



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in
BIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE

**Uso di cellule staminali embrionali per lo studio
in vitro dei meccanismi molecolari di
regionalizzazione della corteccia cerebrale.**

Tesi di Laurea di
Marco Terrigno

Relatore:

Prof. Federico Cremisi

Correlatori:

Prof. Robert Vignali

Prof.ssa Renata Batistoni

Anno Accademico 2012/2013

Indice

Introduzione	1
1.1 Sviluppo embrionale	1
1.2 Induzione neurale	3
1.3 Meccanismo molecolare d'induzione neurale: il ruolo dei fattori WNT	5
1.4 Regionalizzazione del Sistema Nervoso Centrale	8
1.5 Corticogenesi ed arealizzazione corticale	9
1.6 Differenziamento neurale delle cellule ES	13
1.7 La via di segnalazione di WNT	16
1.8 La via di segnalazione di FGF	18
1.9 Scopo della tesi	20
Materiali e metodi	21
2.1 Colture cellulari	21
2.2 Induzione neurale <i>in vitro</i>	22
2.3 Estrazione dell'RNA	24
2.4 Retrotrascrizione	25
2.5 Progettazione dei primers di PCR	26
2.6 RT-PCR semiquantitativa	27
2.7 Immunocitochimica	29

2.8	Microscopia ed analisi delle immagini	30
2.9	Estrazione e quantificazione proteica	31
2.10	Western Blot	32
2.11	Citometria di flusso	33
2.12	Analisi funzionale nei neuroni in coltura	33
2.13	Costruzione vettore lentivirale contenente la sequenza 3'UTR di COUP-TF1	35
2.14	Sequenziamento massivo parallelo dei microRNA (miRNA-seq) ed analisi dei dati	41
Risultati		43
3.1	Neurogenesi in piastra	43
3.2	L'inibizione della via di WNT promuove l'espressione di marcatori telencefalici	48
3.3	I neuroni rispondono al trattamento con FGF8 in maniera tem- poralmente specifica	52
3.4	Regolazione mediata da FGF8 della espressione di COUP-TF1 . . .	54
3.5	Effetto della segnalazione WNT sull'espressione di COUP-TF1 . . .	61
Discussione		64
4.1	Neuroni in piastra: seguendo la via del WNT	64
4.2	La segnalazione FGF8 esercita un effetto temporalmente specifico sul patterning neurale	68
4.3	Meccanismo di regolazione di COUP-TF1 da parte di FGF8	70
4.4	Regolazione a monte dell'espressione di COUP-TF1	74
4.5	Conclusioni	76
Ringraziamenti		77

Elenco delle figure

1.1	Induzione neurale	4
1.2	Neurulazione primaria	5
1.3	Effetto di BMP e WNT nell'induzione neurale anteriore	7
1.4	Sviluppo corticale	10
1.5	FGF e COUP-TF1 nel patterning corticale	12
1.6	WNT signalling	17
1.7	FGF signalling	19
2.1	Retta di regressione del kit MicroBCA™	31
2.2	Genome Browser: 3'UTR di COUP-TF1	35
2.3	Vettore lentivirale d'espressione pWPXLd	36
2.4	Profilo termico PCR clonaggio 3'UTR COUP-TF1	37
2.5	Vettore lentivirale d'espressione virCOUP.	38
2.6	Elettroforesi Colony PCR del vettore virCOUP	39
2.7	Digestioni di controllo del vettore virCOUP	39
2.8	Analisi citofluorimetrica di cellule ES trasdotte con virCOUP.	40
2.9	Neuroni trasdotti con virCOUP	41
3.1	Protocollo di differenziamento neuronale	44
3.2	Imaging Ca ²⁺ in neuroni generati in vitro da cellule ES	46
3.3	Analisi funzionale dei neuroni	47

3.4	Identificazione finestra di trattamento ed effetto dell'IWR-1-endo sul differenziamento delle cellule ES.	49
3.5	Caratterizzazione molecolare dei neuroni ottenuti mediante trattamento con Wi.	51
3.6	Effetto del trattamento con FGF8 su neuroni Wi ₂₋₃	53
3.7	Effetto del trattamento con FGF8 sull'espressione di COUP-TF1.	55
3.8	Regolazione post-trascrizionale di COUP-TF1.	57
3.9	Analisi dei dati di sequenziamento dei microRNA.	59
3.10	Effetto della segnalazione WNT sull'espressione di COUP-TF1.	62

Elenco delle tabelle

2.1	Composizione del mezzo di coltura 2i + LIF (<i>ES medium</i>)	22
2.2	Composizione del mezzo di coltura N ₂ B ₂₇	22
2.3	Composizione del mezzo di coltura Neurobasal B27	24
2.4	Composizione della mix di retrotrascrizione	26
2.5	Sequenze dei primers d'amplificazione	27
2.6	Composizione della mix di PCR	28
2.7	Ciclo termico della PCR	28
2.8	Anticorpi primari per immunocitochimica	29
2.9	Composizione RIPA Buffer	32
2.10	Anticorpi Western Blot	33
2.11	Componenti del brodo di coltura LB	37
2.12	Componenti mix di lipofezione delle cellule HEK 293T.	40

Sommario

Durante lo sviluppo della corteccia gradienti di morfogeni attraversano il neuroepitelio suddividendolo in distinti domini funzionali. L'informazione contenuta in tali gradienti è successivamente tradotta nell'attivazione di specifiche costellazioni di geni nella progenie postmitotica. Una classe di morfogeni particolarmente importante nel patterning corticale è quella dei fattori FGF. Infatti l'espressione di FGF8 in posizione mediale anteriore nel telencefalo di topo in via di sviluppo è necessaria per la corretta specificazione delle strutture corticali più rostrali. Anche COUP-TF1, un gene essenziale per la specificazione dell'identità corticale caudale, è espresso nel neuroepitelio neocorticale con un gradiente caudo-rostrale complementare a quello di FGF8. Inoltre l'espressione di questi due fattori è mutualmente regolata; pertanto diminuendo l'espressione dell'uno, l'altro risponde espandendo il proprio dominio d'espressione.

In questo lavoro abbiamo messo appunto un modello per lo studio in vitro del patterning corticale mediante utilizzo di neuroni ottenuti dal differenziamento di cellule staminali embrionali di topo. Abbiamo quindi utilizzato tale modello per caratterizzare il meccanismo di regolazione di COUP-TF1 da parte di FGF8. Abbiamo dimostrato come il trattamento tardivo con FGF8 determini una riduzione nell'espressione di COUP-TF1 senza alterare l'identità corticale dei neuroni generati. Inoltre tale repressione sembra essere mediata -almeno in parte- a livello post-trascrizionale, poiché l'overespressione della 3'UTR di COUP-TF1 scherma il trascritto endogeno dalla repressione traduzionale mediata da FGF8. Infine abbiamo identificato alcuni microRNA upregolati dal trattamento con FGF8 e possibili candidati come repressori traduzionali di COUP-TF1.

Introduzione

1.1 Sviluppo embrionale

Tutti gli embrioni dei vertebrati, sebbene possano apparire differenti, si sviluppano in maniera relativamente simile. Nei mammiferi, a partire da un ovocito fecondato, rapide divisioni mitotiche portano alla formazione di una blastula multicellulare; questa è costituita da due popolazioni cellulari distinte: le cellule esterne del *trofoectoderma* e quelle della *massa cellulare interna* (ICM). Mentre le prime danno origine a tessuti extra-embryonari, le cellule della ICM, composta da *epiblasto* ed *ipoblasto*, danno origine ai tessuti dell'embrione vero e proprio, al sacco vitellino ed ad altre componenti extra-embryonari (Gardner, 1983).

In particolare l'epiblasto, attraverso i movimenti morfogenetici e gli eventi di differenziazione della gastrulazione, genera tre foglietti embrionali: *ectoderma*, *mesoderma* ed *endoderma*. Da questi tre foglietti hanno origine i differenti tessuti dell'embrione. Perciò le cellule dell'epiblasto sono definite pluripotenti; ovvero possono differenziarsi in tutti i tipi cellulari del nuovo individuo.

Inoltre le cellule dell'epiblasto possono essere derivate dalla ICM e coltivate in vitro su uno strato di *fibroblasti murini inattivati* (MEF). Queste cellule, chiamate *cellule staminali embrionali* (ES), ritengono carattere pluripotente e sono in grado di proliferare estensivamente in vitro, senza mostrare fenomeni di senescenza e mantenendosi in uno stato indifferenziato (Evans e Kaufman, 1981;

Martin, 1981). Inoltre, se impiantate nuovamente all'interno di una blastocisti, partecipano alla formazione di tutti i tessuti, inclusa la linea germinale, e danno origine ad individui fertili (Bradley et al, 1984).

Tuttavia se coltivate in assenza di MEF queste cellule vanno incontro ad un progressivo processo di differenziamento; pertanto il mantenimento dello stato indifferenziato da parte delle ES è dipendente da segnali estrinseci. Infatti, come emerge da numerosi studi, il mantenimento della pluripotenza e del self-renewal è dipendente da fattori appartenenti alla famiglia delle BMP, *Bone Morphogenetic Protein*, (Ying et al., 2003) e WNT (Sato et al., 2004).

Inoltre le cellule ES coltivate in presenza della citochina LIF (*leukemia inhibitory factor*), attivatrice della via JAK/STAT3, e siero, contenente induttori delle proteine *inibitrici del differenziamento* (Id), mantengono il loro stato pluripotente ed indifferenziato anche in assenza di MEF (Ying et al., 2003). In aggiunta le cellule ES possono essere mantenute efficientemente in coltura in assenza di siero utilizzando due piccole molecole: *PD184352*, un inibitore della via di trasduzione del segnale a valle dei recettori tirosina-chinasi, e *CHIR99021*, un inibitore selettivo della glicogeno sintetasi chinasi 3 (GSK3), in combinazione con LIF (Ying et al., 2008).

Recentemente è stato chiarito come il mantenimento della pluripotenza nelle cellule staminali sia determinato da un circuito di autoregolazione imperniato sui geni Oct3/4, Sox2 e Nanog (Nichols et al., 1998; Mitsui et al., 2003; Masui et al., 2007). Questi tre geni, situati all'apice della gerarchia trascrizionale della staminalità, regolano cooperativamente l'espressione di diverse centinaia di geni implicati nella pluripotenza e nel differenziamento (Boyer LA et al., 2005). Inoltre Oct3/4 e Sox2 sono in grado di indurre la pluripotenza quando la loro espressione è artificialmente indotta in cellule differenziate (Takahashi e Yamanaka, 2006; Okita et al., 2007). Pertanto, secondo l'attuale modello, i fattori

necessari per il mantenimento della pluripotenza, come WNT e BMP, agirebbero promuovendo l'espressione dei geni della pluripotenza ed impedendo così alla cellula di proseguire la via del differenziamento.

1.2 Induzione neurale

Il complesso sistema nervoso dei vertebrati ha origine dall'ectoderma dorsale dell'embrione durante i movimenti morfogenetici della gastrulazione. Esperimenti condotti sugli anfibi hanno chiarito come il destino differenziativo di default dell'ectoderma dorsale sia di tipo neurale (Grunz e Tacke, 1989). Tuttavia è necessario che tale regione venga schermata da segnali induttivi che bloccano l'induzione neurale e ne promuovono il differenziamento in senso epidermico. Infatti osservazioni condotte su anfibi e pesci confermano come i fattori della famiglia delle *Bone Morphogenetic Proteins* sopprimano lo sviluppo neurale anteriore; viceversa l'abrogazione della loro attività promuove la specificazione neurale (Munoz-Sanjuan e Brivanlou, 2002). Pertanto l'ectoderma dorsale dell'embrione, protetto dalla segnalazione induttiva mediata dai fattori BMP, acquisisce identità neurale anteriore (Figura 1.1).

Successivamente gradienti di fattori posteriorizzanti suddividono il neuroectoderma in diverse aree lungo l'asse antero-posteriore: *encefalo anteriore* (comprendente telencefalo e diencefalo), *mesencefalo*, *romboencefalo* e *midollo spinale*. Inoltre tali fattori morfogenetici ad azione caudalizzante, responsabili della regionalizzazione iniziale del tubo neurale, inducono, in specifiche coordinate all'interno del neuroepitelio, la formazione di sorgenti locali di segnali induttivi. Questi organizzatori locali sono costituiti da popolazioni cellulari che modificano e rifiniscono la ripartizione iniziale. In tal modo al termine della gastrulazione nuovi domini di espressione genica sono stati definiti e suddividono l'epitelio neurale in

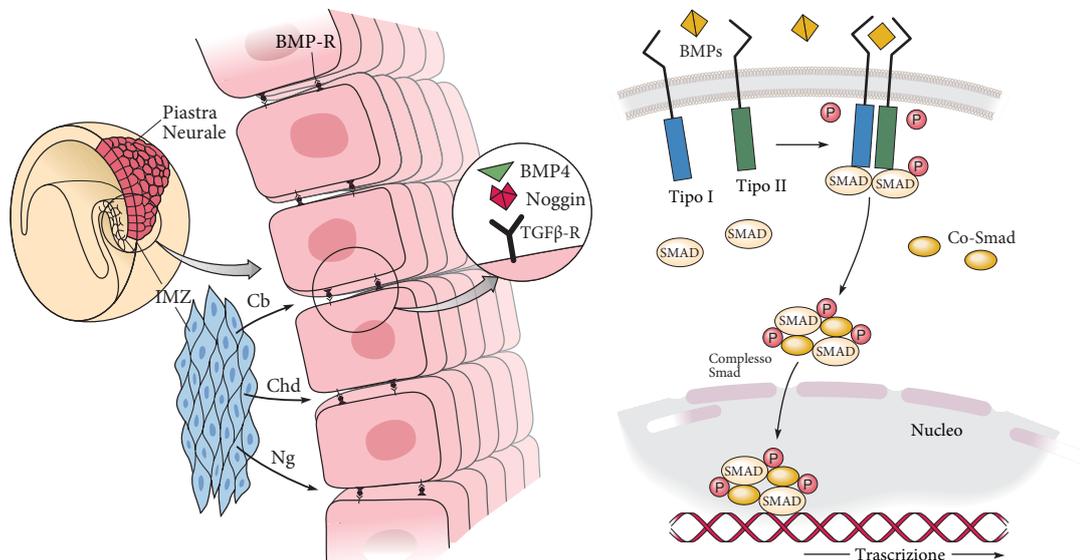


Figura 1.1: Induzione neurale

A sinistra, modello attuale d'induzione neurale in embrione d'anfibio. Durante la gastrulazione le cellule mesodermiche dell'*involuting marginal zone* (IMZ) secernono antagonisti della segnalazione BMP (*Noggin*, *Chordin*, *Cerberus* e *Follistatin*) che schermano l'ectoderma sovrastante, promuovendone l'acquisizione d'un destino neurale. A destra, rappresentazione della via di segnalazione di BMP. L'interazione del ligando con le due subunità del recettore TGFβ-R (Tipo I e II) promuove la dimerizzazione e l'attivazione del recettore tirosina-chinasi. Il recettore attivato fosforilla altre proteine (R-Smad) che, interagendo con cofattori (Co-Smad), formano un complesso proteico che migra nel nucleo e modula la trascrizione dei geni a valle. Abbreviazioni: Cb, *Cerberus*; Ng, *Noggin*; Chd, *Chordin*. (Sanes et al., 2011)

territori discreti che prefigurano le strutture del sistema nervoso maturo.

A gastrulazione avanzata le cellule disposte lungo la linea mediana della piastra neurale si approfondano all'interno dell'embrione formando un avvallamento chiamato *doccia neurale*. Contemporaneamente le cellule marginali della piastra neurale, disposte al confine fra l'epitelio neurale ed il restante ectoderma, formano le *pliche neurali*, sollevandosi e ripiegandosi verso la linea mediana (Smith e Schoenwolf, 1991; Alvarez e Schoenwolf, 1992). La seguente fusione delle pliche neurali porta alla trasformazione del neuroepitelio in un *tubo neurale* (Figura 1.2). Tale struttura tubolare, conformemente alla regionalizzazione iniziale, viene

progressivamente suddivisa in vescicole, le quali rappresentano i rudimenti delle principali suddivisioni funzionali del sistema nervoso centrale, mentre la cavità interna da origine al sistema ventricolare (Gilbert, 2010).

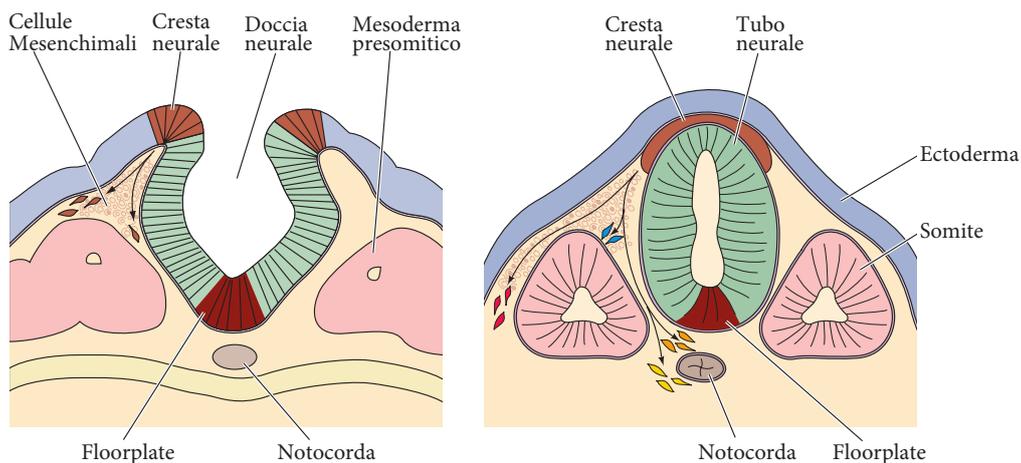


Figura 1.2: Neurulazione primaria

Durante la neurulazione le pliche neurali si sollevano e si fondono dorsalmente a formare il *tubo neurale*. Alla chiusura del tubo neurale, le cellule della *cresta neurale*, all'interfaccia fra ectoderma dorsale e neuroectoderma, si distaccano e formano numerose strutture del sistema nervoso periferico, fra le quali i gangli delle radici dorsali ed i gangli simpatici (Purves et al., 2004)

1.3 Meccanismo molecolare d'induzione neurale: il ruolo dei fattori WNT

I pionieristici esperimenti di trapianto sugli anfibi di Nieuwkoop hanno portato alla elaborazione dell'attuale modello per l'induzione neurale di *Attivazione e trasformazione*. Secondo tale modello, le cellule mesodermiche dell'*organizzatore* (chiamato *Organizzatore di Spemann* negli anfibi, *scudo* nei pesci e *nodo* in mammiferi ed uccelli) e dei suoi derivati (come il *mesoderma precordale* ed il *cordomesoderma*), migrando al di sotto dell'ectoderma dorsale dell'embrione durante la gastrulazione, secernono induttori molecolari (e.g. *Noggin*, *Cordin* e

Follistatin) e proteggono il neuroectoderma presuntivo dal differenziamento in senso epidermico (destino del restante ectoderma); Inoltre tali induttori, mediante l'attivazione di uno specifico programma genetico, promuovono l'acquisizione d'una identità neurale rostrale. Infatti il territorio neuroectodermico così definito esprime, in un primo momento, trascritti che, successivamente, risultano ristretti nella porzione più rostrale del sistema nervoso in via di sviluppo (encefalo anteriore e mesencefalo).

Pertanto, stando a questo modello, i segnali induttori dell'organizzatore impartiscono inizialmente all'ectoderma dorsale un'identità sia neurale che anteriore, ed è la successiva esposizione di tale territorio a fattori trasformanti (e.g. WNT, *Fibroblast growth factor* (FGF) ed *Acido Retinoico*), espressi dal cordomesoderma ad involuzione tardiva, a portare alla formazione delle strutture più caudali del sistema nervoso (Gilbert e Saxèn, 1993; Doniach e Musci, 1995; Nieuwkoop, 1997; Sasai e De Robertis, 1997).

Numerosi studi hanno inoltre dimostrato come l'effetto d'induzione neurale dell'organizzatore e dei suoi derivati si espliciti primariamente antagonizzando l'attività dei fattori appartenenti alla superfamiglia TGF β (di cui fanno parte i fattori *Activina/Nodal* e BMP) e WNT; quest'ultimi, in particolare, identificati per la loro capacità d'antagonizzare la formazione delle strutture neurali anteriori (Niehrs, 1999). Infatti è stato osservato come l'iniezione di antagonisti dei fattori BMP in posizione ventrale in un embrione di *Xenopus* in una fase precoce dello sviluppo sia in grado di indurre la formazione di assi corporei secondari privi di regioni cefaliche (solamente tronco e midollo spinale). Tuttavia la coiniezione di antagonisti WNT promuove la formazione di assi corporei secondari completi di strutture nervose ed organi di senso cefalici. Pertanto l'antagonismo dell'attività dei fattori BMP non è di per sé sufficiente per la formazione di assi corporei completi; infatti l'abrogazione dell'attività posteriorizzante dei fattori WNT risulta neces-

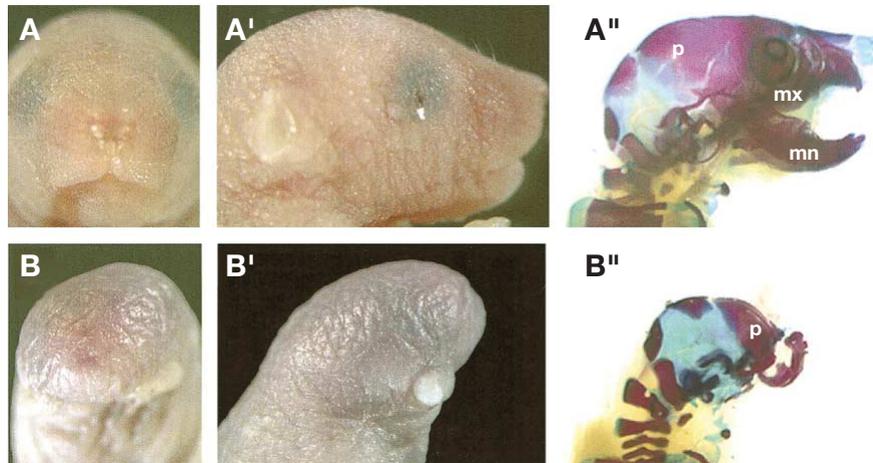


Figura 1.3: Effetto di BMP e WNT nell'induzione neurale anteriore

Dkkopf-1 (Dkk1) e *Noggin* (Ng) sono essenziali per la formazione delle strutture nervose rostrali. Topi i cui geni di Dkk1 e Ng sono stati sperimentalmente deleti mostrano severe malformazioni alle strutture cefaliche. Immagini frontali (A, B) e laterali (A' e B') di topi wild-type (A, A') e mutanti (B, B'). Nei preparati scheletrici a *destra* è possibile osservare una severa perdita d'osso mascellare (mx), mandibolare (mn) e d'ossa anteriori all'osso parietale (p) nell'animale mutante (B'') rispetto al wild-type (A'') (tratto da *Barrantes et al., 2003*)

saria per lo sviluppo delle regioni più rostrali del sistema nervoso (Glinka et al., 1997 - Figura 1.3).

Consistentemente con le distinte attività, tali inibitori sono differenzialmente espressi lungo l'asse antero-posteriore dei derivati dell'organizzatore; in particolare gli inibitori dei fattori WNT sono maggiormente espressi nella regione del mesoendoderma rostrale, in posizione sottostante alle regioni più anteriori della placca neurale (Harland e Gerhart, 1997; De Robertis et al., 2000; Kiecker e Niehrs, 2001). Inoltre nel topo, durante la gastrulazione, una popolazione di cellule extraembrionali migra rostralmente ad occupare la regione sottostante alla piastra neurale anteriore; tali cellule costituiscono l'*endoderma viscerale anteriore* (AVE), un'altra importante sorgente di antagonisti dei segnali caudalizzanti (Kimura et al., 2000; Perea-Gomez et al., 2001). Infatti l'obliterazione dell'AVE o l'abolizione della sua segnalazione in topi mutanti determinano il mancato sviluppo delle strutture rostrali del sistema nervoso (Stern, 2001).

1.4 Regionalizzazione del Sistema Nervoso Centrale

Studi sugli anfibi hanno permesso di chiarire la natura molecolare dei fattori responsabili della regionalizzazione precoce dell'epitelio neurale. Ad esempio cellule di *Xenopus* prelevate disaggregando frammenti del polo animale dell'embrione allo stadio di blastula, riaggregate e coltivate in vitro acquisiscono l'espressione di marker pan-neurali (come NCAM) e di encefalo anteriore (come Otx2 e FoxG1); inoltre il trattamento di queste cellule con WNT3a, RA e FGF2 induce attivazione di marker neurali più posteriori (come En2 e Krox20), espressi nell'embrione a livello del mesencefalo e del romboencefalo (Cox e Hemmati-Brivanlou 1995; McGrew et al., 1997).

Molti organizzatori locali sono stati identificati attraverso studi su anfibi e pesci. Si ritiene, ad esempio, che la regione anteriore della piastra neurale (ANB) e le regioni ad essa adiacenti siano sorgenti di segnali che promuovono l'espressione di geni telencefalici. In particolare TLC, un antagonista WNT membro della famiglia delle *Frizzle Related Protein* (sFRP), è espresso al confine anteriore della piastra neurale di *Zebrafish*. Inoltre l'abolizione della espressione di TLC, così come la rimozione dell'ANB, porta ad una ridotta o assente espressione di marker telencefalici; al contrario, il trapianto di cellule transgeniche esprimenti TLC nella piastra neurale anteriore di embrioni privi di ANB ripristina la normale identità telencefalica delle regioni rostrali. I risultati di tali studi sono inoltre corroborati dall'osservazione che l'attività di TLC può essere vicariata da altri antagonisti WNT (Houart et al. 2002). In aggiunta il fatto che i membri della famiglia sFRP risultino conservati fra le diverse specie e molti di essi siano espressi nella piastra neurale anteriore o nei sottostanti tessuti endodermici suggerisce un ruolo conservato di queste proteine ed una possibile cooperazione funzionale fra l'ANB

ed i tessuti endodermici sottostanti nel patterning neurale anteriore (Wilson e Houart, 2009).

Nonostante i fattori WNT giochino un ruolo centrale nella definizione del territorio telencefalico, essi non sono i soli fattori espressi dall'ANB, infatti anche i fattori FGF (in particolare FGF3 e FGF8) sono espressi nella regione rostrale del neuroepitelio. Inoltre evidenze sperimentali mostrano come la segnalazione mediata da FGF in tale regione, promossa dagli antagonisti WNT, sia sufficiente a ripristinare il fenotipo telencefalico in assenza dell'ANB (Shimamura e Rubenstein, 1997). Tuttavia la compromissione della segnalazione mediata dai fattori FGF non pregiudica la formazione del telencefalo in pesci e mammiferi; pertanto, tale segnalazione, sebbene sia sufficiente per l'induzione telencefalica, non sembra essere necessaria.

1.5 Corticogenesi ed arealizzazione corticale

La neocorteccia dei mammiferi è una struttura specializzata del telencefalo dorsale all'apice della gerarchia neurale delle funzioni di interpretazione, integrazione e processamento dell'informazione sensoriale e di pianificazione e controllo motorio. Tale struttura origina dal neuroepitelio anteriore dorsale del tubo neurale in via di sviluppo.

In una fase precoce dello sviluppo, i progenitori neurali costituiscono una popolazione cellulare omogenea, multipotente e connessa con la superficie ventricolare e piale del tubo neurale mediante processi citopasmatici che conferiscono loro una morfologia bipolare. Inizialmente i progenitori del tubo neurale anteriore proliferano estensivamente dividendosi in maniera prettamente simmetrica, dando cioè origine ad altri progenitori multipotenti ed espandendo così la superficie cerebrale. Con il passare del tempo le divisioni simmetriche rallentano ed i proge-

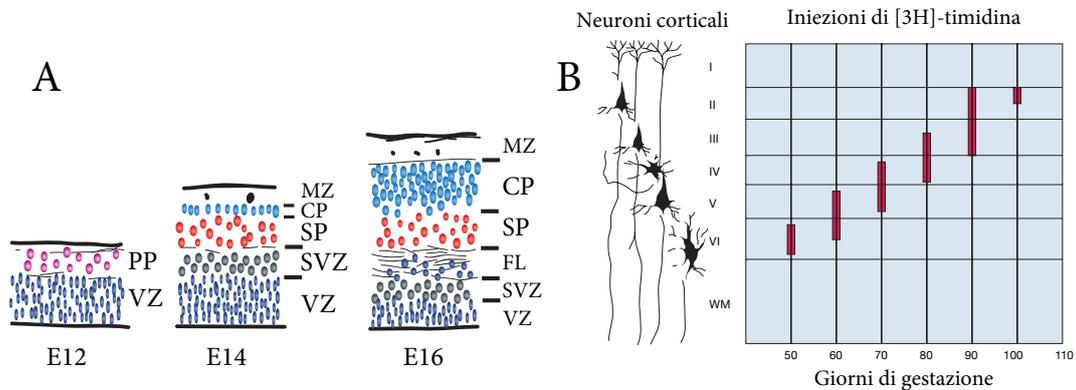


Figura 1.4: Sviluppo corticale

L'immagine a *sinistra* (A) rappresenta la corteccia di topo nelle prime fasi di sviluppo. Si può osservare come i primi neuroni della CP s'intercalino nella PP, suddividendola in MZ e SP. In una fase successiva dello sviluppo compaiono i progenitori intermedi della SVZ (tratto da *Dehay e Kennedy, 2007*). Nell'immagine a *destra* (B), studi di birth-dating mediante inoculo di [3H]-timidina in primate dimostrano un pattern inside-out di produzione dei differenti tipi neuronali della corteccia. In particolare, i neuroni di proiezione sotto-corticali e cortico-talamici degli strati profondi (V-VI) vengono generati prima dei neuroni di proiezione callosali ed intracorticali degli strati più superficiali (IV, III-II). Abbreviazioni: VZ, zona ventricolare; PP, pre-plate; SP, sub-plate; SVZ, zona sub-ventricolare. MZ, zona marginale; CP, piastra corticale; FL, layer delle fibre. (*Sanes et al., 2011*)

neuroni iniziano a dividersi in maniera asimmetrica, dando così origine ai differenti tipi di cellule della corteccia in via di sviluppo, secondo una sequenza temporale stereotipata ed evolutivamente conservata (Figura 1.4).

Nell'essere umano adulto la neocorteccia è composta da sei strati, i quali sono generati a tempi differenti durante lo sviluppo corticale e sono caratterizzati da tipi cellulari differenti, con diversa connettività e profili d'espressione genica. Inoltre la neocorteccia mostra una organizzazione modulare in gruppi verticali, all'interno dei quali le cellule neurali sono altamente interconnesse e funzionalmente correlate.

La neocorteccia risulta inoltre suddivisa in distinti domini funzionali, costituiti da gruppi di colonne cellulari che condividono una funzione comune. Questa arealizzazione della superficie corticale crea un mosaico di funzioni modulari, incluse aree deputate all'udito, alla vista e al controllo motorio. Sebbene la

suddivisione fine della corteccia possa differire nelle varie specie, la neocorteccia di tutti i mammiferi contiene tre regioni principali lungo l'asse antero posteriore: una regione rostrale deputata alla funzione motoria, una corteccia mediale delegata al processamento dell'informazione somatosensoriale ed una regione caudale per l'informazione di tipo visivo.

Studi recenti hanno dimostrato come la suddivisione della neocorteccia in regioni distinte sia assai precoce; infatti già nelle prime fasi di sviluppo gradienti d'espressione genica di differenti fattori di trascrizione, osservati lungo l'asse antero-posteriore del primordio corticale, potrebbero codificare la mappa neocorticale a livello di precursori neurali. In particolare il fattore di trascrizione Pax6 ha un gradiente d'espressione con livelli maggiori in posizione rostro-laterale e minori in posizione caudo-mediale, Emx2 mostra un gradiente d'espressione complementare caudo-mediale/rostro-laterale, mentre COUP-TF1 ha una espressione più elevata a livello caudo-laterale e più bassa a livello rostro-mediale. Inoltre esperimenti di eterotrapianto hanno confermato come i progenitori neurali divengano regionalmente specificati in una fase precoce dello sviluppo (Cohen-Tannoudji et al., 1994; Gitton et al., 1999; Gaillard et al., 1994). Pertanto, l'informazione codificata in gradienti d'espressione genica che attraversano il primordio corticale viene interpretata dai precursori neocorticali, insieme ad informazioni temporali, per generare la corretta progenie di cellule corticali.

Anche i fattori FGF, in aggiunta al loro ruolo precoce nell'induzione telencefalica, sono implicati nella polarizzazione del territorio neocorticale e promuovono l'acquisizione da parte dei progenitori telencefalici dorsali d'una identità corticale anteriore mediante mutua repressione con il fattore di trascrizione Emx2. Infatti presso la piastra commissurale, struttura posta anteriormente alla neocorteccia e formata dall'ANB in seguito alla chiusura dell'estremità anteriore del tubo neurale, permane una forte espressione di fattori FGF (FGF3,8,17,15 e 18). Inoltre

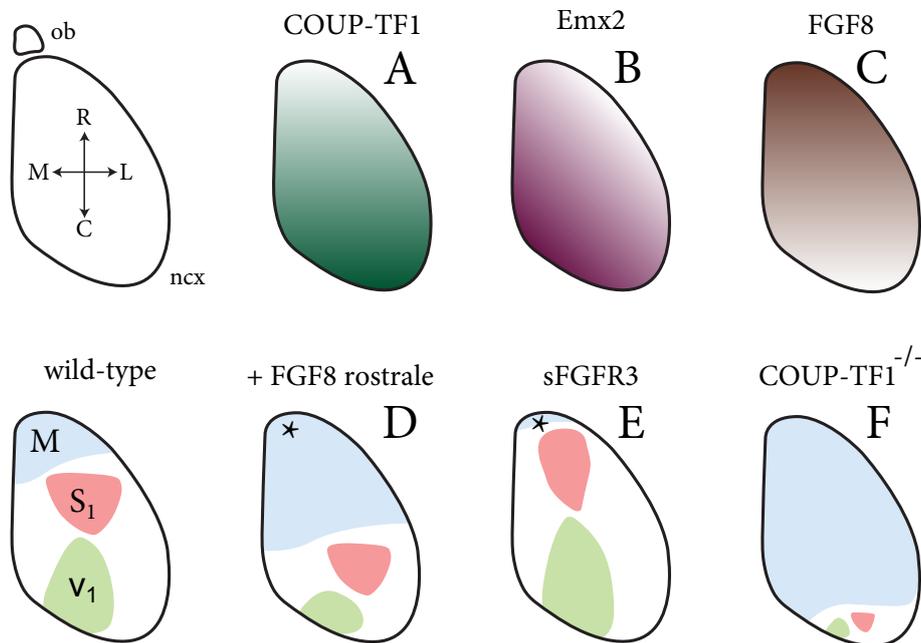


Figura 1.5: FGF e COUP-TF1 nel patterning corticale

Gradienti d'espressione di fattori di trascrizione e di morfogeni attraversano il primordio neocorticale. In *alto* sono mostrati i gradienti *caudo-rostrali* dei fattori posteriorizzanti COUP-TF1 ed Emx2 (A e B) ed il gradiente *antero-posteriore* del fattore rostrale FGF8 (C). In *basso* sono mostrati gli effetti del guadagno e della perdita di funzione di FGF8 (rispettivamente D e E) e dell'ablazione genetica di COUP-TF1 (F) sull'arealizzazione corticale. Abbreviazioni: ob, bulbo olfattivo; ncx, neocorteccia; M, corteccia motoria primaria; S₁, corteccia somato-sensoriale primaria; V₁, corteccia visiva primaria; sFGFR3, forma solubile del recettore FGFR3 (decoy). (tratto da Sansom e Livesey, 2009)

numerose evidenze sperimentali, raccolte da Fukuki-Shimogori e Grove (2001), indicano come l'over-espressione di FGF8, mediante elettroporazione nella regione anteriore della neocorteccia d'embrione di topo, causi una espansione delle aree rostrali della neocorteccia a scapito di quelle posteriori; viceversa l'elettroporazione di un antagonista di FGF8 risulta in un restringimento delle regioni rostrali. Ancora più sorprendentemente, l'attivazione ectopica di FGF8 al polo posteriore della neocorteccia di topo provoca una duplicazione speculare delle aree somatosensoriali più anteriori.

Così come la segnalazione di FGF è essenziale per la corretta specificazione delle regioni più rostrali della neocorteccia, l'espressione di COUP-TF1 è fondamen-

tale per promuoverne l'identità caudale. Infatti la delezione genetica di COUP-TF1 porta ad una ridotta rappresentazione delle aree visive e somatosensoriali posteriori nella mappa corticale (Armentano et al. 2007 - Figura 1.5). In aggiunta, differenti osservazioni sperimentali indicano l'esistenza di una regolazione reciproca fra la segnalazione FGF e l'espressione di COUP-TF1. In particolare, l'over-espressione di FGF8 risulta in una contrazione del dominio di espressione di COUP-TF1; viceversa l'over espressione di COUP-TF1 riduce i livelli di attivazione della via di trasduzione del segnale delle MAP-chinasi, attivata della segnalazione FGF (Faedo et al. 2008). Pertanto questa reciproca inibizione suggerisce un meccanismo per la formazione del gradiente antero-posteriore d'espressione di COUP-TF1 ed un destino di default per i progenitori corticali di tipo caudale. Quest'ultima ipotesi, inoltre, sembra trovare conferma nell'espressione di COUP-TF1 da parte di cellule corticali ottenute dalla differenziazione in vitro di cellule staminali murine (Gaspard et al., 2008).

Pertanto, secondo l'attuale modello, un meccanismo di inter-regolazione definisce a livello dei precursori neocorticali gradienti di morfogeni e fattori di trascrizione; tali gradienti vengono tradotti nei distinti domini d'espressione genica della piastra corticale in via di sviluppo, i quali vengono successivamente interpretati per generare i confini fra le differenti aree della neocorteccia.

1.6 Differenziamento neurale delle cellule ES

Nell'ultimo decennio numerosi studi hanno mostrato l'immenso potenziale delle cellule staminali embrionali, indirizzandone il differenziamento verso differenti tipi cellulari. In particolare un consistente impegno è stato investito nello sviluppo di strategie per ottenere differenti sottotipi di neuroni e cellule gliali a partire da cellule staminali. Questo sforzo ha consentito di sviluppare nuovi modelli per lo

studio in vitro di differenti patologie associate al sistema nervoso.

Uno studio particolarmente importante, condotto da Ying e collaboratori (2003), ha dimostrato come la conversione in cultura delle cellule staminali murine in neuroni non richieda fattori estrinseci, ma sia promossa da fattori FGF autocrini e possa essere favorita seminando un monostrato aderente di cellule staminali in mezzo di cultura minimo chimicamente definito (CDMM), privo di fattori di crescita che ne devierebbero il differenziamento verso altri destini.

Successivamente l'utilizzo di mezzi di cultura chimicamente definiti ha reso possibile l'identificazione dei fattori in grado di indirizzare le cellule staminali verso il differenziamento neurale e di influenzarne l'identità antero-posteriore (A/P) e dorso-ventrale (D/V). Tra questi fattori sono stati descritti l'acido retinoico, BMPs, WNT, FGFs e Sonic Hedgehog (SHH) (Chatzi et al., 2011; Eiraku et al., 2008; Gaspard e Vanderhaeghen, 2010; Hendrick et al., 2009; Li et al., 2009; Watanabe et al., 2005). In particolare la soppressione della segnalazione BMP autologa è in grado di influenzare l'identità posizionale dei neuroni generati da cellule staminali in CDMM, promuovendone l'acquisizione di un profilo di espressione telencefalico dorsale (Bertacchi et al., 2013); mentre il differenziamento delle cellule staminali in CDMM addizionato con fattori WNT genera neuroni che esprimono marcatori neurali posteriori (Hendrickx et al., 2009). Inoltre il trattamento con inibitori dei fattori BMP e TGF β /Activina (rispettivamente Noggin e SB431542), ha suggerito che le cellule staminali embrionali umane producano in vitro tali fattori e che questi possono inibire il differenziamento neurale (Chambers et al., 2009).

Un metodo particolarmente versatile per differenziare cellule staminali murine in differenti tipi di neuroni è stato sviluppato da Sasai e collaboratori. In questo protocollo cellule staminali murine vengono lasciate differenziare in mezzo privo di siero sotto forma di aggregati cellulari sferici in sospensione (SFREBq).

Gli SFREBq si organizzano rapidamente e spontaneamente in un neuroepitelio polarizzato, il quale successivamente origina rosette neurali e va incontro a neurogenesi. Una cospicua frazione delle cellule neurali così ottenute esprime marker telencefalici dorsali come FoxG1 ed Emx1. Inoltre, il trattamento con inibitori di WNT e Nodal/Activina, durante le fasi precoci d'aggregazione, promuove l'acquisizione di una identità rostrale. In aggiunta, nelle colture anteriorizzate, la produzione sequenziale di tipi neuronali differenti ricapitola il processo di istogenesi corticale in vivo; la genesi di cellule Reelin⁺ del primo strato precede la comparsa dei neuroni di proiezione sottocorticali (Tbr1⁺ e Ctip2⁺) e callosali (Brn2⁺ e SatB2⁺). Infine, la manipolazione di queste cellule con FGF, WNT e BMP è in grado promuovere l'acquisizione di identità regionali differenti, inducendo geni esclusivamente espressi in specifiche regioni della neocorteccia (Eiraku et al., 2008).

Un protocollo di differenziamento che si distingue per la sua semplicità è stato proposto dal gruppo di Vanderhaeghen. In questo protocollo le cellule staminali murine sono seminate in piastra a densità molto bassa e lasciate differenziare in mezzo minimo. I neuroni ottenuti mostrano una consistente segnalazione endogena di SHH, esprimono marcatori telencefalici ventrali e sono di tipo GABAergico. Tuttavia il trattamento con antagonisti di SHH sopprime l'acquisizione di identità ventrale e permette di ottenere neuroni piramidali glutammatergici esprimenti marcatori corticali (Reelin, Tbr1, Ctip2 e SatB2). Inoltre il fatto che una consistente frazione delle cellule ottenute con questo protocollo esprima COUP-TF1 suggerisce che le cellule corticali possano acquisire identità regionale specifica in assenza di segnali induttivi intracorticali od extracorticali. (Gaspard et al., 2009).

1.7 La via di segnalazione di WNT

La via canonica di segnalazione mediata dai fattori WNT è determinata dalla stabilizzazione e dall'accumulo della β -catenina citosolica. In effetti in assenza della segnalazione WNT un complesso multiproteico composto dai fattori Adenomatous Polyposis Coli (APC), Casein Chinasi (CK1 α) ed Axin promuove la fosforillazione all'N-terminale della β -catenina da parte della glicogeno sintetasi chinasi 3 (GSK-3 β) e ne determina la degradazione ubiquitina-mediata.

L'interazione del ligando WNT con il recettore transmembrana Frizzle ed il suo corecettore LRP inibisce il meccanismo di degradazione e promuove l'accumulo della β -catenina. La β -catenina nucleare interagisce quindi con i fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia dei fattori TCF/LEF attivando l'espressione di specifici geni (Figura 1.6)

Numerosi studi hanno chiarito come, in una fase precoce dello sviluppo del sistema nervoso, la segnalazione WNT agisca come fattore posteriorizzante e debba essere abolita per consentire lo sviluppo delle strutture nervose rostrali (Mukhopadhyay et al., 2001; Glinka et al., 1997). Inoltre, negli anfibi, l'attivazione della segnalazione di WNT è in grado di agire in sinergia con induttori neurali come *Chordin* e *Follistatin* imponendo una identità caudale al tessuto nervoso e reprimendo l'espressione dei marcatori neurali più anteriori (Mc Grew et al., 1995; Mc Grew et al., 1997). In aggiunta, in *Zebrafish*, l'espressione di antagonisti della segnalazione WNT nella regione anteriore della piastra neurale è necessaria per la corretta specificazione del territorio telencefalico (Houart et al. 2002). Consistentemente con quanto osservato in anfibi e pesci, anche nei mammiferi l'abolizione della segnalazione WNT, mediata da antagonisti WNT secreti dall'endoderma viscerale anteriore (AVE), è necessaria per lo sviluppo delle strutture nervose più rostrali (Stern, 2001). Pertanto, un gradiente di segnalazione WNT partecipa alla regionalizzazione A/P iniziale del sistema nervoso in via di svi-

luppo, come un fattore trasformante ad azione posteriorizzante del modello di Nieuwkoop (Niehrs et al., 1999; Kiecker e Niehrs, 2001).

Inoltre, durante lo sviluppo del telencefalo, differenti fattori WNT sono espressi a livello della regione caudomediale del “*cortical hem*”. Si ritiene che l’hem funga da centro organizzatore secondario per la formazione delle strutture dorsali della corteccia. Evidenze sperimentali indicano come la perdita di WNT3a determini la scomparsa della struttura caudo-mediale dell’ippocampo (Lee SM et al., 2000); mentre l’attivazione costitutiva della β -catenina determina l’espansione delle strutture dorsali della corteccia a scapito dei nuclei telencefalici ventrali (Backman M et al., 2005).

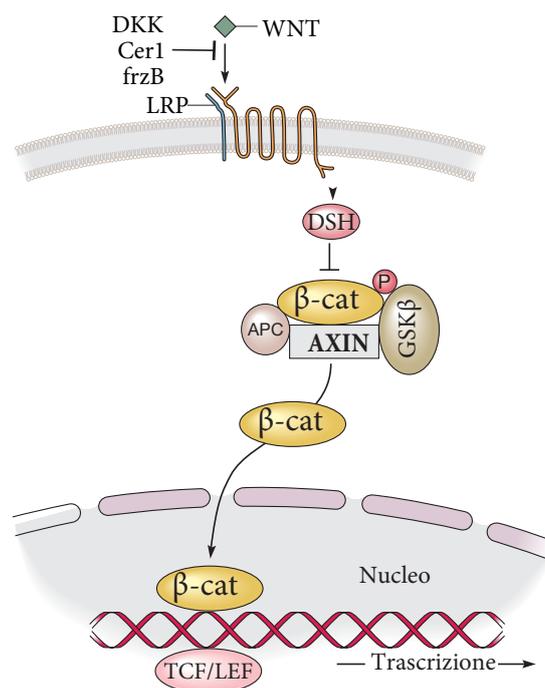


Figura 1.6: WNT signalling

Via di trasduzione del segnale a valle della segnalazione WNT. L’interazione di WNT con il recettore Frizzled attiva DSH e stabilizza la β -catenina. L’inibitore sintetico IWR-1-endo stabilizza AXIN2 e promuove la degradazione della β -catenina, silenziando così la via di WNT/ β -cat. Il CHIR99021, invece, inibisce la GSK3 β , agendo dunque come un’agonista del WNT signalling. Abbreviazioni: DSH, Dishevelled; β -cat, β -catenina; GSK3 β , Glicogeno sintasi chinasi 3 β ; APC, Adenomatous polyposis coli; Cer, Cerberus; DKK, Dikkopf; FrzB, Frizzled-related protein. (Sanes et al., 2011)

1.8 La via di segnalazione di FGF

I fattori FGF sono una famiglia di 22 polipeptidi la cui attività è mediata da recettori tirosina chinasi ad alta affinità (FGFR1-4). La segnalazione dei fattori FGF è implicata nella regolazione dei fenomeni di proliferazione, differenziazione e migrazione cellulare. L'interazione del ligando FGF induce la dimerizzazione delle due subunità del recettore, la cui successiva autofosforillazione attiva la cascata di trasduzione del segnale (Figura 1.7). L'attivazione della via delle MAP chinasi (MapK) è il principale meccanismo tramite il quale la segnalazione FGF esercita il proprio controllo sulla proliferazione e sulla regolazione dei geni a valle. Inoltre l'attività prosurvival e promitotica dei fattori FGF è mediata dalla attivazione della Akt mediata dalla fosfatidilinositolo chinasi 3 (PI3K). Infine parte della via di trasduzione del segnale a valle dei recettori FGF è a carico della fosfolipasi C, la quale induce un aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} e l'attivazione della proteina chinasi C (PKC).

L'attività dei fattori FGF nell'encefalo anteriore dell'embrione di mammifero è mediata principalmente da tre recettori (FGFR1-3), con attività differenti e responsività selettiva verso i vari ligandi. Evidenze sperimentali mostrano come la perdita di espressione del recettore FGFR1 nel telencefalo in via di sviluppo porti alla scomparsa della regione telencefalica rostrale del bulbo olfattivo (Herbet et al., 2003; Herbert e Fishell 2008). Inoltre FGFR3 è espresso con gradiente caudo-rostrale nei progenitori neurali del primordio corticale (zona ventricolare e subventricolare), mentre viene spento nei neuroni corticali postmitotici. Sembra inoltre che l'espressione di FGFR3 sia posta sotto il controllo di altri fattori espressi a gradiente nella corteccia embrionale: FGF8 e Pax6 reprimono l'espressione di FGFR3, mentre Emx2 e COUP-TF1 la promuovono (Fukuchi-Shimogori e Grove 2003; Muzio et al., 2002; Feudo et al., 2008).

La specificazione regionale del telencefalo rostrale è mediata dai fattori FGF8

e FGF17 espressi nella commissura anteriore. Questi fattori promuovono l'espressione dei fattori di trascrizione espressi anteriormente *Spry2*, *Six3*, *Sp8* e di differenti proteine ETS, mentre reprimono l'espressione di induttori caudali come COUP-TF1 ed *Emx2*. Attività opposta mostra invece FGF15 (espresso con gradiente simile ad FGF8), il quale promuove l'espressione di COUP-TF1 e reprime l'espressione di *Sp8*.

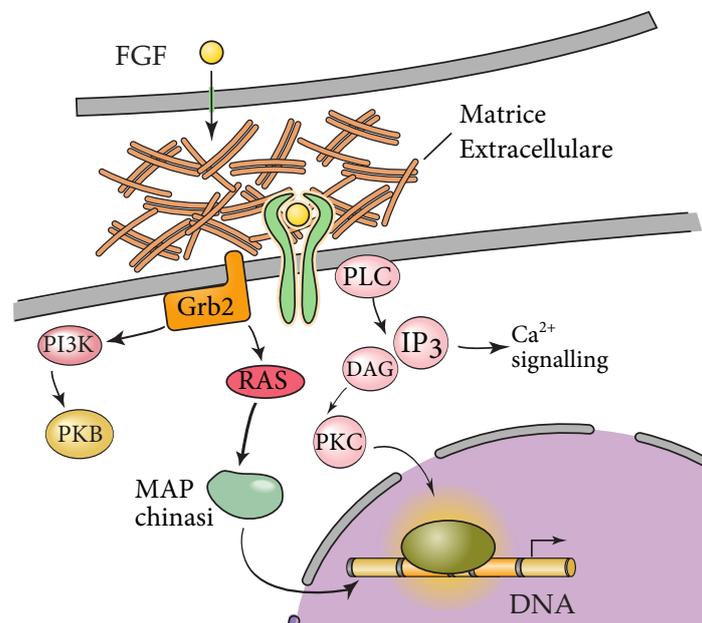


Figura 1.7: FGF signalling

Rappresentazione schematica della via di trasduzione del segnale a valle dei recettori FGF. Alla autofosforillazione del recettore FGFR segue la fosforillazione della proteina FRS2. FRS2, interagendo con la proteina adattatrice Grb2, recluta la proteina scambiatrice di nucleotidi SOS (*Son of sevenless*). Il complesso Grb2/SOS attiva quindi RAS, una proteina legante GTP, la quale innesca una cascata d'eventi di fosforillazione che porta infine alla attivazione di MAPK ERK. MAP, una serina/treonina chinasi, fosforilla numerosi fattori di trascrizione. Fra i target a valle della via MAPK ci sono i fattori *helix-loop-helix* ETS, noti mediatori degli effetti della segnalazione FGF sull'espressione genica. Inoltre, la proteina Grb2 può attivare la PI3K. Il più importante mediatore della via della PI3K è la serina/treonina chinasi PKB/Akt, la quale regola la proliferazione cellulare e la sopravvivenza. Infine, la segnalazione FGF può portare alla attivazione della PLC γ , la quale idrolizza il PIP $_2$ a IP $_3$ e DAG. Il DAG attiva la proteina chinasi PKC, mentre il IP $_3$ stimola il rilascio di Ca $^{2+}$ dai depositi intracitoplasmatici. Abbreviazioni: Grb2, Growth factor receptor-bound protein 2; IP $_3$, Inositolo trifosfato; DAG, diacil glicerolo; PI3K, Fosfoinositide 3-chinasi; PIP $_2$, Fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato; PLC γ , fosfolipasi C γ ; PKB, proteina chinasi B; PKC, proteina chinasi C; (adattato da *Purves et al., 2004*)

1.9 Scopo della tesi

Esperimenti condotti su anfibi e mammiferi hanno chiarito come l'inibizione della segnalazione WNT sia necessaria nelle prime fasi di sviluppo per la formazione delle strutture rostrali del sistema nervoso.

Inoltre gradienti di fattori WNT, BMP, FGF e SHH definiscono gli assi antero-posteriore e dorso-ventrale nel sistema nervoso in via di sviluppo e partecipano alla suddivisione fine della lamina neuroepiteliale in regioni prefiguranti le strutture del sistema nervoso adulto.

E' stato infatti osservato come le differenti aree della neocorteccia originino da una suddivisione precoce del neuroepitelio corticale in distinte regioni ad opera di gradienti di fattori di trascrizione e di morfogeni.

Questi fattori instaurano un circuito di mutua regolazione che ulteriormente raffina i confini di distinti domini d'espressione genica, i quali infine acquisiscono identità regionale specifica.

Ad esempio numerose evidenze sperimentali suggeriscono come l'FGF8, espresso nella midline anteriore della piastra neurale, promuova l'acquisizione di una identità rostrale mediante mutua inibizione con il fattore di trascrizione COUP-TF1, il quale specifica invece una identità neocorticale caudale.

Scopo della tesi è in primo luogo la messa a punto di un modello in vitro per la caratterizzazione molecolare della regolazione di COUP-TF1 nella neurogenesi; quindi, lo studio dell'effetto del FGF8 sull'espressione di COUP-TF1 in neuroni ottenuti in vitro da cellule ES.