tubi da 2ml, si centrifuga a 9300 g per 1 minuto e si allontana l'eluato. Si ricarica la colonna con i rimanenti 262µl, si centrifuga per 1 minuto a 9300 g e si allontana l'eluato. Si trasferisce la colonna in nuovi tubi da 2ml, vi si pipettano 750µl di buffer per lavare il cDNA, si centrifuga a 9300 g per 1 minuto e si allontana l'eluato. Si apre il tappo della colonna e si centrifuga a 12000 g per 5 minuti. Si trasferisce la colonna in tubi da 1,5ml, si pipettano 14µl di buffer per l'eluazione del cDNA direttamente sulla membrana, si incuba 1 minuto a temperatura ambiente e si centrifuga alla massima velocità per 1 minuto. Dall'eluazione si ottengono 12µl di cDNA a doppio filamento purificato

Sintesi del cRNA biotinilato (trascrizione in vitro).

A questo punto si procede alla sintesi del cRNA biotinilato mediante l'uso

dell'ENZO kit (Affymetrix). Si prelevano 5 μ l di ogni campione di cDNA e vi si aggiunge ad ognuno la seguente soluzione:

17 μ l H₂O trattata con DEPC

4 μ l HY Reaction buffer 10X

4 μ l ribonucleotidi biotinilati 10X

DTT 10X 4 μ l

4 μ l miscela di inibitori di RNAsi 10X

2 μ l RNA polimerasi T7 20X

Si agita la miscela, si centrifuga brevemente e si pongono i tubi a 37° per 5 ore, agitando il tubo ogni 40 minuti.

Purificazione del cRNA biotinilato.

Successivamente viene effettuata la purificazione del cRNA biotinilato tramite l'utilizzo del kit Affymetrix "GeneChip Sample Cleanup Module": si aggiungono 60 μ l H₂O purificata da RNAsi ai campioni di cRNA e si agita per 3 secondi. Si aggiungono 350 μ l di "IVT cRNA binding buffer" (Affymetrix) e si agita per 3 secondi. Si aggiungono 250 μ l di etanolo 100% al lisato si mischia pipettando. Si caricano 700 μ l di campione sulla colonna "cRNA cleanup spin" (Affymetrix) collocata in tubi da 2ml, si centrifuga a 9300 g per 15 secondi e si allontana l'eluato. Si trasferisce la colonna in nuovi tubi da 2ml, si aggiungono 500 μ l di "cRNA wash buffer" (Affymetrix) diluito e si centrifuga per 15 secondi a 9300 g per lavare la colonna, e si allontana l'eluato. Si aggiungono 500 μ l di etanolo 80% alla colonna, si centrifuga a 9300 g per 15 secondi e si allontana l'eluato. Si apre il tappo della colonna, si centrifuga a 12000 g per 5 minuti e si butta via l'eluato. Si trasferiscono le colonne in tubi da 1,5ml, quindi per eluire il prodotto purificato si pipettano 11 μ l di H₂O purificata da RNAsi (Affymetrix) direttamente sulla membrana e si centrifuga a 12000 g per 1 minuto (l'operazione va ripetuta una seconda volta). Una volta eluito, il cRNA purificato viene quantizzato mediante spettrofotometro e 200ng vengono sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio all'1% per controllarne l'integrità.

Frammentazione del cRNA per la preparazione del "target".

Per un'ibridazione ottimale dei campioni sui "microarray" si deve operare una frammentazione del cRNA purificato. Si prelevano 18 μ l (corrispondenti a 20 μ g) di campione, si aggiungono 14 μ l di H₂O e 5 μ l di buffer di frammentazione 5X (Affymetrix), quindi si incuba la reazione a 94° per 35 minuti e successivamente si

pone in ghiaccio. I campioni sono poi quantizzati allo spettrofotometro.

Per controllare l'efficacia del procedimento di frammentazione del cRNA si corrono su un gel d'agarosio all'1 % (senza bromuro d'etidio) aliquote di cRNA frammentato e non. Dopo la corsa il gel si colora con SYBR green per 30 minuti e si controlla, con uno standard di peso molecolare che il cRNA sia costituito da frammenti compresi tra 35 e 200 basi.

Scansione dei microarray ed analisi dei dati ottenuti.

Ogni cella contenente le copie di oligonucleotidi sonda è di 18 micrometri ed viene scansionata ad una risoluzione di 3 micron per "pixel" da un sistema di acquisizione, con tecnologia confocale (Affymetrix Scanner 2500).

L'analisi di esperimenti di microarrays si articola attraverso una serie di passaggi che comprendono:

- 1) estrapolazione dalle immagini acquisite,
- 2) trasformazione matematica,
- 3) normalizzazione e *prefiltro* delle informazioni circa l'espressione genica dei trascritti saggiati,
- 4) comparazione dei livelli di espressione tra le differenti condizioni biologiche osservate, con predizione di affidabilità statistica,
- 5) interpretazione dei risultati grezzi attraverso metodiche di raggruppamento ("clustering") di espressione e funzionale, annotazione completa dei geni variati e predizione di reti di regolazione da parte di fattori di trascrizione comuni.

I valori di espressione per ogni trascritto in ogni array vengono estrapolati a partire dalle immagini scansionate (tiff a 16 bit) attraverso il metodo detto "Robust Multiarray Average", in cui si calcola la media delle intensità delle celle PM di un "probeset" correggendola rispetto ai valori di fondo e per i valori delle corrispondenti celle di MM dei "probesets", analoghi in tutti i microarray dell'esperimento (Irizarry et al. 2003).

I valori di espressione calcolati per i "Probe Set" di tutti i "microarray" dell'esperimento sono normalizzati attraverso il metodo della regressione locale dinamica basata sul riferimento dei quantili delle distribuzioni (Bolstad et al 2003).

I dati così generati sono prefiltrati in base alle caratteristiche quantitative assolute (sistema di rilevazione Affymetrix) (manuale Affymetrix) e qualitative (verifica col modello teorico di ibridazione dell'algoritmo di Li and Wong, considerando l'ibridazione dei "Probe Set" nei "microarrays" di ogni gruppo di replicati) (Li and Wong, 2001a, 2001b).

Il metodo statistico discriminante per la valutazione di differenze di espressione relative tra le diverse condizioni biologiche saggiate utilizza il test inferenziale di Student con la correzione delle permutazioni (Tusher et al., 2001). Il limite di significatività è stato fissato per valori di p-value \leq a 0.01. Inoltre, viene applicato un filtro per escludere quei geni che presentano una variazione minore di $|1.5|$ volte.

L'ultima fase dell'analisi computazionale è basata sui metodi di "clustering", gerarchico e k-means (Spellman et al., 1998; Eisen et al., 1998), e sul raggruppamento dei geni variati in famiglie funzionali, in base alle annotazioni presenti nella banca dati di "Geneontology" (Blake et Harris, 2003; The Gene Ontology Consortium, 2000). L'appartenenza ad una determinata famiglia funzionale è valutata statisticamente attraverso il test di Fisher (limite di significatività fissato a valori di p-value \leq 0.05).

Infine viene effettuata un'analisi di reti geniche ("gene network") ricercando sequenze consenso per i fattori di trascrizione attivati sulla base di una matrice decisionale pesata in base a posizione (WPM) (Wingender et al., 2000).

2.6. RT-PCR semiquantitativa.

La trascrizione inversa-PCR ("reazione a catena della polimerasi o Polymerase Chain Reaction") consiste nell'uso sequenziale della trascrizione inversa (RT) e della PCR. Questa tecnica consente di osservare e quantizzare l'espressione dei geni in esame, anche quando i trascritti sono poco abbondanti e risulta particolarmente utile quando il materiale di partenza è particolarmente scarso. Il metodo semiquantitativo da me usato, permette di stimare i livelli di espressione dei geni in esame grazie all'amplificazione contemporanea (nello stesso tubo di reazione) del gene da analizzare e di un gene utilizzato come controllo interno, che codifica per l'enzima ipoxantin-fosfo-ribosil-transferasi (HPRT) (Pernas Alonso et al., 1999). È stato dimostrato che questo gene viene espresso a livelli bassi e costanti in tutto il sistema nervoso centrale sia durante lo sviluppo embrionale sia dopo la nascita (Steel e Buckley, 1993). I livelli di espressione dei diversi geni studiati, sono espressi come rapporto tra la quantità di amplificato del gene in esame e quella del gene HPRT, ottenendo così dei valori relativi e non assoluti.

PCR.

La PCR consiste in una serie di cicli di innalzamento e abbassamento della temperatura ripetuti numerose volte. Ogni ciclo consiste in una fase di denaturazione (un breve trattamento a 95°C per separare le due eliche di DNA), una fase di ibridazione degli oligonucleotidi di innesco alla sequenza bersaglio (si porta il campione a 50-60°C per permettere agli oligonucleotidi di innesco di appaiarsi alle sequenze ad essi complementari) e una fase di sintesi del DNA (in condizioni saline opportune e in presenza di appropriate concentrazioni di deossinucleotidi trifosfati, la DNA polimerasi catalizza a 72°C la sintesi di nuove molecole corrispondenti alle sequenze al 3' rispetto agli inneschi).

Ad ogni ciclo i frammenti neosintetizzati servono a loro volta da stampo per la sintesi di nuove molecole. Dopo pochi cicli di amplificazione il prodotto predominante è un frammento di DNA di lunghezza corrispondente alla distanza tra i due oligonucleotidi di innesco. Ogni ciclo raddoppia la quantità di DNA sintetizzato nel ciclo precedente e ciò rende il metodo estremamente sensibile. I prodotti della PCR vengono poi separati su un gel di agarosio in base alla loro mobilità elettroforetica. Le coppie di oligonucleotidi di innesco (MWG-Biotech, Ebersberg, Germania) da me utilizzati sono state disegnate con il programma E-primer 3 (Emboss) e poi è stato verificato che non formassero "hairpin" o dimeri tramite il programma Oligo-4 (National Biosciences, Plymouth, MN, USA). Gli oligonucleotidi d'innesco da me utilizzati e la lunghezza dei frammenti amplificati sono mostrate in tabella 1.

Oligonucleotidi di innesco	Sequenza (5'-3')	Lunghezza del prodotto amplificato (paia di basi)	Temperatura di ibridazione (°C)
OLIGONUCLEOTIDI D'INNESCO UTILIZZATI PER RT-PCR			
<i>ATF3</i> senso <i>ATF3</i> antisenso	CTCCTGGGTCACTGGTGTTT GAAGTGCACAGGAGGCCAGT	551 bp	56,5
<i>Bdnf</i> senso <i>Bdnf</i> antisenso	CCCAACGAAGAAAACCATAAG CCCCTCGCTAATACTGTCAC	187 bp	56,9
<i>c-Ret</i> senso <i>c-Ret</i> antisenso	CGGCTGCATGAGAATGACTGGA CAAAGCCTCCAGCACATACTTC	494 bp	56
<i>DAT</i> senso <i>DAT</i> antisenso	CGTGGGACCAATGTCTTCAGTG ATGGTGAAGGAGGAGAAGAAGT	498 bp	56,7
<i>EAAT-1</i> senso <i>EAAT-1</i> antisenso	TTGGTTTCGAGGACACAGTGAG CAGGCCACGATTTTGTATTC	504 bp	56
<i>EGR1</i> senso <i>EGR1</i> antisenso	AGCGGCCAGTATAAGTGATG CTGGACATGGTTGAGTGAAC	475 bp	59,2

<i>EP-10</i> senso <i>EP-10</i> antisenso	GCTGGAAGGCATGGAAGGTT AGCCCCATCACCGTAGCAAC	242 bp	54
<i>GAD-65</i> senso <i>GAD-65</i> antisenso	GGCTCTGGCTTTTGGTCCTTC TGCCAATTCCAATTATACTCTTGA	437 bp	58,7
<i>GAD-67</i> senso <i>GAD-67</i> antisenso	GACCGACTTCTCCAACCTGTT TCCCATCACCATCTTTATTTG	464 bp	57
<i>GFAP</i> senso <i>GFAP</i> antisenso	GCTGGAGGTGGAGAGGGACA TGGCGGCGATAGTCGTTAGC	456 bp	59,1
<i>GFRα1</i> senso <i>GFRα1</i> antisenso	CGCTGCCACTCCTGGATTTG GGTGCAGGGGGTGATGTAGG	512 bp	56
<i>GFRα2</i> senso <i>GFRα2</i> antisenso	GGAACATGGAAGAAGAGTGT CACATGCTTAACTCTTTGGAG	278 bp	56
<i>HPRT</i> senso <i>HPRT</i> antisenso	CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG CCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGG	370 bp	56
<i>JUNb</i> senso <i>JUNb</i> antisenso	TACGCAGCGGCAGGATAC CCCTGACCCGAAAAGTAGC	157 bp	54,8
<i>Nestina</i> senso <i>Nestina</i> antisenso	CGCTCGGGAGTGTGCTTAGA GCCTCCAGCAGAGTCTGTAT	273 bp	59,2
<i>NET</i> senso <i>NET</i> antisenso	TGCTGCTCTGCCTGATGGTC AGCCCCAGAGCCAGGAGCAT	541 bp	55
<i>NFL</i> senso <i>NFL</i> antisenso	ACCTCTCCGCCGCTCTCAAG TCTCCTCGACCTCTGTCTGCTCT	613 bp	60
<i>NFM</i> senso <i>NFM</i> antisenso	GAAATGGAAGAAACCCTCACA CCGGCCTTGGCCTCTGGTTTTGG	474 bp	58
<i>Nurr1</i> senso <i>Nurr1</i> antisenso	CGCGTCGCAGTTGCTTGACAC TTGCTGGAACCTGGAATAGT	449 bp	57,9
<i>PTEN</i> senso <i>PTEN</i> antisenso	GAGGCCCTGGATTTTTATGG GGTTGGCCTTGCTTTGTTT	536 bp	55,7
<i>RARα</i> senso <i>RARα</i> antisenso	GTAATCTGGTCGGCAATGGT GCTCCTGCAGCATGTCCAC	518 bp	56,1
<i>SERT</i> senso <i>SERT</i> antisenso	AGGAAGATCTGCCGATTTTC CTGCCAGTTGGGTTTCAAGTA	487 bp	58
<i>TH</i> senso <i>TH</i> antisenso	TGTCACGTCCCCAAGGTTTCAT GGGCAGGCCGGGTCTCTAAGT	276 bp	57
<i>TrpH</i> senso <i>TrpH</i> antisenso	TTCCAGGAGAATCATGTGAGC TTCGGATCCATAACAACAGCA	273 bp	58
<i>VMAT</i> senso <i>VMAT</i> antisenso	ATCCAGACCACCAGACCAGAG CCCCATCCAAGAGCACCAAGG	616 bp	58

Tabella 1

La tabella mostra le sequenze senso e antisenso dei primer usati nell'RT-PCR, con la lunghezza dei frammenti amplificati (bp) e la temperatura di ibridazione dei geni utilizzati: recettore tirosin chinasi Ret (*c-Ret*), trasportatore della dopamina (*DAT*), trasportatore neuronale del glutammato (*EAAT-1*), decarbossilasi dell'acido glutammico *GAD65*, *GAD67* e la sua forma embrionale *EP10*, proteina fibrillare acida della glia (*GFAP*), recettore α 1-2 della famiglia del GDNF (*GFR α 1-2*), ipoxantina fosforibosil trasferasi (*HPRT*), *nestina*, trasportatore della noradrenalina (*NET*), subunità leggera e media del neurofilamento (*NFL*, *NFM*), *Nurr1*, gene homeobox *Ptx3*, trasportatore della serotonina (*SERT*), tirosina idrossilasi (*TH*), triptofano idrossilasi (*TrpH*), trasportatore vescicolare delle monoamine 2 (*VMAT*).

È stato prelevato 1/20 dalla miscela di reazione di sintesi del cDNA e si è proceduto all'amplificazione in 25µl di una miscela di reazione contenente: 150mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM KCl, 0.2mM dNTP (Finnzymes, Milano, Italia) , 1.5mM MgCl₂, 0.4µM di ogni primer, 1u di DNA polimerasi AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Milano, Italia) e 1µCi [³²P]-dCTP (3000Ci/mmol, Amersham, Milano, Italia). L'amplificazione è condotta secondo il seguente schema:

dopo il primo passaggio di denaturazione a 95°C 8 min, seguono un numero variabile di cicli (da 27 a 30) così costituiti:

95°C	30sec
56-58°C	30sec
72°C	40sec

e un passaggio di allungamento finale a 72°C 5 min.

Il numero di cicli utilizzato è tale da cadere nella fase esponenziale della reazione di PCR e viene determinato sperimentalmente per ogni coppia di oligonucleotidi di innesco utilizzata. Ciascuna coppia di inneschi viene co-amplificata in presenza degli inneschi per il gene della ipoxantina-fosforibosil-transferasi, il nostro standard interno.

In ogni reazione sono utilizzati come controlli negativi campioni non sottoposti a trascrizione inversa e campioni in cui si omette il cDNA.

Ogni reazione viene condotta alla temperatura ottimale di appaiamento degli inneschi ("annealing temperature") che dipende dalla composizione in basi degli inneschi stessi e viene da noi valutata mediante software Oligo-4 (National Biosciences). Per ogni amplificato occorre stabilire il numero di cicli in cui l'aumento resta in fase esponenziale sia per il gene in studio che per quello di riferimento.

Identificazione dei prodotti amplificati.

L'identificazione dei prodotti amplificati è eseguita analizzando la mappa di restrizione o mediante sequenza. In generale viene eseguita questa verifica mediante saggi con enzimi di restrizione. Si sono scelti gli appropriati enzimi e si è proceduto con la digestione enzimatica, che avviene aggiungendo al DNA il tampone 10x opportuno e 1-2 unità di enzima di restrizione per µg di DNA. La miscela di reazione viene incubata per 2h alla temperatura ottimale per ogni enzima e la reazione viene bloccata aggiungendo EDTA 10 mM, (pH 8,0). Quindi i frammenti di DNA sono analizzati direttamente su gel di agarosio 1%, confrontando le dimensioni ottenute dei frammenti con quelle attese in base ai siti di taglio degli enzimi scelti. Un

marcatore di peso molecolare noto viene corso con i campioni per valutare la lunghezza dei prodotti di digestione.

Quantificazione degli amplificati.

12µl della reazione di amplificazione vengono corsi su un gel di agarosio 1.5% in buffer TBE (0.9M Tris-borato pH 8, 2 mM EDTA) contenente 1µg/ml di bromuro di etidio. Un marcatore di peso molecolare noto viene corso con i campioni per valutare la lunghezza dei prodotti di PCR.

Il gel è fissato in acido tricloroacetico (TCA) al 6% per 30 min con lieve agitazione. Viene poi lavato in acqua corrente per 1h, e seccato a 80°C per 2h in un essiccatore (“gel dryer”) connesso con una pompa a vuoto ed infine è esposto ad uno schermo “PhosphorImager” precedentemente cancellato da pregresse esposizioni con apposito illuminatore (“eraser”). Lo schermo viene inserito nello strumento di lettura, (Thyphoon, MolecularDynamics) si seleziona l’area che si vuole scansare, e si analizza mediante programma di software ImageQuant. La quantificazione dei livelli di mRNA è ottenuta calcolando il volume di ogni singolo frammento amplificato, che viene standardizzato rispetto al volume del frammento corrispondente ad HPRT, coamplificato nella stessa reazione.

2.7. Real-time PCR.

La combinazione della classica PCR con sistemi di rivelazione della fluorescenza hanno radicalmente modificato i sistemi di quantizzazione dei livelli di mRNA per ogni specifico gene contenuti in campioni biologici. Il principio teorico su cui si basa questa metodica è il seguente: nei tubi di reazione oltre i classici componenti della PCR (oligonucleotidi d’innescio, Taq Buffer, dNTP, MgCl₂ e campione) è presente un fluorocromo, in grado di emettere un segnale fluorescente solo quando è legato con il DNA (SybrGreen, Biorad). Gli strumenti che permettono di effettuare esperimenti di “real time” PCR sono composti da una macchina di PCR munita di un sistema di rivelazione della fluorescenza, in grado di funzionare durante i cicli di amplificazione. Quindi durante l’amplificazione il segnale di fluorescenza incrementerà ad ogni ciclo. Il valore della fluorescenza emessa è misurata ad ogni ciclo, ed è rappresentativo della quantità di prodotto sintetizzata fino a quel punto. Maggiore è la quantità del trascritto, presente all’inizio della reazione, minore numero di cicli serviranno a raggiungere il punto in cui il segnale risulta essere

statisticamente significativo, rispetto al segnale di fondo (Gibson et al., 1996). Questo punto è definito ciclo soglia, compare sempre nella fase esponenziale del processo di amplificazione, fase durante la quale la quantizzazione non è alterata da fenomeni di limitazione di materiale, come avviene nella fase di “plateau”, e dipende solo dalla quantità del trascritto di partenza. Inoltre, tramite la “real-time” PCR è possibile visualizzare una curva di denaturazione degli amplificati che consente di identificare gli eventuali falsi positivi.

Come detto precedentemente, questo tipo di quantizzazione è di tipo relativo (variabile a seconda del materiale complessivo di partenza) e deve essere normalizzata rispetto ai livelli di espressione di un trascritto i cui livelli sono costanti, nelle diverse condizioni sperimentali utilizzate. Ai livelli registrati per questo trascritto si assegna il valore arbitrario di 1 e si valuta quanto il trascritto da analizzare è più o meno espresso, rispetto a questo standard interno. Il gene utilizzato come standard nei miei esperimenti è HPRT (Pernas-Alonso et al., 1999) per i quali è provata in letteratura una certa costanza nei livelli di espressione. Le reazioni per ogni coppia d’oligonucleotidi d’innesco avvengono separatamente su una piastra da 96 alloggiamenti (Applied Biosystems). Lo strumento utilizzato è quello prodotto dalla Applied Biosystems (ABIPRISM 7000 Sequence Detection System) addizionato al kit di materiali fornito dalla medesima ditta. Gli oligonucleotidi d’innesco sono stati disegnati mediante il programma Primer Express v2.0 (Applied Biosystems), ed al contrario di quelli utilizzati per le RT-PCR non “real-time”, producono amplificati di lunghezza più o meno simile compresa tra 70 e 72 coppie di basi. Infatti laddove nelle RT-PCR non “real-time” può risultare utile che geni diversi corrispondano ad amplificati di lunghezza diversi (così da poterli discriminare anche se corsi sullo stesso gel), nelle “real-time” RT-PCR, l’intensità del segnale fluorescente è direttamente proporzionale alla lunghezza dell’amplificato. Gli oligonucleotidi d’innesco disegnati per “real time” RT-PCR e la loro lunghezza sono mostrati in tabella 2

Oligonucleotidi di innesco	Sequenza (5'-3')	Lunghezza del prodotto amplificato (paia di basi)	Temperatura di ibridazione (°C)
OLIGONUCLEOTIDI D'INNESCO UTILIZZATI PER REAL-TIME RT-PCR			
<i>ATF3</i> senso <i>ATF3</i> antisenso	GAAAAAAGAGAAGACAGAGTGCCTG CCTTCAGTTCGGCATTACACAC	72 bp	59,0
<i>Bdnf</i> senso <i>Bdnf</i> antisenso	GGCCCAACGAAGAAAACCAT AGGCACTTGACTGCTGAGCAT	70 bp	58,9
<i>Egr1</i> senso <i>Egr1</i> antisenso	GAGCACCTGACCACAGAGTCC GATAACTTGTCTCCACCAGC	70 bp	59,2
<i>HPRT</i> senso <i>HPRT</i> antisenso	TGGGAGGCCATCACATTGT AATCCAGCAGGTCAGCAAAGA	71 bp	59,2
<i>Nurr1</i> senso <i>Nurr1</i> antisenso	CAACTACAGCACAGGCTACGA GCATCTGAATGTCTTCTACCTTAATG	98 bp	58
<i>Ptx3</i> senso <i>Ptx3</i> antisenso	GCAACTGGCCGCCCAAGG AGGCCCCACGTTGACCGA	83 bp	59
<i>RARα</i> senso <i>RARα</i> antisenso	TGCCATCTGCCTCATCTGTG GCTCCTGCAGCATGTCCAC	72 bp	59,8
<i>TH</i> senso <i>TH</i> antisenso	CCTTTGACCCAGACACAGCA ATACGAGAGGCATAGTTCCTGAG	121 bp	58

Tabella 2

La tabella mostra le sequenze senso e antisenso dei primer usati nell'RT-PCR real time, con la lunghezza dei frammenti amplificati (bp) e la temperatura di ibridazione dei geni utilizzati: *Atf3*, fattore neurotrofico derivato dal cervello (*Bdnf*), early growth response 1 (*Egr1*) ipoxantina fosforibosil trasferasi (*HPRT*), *Nurr1*, gene homeobox *Ptx3*, recettore dell'acido retinoico α (*RAR α*) tirosina idrossilasi (*TH*).

2.8. Analisi dell'espressione proteica mediante western blot.

Estrazione delle proteine.

Le colture espanse di mes di ratto (depolarizzate e controllo) vengono lisate con NaCl 150mM, Tris-HCl pH 8, EDTA 0,4mM e Triton-X100 contenente una soluzione di inibitori di proteasi (Roche, Milano, Italia). La concentrazione proteica di ogni campione è determinata tramite l'utilizzo del Bio-Rad assay kit (Bio-Rad, Milano, Italia)

Preparazione del gel di acrilammide.

Il gel usato per caricare gli eluati proteici è formato nella parte inferiore da un gel di

corsa costituito da Tris pH 8.8 0.375M, 10% Acrilammide/Bisacrilammide, 0.1% SDS, 0.05% APS, TEMED. 0.005%. Nella parte superiore da un gel di impaccamento costituito da Tris pH6.8 0.125M, Acrilammide/Bisacrilammide 5%, SDS 10%, APS 0.05%, TEMED 0.005%. (Laemmli 1970)

Trasferimento su filtro.

60µg dell'eluato proteico sono caricati in ogni pozzetto sul gel di acrilammide e lasciato correre fino ad ottenere una corretta separazione delle bande. Le frazioni proteiche così separate gel sono trasferite su di un filtro di PVDF, precedentemente attivato mediante una immersione di circa 1 minuto in metanolo. Il trasferimento avviene mediante un'elettroforesi in una soluzione di trasferimento (Trizma 25mM, glicina 193mM, metanolo 20%) per 1h alla differenza di potenziale di 100V.

Immunorivelazione.

A trasferimento avvenuto i siti aspecifici sul filtro sono bloccati immergendolo in una soluzione di Tris-HCl pH 8, NaCl 150mM (TBS) e latte non grasso in polvere al 5%, per circa 1h, con leggera agitazione a temperatura ambiente (RT). Nella stessa soluzione sono diluiti gli anticorpi. La soluzione con l'anticorpo Anti-Nurr1 (1:100, Chemicon, Milano, Italia) è stata incubata con leggera agitazione a RT per 1h. Il filtro è stato lavato 5 volte per 5 minuti in TTBS (Tris-HCl 10mM pH 8, NaCl 150mM e Tween-20 0,1%) e una volta per 5 minuti ancora in TBS. È stato poi reimmerso per 1h nella soluzione bloccante (TBS e latte al 5%) con l'anticorpo secondario (anti-IgG di coniglio ottenuto in capra; Amersham Biosciences, Milano, Italia), coniugato alla perossidasi di rafano, e lavato come sopra; quindi la rivelazione del segnale è stata effettuata su lastra autoradiografica mediante l'utilizzo di un substrato chemiluminescente (ECL, Amersham Biosciences).

2.9. Saggio della ricattura della dopamina ad alta affinità.

La ricattura ad alta affinità della dopamina marcata con trizio è un buon saggio di identificazione per i neuroni dopaminergici relativamente maturi (E15-E16), e risulta utile per valutare le diverse condizioni di crescita e di sviluppo dei neuroni DA. Inoltre è una tecnica rapida e facilmente applicabile a numerosi campioni. Per ogni condizione si usano sempre campioni in triplicato e un triplicato di controllo come bianco. Dopo aver aspirato il mezzo alle colture, si procede con un lavaggio in PBS

contenente 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ e 6mg/ml di glucosio. Si incubano le cellule con 50nM di dopamina triziata (7,8-³[H] dopamina, con una attività specifica di 56 Ci/mmol (Amersham) in PBS contenente Ca/Mg/glucosio per 15 min a 37°C. Nel caso del campione di controllo (bianco), si procede sempre con un'incubazione con 50nM di ³[H]DA ma a 0°C. Si eseguono tre lavaggi in PBS tenuto a 4°C al quale si aggiunge Ca/Mg/glucosio. Si lisano le cellule con 0.2N NaOH/0.2% Triton X-100 e si neutralizza con un uguale volume di 0.2N HCl/0.2% Triton X-100. Si determina la radioattività incorporata dalle cellule aggiungendo un volume di liquido di scintillazione (Aquasol) pari ad almeno dieci volte il volume raggiunto e contando le fiale in un contatore di raggi beta (Beckman). I livelli di dopamina ricatturata, riportati nei grafici nella sezione "Risultati", sono espressi come valori a cui è stato sottratto il valore del bianco.

2.9. Analisi immunocitochimica.

Le colture sono state lavate per tre volte con PBS, fissate con paraformaldeide al 4% in PBS (30 minuti a 24 °C), ed in seguito permeabilizzate con 0.1% Triton X-100 in 10% siero normale di capra in PBS, per 15 minuti. Gli anticorpi usati sono: anti-TH policlonale 1:100 (Chemicon), anti-TH monoclonale 1:200 (Chemicon), anti-nestina monoclonale 1:200 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA), anti-TUBβ3 1:500 (Covance/BABco, Princeton, New Jersey, USA), anti-NFM policlonale 1:200 (Chemicon). Il legame dell'anticorpo primario viene evidenziato mediante l'utilizzo di anticorpi secondari fluoresceinati e rodaminati (Chemicon) anti-coniglio e anti-topo (utilizzati entrambi 1:200), oppure mediante l'utilizzo di un anticorpo antiFc di coniglio legato al complesso avidina-biotina coniugato alla perossidasi di rafano (Vectastain Elite, Vector Laboratories, Burlingame CA, U.S.A.). L'aggiunta, come substrato per la perossidasi, della diaminobenzidina (DAB) permette di visualizzare le cellule positive mediante lo sviluppo di un precipitato dal colore marrone.

I nuclei sono marcati utilizzando il colorante nucleare DAPI (Roche) e i vetrini vengono montati con Vectashield (Vector Laboratories, Milano, Italia). Per ogni condizione sono sempre usati campioni in triplicato. Un duplicato di controllo è

trattato con l'anticorpo secondario da solo.

Le cellule positive sono rilevate al microscopio ottico invertito o a fluorescenza.

3. RISULTATI

3.1. Colture dopaminergiche mesencefaliche *espansse*.

3.1.1. Preparazione delle colture.

Le colture *espansse*, da me messe a punto nel corso della tesi, costituiscono una valida tecnica innovativa in grado di generare neuroblasti DA *in vitro* e per indurle il differenziamento, partendo da un numero esiguo di cellule mes embrionali. La generazione *in vitro* di neuroni DA è un buon metodo per analizzare la funzione di nuovi geni implicati nel differenziamento dei neuroni DA (Studer et al., 1998).

Nel mio studio ho analizzato l'effetto proliferativo del fattore basico di crescita dei fibroblasti (bFGF) su neuroblasti mesencefalici in coltura. Cellule dissociate da mes ventrale di ratto ad E12, sono state piastrate a bassa densità (18000 cellule/cm²) e in assenza di siero. Ho usato queste condizioni di coltura per ridurre al minimo l'effetto di fattori che possono indurre il differenziamento (contatti cellulari) e per evitare la proliferazione di cellule gliali, stimolata dalla presenza del siero in coltura. Le cellule in queste condizioni sono state mantenute per diversi giorni *in vitro* (DIV) in presenza di bFGF (20ng/ml), cambiando metà del mezzo ogni tre giorni (come è descritto nella sezione materiali e metodi). Da osservazioni al microscopio ottico, queste cellule durante i primi tre giorni appaiono indifferenziate, con una morfologia rotondeggiante. Dopo circa tre giorni il loro numero aumenta e si evidenziano dei piccoli cloni (clusters) che col tempo aumentano di dimensione e numero. In assenza di bFGF, invece, le cellule mesencefaliche non riescono a sopravvivere, non si osserva l'aumento del numero di cellule (che al contrario diminuiscono fino a scomparire del tutto), né la comparsa dei clusters. Nelle mie condizioni sperimentali il bFGF riesce a protrarre i tempi di divisione mitotica dei neuroblasti per 12 giorni; l'intensa proliferazione ha luogo a partire dal sesto giorno di coltura. Tra 6 e 12 DIV, il numero delle cellule aumenta più di 10 volte (fig. 6a). Le cellule presenti nei clusters mostrano alcuni caratteri differenziati del fenotipo catecolaminergico, evidenziati mediante immuno-citochimica con anticorpi anti-TH (fig. 6b). Quando il bFGF è sottratto dalle colture, si osserva un ulteriore poderoso differenziamento

neuronale e appaiono neuroni TH⁺ in numero maggiore rispetto alla condizione in cui il bFGF è presente nel mezzo di coltura.

Per aumentare il differenziamento DA ho trattato le colture *espansse* con il frammento N-terminale della proteina ricombinante SHH (50ng/ml). Abbiamo quindi analizzato, a differenti DIV gli effetti delle varie combinazioni di aggiunta/sottrazione di bFGF e di SHH-N sul numero di cellule TH⁺ nelle colture mesDA *espansse*.

È stato osservato che il numero delle cellule TH⁺ è circa 2 volte maggiore quando si aggiunge SHH-N dopo i primi 6DIV, rispetto alla condizione in cui c'è la presenza continuata di bFGF (9 DIV). Se le stesse cellule sono lasciate in coltura in presenza di bFGF per 6 DIV e per altri 3 DIV in assenza di bFGF, si ottiene un numero di cellule TH⁺ di circa 2.5 volte maggiore rispetto alle cellule stimulate continuamente con il bFGF. Un effetto simile si ottiene anche quando, contemporaneamente alla sottrazione del bFGF, si aggiunge SHH-N al terreno di coltura. Un numero ancora maggiore di cellule TH⁺ si ottiene quando SHH e bFGF sono aggiunti insieme al mezzo al momento del piastramento e ambedue fattori sono sottratti dopo 6DIV (fig. 6c). Per verificare se l'incremento del numero delle cellule TH⁺ fosse selettivamente dovuto all'aggiunta della proteina SHH, ho utilizzato un anticorpo neutralizzante per bloccare la sua attività. In media, una dose saturante di SHH (50ng/ml) duplica almeno il numero di neuroni TH⁺, mentre l'aggiunta di una dose 5 volte maggiore di anticorpo anti-SHH completamente inibisce la sua azione (fig. 6d). Per verificare se l'aggiunta di SHH potesse avere un effetto trofico sulle colture mes *espansse*, ho misurato la lunghezza, l'area e il numero dei neuriti per cellula TH⁺. Nelle colture non sono state riscontrate significative differenze tra quelle stimulate solo con bFGF e quelle stimulate anche con SHH.

L'aggiunta alle colture di FGF8, prodotto e rilasciato *in vivo* dall'istmo, al momento del piastramento incrementa di 3 volte il numero delle cellule TH⁺ rispetto a colture trattate solo con bFGF e SHH (fig. 6d). Dati recenti hanno dimostrato che l'acido ascorbico (AA) incrementa la sopravvivenza di precursori mesencefalici TH⁺ (Yan, 2001 et al.). A tale scopo, ho voluto testare la possibilità di arricchire le colture *espansse* in neuroni TH⁺, usando un trattamento simile. L'aggiunta di AA (200μM) per 3 DIV dopo 6 DIV di stimolazione con bFGF e SHH determina un aumento di 4-7 volte del numero delle cellule TH⁺, se paragonate a colture trattate solo con bFGF e SHH (fig. 6d). L'effetto dell'AA sull'aumento delle cellule TH⁺ è additivo a quello di FGF8.

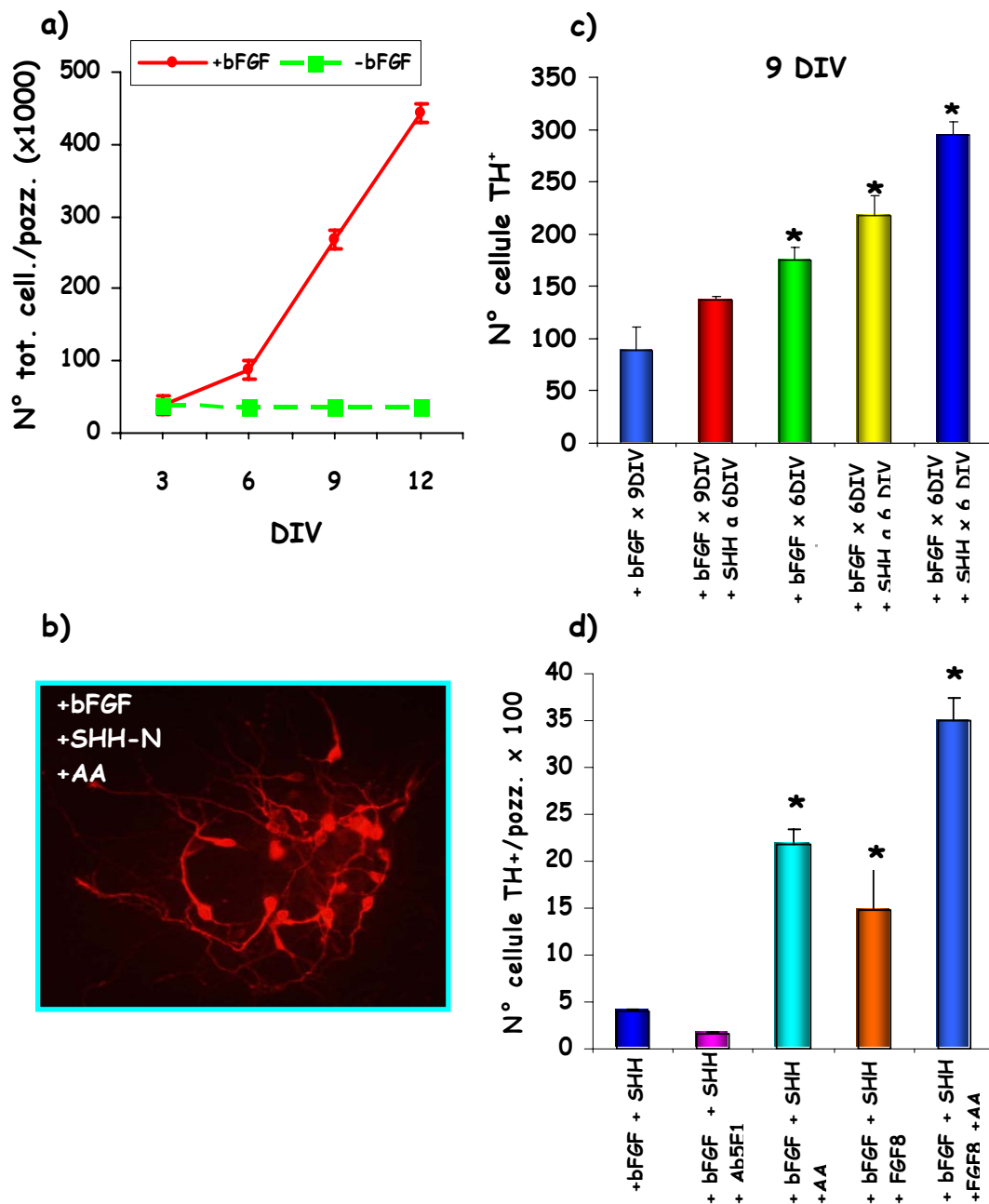


Fig. 6 Caratterizzazione dell colture mesDA espanse.

- Curva di crescita dei precursori mesencefalici in presenza e in assenza di bFGF.
- Immunocitochimica con anticorpi anti-TH a 9DIV, dopo stimolazione con bFGF e SHH per i primi 6DIV e successiva aggiunta di acido ascorbico (AA).
- Numero di cellule TH⁺ a 9DIV, in colture trattate con bFGF per 9DIV (bFGF x 9DIV), con bFGF per 9DIV e conseguente aggiunta di SHH a 6DIV (bFGF x 9DIV, SHH a 6DIV), con bFGF per 6DIV (bFGF x 6 DIV), con bFGF per 6DIV e conseguente aggiunta di SHH a 6DIV (bFGF x 6 DIV, SHH a 6DIV), in presenza di ambedue fattori per i primi 6 DIV (bFGF x 6 DIV, SHH x 6DIV).
- Numero di cellule TH⁺ a 9DIV, trattate per i primi 6 DIV con bFGF e SHH e anticorpi anti-SHH (Ab5E1) o con bFGF, SHH e FGF8 per i primi 6 DIV e successiva aggiunta di AA per 3 DIV.

Gli asterischi mostrano le differenze statisticamente significative (* $p \leq 0.01$) rispetto alla condizione di controllo.

3.1.2. Caratterizzazione delle colture mesDA *espansse*.

Una volta verificato l'effetto proliferativo del bFGF e messe a punto le condizioni che determinano il differenziamento del maggior numero di neuroni TH⁺ (6DIV di stimolazione con bFGF e SHH e FGF8 successiva sottrazione per altri 3DIV e aggiunta di AA), ho voluto studiare e caratterizzare meglio la popolazione di cellule *espansse in vitro*, sia valutandone l'espressione genica, sia analizzandole dal punto di vista funzionale.

Allo scopo di verificare la composizione cellulare di queste colture *espansse* sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza con anticorpi specifici. Nelle colture mesDA sono presenti prevalentemente precursori neurali e neuroni, come mostrato rispettivamente dalla presenza della nestina nel 90% delle cellule, e di neurofilamento medio (NFM) nel 70% delle cellule (fig. 7a). Inoltre, sono presenti neuroni differenziati e neuroni DA, come mostrato dalla presenza di tubulina- β 3, e di TH. A questo punto, è stata accertata anche la presenza dei trascritti per nestina, e per la subunità leggera e media del neurofilamento (NFL, NFM), già presenti in neuroni in via di maturazione o maturi, ma non quella del neurofilamento pesante (NFH), espresso solo in neuroni più maturi. Nelle differenti condizioni di coltura analizzate (\pm bFGF; \pm SHH), l'espressione genica di NFL e di NFM non varia significativamente (fig. 7b).

Nelle colture trattate per 6 DIV con bFGF oppure con bFGF e SHH, l'espressione genica di NFL è circa 2 volte maggiori nelle colture stimulate con bFGF rispetto alle colture in condizioni standard (vedi materiali e metodi), mentre i livelli di espressione genica di NFM sono simili in entrambe le condizioni (fig. 7b).

Per valutare la presenza e l'eventuale proliferazione di cellule gliali nelle colture *espansse in vitro*, sono stati analizzati i livelli di espressione della proteina fibrillare acida della glia (GFAP), il filamento intermedio del citoscheletro degli astrociti. Il livello di espressione della GFAP è basso nelle colture *espansse* con bFGF ed è paragonabile a quello di cellule piastrate in condizioni standard, a cui dopo 3 DIV è stato aggiunto l'AraC, per inibire la crescita delle cellule gliali (fig. 7b).

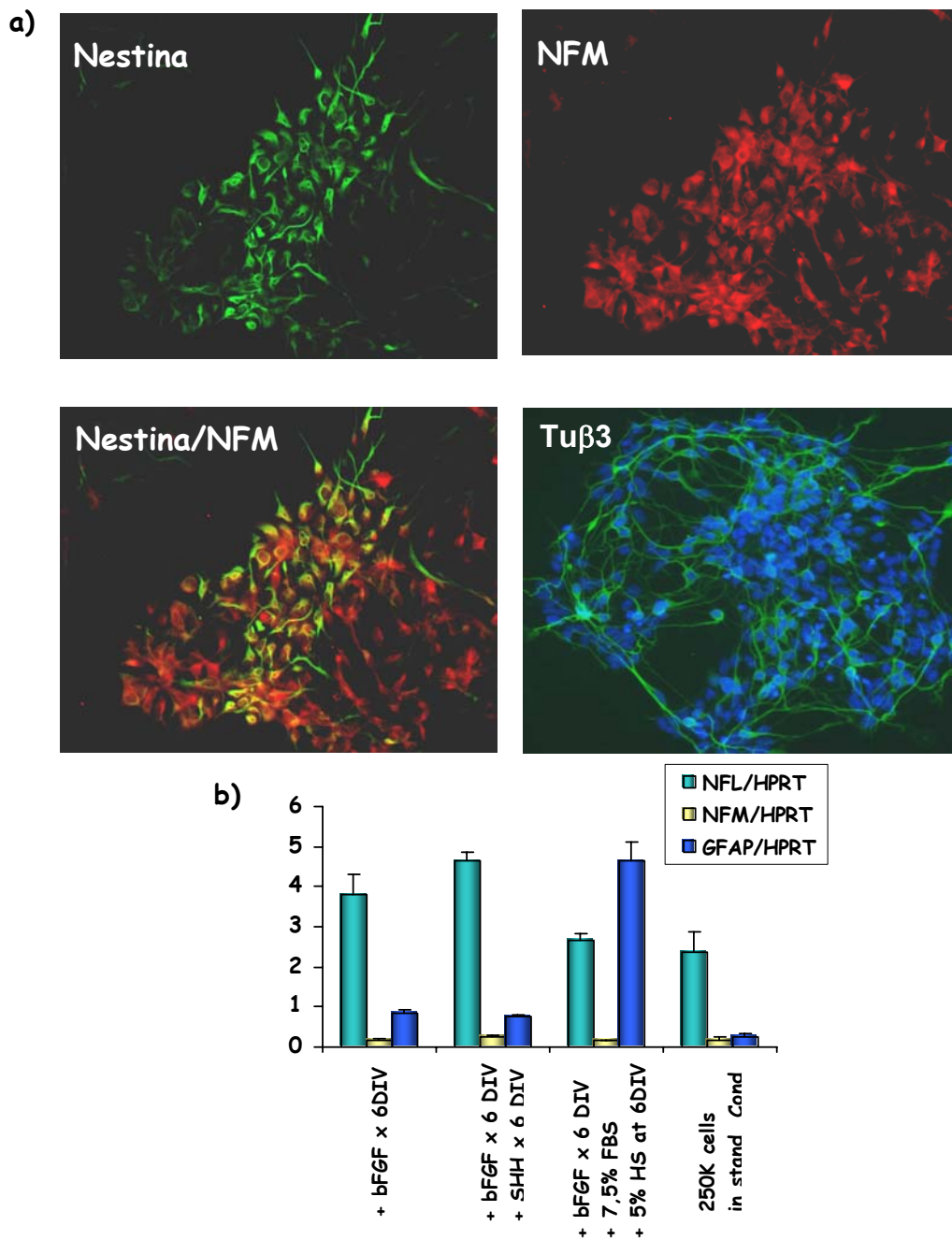


Fig. 7 Caratterizzazione ed espressione genica in colture mesDA espanse e in condizioni standard.

- a) Immunofluorescenza a 9DIV con anticorpi anti-nestina, anti neurofilamento medio (NFM) e anti-tubulina β 3, dopo stimolazione con bFGF e SHH per 6DIV.
- b) Il diagramma mostra le quantizzazioni relative della subunità leggera del neurofilamento (NFL), del neurofilamento medio (NFM), della proteina fibrillare acida della glia (GFAP) rispetto a quelle dell'ipoxantina fosforiboril transferasi (HPRT, standard interno). I dati sono espressi come rapporto NFL/HPRT, NFM/HPRT, GFAP/HPRT. Le colture espanse sono analizzate a 12 DIV dopo trattamento con bFGF per 6DIV, con bFGF e SHH per i primi 6DIV, o con bFGF per i primi 6DIV e successiva aggiunta di siero, o piastrate in condizioni standard.

Siccome i neuroni gabaergici costituiscono un'importante contingente dei neuroni della *substantia nigra*, è stata analizzata l'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi del GABA per decarbossilazione dell'acido glutammico (GAD), per verificare se potessero essere influenzati dal trattamento con bFGF e SHH.

Come atteso, i livelli di espressione di *GAD65*, *GAD67* e *EP10* (la forma troncata embrionale di *GAD67*) sono rilevabili, ma non significativamente differenti nelle varie condizioni di coltura analizzate (\pm bFGF, \pm SHH-N). La presenza dei neuroni GABAergici è stata analizzata anche mediante analisi immunocitochimica con anticorpi anti-GAD e sono state individuate circa 300 cellule positive per pozzetto, che non colocalizzano mai con cellule TH⁺. RT-PCR per il trasportatore neuronale-specifico del glutammato (*EAAT-1*) dimostrano la presenza di neuroni glutammatergici (fig. 8).

In aggiunta, le colture mesDA *espansive* esprimono tutti i geni DA analizzati, come *TH*, *DAT*, *Nurr1*, *VMAT2*, *GFR α 1* e *GFR α 2* e il recettore tirosin chinasi Ret (*c-Ret*) (fig. 8). Le differenti condizioni di coltura (\pm bFGF, \pm SHH-N) non influenzano il profilo di espressione di questi geni.

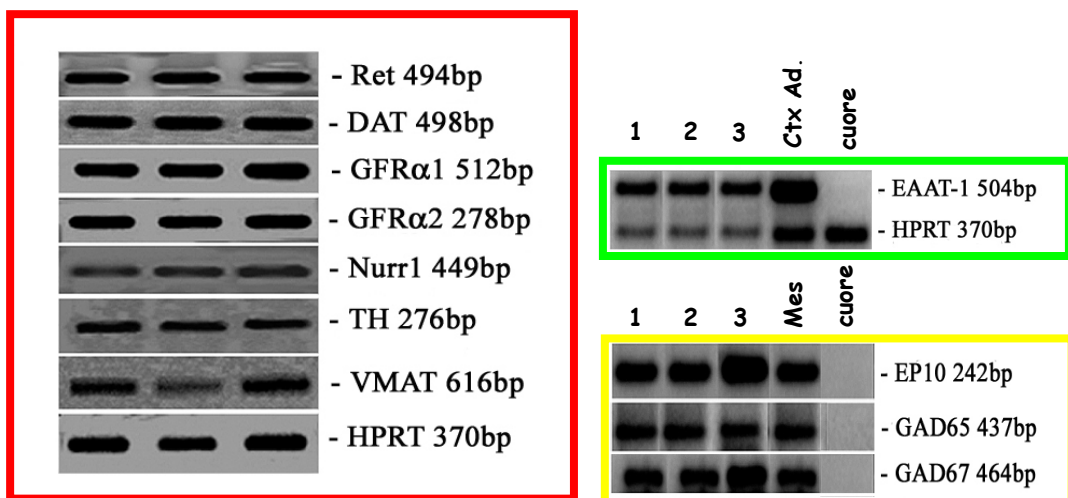


Fig. 8 Frammenti di RT-PCR in colture mesDA espansive a 9DIV:

Recettore tirosin chinasi Ret (*c-Ret*), trasportatore della dopamina (*DAT*), recettore della famiglia del GDNF α 1-2 (*GFR α 1*, *GFR α 2*), *Nurr1*, tirosina idrossilasi (*TH*), trasportatore vescicolare delle monoammine (*VMAT2*), ipoxantina fosforibosil transferasi (HPRT), trasportatore neuronale del glutammato (*EAAT-1*), decarbossilasi dell'acido glutammico *GAD65*, *GAD67* e la sua forma embrionale *EP10*, trasportatore della noradrenalina (*NET*), trasportatore della serotonina (*SERT*), triptofano idrossilasi (*TrpH*). **Le linee 1-3** mostrano in triplicato di esperimento i prodotti amplificati; la linea 4 mostra i frammenti in tessuti di ratto di controllo (corteccia frontale per *EAAT1*; ponte per *NET*, *SERT*, *TrpH*; Mes E15 per *GAD65*, *GAD67*, *EP10*; nella linea 5 è riportato il cDNA di cuore adulto (controllo negativo). La lunghezza dei prodotti amplificati è mostrata a destra in paia di basi (bp).

In seguito alla sottrazione di bFGF e SHH e all'aggiunta di AA si osserva un incremento di 7 volte dell'mRNA di *TH* e di 2 volte dell'mRNA di *DAT* (fig. 9b).

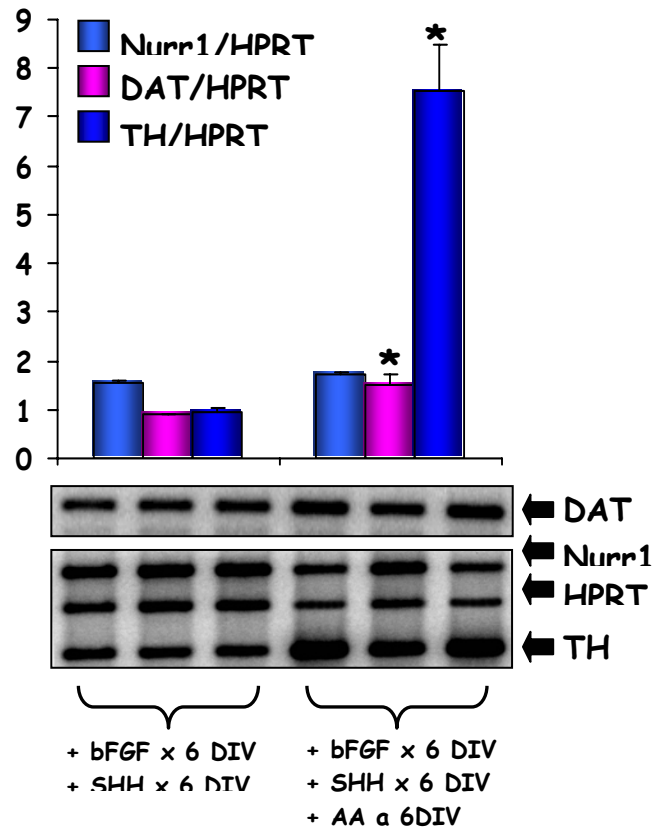


Fig. 9 Il ruolo dell'acido ascorbico.

RT-PCR in colture mesDA trattate con AA dopo i primi 6DIV di stimolazione con bFGF e SHH. Il gel nel riquadro mostra i frammenti dei campioni in triplicato di esperimento dei geni *DAT*, *HPRT*, *Nurr1*, *TH*.

Gli asterischi mostrano le differenze statisticamente significative (* $p \leq 0.01$) rispetto alla condizione senza AA.

Per caratterizzare lo stato di maturazione dei neuroblasti mesencefalici, è stato utilizzato il saggio della ricattura ad alta affinità della dopamina marcata, una capacità espressa solo nei neuroni DA embrionali differenziati. Come mostrato in fig. 10a, a 12 DIV l'uptake della DA aumenta significativamente se il bFGF è sottratto dal mezzo dopo 6 DIV di stimolazione, rispetto alle colture cresciute per 9DIV in presenza di bFGF. Il saggio di ricattura non è influenzato dalla presenza di SHH, invece, l'aggiunta di AA induce un modesto incremento della ricattura della DA (fig. 10b).

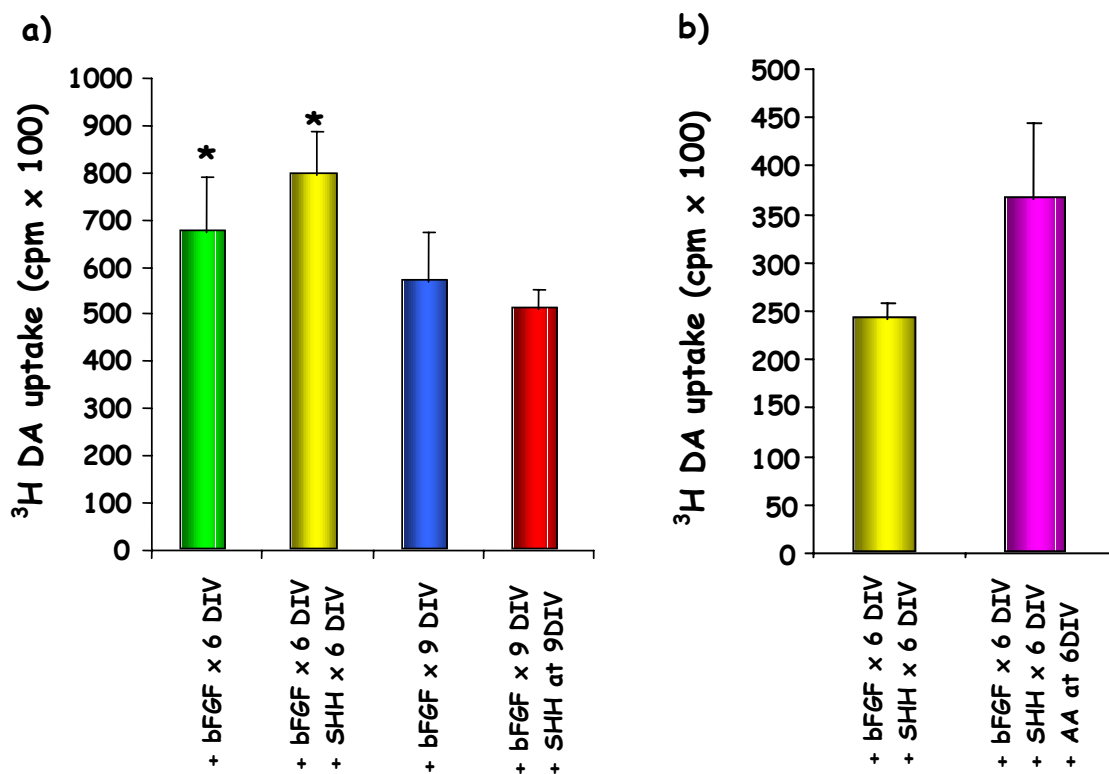


Fig. 10 Saggio di ricattura ad alta affinità della dopamina triziata.

- a) Ricattura della dopamina in colture mesDA trattate con bFGF per 6DIV (bFGF x 6 DIV), con bFGF per 6DIV e conseguente aggiunta di SHH a 6DIV (bFGF x 6 DIV, SHH a 6DIV), con bFGF per 9DIV (bFGF x 9DIV), con bFGF per 9DIV e conseguente aggiunta di SHH a 9DIV (bFGF x 9DIV, SHH a 9DIV).
- b) Ricattura della dopamina in colture mesDA trattate con bFGF e SHH per i primi 6DIV (bFGF x 6 DIV, SHH x 6DIV), e ulteriore aggiunta di AA.

Per verificare che la ricattura della DA fosse esclusivamente effettuata da neuroni DA e per escludere la presenza di altri neuroni aminergici nelle colture mesDA *espansse*, ho effettuato il saggio in presenza di inibitori specifici. Come mostrato nella fig. 10c, la ricattura della DA è completamente abolita mediante l'uso del GBR-12909 (Baldo et al., 1991), un selettivo inibitore di DAT; al contrario non si riscontrano effetti utilizzando la fluoxetina, un selettivo inibitore del trasportatore della serotonina (SERT) e con la reboxetina, un selettivo inibitore del trasportatore della noradrenalina (NET). Questi dati indicano che virtualmente tutte le cellule TH⁺

presenti in coltura sono neuroni DA e che altri neuroni aminergici sono assenti. Per verificare questa ipotesi, sono stati effettuati anche esperimenti di RT-PCR per individuare l'eventuale espressione di geni serotonergici (SERT, triptofano idrossilasi, l'enzima della biosintesi della serotonina) e noradrenergici (NET). Come atteso, non c'è l'espressione di nessuno di questi trascritti nelle colture mesDA *espansse*, mentre sono individuabili in tessuti di controllo (fig. 10d).

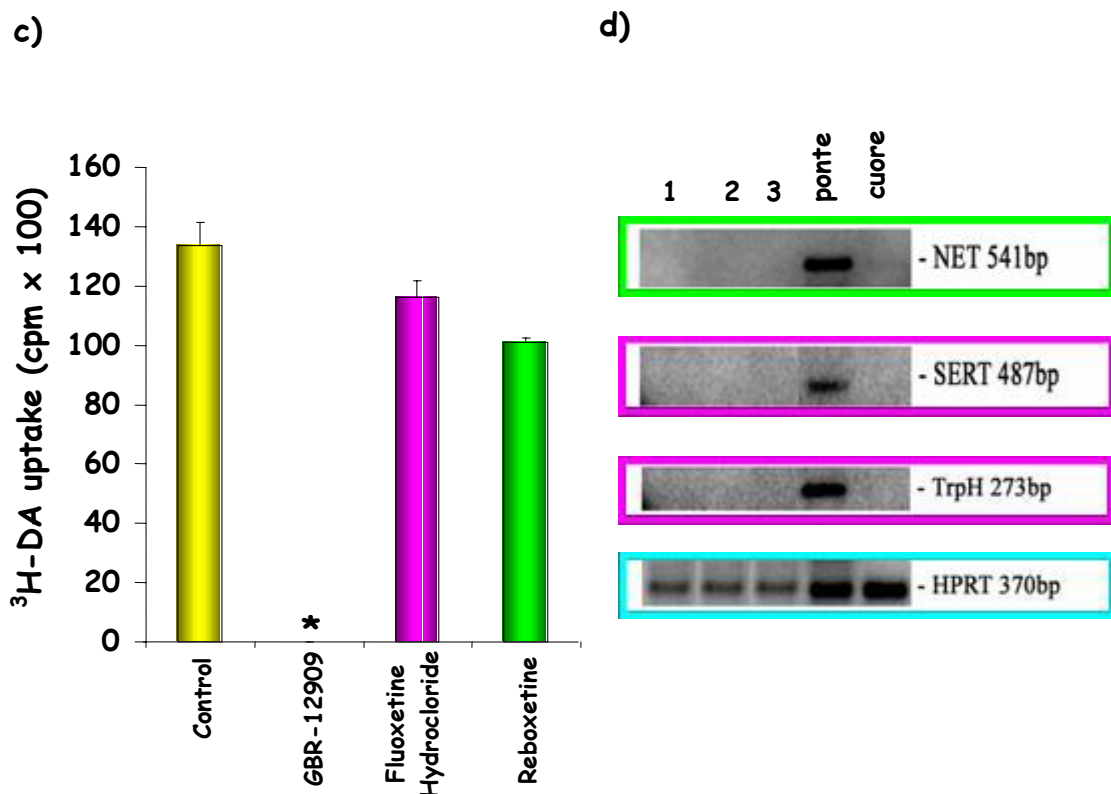


Fig. 10 La ricattura ad alta affinità della dopamina triziata è effettuata esclusivamente da neuroni mesDA.

- a) Uptake della dopamina in colture di controllo trattate con inibitori selettivi del trasportatore della dopamina (GBR12909), del trasportatore della serotonina (fluoxetina) e del trasportatore della noradrenalina (reboxetina).
- b) RT-PCR analisi del trasportatore della noradrenalina (*NET*), del trasportatore della serotonina (*SERT*), della triptofano idrossilasi (*TrpH*) e dello standar interno *HPRT*. La lunghezza dei prodotti amplificati è mostrata a destra in paia di basi (bp).

Gli asterischi mostrano le differenze statisticamente significative (* $p \leq 0.01$) rispetto alla condizione senza AA.

3.2. Modulazione dell'espressione genica di *Nurr1* in neuroni dopaminergici mesencefalici.

3.2.1 Espressione genica di *Nurr1* durante lo sviluppo mesencefalico: studi *in vitro* e *in vivo*.

Ho analizzato il profilo di espressione di *Nurr1* durante l'ontogenesi del mesencefalo ventrale di ratto, mediante RT-PCR semiquantitativa. I trascritti di *Nurr1* sono chiaramente individuabili già ad E12, quando è presente solo l'espressione di *TH*. Ad E13, i livelli di mRNA di *Nurr1* mostrano un notevole e significativo incremento. Gli alti livelli di espressione di *Nurr1* persistono per circa 2 giorni dopo, fino ad E15, e raggiungono valori almeno 15 volte più elevati di quelli osservati a E12. Successivamente, l'espressione genica di *Nurr1* si riduce rapidamente e si mantiene costante fino all'adulto, raggiungendo livelli simili a quelli osservati negli stadi precoci dello sviluppo (fig. 11a). Altri geni espressi dai neuroni DA durante l'ontogenesi mesencefalica, come *DAT*, *TH*, *VMAT2*, hanno differenti profili di espressione (Perrone-Capano et al., 1994).

Per verificare se, durante lo sviluppo, il profilo di espressione genica di *Nurr1* fosse dipendente da influenze extracellulari oppure "cell autonomous", ho preparato colture primarie di mesencefalo di ratto a diversi stadi embrionali E12, E13, E14, cresciute in condizioni standard (cioè ad alta densità e in presenza di siero, vedi la sezione materiali e metodi). Il profilo di espressione di *Nurr1* è stato analizzato a vari DIV. In colture preparate da mes E12 un picco di espressione di *Nurr1* è osservabile dopo 3DIV, in quelle generate da mes E13 il picco è dopo 2DIV, in colture generate da E14 dopo 1DIV (fig. 11b). Questo profilo di espressione è specifico di *Nurr1*, altri geni espressi nei neuroni DA, come *TH*, *DAT*, *VMAT2* hanno differenti profili di espressione (Perrone-Capano et al., 1996). Questi dati dimostrano che l'espressione genica di *Nurr1*, sia *in vitro* che *in vivo*, è regolata precisamente durante lo sviluppo, in particolare durante la fase di maturazione dei neuroni mesDA, anche se può essere modulata da fattori epigenetici.

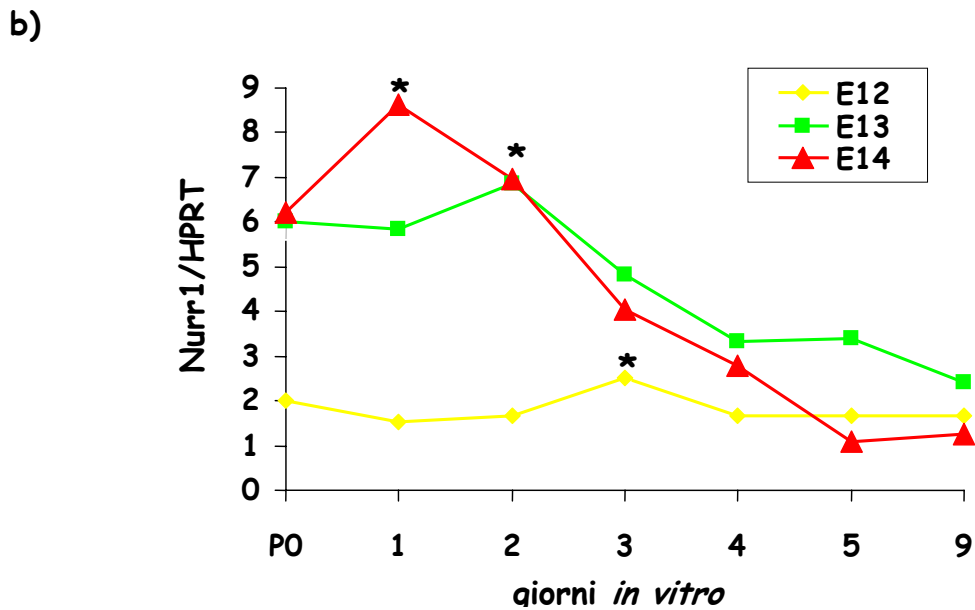
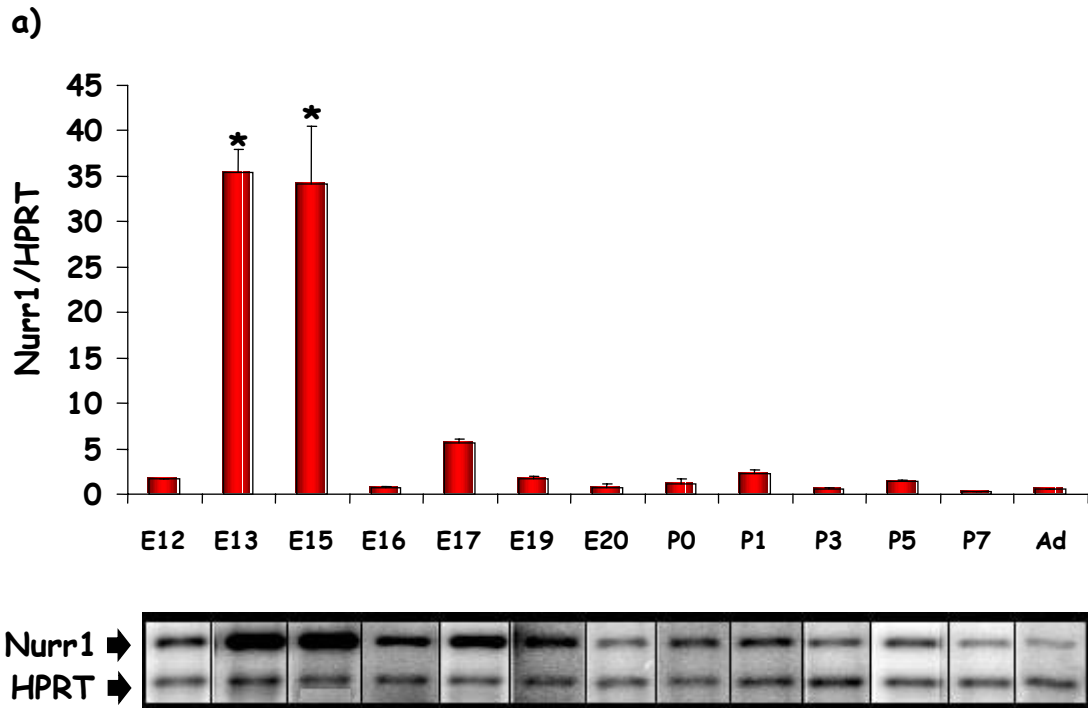


Fig. 11 Livelli di espressione di *Nurr1* nel mesencefalo di ratto, durante l'ontogenesi (a) e in colture mes primarie (b).

I pannelli mostrano i livelli di espressione dei relativi mRNA, valutati mediante RT-PCR e normalizzati rispetto allo standard interno HPRT, come descritto nella sezione materiali e metodi. I dati sono espressi come rapporto Nurr1/HPRT a diversi stadi embrionali (E), postnatali (P) ed adulto (Ad) o a vari giorni *in vitro*. Gli asterischi mostrano le differenze statisticamente significative (* $p \leq 0.01$) rispetto al valore di E12 o punto zero (P0). Il gel nel riquadro mostra i frammenti coamplificati di Nurr1 e di HPRT in triplicati sperimentali.

3.2.2. La depolarizzazione stimola l'espressione genica di *Nurr1* in neuroni embrionali DA.

In studi recenti è stato dimostrato che l'espressione genica di *Nurr1* può essere indotta da stimolazione elettrica sia nel SNC dell'adulto (Pena de Ortiz et al., 1996; Xing et al., 1997; Crispino et al., 1998) che in colture cellulari (Law et al., 1992; Brosenitsch et al., 2001; Kovalovsky et al., 2002).

Per verificare l'ipotesi che il potenziale di membrana potesse influenzare i livelli di mRNA di *Nurr1* anche in colture mesDA embrionali, sono stati effettuati esperimenti di depolarizzazione. In seguito al trattamento con alte concentrazioni di K^+ (2h, 56 mM KCl), i livelli di mRNA di *Nurr1*, saggiati sia per RT-PCR semiquantitativa che per real-time PCR, aumentano notevolmente (dalle 3 alle 7 volte) sia in colture mes E13 piastrate in condizioni standard (vedi materiali e metodi) che in colture mesDA espanse (fig. 12).

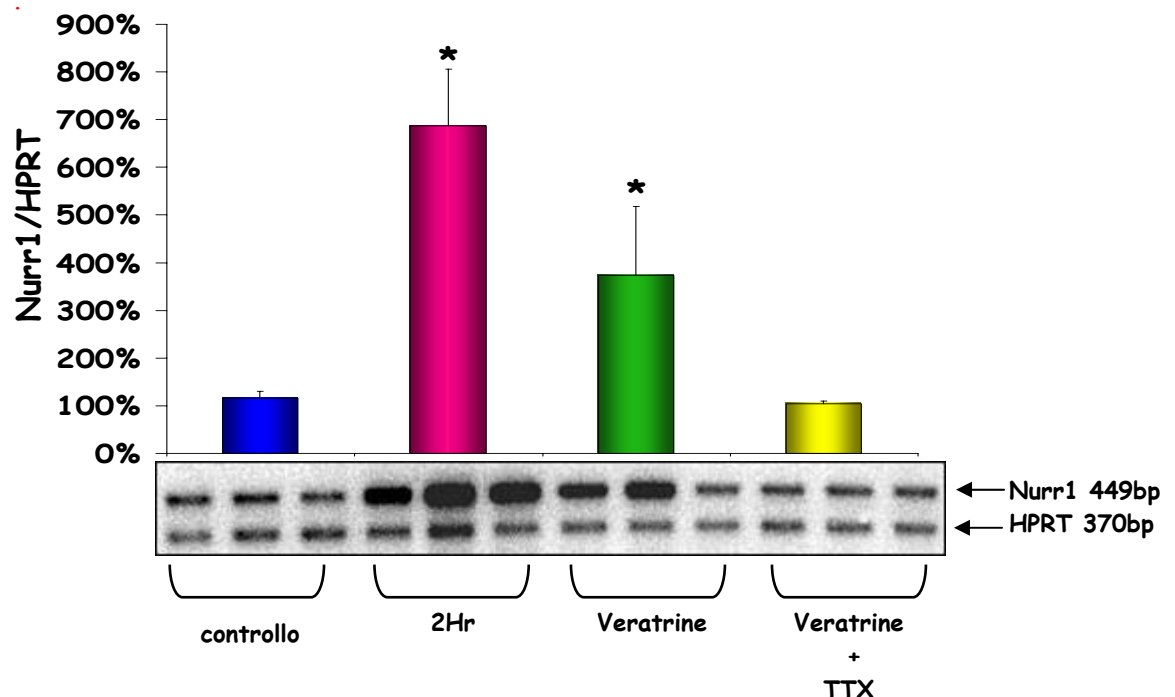


Fig. 12 La depolarizzazione induce la variazione di espressione genica di *Nurr1* in colture di neuroni mesDA.

Il diagramma mostra la quantizzazione relativa (media \pm ES) del prodotto amplificato di *Nurr1* comparato all'HPRT. I dati sono espressi come rapporto Nurr1/HPRT in colture di neuroni mesDA a 9 DIV: controllo; colture trattate per 2 hrs con K^+ (56 mM); colture trattate per 2 hrs con veratrina (10 mM); colture trattate per 2 hrs con veratrina (10mM) \pm tetrodotossina (5mM, TTX). Il gel nel riquadro mostra i frammenti coamplificati di *Nurr1* e *HPRT* in triplicati di esperimento.

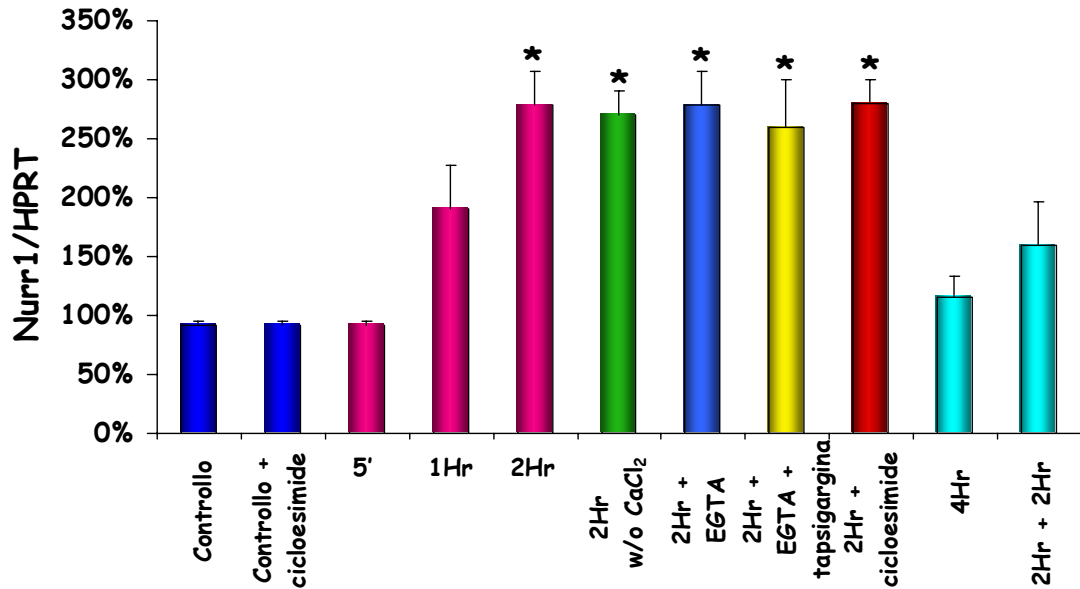
Gli asterischi mostrano le differenze statisticamente significative (* $p \leq 0.01$) rispetto al controllo.

Per verificare che l'effetto osservato fosse dovuto alla depolarizzazione della membrana, le colture *espansse* sono state trattate per 2h con veratrina, che causa l'apertura permanente dei canali sodio voltaggio-dipendenti. Come atteso, il trattamento con veratrina causa un aumento di mRNA di *Nurr1* e il suo effetto è completamente abolito in presenza di tetrodotossina, che blocca specificamente i canali sodio voltaggio-dipendenti (fig. 12). L'aumento dei livelli di mRNA di *Nurr1* è stato osservato anche dopo 2h di trattamento delle colture con 25mM di K^+ , ma non con 10mM di K^+ .

Per comprendere la cinetica di questa specifica attivazione di espressione genica è stato analizzato l'andamento temporale in seguito a depolarizzazione con alto potassio, per vari tempi in coltura. Come mostrato in fig. 13a, 5' di trattamento con elevato K^+ non sono sufficienti ad indurre una variazione trascrizionale di *Nurr1*. Un aumento dell'mRNA di *Nurr1*, sebbene in maniera non statisticamente significativa, è rilevabile dopo 1h di depolarizzazione e raggiunge valori massimi dopo 2h di trattamento. Prolungando la stimolazione con K^+ oltre le due ore (fino a 4 ore) non solo non si ottiene un ulteriore incremento nell'mRNA di *Nurr1*, ma piuttosto si osserva un ritorno ai livelli basali. In ogni caso, dopo 120 minuti dalla fine del tempo di depolarizzazione i livelli del trascritto di *Nurr1* ritornano ai valori dei controlli (fig. 13a). Questi risultati dimostrano che in colture primarie mesDA *espansse*, l'espressione genica di *Nurr1* risponde alla depolarizzazione della membrana con un rapido incremento dell'mRNA di *Nurr1*, seguito da un rapido decremento, dinamica che è tipica dei geni espressi molto precocemente. *Nurr1* infatti è un gene di questa categoria ("immediate early genes"), come dimostrato dal suo aumento in seguito a depolarizzazione anche in assenza di sintesi proteica (Volpicelli et al 2004; fig. 13a). Al contrario la depolarizzazione non modifica l'espressione di altri geni analizzati (*TH*, *DAT*, *Ret*, *Ptx3*, *GFR α 1* e *GFR α 2*).

Per verificare che l'attivazione trascrizionale di *Nurr1* fosse funzionale e che ad esso corrispondesse un aumento della proteina, è stato effettuato un esperimento di "western blotting" utilizzando anticorpi anti-Nurr1 su estratti proteici di colture mesDA *espansse*, non trattate e depolarizzate per 2h con K^+ . Si noti che l'intensità della banda di 60 KDa rivelata dall'anticorpo (corrispondente al peso molecolare della proteina Nurr1) è maggiore nel campione depolarizzato che nel controllo (fig. 13b).

a)



b)

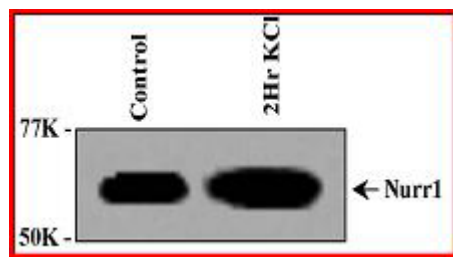


Fig. 13 La depolarizzazione induce variazioni della proteina e dell'espressione genica di *Nurr1* in colture mesDA espanse.

a) Il diagramma mostra le quantizzazioni relative del prodotto amplificato di *Nurr1* rispetto allo standard interno HPRT. I dati sono espressi come rapporto *Nurr1* /HPRT in colture mesDA espanse a 9DIV.

Gli asterischi mostrano le differenze statisticamente significative (* $p \leq 0.01$) rispetto al valore del controllo.

b) Western blotting con anticorpi anti-*Nurr1*, che mostra un aumento della proteina *Nurr1* in seguito a 2h di depolarizzazione, rispetto alle colture di controllo.

3.3. Utilizzo di “microarrays” per lo studio dei geni modulati dalla depolarizzazione.

Nell'intento di comprendere le cause e gli effetti dell'attivazione di Nurr1 in seguito a depolarizzazione, ho utilizzato un approccio che consente di osservare contemporaneamente le variazioni quantitative e qualitative in tutto il trascrittoma.

La scelta è caduta sull'utilizzo di “microarrays” contenenti sonde rappresentative di tutti i geni trascritti nel genoma del ratto (cosiddetto approccio “genome wide”).

Per limitare gli effetti dovuti alla variabilità individuale, gli embrioni sono stati raggruppati in tre gruppi, come descritto nella sezione materiali e metodi. Da ogni raggruppamento sono state preparate colture di neuroni mesDA *espanses* in triplicato trattate nel modo seguente:

- a) controllo non trattato
- b) 2h di depolarizzazione (56mM K⁺) seguita da 30' in mezzo non depolarizzante (2h+30')
- c) 2h di depolarizzazione seguita da 2h in mezzo non depolarizzante (2h+2h).

Dall'RNA totale, estratto da ogni campione, è stato sintetizzato il cRNA biotinilato, utilizzato nelle reazioni di ibridazione sui “microarrays”. Dai segnali di fluorescenza ottenuti dalla scansione dei “microarrays” ibridati sono stati generati dei valori numerici (Irizarry et al., 2003; Bolstad et al., 2003).

Per eliminare i gruppi di sonde che ibridano con lo stesso trascritto (“probe set”), con un'insufficiente qualità d'ibridazione (si veda la sezione materiali e metodi) è stata effettuata un'operazione di *pre-filtro*. Successivamente, sono stati effettuati tre differenti tipi di filtri che tengono conto: del numero assoluto di copie di un determinato trascritto nei campioni; delle differenze tra il segnale di ogni cella e segnale di fondo; delle variazioni dei segnali di ogni “probe set” dal segnale medio per ogni gruppo di replicati.

Con questo tipo di analisi è stato possibile identificare 8700 “probe set” correttamente ibridati, su 15923 totali analizzati.

La successiva analisi statistica è stata tesa ad individuare i “probe set”, variati statisticamente rispetto al controllo (Tusher et al., 2001). In questa analisi sono stati considerati solo i geni la cui espressione risulta aumentata o diminuita di 1,5 volte (corrispondente al 50% in più o in meno) rispetto al controllo. Utilizzando questo ulteriore filtro, dopo 30' dalla fine della depolarizzazione, rispetto al controllo non

trattato, 62 geni mostrano una trascrizione aumentata, mentre 191 geni diminuita; 120 min dopo la fine della depolarizzazione 117 geni mostrano una trascrizione aumentata, mentre 92 geni diminuita (fig. 14, tabelle 3,4,5,6).

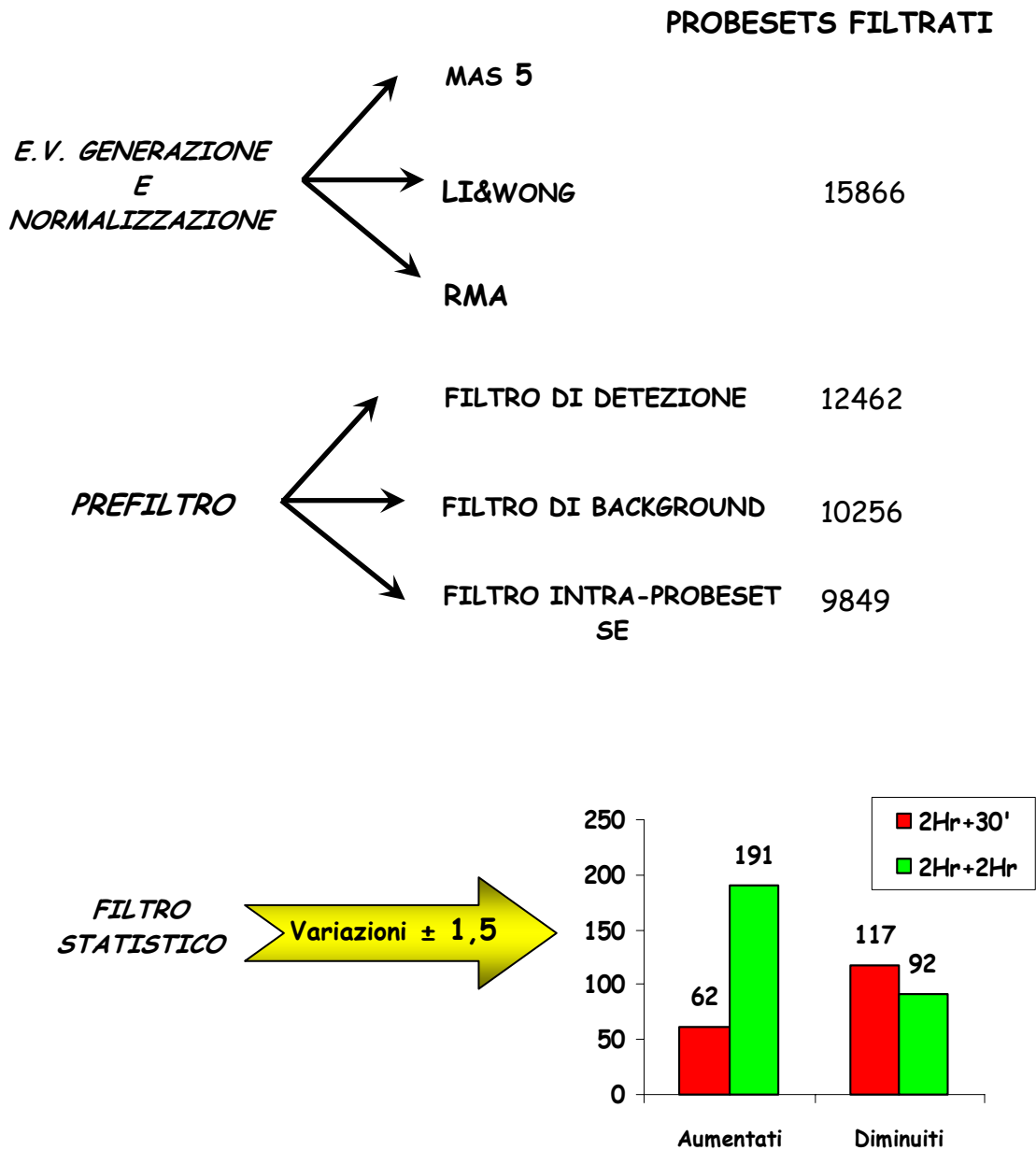


Fig. 14 Analisi dei microarrays mediante filtri statistici.

Tabella 3 Geni trascrizionalmente aumentati a 30' dalla fine della depolarizzazione.

Simbolo	Gene	Variazione
Atf3	Activating transcription factor 3	12,0
Egr2	early growth response 2	10,1
Cyr61	cysteine rich protein 61	7,9
Egr1	Early growth response 1	7,8
Gro1	gro	6,4
Copeb	core promoter element binding protein	6,3
Slc38a2	amino acid transporter system A2	4,5
Zfp36	zinc finger protein 36 /DEF=Rattus norvegicus gene for TIS11, complete cds /FL=gb:NM 133290.1	3,9
Adm	adrenomedullin	3,8
Ptpn16	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 16	3,7
Arc	activity regulated cytoskeletal-associated protein	3,3
Klf5	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	3,2
Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	3,2
Taa1	tumor-associated glycoprotein pE4	3,2
Homer1	homer, neuronal immediate early gene, 1	3,1
Hist4	germinal histone H4 gene	3,0
Jun	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	2,8
Myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	2,7
Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	2,6
Jun	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	2,6
Pafah1b1	platelet-activating factor acetylhydrolase beta subunit (PAF-AH beta)	2,5
Nr4a1	immediate early gene transcription factor NGFI-B	2,5
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	2,3
Lgals3	lectin, galactose binding, soluble 3	2,3
Scg2	Secretogranin II	2,3
Cpg21	MAP-kinase phosphatase (cpg21)	2,3
Cyp51	cytochrome P450, subfamily 51	2,2
Pten	phosphatase and tensin homolog	2,2
Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like	2,2
Trif-pending	Trif gene	2,1
Adamts1	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 (ADAMTS-1)	2,1
Jun	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	2,1
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	2,0
Mesc	peroxisomal Ca-dependent solute carrier-like protein	2,0
Homer1	homer, neuronal immediate early gene, 1	2,0
Myd116	myeloid differentiation primary response gene 116	2,0
Gls	glutaminase	1,9
Hs3st1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	1,9
Cyp51	cytochrome P450, subfamily 51	1,9
Ltbp1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	1,9
Nudel	"LIS1-interacting protein NUDEL; endooligopeptidase A"	1,9
Ptp2E	protein tyrosine phosphatase 2E	1,9
Facl4	fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 4	1,8
Avil	pervin	1,8
Hes1	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	1,8

Simbolo	Gene	Variazione
Id1	Inhibitor of DNA binding 1, helix-loop-helix protein (splice variation)	1,8
LOC207125	unknown protein	1,8
Arl4	ADP-ribosylation-like 4	1,8
Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	1,7
Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	1,7
Ubc7	ubiquitin-conjugating enzyme UBC7	1,7
Nfil3	nuclear factor, interleukin 3, regulated	1,7
Cited2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	1,6
Nfasc	neurofascin	1,6
Dyrk1a	Dual Specificity Yak1-related kinase	1,6
Sgk	serum/glucocorticoid regulated kinase	1,6
Has2	Hyaluronan synthase 2	1,6
Tieg	TGFB inducible early growth response	1,6
Bcaa	retinoblastoma-binding protein 1-related protein	1,5
Hmox1	Heme oxygenase	1,5
Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase)-like	1,5

Tabella 4 Geni trascrizionalmente diminuiti a 30' dalla fine della depolarizzazione

Simbolo	Gene	Variazione
Eif4ebp1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	-1,5
Gfer	growth factor, erv1 -like	-1,5
Asah	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)	-1,5
Siat9	"sialyltransferase 9 (CMP-NeuAc:lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase; GM3 synthase)"	-1,5
Ncdn-pending	neurochondrin	-1,5
Cap2	adenylyl cyclase-associated protein 2	-1,5
Dyt1	"dystonia 1, torsion (autosomal dominant; torsin A)"	-1,5
Cytor4	similar to cytokine receptor related protein 4	-1,5
Cirl2	calcium-independent alpha-latrotoxin receptor homolog 2	-1,5
Gsr	glutathione reductase	-1,5
Top2a	topoisomerase (DNA) 2 alpha	-1,5
Nrp	neuropilin	-1,5
Amph1	amphiphysin	-1,5
Ccnh	cyclin H	-1,5
Slc5a6	solute carrier family 5, member 6	-1,5
Pik3r2	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2	-1,5
Lrp2	low density lipoprotein receptor-related protein 2	-1,5
Cat	Catalase	-1,5
Usf2	transcription factor USF2	-1,5
B4galt6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	-1,5
Tefubf	Transcription factor UBF	-1,5
Abcb6	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	-1,5
Bok	Bcl-2-related ovarian killer protein	-1,5
Cirbp	cold inducible RNA-binding protein	-1,5
Ipmk	inositol polyphosphate multikinase	-1,5
Masp1	mannose-binding protein associated serine protease-1	-1,5
Fbn2	fibrillin-2	-1,5
Copb2	beta prime COP	-1,5
Nfib	nuclear factor I/B	-1,5
Acaa1	acetyl-CoA acyltransferase, 3-oxo acyl-CoA thiolase A	-1,5
Fibp	fibroblast growth factor (acidic) intracellular binding protein	-1,5
LOC246185	embryo-related protein	-1,5
Arrb2	Arrestin, beta 2	-1,6
Rab11b	RAB11B, member RAS oncogene family	-1,6
LOC170927	Mid-1-related chloride channel 1	-1,6
Mxi1	max interacting protein 1	-1,6
G6pt1	glucose-6-phosphatase, transport protein 1	-1,6
Pold1	DNA polymerase delta, catalytic subunit	-1,6
Pex3	peroxisomal biogenesis factor 3	-1,6
	sequence-specific single-stranded-DNA-binding protein	-1,6
Slc12a4	solute carrier family 12, member 4	-1,6
Tk1	ESTs, Highly similar to A39968 thymidine kinase (EC 2.7.1.21) - rat (fragment) [R.norvegicus]	-1,6
Nfia	nuclear factor I/A	-1,6
Mbtps1	membrane-bound transcription factor protease, site 1	-1,6
Rfc2	replication factor C (activator 1) 2 (40kD)	-1,6

Simbolo	Gene	Variazione
LOC54190	rabaptin 5	-1,6
Ptk2	Protein tyrosine kinase	-1,6
Col18a1	collagen, type XVIII, alpha 1	-1,6
Becn1	beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein)	-1,6
Pkcl	protein kinase C, lambda	-1,6
Fen1	Flap structure-specific endonuclease 1	-1,6
Sepp1	selenoprotein P, plasma, 1	-1,6
Sfmbt	Scm-related gene containing four mbt domains	-1,6
Mapk8ip	mitogen activated protein kinase 8 interacting protein	-1,6
Ap3m1	adaptor-related protein complex AP-3, mu 1 subunit	-1,6
Prep	prolyl endopeptidase	-1,6
Mapk8ip	mitogen activated protein kinase 8 interacting protein	-1,6
	ESTs, Highly similar to KRP2_RAT KINESIN-RELATED PROTEIN 2 [R.norvegicus]	-1,6
Ap3m1	adaptor-related protein complex AP-3, mu 1 subunit	-1,6
Serpinb5	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 5	-1,6
Nfib	nuclear factor I/B	-1,6
LOC286990	epidermal Langerhans cell protein LCP1	-1,6
Gsta1	glutathione S-transferase, alpha 1	-1,6
Timm9	translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog (yeast)	-1,6
p58/p45	nucleoporin p58	-1,6
Chek1	checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)	-1,6
Tsc2	Tuberous sclerosis 2, (renal carcinoma)	-1,6
Ip63	IP63 protein	-1,6
Ufd1l	ubiquitin fusion degradation 1-like	-1,6
Egln1	ESTs, Weakly similar to A53770 growth factor-responsive protein, vascular smooth muscle - rat [R.norvegicus]	-1,6
Cacnb3	Calcium channel subunit beta 3	-1,6
Ptgfrn	prostaglandin F2 receptor negative regulator	-1,6
Znf22	zinc finger protein 22 (KOX 15)	-1,6
Pc	Pyruvate carboxylase	-1,6
Trim9	tripartite motif protein 9	-1,6
Slc20a1	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	-1,6
Nfix	nuclear factor I/X	-1,6
Bet1	blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)	-1,6
Sep15-pending	15-kDa selenoprotein	-1,6
Adcy6	adenylyl cyclase 6	-1,6
	Heat shock cognate protein 70	-1,6
Cyrl	cytokine receptor-like protein CYRL	-1,6
SLP-a	E-septin	-1,6
Sod3	Superoxide dismutase 3	-1,6
RA410	vesicle transport-related	-1,6
Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1	-1,6
Faim	Fas apoptotic inhibitory molecule	-1,6
Rab9	RAB9, member RAS oncogene family	-1,6
Maged1	melanoma antigen, family D, 1	-1,6
AF045564	development-related protein	-1,6
GRASP65	golgi peripheral membrane protein p65	-1,6
Col2a1	procollagen, type II, alpha 1	-1,6
Smoh	Smoothened	-1,6
Gpr37	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	-1,6

Simbolo	Gene	Variazione
Kcnb1	Potassium voltage gated channel, Shab-related subfamily, member 1	-1,6
Tsnax	translin-associated factor X	-1,6
	protein kinase inhibitor, alpha	-1,6
Mog	Myelin oligodendrocyte glycoprotein	-1,6
Prelp	proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein	-1,6
LOC286990	epidermal Langerhans cell protein LCP1	-1,6
Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	-1,6
Cbr1	carbonyl reductase 1	-1,6
Gprk6	G protein-coupled receptor kinase 6	-1,6
Tcea2	transcription elongation factor A2	-1,6
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2	-1,6
P65	p65 protein	-1,6
Secp43	tRNA selenocysteine associated protein	-1,6
Glr1	glutaredoxin 1 (thioltransferase)	-1,6
Ppap2a	phosphatidate phosphohydrolase type 2a	-1,6
Nelf	nasal embryonic LHRH factor	-1,6
Stk3	serine/threonine kinase 3	-1,6
Map4k3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3	-1,6
Suclg1	succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit	-1,6
Ragb	GTP-binding protein ragB	-1,6
Sdc3	syndecan 3	-1,6
Olfm1	olfactomedin related ER localized protein	-1,7
Vsp54	Vps54-like	-1,7
Evt1	evectin-1	-1,7
Igf2	Insulin-like growth factor II (somatomedin A)	-1,7
CIZ	Cas-associated zinc finger protein	-1,7
Spag5	sperm associated antigen 5	-1,7
Pecr	peroxisomal 2-enoyl-CoA reductase	-1,7
Urod	uroporphyrinogen decarboxylase	-1,7
Txn2	thioredoxin 2	-1,7
APPILS	leucyl-specific aminopeptidase PILS	-1,7
Lypla2	lysophospholipase II	-1,7
Synj1	synaptojanin 1	-1,7
rKr1	Cys2/His2 zinc finger protein (rKr1)	-1,7
Ratireb	iron-responsive element-binding protein	-1,7
Jup	junction plakoglobin	-1,7
Ralgds	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	-1,7
	ribosomal protein, mitochondrial, L2	-1,7
Lkap	limkain b1	-1,7
Stx4a	syntaxin 4	-1,7
Nrcam	Neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule	-1,7
Bnip1	BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 1	-1,7
Dgkz	diacylglycerol kinase zeta	-1,7
Arl2	ADP-ribosylation-like 2	-1,7
Atp2c1	ATPase, Ca ⁺⁺ -sequestering	-1,7
Arfrp1	ADP-ribosylation factor related protein 1	-1,7
AF348365	thyroid hormone-response protein-1	-1,7
LOC246215	voltage-gated Ca channel	-1,7
Cnp1	2',3'- Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	-1,7
Col12a1	procollagen, type XII, alpha 1	-1,7
Dcps	mRNA decapping enzyme	-1,7

Simbolo	Gene	Variazione
Ivd	Isovaleryl Coenzyme A dehydrogenase	-1,7
	axin 2	-1,7
Msn	moesin	-1,7
Eno2	enolase 2, gamma	-1,7
Timm22	translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	-1,7
	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	-1,7
Srm	spermidine synthase	-1,7
Epn2	EH domain binding protein epsin 2	-1,7
Nsf	N-ethylmaleimide sensitive factor	-1,7
Npr2	natriuretic peptide receptor 2	-1,7
Hspb1	Heat shock 27 kDa protein	-1,7
Ptpd	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	-1,7
Akr7a2	aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)	-1,7

Tabella 5 Geni trascrizionalmente aumentati a 120' dalla fine della depolarizzazione

Simbolo	Gene	Variazione
Egr2	early growth response 2	7,1
LOC286921	aldose reductase-like protein	5,6
Egr1	Early growth response 1	5,4
Atf3	Activating transcription factor 3	5,1
Homer1	homer, neuronal immediate early gene, 1	5,1
Lgals3	lectin, galactose binding, soluble 3	4,7
H1f4	H1 histone family, member 4	4,5
Vgf	VGF nerve growth factor inducible	4,3
Tdag	T-cell death associated gene	4,2
Pai1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, member 1	3,9
Dusp6	dual specificity phosphatase 6	3,8
Ctgf	connective tissue growth factor	3,7
Areg	amphiregulin	3,6
Hmox1	Heme oxygenase	3,6
Tage4	tumor-associated glycoprotein pE4	3,6
Adamts1	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 (ADAMTS-1)	3,4
Runx1	Runt related transcription factor 1	3,2
Fosl1	Fos-like antigen 1	3,2
Dtr	Diphtheria toxin receptor (heparin binding epidermal growth factor - like growth factor)	3,1
H1f0	Histone H1-0	3,1
Tieg	TGFB inducible early growth response	3,0
Bhlhb2	basic helix-loop-helix domain containing, class B2	2,9
Cebpd	CCAAT/enhancerbinding, protein (C/EBP) delta	2,8
Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	2,7
Myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	2,7
Cav	Caveolin, caveolae protein, 22 kDa	2,6
Calca	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	2,6
Mgp	matrix Gla protein	2,6
Hist4	germinal histone H4 gene	2,6
Lmna	lamin A	2,5
Nptx1	neuronal pentraxin 1	2,5
Pten	phosphatase and tensin homolog	2,5
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	2,5
Gro1	gro	2,4
Fhl2	four and a half LIM domains 2	2,4
Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	2,3
Copeb	core promoter element binding protein	2,3
Sdc4	syndecan 4	2,3
Rgc32	Rgc32 protein	2,3
Npm1	nucleophosmin 1	2,3
Cpg21	MAP-kinase phosphatase (cpg21)	2,3
Rem2	Ras-related GTP-binding protein of the Rad/Gem/Kir family, member 2	2,3
Ltbp1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	2,3
Emp1	Epithelial membrane protein 1	2,2
Smhs1	Smhs1 protein	2,2
Adm	adrenomedullin	2,2

Simbolo	Gene	Variazione
Rgs4	regulator of G-protein signaling 4	2,1
Fhl2	four and a half LIM domains 2	2,1
Hspa1a	heat shock 70kD protein 1A	2,1
Cxcl10	small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 10	2,1
Klf9	Kruppel-like factor 9	2,1
Actn1	actinin, alpha 1	2,0
Scg2	Secretogranin II	2,0
Nog	Noggin	2,0
Cebpg	CCAAT/enhancer binding protein ,gamma	2,0
Junb	jun B proto-oncogene	2,0
Cyp51	cytochrome P450, subfamily 51	2,0
Prph	Peripherin	1,9
Lmna	lamin A	1,9
Pawr	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	1,9
S100a10	S-100 related protein, clone 42C	1,9
Tnfrsf6	tumor necrosis factor induced protein 6	1,9
Bmp2	bone morphogenetic protein 2	1,9
Slc39a1	solute carrier family 39 (iron-regulated transporter), member 1	1,9
Mcl1	myeloid cell leukemia sequence 1	1,9
Nr4a1	immediate early gene transcription factor NGFI-B	1,9
Jub	Ajuba protein	1,8
S100a6	calcium binding protein A6 (calyculin)	1,8
Rgs4	regulator of G-protein signaling 4	1,8
Bdnf	Brain derived neurothrophic factor	1,8
Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	1,8
Slc7a1	Solute carrier family 7 member A1 (amino acid transporter cationic 1)	1,8
Nid67	putative small membrane protein NID67	1,8
Gpr105	G protein-coupled receptor 105	1,8
Id1	Inhibitor of DNA binding 1, helix-loop-helix protein (splice variation)	1,8
Tpbp	trophoblast glycoprotein	1,8
Ube2d3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (homologous to yeast UBC4/5)	1,8
Homer1	homer, neuronal immediate early gene, 1	1,7
Rgs2	regulator of G-protein signaling protein 2	1,7
Arc	activity regulated cytoskeletal-associated protein	1,7
Gp38	glycoprotein 38	1,7
Cyp51	cytochrome P450, subfamily 51	1,7
Anx3	Annexin III (Lipocortin III)	1,7
Trif-pending	Trif gene	1,7
Me1	malic enzyme 1	1,7
Stk17b	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	1,7
Lnk	linker of T-cell receptor pathways	1,7
Ube2d2	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	1,6
Btg3	B-cell translocation gene 3	1,6
Glc3c	Glutamylcysteine gamma synthetase light chain	1,6
Vldlr	Very low density lipoprotein receptor	1,6
Slc31a1	solute carrier family 31 (copper transporters), member 1	1,6
Cd44	CD44 antigen	1,6
Myd116	myeloid differentiation primary response gene 116	1,6
Col5a3	collagen, type V, alpha 3	1,6
Slc30a1	solute carrier family 30, member 1	1,6
LOC266687	putative phosphate-phosphoenolpyruvate translocator	1,6

Simbolo	Gene	Variazione
Dio3	deiodinase, iodothyronine, type 3	1,6
Arhb	rhoB gene	1,6
Has2	Hyaluronan synthase 2	1,6
Vti1- pending	SNARE Vti1a-beta protein	1,6
LOC207125	unknown protein	1,6
Tacr1	Tachykinin 1 receptor	1,6
Gsta1	glutathione S-transferase, alpha 1	1,5
Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	1,5
Penk-rs	preproenkephalin, related sequence	1,5
Zpk	Zipper (leucine) protein kinase	1,5
Rgs2	regulator of G-protein signaling protein 2	1,5
Pou3f1	POU domain, class 3, transcription factor 1	1,5
Prkar1a	Protein kinase, cAMP dependent, regulatory, type 1	1,5
Anxa1	annexin A1	1,5
Rara	Retinoic acid receptor, alpha	1,5
Anxa7	annexin A7	1,5

Tabella 6 Geni trascrizionalmente diminuiti a 120' dalla fine della depolarizzazione.

Simbolo	Gene	Variazione
LOC245925	CTD-binding SR-like protein rA9	-1,5
Syn2	synapsin 2	-1,5
Atp1a2	ATPase, Na+K+ transporting, alpha 2	-1,5
LOC65984	acetoacetyl-CoA synthetase	-1,5
Faf1	Fas-associated factor 1	-1,5
Loc65042	tricarboxylate carrier-like protein	-1,5
G10	maternal G10 transcript	-1,5
Grik2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2	-1,5
Suox	sulfite oxidase	-1,5
Cox17	cytochrome c oxidase, subunit XVII assembly protein homolog (yeast)	-1,5
LOC192253	myosin heavy chain Myr 8	-1,5
Clcn7	chloride channel 7	-1,5
StaaP	stellate cell activation associated protein	-1,5
Pmpcb	mitochondrial processing peptidase beta	-1,5
Mtmr9	myotubularin related protein 9	-1,5
LOC171057	dopamine responsive protein	-1,5
HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-1,6
Cdx2	caudal type homeo box 2	-1,6
Gucy1b3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	-1,6
Sdf1	Stromal cell-derived factor 1	-1,6
Mllt3	" ""myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax (Drosophila) homolog); translocated to, 3"""	-1,6
Cca2	CCA2 protein	-1,6
Scamp3	secretory carrier membrane protein 3	-1,6
Prpsap2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2	-1,6
Znf354c	zinc finger protein 354C	-1,6
Pxmp3	peroxisomal membrane protein 3	-1,6
Abcd3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	-1,6
Synj1	synaptojanin 1	-1,6
Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	-1,6
Camk1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I	-1,6
Uae1	UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase	-1,6
Gabbr1	gamma-aminobutyric acid receptor, subunit beta 1	-1,6
Spnb3	beta-spectrin 3	-1,6
LOC56764	dnaj-like protein	-1,6
Cspg5	chondroitin sulfate proteoglycan 5	-1,6
CYP4F4	cytochrome P450 4F4	-1,6
Nfia	nuclear factor I/A	-1,6
Pdgfrb	Platelet-derived growth factor receptor, beta	-1,6
Kcnn2	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2	-1,6
Hsp27	Heat shock 27 kDa protein	-1,6
Tagln3	transgelin 3	-1,6
Mapk9	stress activated protein kinase alpha II	-1,6
EF-G	G elongation factor	-1,6
Nsf	N-ethylmaleimide sensitive factor	-1,6
Hdgfrp3	hepatoma-derived growth factor, related protein 3	-1,6

Simbolo	Gene	Variazione
Dpp3	dipeptidylpeptidase III	-1,6
Bckdha	Branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase subunit E1 alpha	-1,6
Fdx1	ferredoxin 1	-1,6
Stk6	serine/threonine kinase 6	-1,6
Secp43	tRNA selenocysteine associated protein	-1,6
GRASP65	golgi peripheral membrane protein p65	-1,6
Hsc70	Heat shock cognate protein 70	-1,6
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	-1,6
Pold1	DNA polymerase delta, catalytic subunit	-1,6
Mmp16	matrix metalloproteinase 16	-1,6
Homer1	homer, neuronal immediate early gene, 1	-1,6
Hpcl2	2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase	-1,6
Mras	Muscle and microspikes RAS	-1,6
Frap1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	-1,6
Sp17	sperm autoantigenic protein 17	-1,6
Fabp3	fatty acid binding protein 3	-1,7
Timeless	timeless (Drosophila) homolog	-1,7
Uggt	UDP-glucose glycoprotein: glucosyltransferase UGGT	-1,7
Hagh	Hydroxyacyl glutathione hydrolase	-1,7
Pcd8	programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)	-1,7
Cetn3	centrin, EF-hand protein, 3 (CDC31 homolog, yeast)	-1,7
Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	-1,7
Ap3m1	adaptor-related protein complex AP-3, mu 1 subunit	-1,7
Stau2	staufer, RNA binding protein, homolog 2 (Drosophila)	-1,7
Parg	poly(ADP-ribose) glycohydrolase	-1,7
LOC171116	RN protein	-1,7
Accn1	amiloride-sensitive cation channel 1	-1,7
LOC60383	protein kinase C-binding protein Beta15	-1,7
Sv2b	synaptic vesicle glycoprotein 2 b	-1,7
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1	-1,7
Idax	inhibitor of the Dvl and Axin complex	-1,7
Epb4.113	erythrocyte protein band 4.1-like 3	-1,7
Gtf2f2	general transcription factor IIF, polypeptide 2 (30kD subunit)	-1,7
Slc6a13	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13	-1,7
Znf179	zinc finger protein 179	-1,7
Slb	selective LIM binding factor, rat homolog	-1,7
Mcmd6	mini chromosome maintenance deficient 6 (S. cerevisiae)	-1,7
Slc24a3	solute carrier family 24, member 3	-1,7
Nsf	N-ethylmaleimide sensitive factor	-1,7
Pius	PiUS protein	-1,7
Mrpl17	mitochondrial ribosomal protein L17	-1,7
W307	W307 protein	-1,7
Nup107	nuclear pore complex protein	-1,7
P65	p65 protein	-1,7

3.3.1. Raggruppamento dei trascritti filtrati dall'analisi dei dati ottenuti dalla scansione dei "microarrays".

I geni trascrizionalmente variati sono stati raggruppati in famiglie funzionali mediante l'archivio dati del consorzio Geneontology che suddivide tutti i geni annotati del genoma del ratto in famiglie funzionali (Blake et Harris, 2003; The Gene Ontology Consortium, 2000). I geni sono stati raggruppati: per la funzione molecolare svolta dal gene, per il processo biologico in cui è coinvolto il gene e per la componente cellulare in cui è localizzata la proteina tradotta dal gene. Nell'esperimento effettuato i geni sono stati raggruppati per la loro funzione molecolare e per il processo biologico in cui sono coinvolti. La differenza tra funzione molecolare e processo biologico risiede nel fatto che la funzione molecolare è una sola mentre un processo biologico è spesso costituito da più passaggi distinti ed è quindi una definizione più generica.

Bisogna sottolineare che un prodotto genico ha una o più funzioni molecolari ed è utilizzato in uno o più processi biologici e può essere associato a uno o più componenti cellulari. Quindi, uno stesso gene può comparire in più famiglie, all'interno della stessa tipologia di catalogazione.

Essendo numerose le famiglie funzionali ottenute in seguito al raggruppamento dei geni, per comprendere quali di questi gruppi genici fosse più verosimilmente coinvolto nella cascata d'attivazione genica causata dalla depolarizzazione, è stato effettuato un test statistico di Fisher (Hosack et al., 2003). In questo modo, sono state considerate significativamente variate solo le famiglie geniche che annoverano un numero relativo minimo di geni variati nei "microarrays" (tabelle 7, 8).

Tabella 7 Geni raggruppati in famiglie in base alla loro funzione molecolare, a= p< 0.01; b =p < 0.05

Aumentati dopo 30' dalla fine della depolarizzazione

Famiglia funzionale di geni codificanti per proteine:	Geni variati nei microarrays	Geni totali catalogati nella famiglia funzionale
Leganti DNA	16a	338
Leganti acidi nucleici	16a	444
Con attività di regolazione trascrizionale	11a	235
Con attività tirosin-fosfatase	4b	28
Con attività di fattori di trascrizione	8b	183
Con attività fosfatase	4b	48
Con attività MAP-chinasi fosfatase	2b	3
Con attività tirosin/serin/treonin fosfatase	2b	4

Diminuiti dopo 30' dalla fine della depolarizzazione

Famiglia funzionale di geni codificanti per proteine:	Geni variati nei microarrays	Geni totali catalogati nella famiglia funzionale
Con attività di trasportatori	9a	72
Con attività catalitica	52b	1248
Con attività di GTPasi monomeriche	5b	42

Tabella 8 Geni raggruppati in famiglie in base al processo biologico, ^a= p< 0.01; ^b=p < 0.05

Aumentati dopo 30' dalla fine della depolarizzazione

Famiglia funzionale di geni codificanti per proteine coinvolte:	Geni variati nei microarrays	Geni totali catalogati nella famiglia funzionale
Nella trascrizione	15a	353
Nello sviluppo	13a	406
Nella biosintesi degli steroli	5a	17
Nella defosforilazione degli amminoacidi	4b	37
Trasporto assonale retrogrado	2b	2
Nel metabolismo dei lipidi	7b	204

Diminuiti dopo 30' dalla fine della depolarizzazione

Famiglia funzionale di geni codificanti per proteine coinvolte:	Geni variati nei microarrays	Geni totali catalogati nella famiglia funzionale
Nella replicazione del DNA	5a	17
Nell'endocitosi	5a	40
Nella trasduzione del segnale mediata da GTPasi	6a	76
Nel metabolismo dei monosaccaridi	5b	56
Nella derivazione dell'energia dall'ossidazione di composti organici	5b	60
Nella trascrizione	16b	353
Nel trasporto mediato da vescicole	7b	114
Nel metabolismo del glucosio	4b	43
Nel metabolismo dei carboidrati	4b	43
Nel ciclo cellulare	9b	179
Nel metabolismo energetico	5b	78

3.3.2. Organizzazione gerarchica dei fattori di trascrizione attivati.

Parallelamente al raggruppamento in famiglie funzionali è stata condotta l'analisi delle possibili interazioni gerarchiche e temporali dei geni, che presentano variazioni d'espressione in seguito allo stimolo depolarizzante. A tale scopo, è stata utilizzata la tecnica bioinformatica detta analisi di reti geniche ("gene network").

L'analisi iniziale si è basata sulle possibili interazioni tra i geni che codificano per fattori di trascrizione, i cui trascritti mostrano livelli variati (in positivo o negativo) in seguito a depolarizzazione. Il successivo livello di analisi è stato effettuato su i possibili geni effettori, che possono svolgere una funzione d'interesse nello sviluppo e nel differenziamento dei neuroni, oppure su geni, che anche in altri sistemi sperimentali, da dati di letteratura, risultano essere responsivi allo stimolo depolarizzante. L'analisi riportata di seguito si riferisce unicamente ai geni, la cui espressione risulta aumentata.

La metodologia attraverso la quale è possibile individuare potenziali interazioni tra i fattori di trascrizione ed i loro geni bersaglio, è quella di individuare le sequenze *consensus* di legame per i fattori di trascrizione presenti nelle sequenze promotrici. Si può ipotizzare che l'espressione di un gene è regolata da uno o più fattori se nel suo promotore si trovano motivi di legame specifici per quel fattore; e inoltre è ipotizzabile che due o più geni siano coregolati se presentano sequenze *consensus* per gli stessi fattori di trascrizione.

Attualmente sono disponibili le banche dati delle sequenze promotrici e banche dati per le sequenze di legame per i fattori di trascrizione. Quelle da noi utilizzate in questa analisi sono la banca delle regioni promotrici di Genomatix (Sherf et al., 2000) e la matrice di TFBS (Transcription Factor Binding Sites) di Transfac (Wingender et al., 2000).

I dati di previsione computazionale sono stati corroborati ed ulteriormente integrati da dati presenti in letteratura. Lo schema generato tramite la strategia descritta (fig. 15) mostra l'ipotetica cascata d'attivazione genica indotta dalla depolarizzazione.

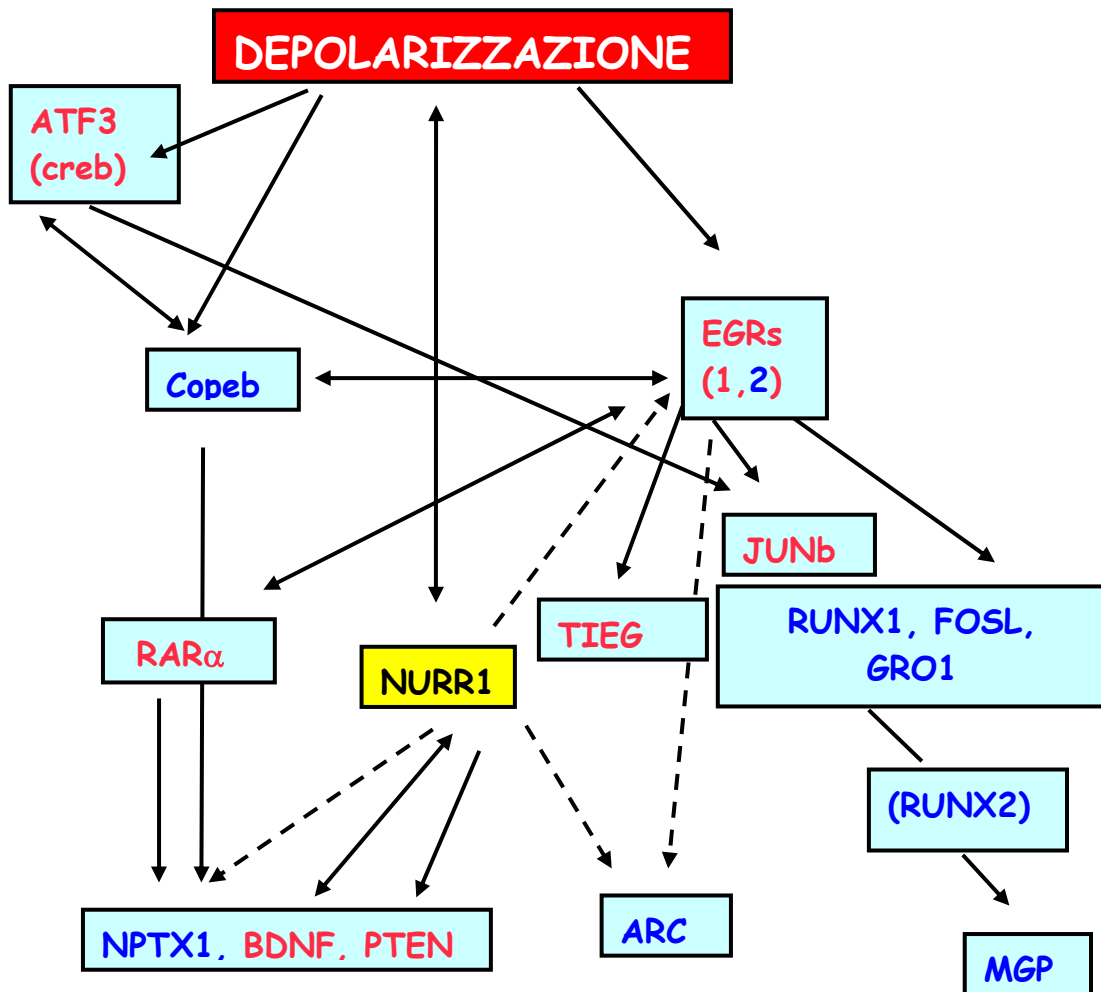


Fig. 15 Schema ipotetico della cascata di attivazione genica indotta dalla depolarizzazione.

I geni da cui partono le frecce codificano per proteine con sequenze che possono legare i promotori dei geni raggiunti dalla freccia. I geni da cui non parte alcuna freccia sono possibili bersagli. Le linee intere indicano che le interazioni predette sono statisticamente significative con $*p \leq 0,01$; le linee tratteggiate indicano che le interazioni predette sono statisticamente significative con $*p \leq 0,05$. In rosso sono mostrati i geni validati mediante RT-PCR.

3.4. Validazione delle analisi bioinformatiche mediante RT-PCR.

Data l'importanza dei fattori di attivazione trascrizionale in un qualunque processo biologico, è stato deciso di focalizzare l'attenzione su quei geni i cui prodotti sono possibili interattori diretti di Nurr1, come *Egr1* (Early Growth Response 1, anche chiamato *Zenk*, *Tis8*, *Zif/268*, *NGFI-A* or *Krox24*), *Atf3* (Activating Transcription Factor 3), *JunB*, *RAR α* (Retinoic Acid Receptor Alpha), *Pten* (Phosphatase and tensin homolog) e *Bdnf*.

I geni per i quali è stata effettuata questa validazione sono i seguenti:

1) *Atf3* ed *Egr1* che nello schema dei fattori di trascrizione si trovano a monte della cascata d'attivazione genica. Entrambi questi geni sono "immediate early genes" e risultano essere attivati da una vasta gamma di stimoli extracellulari (Hai et Hartman, 2001; Quirin-Stricker et al., 1997)

2) *Junb* e *RAR α* , che nello stesso schema si trovano ad essere sia a monte che a valle di altri geni. *Junb* è anch'esso un gene attivato precocemente in seguito a vari tipi di stimoli intra ed extra-cellulari (Herdegen et Leah, 1998); *RAR α* è il recettore dell'acido retinoico, il cui ruolo nello sviluppo del CNS è ben noto (Eichele, 1997). *RAR α* appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione attivati da ligandi, ed è conosciuto in particolar modo per il suo ruolo nella leucemia promielocitica acuta (Chen et Chen, 1992).

3) *Pten* e *Bdnf*, che nello schema in fig. 15 sono rappresentati come geni attivati da *Copeb* (Core Promoter Element-Binding Protein), *RAR α* e *Nurr1*. *Pten* è un gene coinvolto nel differenziamento neuronale (Lachyankar et al., 2000), che defosforila il D3 fosfato di PI(3,4,5)P₃ affinché diventi PI3-K. *Bdnf* è un fattore neurotrofico importante per la sopravvivenza neuronale (Dechant et al., 2002; Baker et al., 2005). Per ogni gene discusso, sono state valutate le variazioni trascrizionali, rispetto ai controlli non trattati, sia nei "microarrays" che nelle RT-PCR o Real time PCR. Negli stessi campioni utilizzati per i microarrays i risultati sono stati validati in campioni indipendenti, sempre almeno in triplicato. Tutte le variazioni citate sono statisticamente significative.

I primi geni su i quali ho soffermato la mia attenzione sono stati *ATF3* e *Egr1*. Come mostrato in fig. 16a, l'mRNA di *Egr1* e *ATF3* mostra, rispettivamente, un aumento significativo dopo 1h e 2h di depolarizzazione e successivamente decresce. L'attivazione precoce di *Egr1* e di *Atf3* in seguito alla depolarizzazione, che precede

o è contemporanea a quella di *Nurr1*, suggerisce che questi fattori di trascrizione potrebbero avere un ruolo nello sviluppo embrionale dei neuroni mesDA. Per verificare se i cambiamenti osservati in questi trascritti fossero temporalmente correlati all'espressione di *Nurr1*, ho saggiato *in vivo*, mediante RT-PCR semiquantitativa, i livelli di espressione di questi due geni nel mes, a vari stadi dello sviluppo embrionale e postnatale.

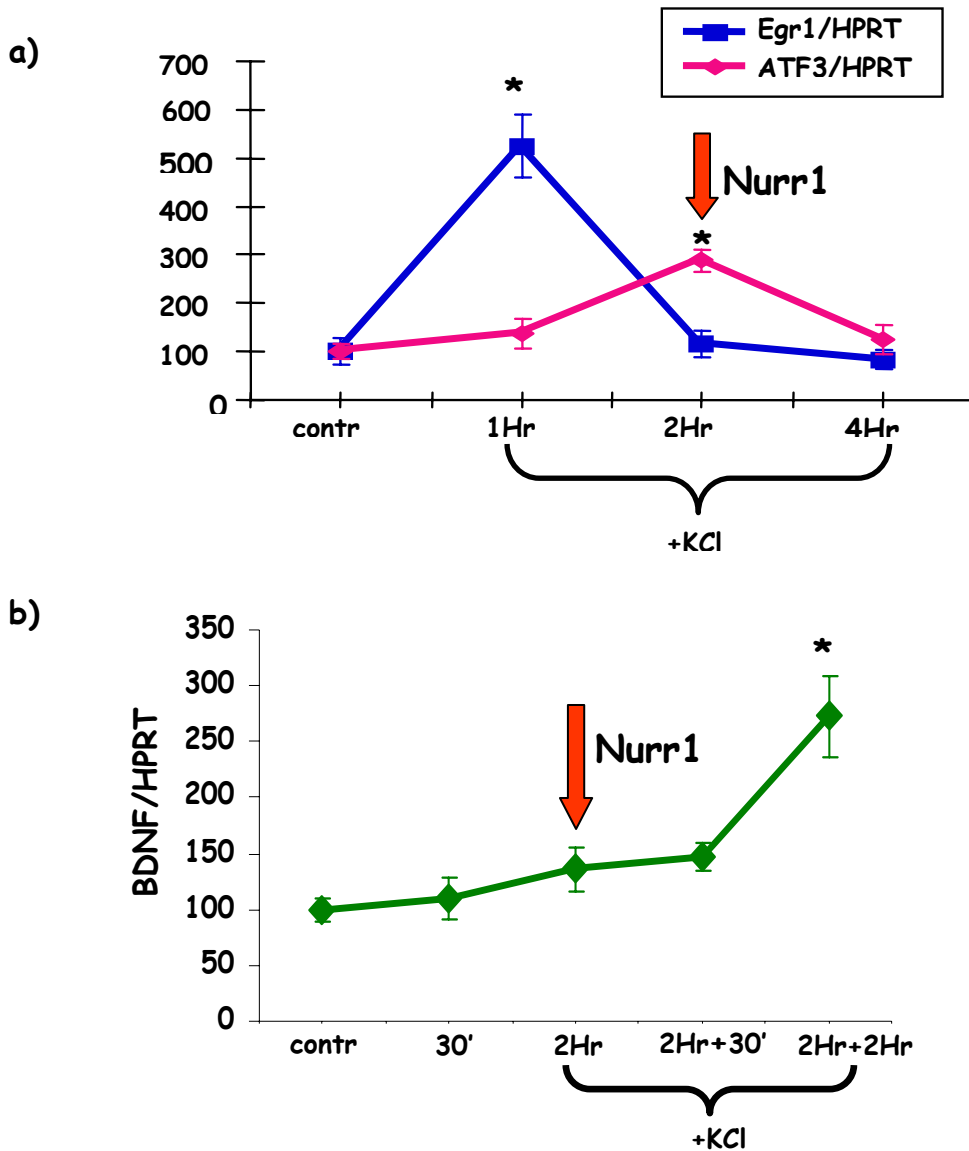


Fig. 16 Espressione dei geni *EGR1*, *BDNF* e *ATF3* in colture meDA espanse depolarizzate.

I diagrammi mostrano le quantizzazioni relative (media \pm ES) dei prodotti amplificati dei geni *Egr1*, *Atf3* e *Bdnf*, comparati all'*HPRT*. I dati sono espressi come rapporto *Egr1/HPRT*, *Atf3/HPRT*, *Bdnf/HPRT* in colture di neuroni mesDA a 9 DIV: controllo; colture trattate per 30', 2h con K^+ (56 mM), per 2h con K^+ (56 mM) e 30' in mezzo non depolarizzante, per 2h con K^+ (56 mM) e 2h in mezzo non depolarizzante.

L'mRNA di *Atf3* è evidenziabile a E11, e mostra un significativo aumento ad E12. In seguito l'mRNA di *Atf3* rapidamente e significativamente decresce rispetto a quello osservato negli stadi precoci dello sviluppo e resta costante fino all'adulto (fig. 17b). L'mRNA di *Egr1* è rilevabile ad E11, mostra un significativo aumento ad E12; tra E13 e E19 decresce rapidamente e in modo significativo, successivamente aumenta di nuovo sia durante lo sviluppo postnatale e nella vita adulta (fig. 17a).

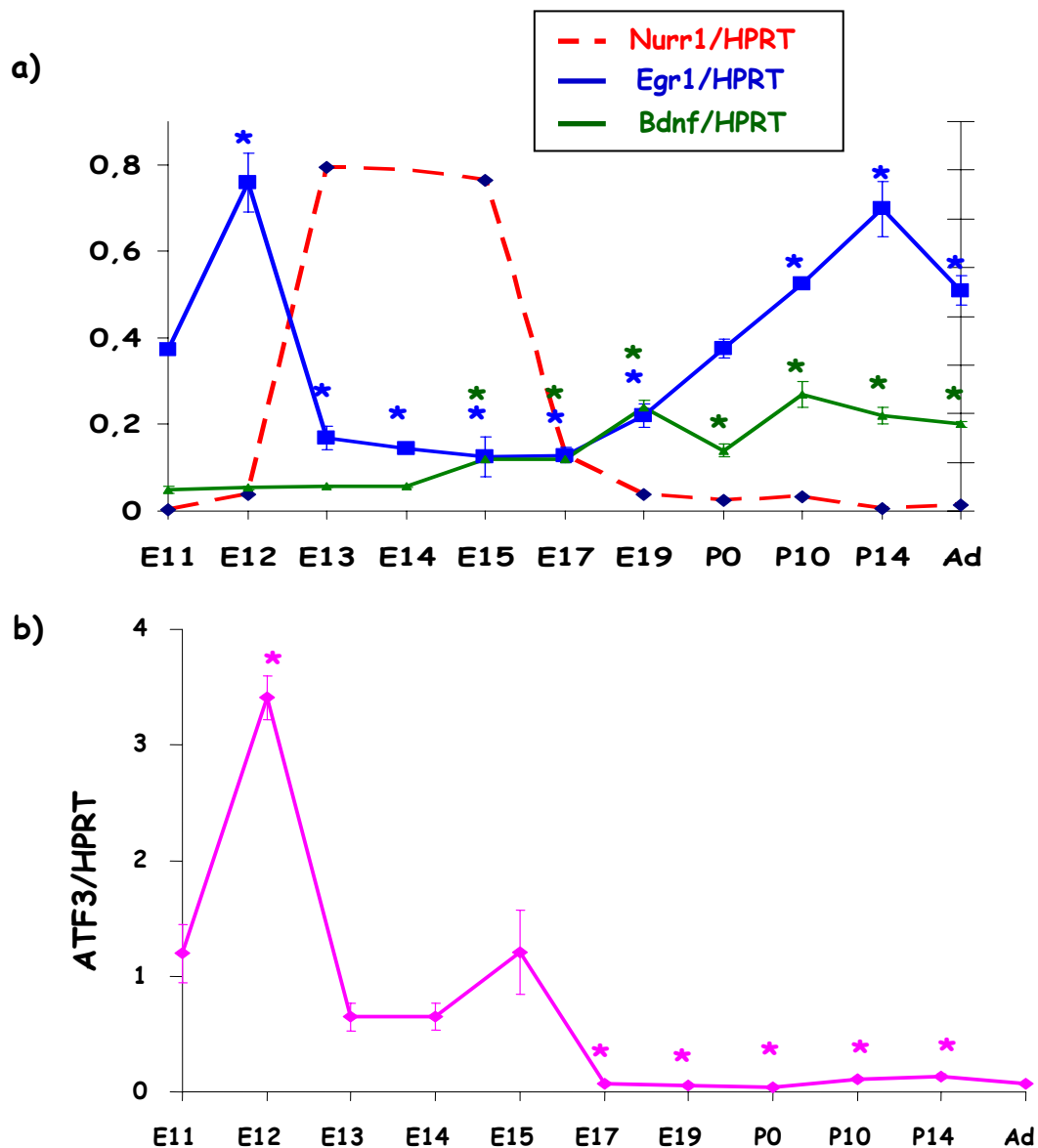


Fig. 17 Livelli di espressione dei geni *Egr1*, *Atf3* e *Bdnf* nel mesencefalo di ratto, durante l'ontogenesi.

I pannelli mostrano i livelli di espressione dei relativi mRNA, valutati mediante RT-PCR e normalizzati rispetto all'*HPRT*. I dati sono espressi come rapporto *Egr1/HPRT*, *Bdnf/HPRT* (a) e *Atf3/HPRT* (b) a diversi stadi embrionali (E), postnatali (P) e adulto (Ad). In rosso è mostrato il profilo di espressione di *Nurr1*.

Gli asterischi mostrano le differenze statisticamente significative (* $p \leq 0.01$) rispetto al valore di E11.

Successivamente abbiamo soffermato l'attenzione su *Bdnf*, che in seguito a 2h+2h di depolarizzazione è aumentata da 1,5 a 2,5 volte e il cui prodotto genico è implicato nello sviluppo e nella sopravvivenza dei neuroni nigrostriatali (Baker et al., 2005). La banca dati dei fattori di trascrizione mostra che il promotore di *Bdnf* può interagire con *Nurr1*, cioè ha una sequenza di consenso per il legame a Nurr1. Nelle colture *espansse*, l'mRNA di *Bdnf* mostra un aumento di 2 volte, rispetto al controllo, 2h dopo la fine della depolarizzazione (fig. 16b). Durante lo sviluppo, l'mRNA di *Bdnf* è rilevabile ad E11, mostra un notevole aumento ad E15 e resta costante durante lo sviluppo embrionale e postnatale, fino alla vita adulta (fig. 17a).

3.5. Trasduzione del segnale.

Per comprendere i meccanismi molecolari che legano la depolarizzazione della membrana con l'espressione genica di *Nurr1*, in primo luogo ho preso in considerazione il possibile coinvolgimento dei canali calcio voltaggio-dipendenti di tipo L e N, i quali mediano l'espressione genica neuronale attività-specifica, attraverso l'innalzamento dei livelli di calcio intracellulare (Finkbeiner et al., 1998). La nimodipina e l' ω -conotossina, inibitori dei canali calcio di tipo N e L, non sono in grado di bloccare l'induzione dell'mRNA di *Nurr1* in seguito a depolarizzazione con alto K^+ . In secondo luogo, ho analizzato il coinvolgimento del calcio nel mediare l'espressione genica di *Nurr1*. A tale scopo, ho effettuato gli esperimenti di depolarizzazione in presenza di EGTA, per chelare il calcio extracellulare e in presenza di tapsigargina, che depleta i depositi di calcio intracellulare. Come mostrato in fig. 13 entrambi i trattamenti non sono in grado di bloccare l'iperespressione dell'mRNA di *Nurr1*, indicando che nelle colture mesDA *espansse* la depolarizzazione della membrana con alto K^+ induce l'espressione di *Nurr1* mediante un meccanismo calcio-indipendente.

Dal momento che ERK è implicato nella regolazione di un gran numero di funzioni neuronali, ho analizzato gli effetti della depolarizzazione su ERK nelle nostre condizioni sperimentali. Come ipotizzato, nelle colture *espansse* la depolarizzazione con K^+ causa una robusta fosforilazione di ERK, che mostra un picco dopo 5' ed è ancora evidente, anche dopo 2h di depolarizzazione (fig. 18a). Tuttavia la depolarizzazione con K^+ è capace di indurre l'aumento dell'espressione genica di *Nurr1* anche in presenza di inibitori di MEK (U0126, fig. 18b), quindi in assenza di

fosforilazione di ERK (fig. 18a). MEK infatti è l'enzima che fosforila ERK ed è detto anche MAPKK. Anche la depolarizzazione in presenza di inibitori di PKA, H89, non altera significativamente l'induzione di *Nurr1* (fig. 18b). In esperimenti di controllo, da me condotti su cellule PC12, gli inibitori U0126 e H89 bloccano, rispettivamente, la fosforilazione di ERK e CREB in seguito a stimolazione con NGF e forskolina.

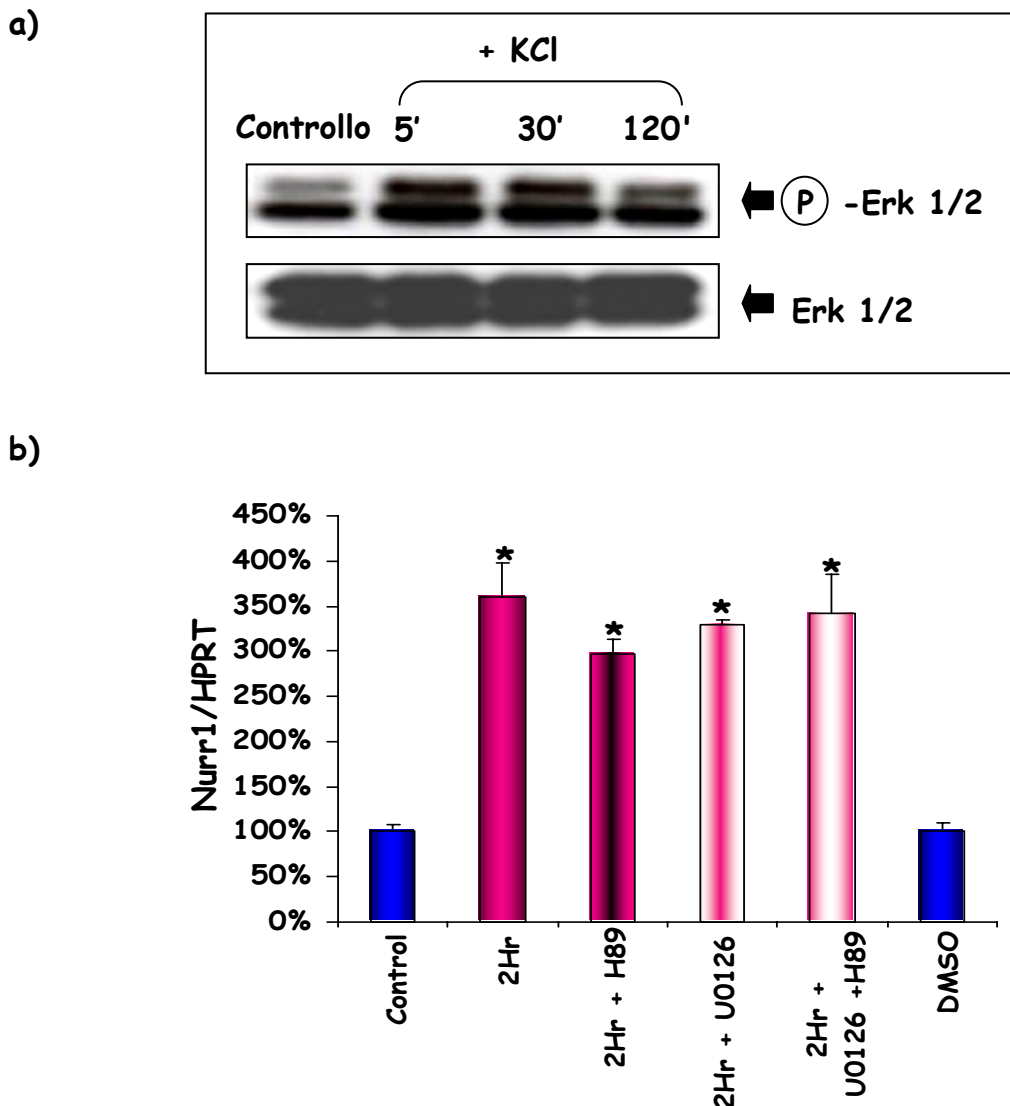


Fig. 18 L'incremento di mRNA di *Nurr1* è Erk-indipendente.

- a) La depolarizzazione induce la fosforilazione di ERK: i livelli di fosfo-ERK (P-Erk1/2) e di ERK (ERK1/2) sono analizzati per western blotting, utilizzando anticorpi anti-fosfo-p44/42 MAP chinasi (P-ERK1/2) e anti-ERK1 in colture non trattate (controllo) e depolarizzate per differenti tempi.
- b) Effetti selettivi degli inibitori su l'espressione genica di *Nurr1*: colture non trattate (controllo), depolarizzate per 2hr (2hr) con e senza inibitori di PKA, H89, e di MAP chinasi, U0126, o di entrambi, o con il solvente da solo (DMSO).

Gli asterischi mostrano le differenze statisticamente significative (* $p \leq 0.01$) rispetto al controllo.

In seguito a depolarizzazione, in presenza di inibitori di MEK, U0126, oltre alla iperespressione di *Nurr1*, si mantiene anche quella di *Egr1* e *Bdnf*, ma non di *Atf3*. Questi dati ci suggeriscono che *Nurr1*, *Egr1* e *Bdnf*, ma non *Atf3* possono essere sulla stessa via di segnalazione MAPK-indipendente (fig. 19).

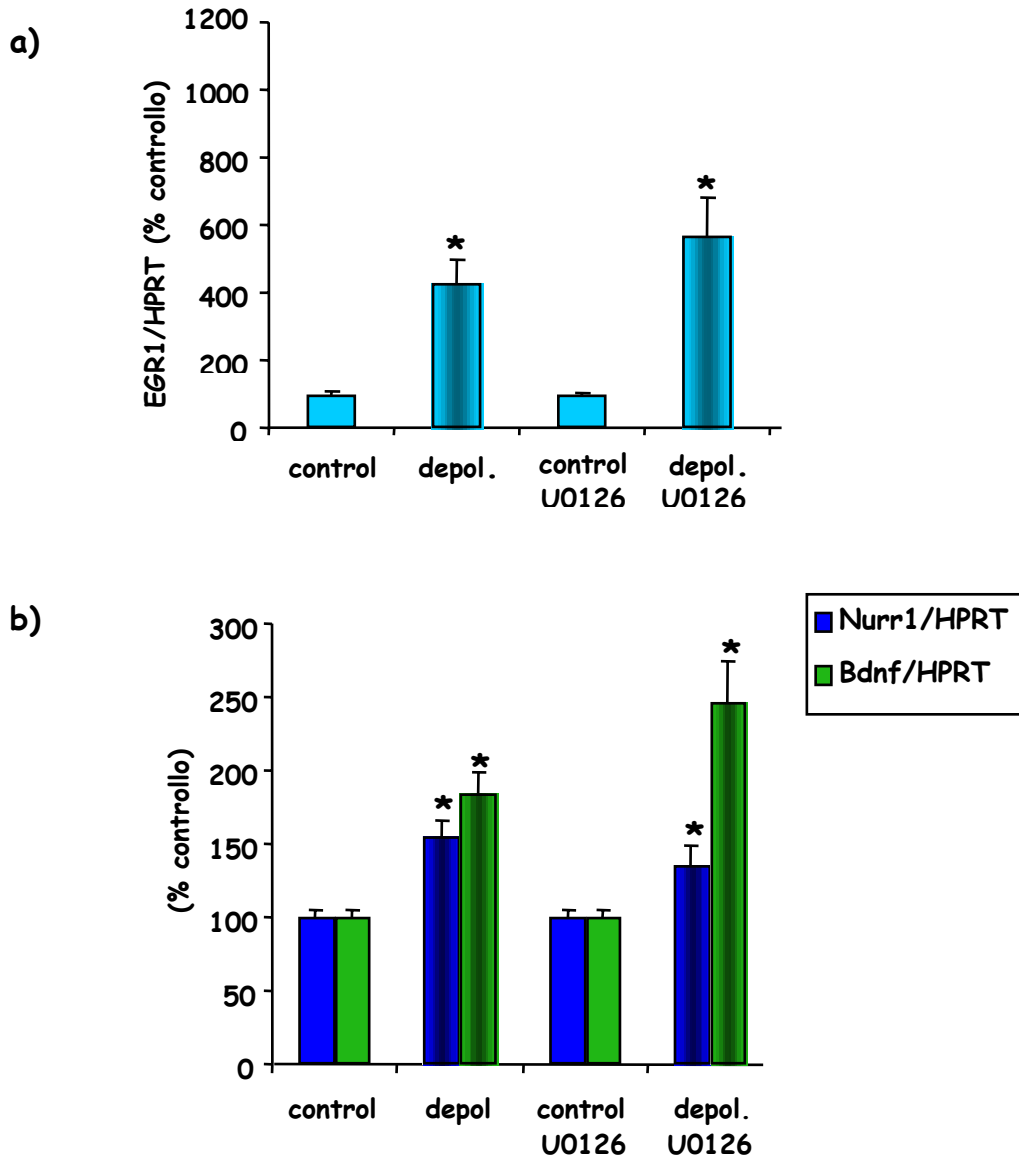


Fig. 19 L'espressione dei geni *Nurr1*, *Egr1*, *Bdnf* in colture mesDA espanse depolarizzate è MAPK-indipendente.

I diagrammi mostrano le quantizzazioni relative (media \pm ES) dei prodotti amplificati dei geni *Egr1*, *Bdnf*, comparati all'HPRT. I dati sono espressi come rapporto Nurr1/HPRT, Egr1/HPRT, Bdnf/HPRT in colture di neuroni mesDA a 9 DIV: controllo; colture depolarizzate per 2h con K^+ (56 mM), controllo e depolarizzati con inibitori di MAPK (U0). Gli asterischi mostrano le differenze statisticamente significative (* $p \leq 0.01$) rispetto al controllo.

Saranno necessari esperimenti che facciano emergere dati ulteriori sullo studio dei geni che interagiscono con *Nurr1* (es. *Egr1* e *Bdnf*). In quest'ottica risulteranno sicuramente chiarificatori esperimenti di interferenza di altre vie di segnalazione (es. fosfolipasi C, protein chinasi C e PI3-chinasi) ed esperimenti di siRNA, volti al silenziamento di *Nurr1* o di altri geni, in modo da stabilire il loro effettivo coinvolgimento e la loro gerarchia funzionale nel differenziamento dopaminergico.

4. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni numerosi studi sono stati indirizzati alla comprensione di come la grande varietà di neuroni, prodotti durante lo sviluppo embrionale e come questi possono acquisire una straordinaria specificità che porti alle peculiari caratteristiche del sistema nervoso adulto e come si possano stabilire le corrette connessioni sinaptiche, necessarie per la formazione di circuiti funzionali. In molti laboratori, incluso il nostro, un importante obiettivo è stato quello di sviluppare un sistema *in vitro*, che permettesse di generare specifiche classi di neuroni embrionali. L'identificazione di condizioni necessarie per l'induzione dei neuroblasti e l'attivazione di modelli di sviluppo DA-specifici possono essere particolarmente utili per il trattamento di malattie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson e per lo studio di alterazioni che implicano disordini dello sviluppo, come nell'ADHD.

In studi precedenti, è stato osservato che, *in vitro*, diversi fattori di crescita hanno un effetto stimolatorio sulla sopravvivenza e sulla divisione di cellule neuroepiteliali. Per esempio, il fattore di crescita epidermica (EGF) agisce sulla sopravvivenza e la proliferazione dei neuroblasti mesencefalici di ratto ad E16 (Mytilineou, et al., 1992; Casper et al., 1991) e dello striato di topi adulti (Reynolds et Weiss, 1992). L'EGF, così come il bFGF, è in grado di stimolare la proliferazione cellulare e incrementare la ricattura della dopamina in colture di mes di ratto ad E15-E17 (Knusel et al., 1990; Park et Mytilineou, 1992).

Il bFGF è capace di prolungare i tempi di divisione mitotica di diverse popolazioni di precursori neuronali (Gensburger et al., 1987).

In questo lavoro di tesi, in primo luogo, ho sviluppato un metodo che permette di espandere il numero di neuroblasti mes in colture primarie e di arricchirli in neuroni DA, mediante l'effetto mitogeno del bFGF e l'azione induttrice della proteina SHH e FGF8. È stato dimostrato che la sottrazione di bFGF determina un aumento del differenziamento DA e che, in queste condizioni, SHH e FGF8 giocano un ruolo induttivo specifico su i precursori DA. In questo modo riusciamo ad ottenere un incremento dei neuroni DA. I neuroni DA indotti da questi morfogeni che, nelle nostre condizioni mimano gli effetti *in vivo*, come descritto da Hynes (1995), non sembrano avere *in vitro* un effetto trofico per in neuroni DA, come descritto da Miao

(1997). Queste differenze possono essere dovute alle diverse condizioni di coltura e agli stadi di sviluppo delle cellule DA.

È plausibile anche che molti precursori DA nel mesencefalo ventrale a E11-12 siano già indotti da SHH, tuttavia, non è sorprendente che SHH, nelle colture espanse, possa aumentare ulteriormente il differenziamento DA, che è bloccato da specifici anticorpi. SHH esercita il suo effetto *in vitro* su i precursori neuronali in divisione, stimolati con bFGF. Tuttavia, il numero delle cellule TH⁺ è maggiore quando SHH è aggiunta al mezzo al momento del piastramento e sottratto dopo 6DIV e successivamente è aggiunto AA. Inoltre, l'aggiunta alle colture di FGF8, prodotto e rilasciato *in vivo* dall'istmo, incrementa ulteriormente il differenziamento DA in colture mesencefaliche suggerendo che le componenti endogene che cooperano al differenziamento DA nel mesencefalo *in vivo* (Ye et al. 1998), agiscono sinergicamente anche *in vitro*.

Questi risultati indicano che, nelle nostre colture espanse, ci sono ancora neuroni in via di sviluppo, infatti l'espressione di geni che codificano per i filamenti intermedi mostrano che NFL e NFM, ma non NFH sono presenti nelle colture espanse, ciò è in accordo con i dati presenti in letteratura che hanno provato che l'espressione di NFH appare in varie regioni del SNC durante gli stadi tardivi di sviluppo (Pernas-Alonso et al., 1996; Julien et al., 1986).

L'aggiunta di bFGF e SHH alle colture mesDA non induce la proliferazione di cellule gliali, come monitorato dall'espressione della GFAP, sebbene non inibisce la sopravvivenza dei glioblasti, che, nelle nostre condizioni di coltura, restano quiescenti. Nelle colture espanse, i neuroni DA mostrano importanti proprietà dei neuroni mesDA, inclusa l'espressione dei geni DA (*Nurr1*, *Ptx3*, *TH*, *VMAT2*, *c-Ret*, *DAT*) e la capacità di ricattare la dopamina, mediante il trasportatore della DA, DAT, che selettivamente permette la ricattura della DA liberata nella fibra presinaptica, con meccanismo ad alta affinità. Mediante il saggio di ricattura della dopamina è stato dimostrato che nelle colture *espanse* solo i neuroni aminergici sono neuroni DA differenziati, come dimostrano l'assenza di marcatori serotonergici e noradrenergici. Oltre a neuroni DA, nelle colture espanse sono presenti neuroni GABAergici e glutammatergici. Le colture *espanse* forniscono un'utile fonte di neuroni mesDA, inoltre, possono fornire un nuovo metodo per generare neuroni DA per esperimenti di trapianti in modelli animali di Parkinson e sul lungo tempo, tale metodo potrà essere usato per approcci di medicina rigenerativa (Dunnet et al.,

2001). Tuttavia la questione se i neuroni DA possono essere funzionalmente usati nei trapianti nigrostriatali, indipendentemente dalla loro origine anatomica e funzionale, è ancora una questione aperta, così come l'alta selettività che riguarda le interazioni tra i neuroni embrionali e quelli adulti nella via nigrostriatale. Per esempio, solo i neuroni ottenuti dal mes, ma non da altre aree del SNC, sono capaci di ricostituire il circuito nigrostriatale e così restaurare la funzione quando trapiantati in modelli animali con lesioni di questa via, come accade nell'uomo nel morbo di Parkinson (Zuddas et al., 1991). Va detto che l'overespressione di *Nurr1* in precursori del SNC, che *in vitro* hanno molte caratteristiche di cellule DA, non determina un miglioramento funzionale di questi neuroni se trapiantati in modelli di ratti Parkinsoniani, anzi questi mostrano una riduzione della sopravvivenza e del differenziamento, paragonate a cellule DA provenienti da precursori E12 (Kim et al., 2003). Questi dati indicano che sono necessari nuovi approcci sperimentali per generare un gran numero di neuroni DA di origine mes, e a tale scopo possono essere utilizzate le colture mesDA *espansive*.

Il secondo obiettivo del lavoro di tesi riguarda lo studio della regolazione e le interazioni del fattore di trascrizione *Nurr1*, la cui espressione è condizione indispensabile per lo sviluppo e mantenimento dei neuroni mesDA, come precedentemente detto (Zetterstrom et al., 1997). Allo stato attuale non tutti i meccanismi di attivazione e di azione di *Nurr1*, nonché molti dei suoi geni bersaglio, sono ancora noti.

Durante l'ontogenesi del mes di ratto, *Nurr1* mostra un picco di espressione tra E13 e E15, il periodo di massima differenziazione DA nel mes di ratto (Perrone Capano et al., 2000; Volpicelli et al., 2004). In questa finestra temporale di sviluppo i livelli di mRNA di *Nurr1* sono almeno 15 volte più alti rispetto a quelli osservati a E12 o negli stadi embrionali più tardivi o postnatali. *Nurr1* mostra un precipuo profilo di espressione quando è paragonato a quello di altri geni come ad es. *TH* e *DAT* (Perrone Capano et al., 1996). Alti livelli di *Nurr1* sembrano pertanto essere necessari nella fase di sviluppo embrionale, cruciale per la determinazione mesDA. In accordo con questa ipotesi, da dati di letteratura si evince che *Nurr1* è necessario e indispensabile per la generazione di cellule mesDA (Zetterstrom et al., 1997; Le et al., 1999) e gioca un ruolo critico nella loro maturazione e migrazione, nell'innervazione striatale e nella sopravvivenza (Saucedo-Cardenas et al., 1998; Wallen et al., 1999), inoltre, l'overespressione di *Nurr1* può generare neuroni DA

funzionali da precursori del SNC (Kim et al., 2003). Per capire se il profilo di espressione genica di *Nurr1* è di tipo “cell autonomous” o dipendente da segnali extracellulari, sono stati effettuati esperimenti *in vitro* su colture mesDA. I nostri dati dimostrano che l’ mRNA di *Nurr1* segue *in vitro* un profilo di espressione simile a quello osservato *in vivo* durante lo sviluppo, concordemente agli stadi embrionali analizzati. Il picco di espressione di *Nurr1* è più alto *in vivo* che *in vitro*, suggerendo che l’aumento di espressione di *Nurr1* durante lo sviluppo può dipendere sia da fattori intrinseci ai neuroni mesDA, che, almeno parzialmente, da fattori estrinseci, cioè fattori epigenetici ancora sconosciuti, presumibilmente assenti nelle colture primarie mesencefaliche, che possono accrescere i livelli di *Nurr1*. L’espressione genica di *Nurr1* è plastica sia *in vivo* che *in vitro*, come evidenziato dall’aumento di *Nurr1* (mRNA e proteina) in seguito a depolarizzazione. Dato che *Nurr1* nei neuroni in sviluppo e maturi colocalizza con i neuroni TH⁺ e DAT⁺ (Zetterstrom et al., 1997; Wallen et al., 2001; Bannon et al., 2002), i nostri dati suggerisco che l’attività elettrica può fisiologicamente modulare *Nurr1* nei neuroni DA in sviluppo e sembra correlata ai diversi stadi di sviluppo e ai differenti stati fisiologici del neurone mesDA e, probabilmente, anche in quelli dell’adulto. È noto che l’espressione genica di *Nurr1*, come quella di altri “immediate early genes”, può essere rapidamente indotta dall’attività elettrica sia *in vivo* che *in vitro* (Pena de Ortiz et al., 1996; Xing et al., 1997 Crispino et al., 1998; Bronsenitsch et al., 2001). Nelle colture mesDA l’aumento di espressione genica di *Nurr1* è rapida e continua, e avviene entro le prime 2h. Questo aumento è parallelo all’incremento della proteina, suggerendo che può essere modulata la trascrizione di una cascata di geni bersaglio. Nelle nostre condizioni non ci sono variazioni nei geni, putativi bersagli di *Nurr1*, inclusi *TH*, *DAT* e *RET*. Allo stesso modo altri mRNA come *GFRα1* e *GFRα2*, che sono modulati dalla depolarizzazione nel sistema nervoso periferico (SNP) di pollo, non variano in seguito a depolarizzazione. Questo può essere giustificato dal fatto che altri geni o il paradigma sperimentale o tempi più lunghi possono essere richiesti per riscontrare la modulazione di geni noti o sconosciuti, attivati da *Nurr1*.

Quale può essere il ruolo fisiologico dell’attivazione di *Nurr1* indotta dalla depolarizzazione? È attraente speculare sul fatto che l’attività neuronale può giocare un ruolo selettivo, regolando l’espressione di un fattore di trascrizione critico per lo sviluppo dei neuroni mesDA, a stadi cruciali durante l’embriogenesi. Tuttavia, il picco di espressione genica di *Nurr1* durante l’ontogenesi mesencefalica precede

l'inizio dell'attivazione di altri geni selettivamente espressi dai neuroni mesDA, come TH e DAT (Zetterstrom et al., 1997; Perrone Capano et al., 2000). D'altra parte, è ben noto che l'espressione genica dipendente dall'attività e gioca un ruolo critico in funzioni neuronali diverse, incluso il differenziamento (Buonanno et al., 1999), la crescita neuritica (Wong et al., 2002) e la sopravvivenza neuronale (Ghosh et al., 1994).

I nostri dati mostrano che l'espressione genica di *Nurr1* è mantenuta nel mes adulto a livelli rilevabili indicando che la sua modulazione attraverso l'attività elettrica potrebbe avvenire anche nel mes adulto. Inoltre, studiare la modulazione di *Nurr1* nel mes adulto potrebbe essere dal punto di vista clinico interessante per studiare alcuni disordini neurologici, relativi a disfunzioni del sistema DA. Infatti, recenti lavori dimostrano che:

1. la dose del gene *Nurr1* regola i livelli di DA nel cervello adulto (Eells et al., 2002),
2. *Nurr1* può avere un ruolo neuroprotettivo su i neuroni mesDA (Le et al., 1999),
3. *Nurr1* è regolato negativamente nel mesencefalo in soggetti che abusano di cocaina (Bannon et al., 2002, 2004),
4. Nell'uomo polimorfismi nell'introne 6 del gene *Nurr1* sono associati con il morbo di Parkinson (Xu et al., 2002).
5. In aggiunta, mutazioni missenso nel gene *Nurr1* sono state ritrovate in casi di schizofrenia e in disordini maniaco-depressivi (Buervenich et al., 2000; Chen et al., 2001).

Il terzo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di utilizzare il paradigma sperimentale della depolarizzazione, che determina un incremento trascrizionale di *Nurr1*, per individuare i possibili geni attivatori e effettori di *Nurr1*.

La nuova tecnologia di ibridizzazione di RNA totali con oligonucleotidi immobilizzati su "microchips", che rappresentano tutti i geni noti ed EST di *Rattus norvegicus*, consente di poter osservare contemporaneamente le variazioni del trascrittoma *in toto*. Poiché *Nurr1* è un "immediate early gene", si è optato di utilizzare campioni di cRNA derivanti da colture mesDA, raccolte a tempi brevi dalla fine della depolarizzazione, ovvero a 30 e 120 minuti, per ibridarli su i "microarrays", avendo avuto cura di eliminare le possibili variazioni individuali come descritto nella sezione materiali e metodi.

Questo disegno sperimentale ha permesso di individuare:

- 1) geni attivati immediatamente a seguito della fine della depolarizzazione, tra cui vi sono con ogni probabilità gli attivatori di *Nurr1* ed i suoi possibili interattori.
- 2) geni attivati dopo 2 ore dalla fine della depolarizzazione, tra i quali vi sono probabilmente i primi effettori di *Nurr1*.

Studi di correlazione effettuati sulle distribuzioni dei valori di espressione mostrano che i “microarrays” degli stessi gruppi di replicati presentano un coefficiente di correlazione lineare (R^2) maggiore di 0,99. Ciò indica che vi è una bassa variabilità nei risultati derivanti da triplicati di colture primarie trattate indipendentemente.

Inoltre, RT-PCR semiquantitative effettuate sugli stessi campioni utilizzati per gli esperimenti con i “microarrays” indicano che c'è una buona attendibilità dell'esperimento dal punto di vista tecnico e che i dati ottenuti nei “microarrays” corrispondono a vere variazioni dei trascritti. Va precisato, comunque, che gli incrementi trascrizionali risultanti dalle RT-PCR e dai “microarrays” non sono sempre quantitativamente identici, ed in generale negli esperimenti di “microarrays” vi è una sottostima dei livelli d'espressione genica.

I risultati degli esperimenti ottenuti con i “microarrays” sono stati validati anche dal punto di vista biologico. Infatti, effettuando real-time PCR o RT-PCR semiquantitative, su campioni ottenuti da successive ed indipendenti repliche di esperimenti di depolarizzazione, sono stati ottenuti risultati che corroborano l'esperimento realizzato mediante l'utilizzo di “microarrays”.

Dei 15923 geni analizzati inizialmente, in seguito al *pre-filtro*, ed ai filtri statistici, sono stati individuate alcune centinaia di geni la cui trascrizione è significativamente variata. Tra questi, 62 risultano essere aumentati a 30 minuti e 117 a 120 min dopo la fine della depolarizzazione. I geni i cui trascritti sono invece diminuiti sono: 191 a 30 minuti e 92 a 120 minuti dopo la fine della depolarizzazione.

Come si evince da questi dati, nonostante la forte stringenza dei filtri statistici adottati, la quantità di dati ottenuta è notevole e non è stato semplice ordinarli biologicamente. Infatti, sono possibili molteplici tipi di raggruppamento per i molti geni variati significativamente. In questo studio è stato scelto di raggrupparli in famiglie funzionali sfruttando l'archivio dati del consorzio Geneontology (The Geneontology consortium, 2000).

Sia adottando un raggruppamento per funzioni molecolari che per processi biologici, le famiglie di geni che comprendono i fattori di trascrizione risultano essere variate in modo statisticamente significativo, e ciò è consistente con le ipotesi alla base della programmazione dell'esperimento.

È interessante notare, che nel raggruppamento per processi biologici, tra le famiglie presenti con maggiore significatività, vi è quella dei geni coinvolti nello sviluppo. Anche questo dato conferma che l'approccio sperimentale utilizzato consente di studiare i geni coinvolti nello sviluppo dei neuroni DA.

Bisogna tener presente che i geni variati in seguito a depolarizzazione non necessariamente rientrano nella via di segnalazione di Nurr1, ma potrebbero essere coinvolti in processi biologici attivati parallelamente mediante depolarizzazione.

Tramite l'analisi delle sequenze promotrici, sono state individuate le possibili gerarchie d'attivazione tra i fattori di trascrizione ed alcuni geni d'interesse attivati in seguito a depolarizzazione. Confrontando lo schema gerarchico così ottenuto con il momento di attivazione temporale dei geni presi in considerazione, i fattori di trascrizione ivi descritti si possono suddividere in due gruppi. Il primo gruppo presenta geni con un picco d'attivazione trascrizionale a 30 minuti dalla fine della depolarizzazione, ovvero *Atf3*, *Egr1*, *Egr2*, *Copeb*, *Junb*, e *Nurr1*. Nel secondo gruppo sono inclusi fattori di trascrizione che presentano un picco d'attivazione trascrizionale a 120 minuti dalla fine della depolarizzazione quali *Bdnf*, *RAR α* , *Tieg*, *Runx1* (Runt-Related Transcription Factor 1) e *FosL* (FOS-like antigen).

È interessante notare che, tra i fattori di trascrizione appartenenti al primo gruppo, *Atf3*, *Egr1*, *Egr2* e *Copeb* si possono attivare reciprocamente; ognuno di loro infatti, presenta sequenze *consensus* sul proprio promotore per gli altri tre. I promotori di *Junb* e *Nurr1*, presentano invece, sequenze di legame sia per *Egr1* che per *Atf3*.

Sulla base di queste previsioni bioinformatiche si può ipotizzare che nel nostro sistema sperimentale, la depolarizzazione causerebbe l'attivazione di un primo gruppo di fattori trascrizionali, i cui livelli d'espressione si manterrebbero attraverso meccanismi d'attivazione reciproca. Sembra inoltre che *Nurr1* possa essere attivato sia direttamente dallo stimolo depolarizzante, sia dall'azione di altri geni, che presentano picchi di espressione temporalmente precedenti a quelli di *Nurr1*.

L'andamento dell'espressione genica di *Egr1* durante l'ontogenesi del mesencefalo presenta un picco d'attivazione trascrizionale ad E12, ovvero un giorno prima della ristretta finestra temporale in cui *Nurr1* ha il suo massimo livello di trascrizione.

Tutto ciò, insieme ai dati sopra discussi, sembra corroborare l'ipotesi che *Egr1* sia coinvolto in parte nell'attivazione di *Nurr1*, sia durante l'embriogenesi che a seguito della depolarizzazione.

Infine l'analisi bioinformatica ha evidenziato possibili sequenze di legame per *Nurr1* nei promotori di alcuni geni potenziali bersagli, tra i quali *Bdnf* e *Pten*, noti per il loro coinvolgimento sia nello sviluppo che nel differenziamento neuronale (Baker et al., 2005; Lachyankar et al., 2000; Beck et al., 1993).

Per identificare ed ordinare le possibili relazioni tra i vari geni variati nei microarrays e per comprendere la loro implicazione nella regolazione dell'espressione genica di *Nurr1* abbiamo analizzato le vie di segnalazione intracellulare che sottendono l'aumento di espressione di *Nurr1* in seguito a depolarizzazione. È importante notare che l'induzione di *Nurr1*, mediante depolarizzazione prolungata, è indipendente dall'entrata di calcio extracellulare attraverso i canali calcio di tipo L o N voltaggio dipendente, come dall'attività di MEK o PKA. Sebbene i nostri esperimenti dimostrino che l'aumento di espressione di *Nurr1* in seguito a depolarizzazione è di tipo calcio indipendente, in letteratura, sono stati descritti entrambi i meccanismi calcio-dipendente e indipendenti (Kovalovsky et al., 2002) in cellule endocrine e neuronali coinvolti nell'induzione di *Nurr1*. Quindi, differenti vie di segnalazione intracellulari possono partecipare all'attivazione di *Nurr1*, in modo dipendente dal contesto cellulare studiato e/o dalla maturazione durante lo sviluppo; allo stesso modo più vie di segnalazione possono essere richieste simultaneamente per l'induzione di *Nurr1* in colture mesDA. Infatti, in seguito a depolarizzazione, in presenza di inibitori di MEK, U0126, oltre alla iperespressione di *Nurr1*, si mantiene anche quella di *Egr1* e *Bdnf*, ma non di *Atf3*. È ipotizzabile pensare che *Nurr1*, *Egr1* e *Bdnf*, ma non *Atf3* siano sulla stessa via di segnalazione MAPK-indipendente. Tuttavia, saranno necessari ulteriori esperimenti di interferenza di altre vie di segnalazione (es. fosfolipasi C, protein chinasi C e PI3-chinasi) ed esperimenti di siRNA, volti al silenziamento di *Nurr1* o di altri geni, per stabilire il loro effettivo coinvolgimento nel differenziamento dopaminergico e la loro gerarchia funzionale.

Questo studio quindi, mediante approcci sperimentali di colture cellulari, incremento di specifiche sottopopolazioni di neuroni dopaminergici, studi di espressione genica, interferenza con i segnali intracellulari e spegnimento di geni d'interesse mediante RNA interference (in corso), fornisce importanti informazioni sui meccanismi che determinano il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni mesDA. Tali studi

potranno avere importanti ricadute sullo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, sia rigenerative che farmacologiche, per la cura delle malattie che coinvolgono il sistema dopaminergico.

5. CONCLUSIONI.

Durante il lavoro di tesi di dottorato, ho studiato alcuni dei meccanismi molecolari che sottendono al differenziamento dopaminergico. In particolare, ho messo a punto un metodo che permette di ottenere neuroni DA *in vitro* mediante l'azione di mitogeni (bFGF) e di specifiche molecole induttive (SHH, FGF8 e acido ascorbico), inoltre mi sono interessata all'analisi della regolazione e delle interazioni del fattore di trascrizione *Nurr1*.

I principali risultati ottenuti nel corso di questo lavoro sono qui schematicamente riassunti:

- 1) L'aggiunta di bFGF alle colture mesencefaliche stimola la proliferazione dei neuroblasti ma rallenta il differenziamento DA. L'aggiunta di SHH e di FGF8 aumenta il numero delle cellule TH⁺. L'aggiunta di AA aumenta ulteriormente il numero delle cellule TH⁺.
- 2) Tali colture, oltre ad essere arricchite in neuroni che esprimono la tirosina idrossilasi, marcatore specifico dei neuroni catecolaminergici, sono anche ricche in precursori neurali, come evidenziato dalla presenza di cellule positive per la nestina (il filamento intermedio del citoscheletro dei neuroblasti), e di neuroni ben differenziati, come evidenziato dall'espressione della proteina della subunità media del neurofilamento (NFM) e della tubulina $\beta 3$.
- 3) *In vivo* il gene *Nurr1* è altamente espresso nei neuroni mesDA in una precisa finestra temporale, suggerendo che alti livelli di *Nurr1* sono richiesti per il differenziamento DA durante l'ontogenesi.
- 4) L'mRNA di *Nurr1 in vitro* segue un profilo di espressione simile a quello osservato *in vivo* durante lo sviluppo.
- 5) L'espressione del gene *Nurr1* è plastica *in vivo* così come *in vitro*, ed è aumentata dalla depolarizzazione, che causa un aumento rapido e transitorio del fattore di trascrizione *Nurr1*, sia a livello dell'mRNA che a livello della proteina.
- 6) La modulazione dell'espressione del gene *Nurr1* è indipendente dai canali Ca²⁺, così come da MAPK e PKA.

- 7) L'utilizzo di "microarrays" a sonde oligonucleotidiche ad alta densità ibridati con campioni di cRNA, ottenuti da colture *espanse* mesDA depolarizzate e di controllo, ha permesso di individuare un gruppo di circa 300 geni la cui espressione è modulata dalla depolarizzazione, e che almeno in parte potrebbero essere potenzialmente coinvolti nella via di segnalazione di *Nurr1*.
- 8) Saggi di RT-PCR e di real-time RT-PCR hanno validato sia dal punto di vista tecnico che biologico l'analisi bioinformatica dei dati ottenuti dai "microarrays".
- 9) La cinetica di attivazione di alcuni di questi geni in seguito a depolarizzazione ha permesso di evidenziare alcuni fattori di trascrizione che precedono l'attivazione trascrizionale di *Nurr1* (*Egr1*, *Atf3*) e altri geni che aumentano la loro espressione in seguito all'attivazione trascrizionale di *Nurr1* (*Bdnf*, *Pten*), e che rappresentano dei potenziali bersagli attivati da *Nurr1*.
- 10) L'analisi di interferenza delle vie di segnalazione hanno evidenziato che *Egr1*, *Nurr1* e *Bdnf*, ma non *Atf3* sono sulla stessa via di segnalazione MAPK- indipendente.

Questi risultati nel loro insieme mostrano che il fattore di trascrizione *Egr1* precede la modulazione trascrizionale di *Nurr1* sia *in vitro* che *in vivo* ed è sulla sua stessa via di segnalazione, ciò suggerisce che *Egr1* possa agire come possibile gene attivatore di *Nurr1* durante lo sviluppo dei neuroni mesDA.

Parallelamente si evince che, sia *in vitro* che *in vivo*, l'attivazione trascrizionale della neurotrofina *Bdnf* è successiva a quella di *Nurr1* ed è anch'essa sulla stessa via di segnalazione. Ciò rende plausibile l'ipotesi che *Bdnf* possa essere un effettore di *Nurr1*.

L'analisi di questi risultati, tuttora in corso, coniugata ad ulteriori esperimenti sulle colture *espanse* mesDA (interferenza di altre vie di segnalazione, silenziamento dei geni a monte e a valle di *Nurr1*) permetterà di chiarire più approfonditamente mediante quali meccanismi molecolari si propaghi il segnale differenziativo regolato da *Nurr1*.

6. BIBLIOGRAFIA

Aarnisalo P, Kim CH, Lee JW, Perlmann T (2002) Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nurr1. *J Biol Chem* 277:35118-35123.

Ande'n NE, Carlsson A, Dahlstroem A, Fuxe K, Hillarp NA, Larsson K (1964). Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci.*;15:523-30.

Ande'n NE, Fuxe K, Hamberger B, Hokfelt T (1966). A quantitative study on the nigro-neostriatal dopamine neuron system in the rat. *Acta Physiol Scand* 67:306–312.

Airaksinen MS, Saarma M (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3:383-394.

Amara SG, Arriza JL (1993) Neurotransmitter transporters: three distinct gene families. *Curr Opin Neurobiol* 3:337-344.

Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL (2002) Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 129:4753-4761.

Baker SA, Stanford LE, Brown RE, Hagg T. (2005) Maturation but not survival of dopaminergic nigrostriatal neurons is affected in developing and aging BDNF-deficient mice. *Brain Res*1039:177-188.

Baldo BA and Kelley AE (1991) Cross-sensitization between cocaine and GBR 12909, a dopamine uptake inhibitor. *Brain Res Bull* 27:105-108.

Bannon MJ, Pruetz B, Manning-Bog AB, Whitty CJ, Michelhaugh SK, Sacchetti P, Granneman JG, Mash DC, Schmidt CJ. (2002) Decreased expression of the transcription factor NURR1 in dopamine neurons of cocaine abusers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9):6382-6385.

Bannon MJ, Pruetz B, Barfield E, Schmidt CJ (2004) Transcription factors specifying dopamine phenotype are decreased in cocaine users. *Neuroreport* 15(3):401-404.

Barbeau, A, Sourkes, TL, Murphy, GF, (1962). Les catecholamines dans la maladie de Parkinson. In: Ajuriaguerra, J. (Ed.), *Monoamines et Systeme Nerveux Central*. Symposium Bel-Air, Geneva. Georg and Co., Geneva 247– 262.

Beck KD, Knusel B, Hefti F (1993) The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des(1-3)-insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 52(4):855-866.

Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F (1995) Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 373:339-341.

Berger B, Di Porzio U, Daguet MC, Gay M, Vigny A, Glowinski J, Prochiantz A (1982) Long-term development of mesencephalic dopaminergic neurons of mouse embryos in dissociated primary cultures: morphological and histochemical characteristics. *Neuroscience* 7:193-205.

Bertler A, Rosengrens E (1959). Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 15:1 –3.

Bjorklund A, Lindvall O (2000) Parkinson disease gene therapy moves toward the clinic. *Nat Med* 6:1207-1208..

Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2344-2349.

Blake JA, and Harris M (2003). The Gene Ontology Project: Structured vocabularies for molecular biology and their application to genome and expression analysis. In: A.D. Baxevanis, D.B. Davison, R. Page, G.

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP(2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 22; 19(2):185-193.

Bouvier MM, Mytilineou C (1995) Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J Neurosci* 15:7141-7149.

Bradford HF, Zhou J, Pliego-Rivero B, Stern GM, Jauniaux E (1999) Neurotrophins in the pathogenesis and potential treatment of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 80:19-25.

Briscoe J, Ericson J (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 11:43-49.

Britto J, Tannahill D, Keynes R (2002) A critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain. *Nat Neurosci* 5:103-110.

Brosenitsch TA, Katz DM (2001) Physiological patterns of electrical stimulation can induce neuronal gene expression by activating N-type calcium channels. *J Neurosci* 21:2571-2579.

Buonanno A and Fields RD (1999) Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Curr Opin Neurobiol* 9, 110-120.

Buervenich S, Carmine A, Arvidsson M, Xiang F, Zhang Z, Sydow O, Jonsson EG, Sedvall GC, Leonard S, Ross RG, Freedman R, Chowdari KV,

Nimgaonkar VL, Perlmann T, Anvret M, Olson L (2000) NURR1 mutations in cases of schizophrenia and manic-depressive disorder. *Am J Med Genet* 96:808-813.

Carlsson A (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11, 490– 493.

Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A, Collier TJ (2001) A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 171:98-108.

Castellanos FX, Tannock R (2002) Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* 3:617-628.

Casper D, Mytilineou C, Blum M (1991) EGF enhances the survival of dopamine neurons in rat embryonic mesencephalon primary cell culture. *J Neurosci Res*; 30: 372-381.

Chen Z, Chen SJ. (1992) RARA and PML genes in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.*; 8(4-5):253-260. Review

Chen YH, Tsai MT, Shaw CK, Chen CH (2001) Mutation analysis of the human NR4A2 gene, an essential gene for midbrain dopaminergic neurogenesis, in schizophrenic patients. *Am J Med Genet* 105:753-757.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-159.

Chung S, Sonntag KC, Andersson T, Bjorklund LM, Park JJ, Kim DW, Kang UJ, Isacson O, Kim KS (2002) Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 16:1829-1838.

Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L, Isacson O. (2005) Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Hum Mol Genet.* 14:1709-1725.

Costantini LC, Jacoby DR, Wang S, Fraefel C, Breakefield XO, Isacson O (1999) Gene transfer to the nigrostriatal system by hybrid herpes simplex virus/adeno-associated virus amplicon vectors. *Hum Gene Ther* 10:2481-2494.

Cotzias GC (1968) L-Dopa for Parkinsonism. *N Engl J Med* 14;278(11):630.

Crispino M., Tocco G., Feldman J. D. Herschman H. R. and BaudryM. (1998) nurr1 mRNA expression in neonatal and adult rat following kainic acid-induced seizure activity. *Mol Brain Res* 59:178-188.

Dahlstrom, A, Fuxe, K, (1964). Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system: I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurones. *Acta Physiol Scand* 62:1–55.

Daguet MC, Di Porzio U, Prochiantz A, Kato A, Glowinski J (1980) Release of dopamine from dissociated mesencephalic dopaminergic neurons in primary cultures in absence or presence of striatal target cells. *Brain Res* 191:564-568.

Dechant G, Neumann H. (2002) Neurotrophins. *Adv Exp Med Biol* 513:303-34. Review.

Denis-Donini S, Glowinski J, Prochiantz A (1984) Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature* 307:641-643.

Denis-Donini S. (1999) Dopaminergic neurons in the olfactory bulb. In *Development of Dopaminergic Neurons* (Eds. di Porzio U., Perrone-Capano C. and Pernas Alonso R.), Neuroscience Intelligence Unit 4 R.G. Landes Company, Austin:145-156.

di Porzio U, Daguet MC, Glowinski J, Prochiantz A (1980) Effect of striatal cells on in vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurones grown in serum-free conditions. *Nature* 288:370-373.

di Porzio U, Zuddas A, Cosenza-Murphy DB, Barker JL (1990) Early appearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the mesencephalon of mouse embryos. *Int J Dev Neurosci* 8:523-532.

Djamgoz MB, Wagner HJ (1992) Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. *Neurochem Int* 20:139-191.

Dunnett SB, Bjorklund A and Lindvall O (2001) Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2:365-369.

Eells JB, Lipska BK, Yeung SK, Misler JA, Nikodem VM (2002) Nurr1-null heterozygous mice have reduced mesolimbic and mesocortical dopamine levels and increased stress-induced locomotor activity. *Behav Brain Res* 136(1):267-75.

Egan MF, Weinberger DR (1997) Neurobiology of schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 7:701-707.

Ehringer H, Hornykiewicz O, (1960). Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyrimidalen Systems. *Wien. Klin. Wochenschr.* 38, 1236–1239

Eichele G (1997) Retinoids: from hindbrain patterning to Parkinson disease. *Trends Genet* 13:343-345.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14863-14868.

Engel J, Bohn MC (1991) The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia. *J Neurosci* 11:3070-3078.

- Engele J. and Bayatti N.** (1999) Growth factor actions on developing midbrain dopaminergic neurons. In *Development Dopaminergic Neurons* (Eds. U. di Porzio, C. Perrone Capano and Pernas-Alonso). Neuroscience Intelligence Unit 4. R.G. Landes Company, Austin; 57-73.
- Enomoto H, Araki T, Jackman A, Heuckeroth RO, Snider WD, Johnson EM, Jr., Milbrandt J** (1998) GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21:317-324.
- Ericson J, Muhr J, Placzek M, Lints T, Jessell TM, Edlund T** (1995) Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81:747-756.
- Feng L, Wang CY, Jiang H, Oho C, Mizuno K, Dugich-Djordjevic M, Lu B.** (1999) Differential effects of GDNF and BDNF on cultured ventral mesencephalic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 66(1-2):62-70.
- Finkbeiner S, Greenberg ME** (1998) Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression *J Neurobiol* 37(1):171-89.
- Fizman ML, Zuddas A, Masana MI, Barker JL, di Porzio U** (1991) Dopamine synthesis precedes dopamine uptake in embryonic rat mesencephalic neurons. *J Neurochem* 56:392-399.
- Forman BM, Umesono K, Chen J, Evans RM** (1995) Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 81:541-550.
- Freeman TB, Spence MS, Boss BD, Spector DH, Strecker RE, Olanow CW, Kordower JH** (1991) Development of dopaminergic neurons in the human substantia nigra. *Exp Neurol* 113:344-353.
- Gainetdinov RR, Fumagalli F, Wang YM, Jones SR, Levey AI, Miller GW, Caron MG** (1998) Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. *J Neurochem* 70:1973-1978.
- Georgievska B, Kirik D, Rosenblad C, Lundberg C, Bjorklund A** (2002) Neuroprotection in the rat Parkinson model by intrastriatal GDNF gene transfer using a lentiviral vector. *Neuroreport* 13:75-82.
- Gensburger C, Labourdette G, Sensenbrenner M** (1987) Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro. *FEBS Lett.*; 217: 1-5.
- Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME** (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263, 1618-1623.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM** (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995-1001.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379:606-612.

Grondin R, Gash DM (1998) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol* 245:35-42.

Haas SJ, Wree A (2002) Dopaminergic differentiation of the Nurr1-expressing immortalized mesencephalic cell line CSM14.1 in vitro. *J Anat* 201:61-69.

Halladay AK, Yue Y, Michna L, Widmer DA, Wagner GC, Zhou R (2000) Regulation of EphB1 expression by dopamine signaling. *Brain Res Mol Brain Res* 85:171-178.

Hai and Hartman (2001) The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene*. 273(1):1-11.

Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28(3):370-490.

Ho KS, Scott MP (2002) Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 12:57-63.

Hosack DA, Dennis G Jr, Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA (2003) Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4(10):70.

Hwang DY, Ardayfio P, Kang UJ, Semina EV, Kim KS. (2003) Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain Res Mol Brain Res* 114:123-131.

Hynes M, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA, Rosenthal A. (1995) Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron*. 15(1):35-44.

Hynes M, Rosenthal A (1999) Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr Opin Neurobiol* 9:26-36.

Hynes M., Ye W., Wang K., Stone D., Murone M., Sauvage Fd., Rosenthal A. (2000) The seven-transmembrane receptor smoothed cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nat. Neurosci.* 3:41-46.

Ingham PW, McMahon AP (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15:3059-3087.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 4(2): 249-64.

Iwawaki T, Kohno K, Kobayashi K (2000) Identification of a potential nurr1 response element that activates the tyrosine hydroxylase gene promoter in cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 274:590-595.

Jenner P, Schapira AH, Marsden CD (1992) New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology* 42:2241-2250.

Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.

Julien JP, Meyer D, Flavell D, Hurst J, Grosveld F. (1986) Cloning and developmental expression of the murine neurofilament gene family. *Brain Res* 387: 243-250.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Principles of neural science, 4th Edition. New York: McGraw-Hill Health Professions Division.

Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. 28(1):31-40.

Kim JY, Koh HC, Lee JY, Chang MY, Kim YC, Chung HY, Son H, Lee YS, Studer L, McKay R, Lee SH (2003) Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J. Neurochem* 85: 1443-1454.

Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long LK, Auerbach BA, Joyner AL, Barbacid M (1993) Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* 75:113-122.

Knusel B, Michel PP, Schwaber JS, Hefti F (1990) Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J Neurosci* 10:558-570.

Koebernick K, Pieler T (2002) Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling. *Differentiation* 70:69-76.

Koeltzow TE, Xu M, Cooper DC, Hu XT, Tonegawa S, Wolf ME, White FJ (1998) Alterations in dopamine release but not dopamine autoreceptor function in dopamine D3 receptor mutant mice. *J Neurosci* 18:2231-2238.

Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290:767-773.

Kovalovsky D., Refojo D., Liberman A.C., Hochbaum D., Pereda M.P., Coso O.A., Stalla G.K., Holsboer F. and Arzt E. (2002) Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol. Endocrinol.* 16, 1638-1651.

- Kriegstein K, Suter-Crazzolara C, Hotten G, Pohl J, Unsicker K.** (1995) Trophic and protective effects of growth/differentiation factor 5, a member of the transforming growth factor-beta superfamily, on midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci Res.* 42:724-732.
- Kruger L, Saporta S, Swanson LW** (1995) Photographic Atlas of the rat brain.
- Kumer SC, Vrana KE** (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67:443-462.
- Lachyankar MB, Sultana N, Schonhoff CM, Mitra P, Poluha W, Lambert S, Quesenberry PJ, Litofsky NS, Recht LD, Nabi R, Miller SJ, Ohta S, Neel BG, Ross AH** (2000). A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci* 20(4):1404-13.
- Laemmlli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-685.
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV** (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6(1):21-27.
- Law SW, Conneely OM, DeMayo F, O'Malley BW** (1992). Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol. Endocrinol* 6:2129-2135.
- Le W, Conneely OM, Zou L, He Y, Saucedo-Cardenas O, Jankovic J, Mosier DR, Appel SH.** (1999) Selective agenesis of mesencephalic dopaminergic neurons in *Nurr1*-deficient mice. *Exp Neurol.*; 159(2):451-8.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD.** (2000) Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18:675-679.
- Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP** (2001) Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by *Ptc1*. *Cell* 105:599-612..
- Li C. and Wong W. H.** (2001a) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci* 98, 31-36.
- Li C. and Wong W. H.** (2001b) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biology* 2(8): research0032.1-0032.11
- Lindvall O, Bjorklund A, Skagerberg G** (1984) Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* 306:19-30.

- Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM** (1998) Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol* 149: 411-423.
- Liu Y, Edwards RH** (1997) The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 20:125-156.
- Lumsden A, Krumlauf R** (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274:1109-1115.
- Machold R, Fishell G** (2002) Hedgehog patterns midbrain ARChitecture. *Trends Neurosci* 25:10-11.
- Matsuura N, Lie DC, Hoshimaru M, Asahi M, Hojo M, Ishizaki R, Hashimoto N, Noji S, Ohuchi H, Yoshioka H, Gage FH** (2001) Sonic hedgehog facilitates dopamine differentiation in the presence of a mesencephalic glial cell line. *J Neurosci* 21:4326-4335.
- McCaffery P, Drager UC** (1994) High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7772-7776.
- McKay R.** (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science*. 276:66-71.
- Meyer M, Matarredona ER, Seiler RW, Zimmer J, Widmer HR** (2001) Additive effect of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 on rat fetal nigral explant cultures. *Neuroscience* 108:273-284.
- Miao N, Wang M, Ott JA, D'Alessandro JS, Woolf TM, Bumcrot DA, Mahanthappa NK, et al.** (1997) Sonic hedgehog promotes the survival of specific CNS neuron populations and protects these cells from toxic insult *in vitro*. *J Neurosci*; 17:5891-5899.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R.** (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 63:71-124.
- Mytilineou C., Park T., Shen J.** (1992) Epidermal growth factor-induced survival and proliferation of neuronal precursor cells from embryonic rat mesencephalon. *Neurosc. Lett* 135:62-66.
- Nelson EL, Liang CL, Sinton CM, German DC** (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *J Comp Neurol* 369:361-371.
- 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.
- Nunes I, Tovmasian LT, Silva RM, Burke RE, Goff SP** (2003) Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*.100(7): 4245-50.

- Park T. H., Mytilineou C.** (1992) Protection from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) toxicity and stimulation of regrowth of MPP⁺-damage dopaminergic fibers by treatment of mesencephalic cultures with EGF and basic FGF. *Brain Res* 599: 83-97.
- Patten I, Placzek M** (2002) Opponent activities of Shh and BMP signaling during floor plate induction in vivo. *Curr Biol* 12:47-52.
- Pena de Ortiz S, Jamieson GA Jr.** (1996) HZF-3, an immediate-early orphan receptor homologous to NURR1/NOT: induction upon membrane depolarization and seizures. *Brain Res Mol Brain Res.* 38(1):1-13.
- Perlman T., Jansson L.** (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 9:769-782.
- Pernas-Alonso R, Schaffner AE, Perrone-Capano C, Orlando A, Morelli F, Hansen CT, Barker JL, Esposito B, Cacucci F, di Porzio U** (1996) Early upregulation of medium neurofilament gene expression in developing spinal cord of the wobbler mouse mutant. *Brain Res Mol Brain Res* 38(2):267-275.
- Pernas-Alonso R, Morelli F, di Porzio U, Perrone-Capano C** (1999) Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. *Brain Res Brain Res Protoc* 4:395-406.
- Perrone-Capano C, Tino A, di Porzio U** (1994) Target cells modulate dopamine transporter gene expression during brain development. *Neuroreport* 5:1145-1148.
- Perrone-Capano C, di Porzio U** (1996) Epigenetic factors and midbrain dopaminergic neurone development. *Bioessays* 18:817-824.
- Perrone-Capano C, Tino A, Amadoro G, Pernas-Alonso R, di Porzio U** (1996) Dopamine transporter gene expression in rat mesencephalic dopaminergic neurons is increased by direct interaction with target striatal cells in vitro. *Mol Brain Res* 39: 160-166
- Perrone-Capano C, Da Pozzo P, di Porzio U** (2000) Epigenetic cues in midbrain dopaminergic neuron development. *Neurosci Biobehav Rev* 24:119-124.
- Perrone-Capano C, di Porzio U** (2000) Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Int J Dev Biol* 44:679-687.
- Pilgrim C., Beyer C., Reisert I.** (1999) The effects of sex and sex hormones on the development of dopaminergic neurons. In *Development of dopaminergic neurons* (Eds. di Porzio U., Perrone Capano C. e Pernas Alonso R.), Neuroscience Intelligence Unit 4. R.G. Landes Company; 75-86.
- Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV, Beachy PA** (1996) Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 86:21-34.

Poulsen KT, Armanini MP, Klein RD, Hynes MA, Phillips HS, Rosenthal A (1994) TGF beta 2 and TGF beta 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons. *Neuron* 13:1245-1252.

Prochiantz A, di Porzio U, Kato A, Berger B, Glowinski J (1979) In vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurons from mouse embryos is enhanced in presence of their striatal target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5387-5391.

Puelles E, Annino A, Tuorto F, Usiello A, Acampora D, Czerny T, Brodski C, Ang SL, Wurst W, Simeone A (2004) Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 131:2037-2048.

Quirin-Stricker C, Mauvais C, Schmitt M (1997) Transcriptional activation of human choline acetyltransferase by AP2- and NGF-induced factors. *Brain Res Mol Brain Res* 49(1-2):165-174.

Reveron ME, Savelieva KV, Tillerson JL, McCormack AL, Di Monte DA, Miller GW (2002) L-DOPA does not cause neurotoxicity in VMAT2 heterozygote knockout mice. *Neurotoxicology* 23:611-619.

Reynolds B.A., Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*; 255:1707-1710.

Rieger DK, Reichenberger E, McLean W, Sidow A, Olsen BR (2001) A double-deletion mutation in the Pitx3 gene causes arrested lens development in aphakia mice *Genomics* 72(1):61-72.

Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, Jessell TM (1995) Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81:445-455.

Roussa E, Krieglstein K (2004) Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF-beta. *Cell Tissue Res* 318(1):23-33.

Rubenstein JL. (1998) Development of serotonergic neurons and their projections. *Biol Psychiatry*. 44:145-150.

Sacchetti P, Mitchell TR, Granneman JG, Bannon MJ (2001) Nurr1 enhances transcription of the human dopamine transporter gene through a novel mechanism. *J Neurochem* 76:1565-1572.

Sacchetti P, Dwornik H, Formstecher P, Rachez C, Lefebvre P (2002) Requirements for heterodimerization between the orphan nuclear receptor Nurr1 and retinoid X receptors. *J Biol Chem* 277:35088-35096.

Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, Gage FH (1999) Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine

hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 126:4017-4026.

Sales N, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1989) Ontogeny of dopaminergic D-2 receptors in the rat nervous system: characterization and detailed autoradiographic mapping with [¹²⁵I]iodosulpride. *Neuroscience* 28:673-700.

Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H (1999) Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126:3915-3924.

Saucedo-Cardenas O., Quintana-Hau J.D., Le W.D., Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JP, Conneely OM. (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4013-4018.

Schambra UB, Duncan GE, Breese GR, Fornaretto MG, Caron MG, Fremeau RT, Jr. (1994) Ontogeny of D1A and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. *Neuroscience* 62:65-85.

Schinelli S, Zuddas A, Kopin IJ, Barker JL, di Porzio U. (1988). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine metabolism and 1-methyl-4-phenylpyridinium uptake in dissociated cell cultures from the embryonic mesencephalon. *J Neurochem.* 50(6):1900-1907

Schultz W. (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr. Opin. Neurobio* 17:191-197.

Sherwood P., Timiras (1970) A Stereotaxic atlas of the developing rat brain The University of California Press

Simeone A (2005) Genetic control of dopaminergic neuron differentiation. *Trends Neurosci.* 28:62-65.

SiuYi Leung D, Unsicker K, Reuss B (2001) Gap junctions modulate survival-promoting effects of fibroblast growth factor-2 on cultured midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 18:44-55.

Smidt MP, van Schaick HS, Lanctot C, Tremblay JJ, Cox JJ, van der Kleij AA, Wolterink G, Drouin J, Burbach JP (1997) A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13305-13310.

Smidt MP, Asbreuk CH, Cox JJ, Chen H, Johnson RL, Burbach JP (2000) A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nat Neurosci* 3:337-341.

Smits SM, Ponnio T, Conneely OM, Burbach JP, Smidt MP. (2003) Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 18(7):1731-1738.

Smidt MP, Smits SM, Burbach JP (2004) Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318:35-43.

Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 9(12):3273-3297.

Steel MC, Buckley NJ (1993) Differential regulation of muscarinic receptor mRNA levels in neuroblastoma cells by chronic agonist exposure: a comparative polymerase chain reaction study. *Mol Pharmacol* 43:694-701.

Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A (1996) The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384:129-134.

Studer L, Tabar V, McKay RD (1998) Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat. Neurosci* 1:290-295.

Suwelack D, Hurtado-Lorenzo A, Millan E, Gonzalez-Nicolini V, Wawrowsky K, Lowenstein PR, Castro MG. (2004) Neuronal expression of the transcription factor Gli1 using the Talpha1 alpha-tubulin promoter is neuroprotective in an experimental model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 11:1742-1752.

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA (2002) Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 418:892-897.

Takada M (1993) Widespread dopaminergic projections of the subparafascicular thalamic nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 32:301-309.

Tang YP, Noda Y, Nabeshima T (1997) Involvement of activation of dopaminergic neuronal system in learning and memory deficits associated with experimental mild traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 9: 1720-1727.

Temple S., Alvarez-Buylla (1999) A. stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol* 9:135-141.

The Gene Ontology Consortium (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25:25-29

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.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(9):5116-21.

- Vallone D., Picetti R., Borrelli E.** (1999) The involvement of dopamine in various physiological functions: from drug addiction to cell proliferation. In *Development of Dopaminergic Neurons* (Eds. di Porzio U., Perrone-Capano C. and Pernas Alonso R.), Neuroscience Intelligence Unit 4. R.G. Landes Company, Austin, 101-122.
- van den Munckhof P, Luk KC, Ste-Marie L, Montgomery J, Blanchet PJ, Sadikot AF, Drouin J.** (2003) Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development*. 130:2535-2542.
- Volpicelli F, Perrone-Capano C, Da Pozzo P, Colucci-D'Amato L, di Porzio U** (2004a) Modulation of *nurr1* gene expression in mesencephalic dopaminergic neurones. *J Neurochem* 88(5):1283-1294. Erratum in: *J Neurochem*. 2004 Jul;90(1):256.
- Volpicelli F., Consales C., Viggiano D., Caiazzo M., Colucci-D'Amato L., Perrone-Capano C., di Porzio U.** (2004b) Enhancement of dopaminergic differentiation in proliferating midbrain neuroblasts by Sonic hedgehog and ascorbic acid. *Neural Plast* 11(1-2):45-57.
- Von Euler U, Lishajko F,** (1957) Dopamine in mammalian lung and spleen. *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 6:295–303.
- Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B, Groenewegen HJ** (1988) The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25:857-887.
- Wagner, AF, Cirillo, VJ, Meisinger, MA, Ormond, RE, Kuehl Jr, FA, Brink, NG** (1966). A further study of catecholamine omicronmethylation in schizophrenia. *Nature* 211:604–605.
- Wagner J, Akerud P, Castro DS, Holm PC, Canals JM, Snyder EY, Perlmann T, Arenas E** (1999) Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in *Nurr1*-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* 17:653-659.
- Wallen A, Zetterstrom RH, Solomin L, Arvidsson M, Olson L, Perlmann T.** (1999) Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in *NURR1* mutant mice. *Exp Cell Res* 253(2):737-746.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS** (1995) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376:572-575.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS** (1998) Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system. *Cereb Cortex* 8(4):321-345.
- Wilson L, Maden M.** (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol.*;282:1-13.
- Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Prüß M, Reuter I, Schacherer F** (2000) TRANSFAC®: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* 28, 316-319.

Wong RO and Ghosh A (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* 3, 803-812.

Wurst W, Bally-Cuif L (2001) Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* 2:99-108.

Xing G, Zhang L, Zhang L, Heynen T, Li XL, Smith MA, Weiss SR, Feldman AN, Detera-Wadleigh S, Chuang DM, Post RM (1997) Rat *nurr1* is prominently expressed in perirhinal cortex, and differentially induced in the hippocampal dentate gyrus by electroconvulsive vs. kindled seizures. *Brain Res. Mol. Brain Res* 47:251-261.

Xu PY, Liang R, Jankovic J, Hunter C, Zeng YX, Ashizawa T, Lai D, Le WD (2002) Association of homozygous 7048G7049 variant in the intron six of *nurr1* gene with Parkinson's disease. *Neurology* 58:881-884.

Yan J, Studer L, McKay RD (2001) Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem* 76(1):307-311.

Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA, Rosenthal A (1998) FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93:755-766.

Yue Y, Widmer DA, Halladay AK, Cerretti DP, Wagner GC, Dreyer JL, Zhou R (1999) Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2. *J Neurosci* 19:2090-2101.

Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science* 276:248-250.

Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 374:640-643.

Zuch CL, David D, Ujhelyi L, Hudson JL, Gerhardt GA, Kaplan PL, Bickford PC.(2004) Beneficial effects of intraventricularly administered BMP-7 following a striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res.*1010:10-16.

Zuddas A, Vaglini F, Fornai F, Corsini GU (1990) Embryonic neural grafts induce recovery in mice with permanent striatal lesion. *Pharmacol Res* 22 Suppl 1:3-4.

Zuddas A, Corsini GU, Barker JL, Kopin IJ, Di Porzio U (1991) Specific Reinnervation of Lesioned Mouse Striatum by Grafted Mesencephalic Dopaminergic Neurons. *Eur J Neurosci* 3(1):72-85.

7. INDICE ABBREVIAZIONI

5-HT	Serotonina/Serotonergico
AA	Acido ascorbico
AADC	Decarbossilasi degli L-aminoacidi aromatici
Ad	Adulto
ADH2	Aldeide deidrogenasi 2
ADHD	Disturbo da deficit dell'attenzione ed iperattività afachico
AK	
A-P	Antero-posteriore
ATF3	Activating Transcription Factor 3
BBF	Blu di bromofenolo
BDNF	Fattore neurotrofico derivato dal cervello
bFGF	Fattore basico di crescita dei fibroblasti
cAMP	Adenosin-monofosfato-ciclico
COMT	Catecol-O-metil-transferasi
COPEB	Core Promoter Element-Binding Protein
CVT	Cervelletto
DA	Dopamina/Dopaminergico
DAR	Recettore della dopamina
DAT	Trasportatore ad alta affinità della dopamina
DMSO	dimetilsolfossido
DIV	Giorni in vitro
DOPAC	Acido acetico 3,4 diidrofenile
D-V	Dorso-ventrale
E	Giorno dello sviluppo embrionale
EAAT-1	Trasportatore neuronale del glutammato
EGF	Fattore di crescita epidermica
EGR1/2	Early Growth Response 1/2
EphB	Efrina B
ES	Cellule staminali embrionali
FBS	Siero fetale bovino
FGF4	Fattore di crescita dei fibroblasti 4
FGF8	Fattore di crescita dei fibroblasti 8
GAD	Decarbossilasi dell'acido glutammico
GDNF	Fattore neurotrofico derivato dalla glia
GFAP	Proteina fibrillare acida della glia
GFRα	Recettore della famiglia del GDNF
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositolo
GST	Glutazione S-trasferasi
H	ora
HPRT	Ipoxantin fosforibosil transferasi
HS	Siero di cavallo
HVA	Acido omovanillico
IPTG	Isopropil-B-Dthiogalactopiranoside
L-DOPA	L-3,4-diidrossifenilalanina
MAO	Monoammino ossidasi

MES	Mesencefalo/Mesencefalico
mesDA	Dopaminergici mesencefalici
MM	MisMach cell
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinico
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropirridina
NBM	Neural Basal medium
NET	Trasportatore della noradrenalina
NF	Neurofilamenti
NT	Neurotrofine
P	Postnatale
PBS	Fosfato di sodio
PD	Morbo di Parkinson
PKA	Proteina chinasi adenosinmonofosfato ciclico (cAMP)- dipendente
PTC	Patched
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RAE	Rat expression microarray
RARα	Retinoic Acid Receptor Alpha
RXR	Recettore per i retinoidi
SN	Substantia nigra
SHH	Sonic hedgehog
SHH-C	Frammento Carbossi terminale di SHH
SHH-N	Frammento ammino terminale di SHH
SMO	Smoothened
SNC	Sistema nervoso centrale
SNP	Sistema nervoso periferico
TA	Temperatura ambiente
TB	Tripan bleu
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCA	Acido tricloroacetico
TFBS	Trascription factor binding sites
TIEG	Transforming Growth Factor-Beta-Inducible Early Growth Response
TGF	Fattore di crescita delle cellule trasformanti
TH	Tirosina idrossilasi
TM	Transmembranari
TrpH	Triptofano idrossilasi
TTX	Tetratodossina
VMAT2	Trasportatore vescicolare delle monoamine 2
VTA	Area tegmentale ventrale

8. RINGRAZIAMENTI

Dopo ogni bella esperienza che finisce è doveroso fare dei ringraziamenti alle persone che da sempre hanno creduto nelle mie capacità.

Innanzitutto vorrei ringraziare il dottor Umberto di Porzio che mi ospita da 6 anni nel suo laboratorio e mi ha sempre guidato con grande disponibilità ed entusiasmo, la prof. Carla Perrone-Capano e il dottor Luca Colucci D'Amato per il loro contributo critico. Ringrazio Dario Greco per aver realizzato le analisi bioinformatiche riportate nella tesi. Inoltre un affettuoso ringraziamento va ai miei cari amici di lab. Damiana, Luigi, Massimiliano, Claudia, Antonello, Barbara, Paolo, Marianna, che in questi ultimi anni hanno condiviso con me questa "avventura". Ringrazio P.A Beachy (Baltimora, MD, USA) per le cellule trasformate con il frammento N-Terminale di SHH, la Developmental Studies Hybridoma Bank per gli anticorpi 5E1, Rat-401 e GAD-6 (Iowa City, IA, USA).

Infine, ma sicuramente per me di grande importanza, ringrazio i miei genitori, che mi hanno sempre confidato in me e mi hanno permesso di arrivare fin qui, mio marito che mi supporta moralmente e mi "sopporta" e le mie sorelline, che mi sono sempre state accanto.

Questo lavoro è stato supportato dai fondi CEE QLRT-2001-01000-GDNF, FIRB Neuroscience RBNE01WY7P e dal Programma Nazionale sulle cellule staminali dell'Istituto Superiore di Sanità.