



UNIVERSITA' DI PISA

Tesi di Laurea Magistrale
in Biologia Molecolare e Cellulare

**Caratterizzazione della linea knock-in di topo
FloxedTph2 come modello per indagare il ruolo
della serotonina nel Sistema Nervoso Centrale**

Candidato: Marta Pratelli

Relatore: Prof. Massimo Pasqualetti

INDICE

RIASSUNTO	I
ABSTRACT	V
INTRODUZIONE	1
1.1 Sintesi e metabolismo della serotonina	1
1.2 Distribuzione e funzioni della serotonina	3
1.3 Anatomia del sistema serotoninergico centrale	6
1.4 Sviluppo del sistema serotoninergico	8
1.5 La serotonina nello sviluppo	11
1.6 Il gene <i>Tph2</i>	15
1.7 La genetica molecolare nel topo ed il suo impiego come animale modello	21
1.8 Generazione dell'allele <i>FloxedTph2</i> ^(FRT-neo-FRT) e della linea <i>FloxedTph2</i> ^(FRT-neo-FRT)	29
1.9 Scopo della tesi ed approccio sperimentale	31
MATERIALI E METODI	35
2.1 Animali	35
2.2 Genotipizzazione	35
2.3 Prelievo embrioni	36
2.4 Estrazione DNA dal sacco vitellino	37
2.5 Preparazione dei tessuti per esperimenti di immunoistochimica	38
2.6 Immunoistochimica in fluorescenza	38

2.7 Immunoistochimica con rivelazione in DAB e sistema di amplificazione “ABC-Kit” “Vectastain”	39
2.8 Acquisizione ed elaborazione delle immagini	40
2.9 Estrazione RNA totale	40
2.10 RT-PCR	41
2.11 PCR “esone-specifica”	42
2.12 Somministrazione dei farmaci	43
RISULTATI	45
3.1 Generazione di topi mutanti <i>Tph2Null</i> -/-	45
3.2 Caratterizzazione del <i>locus Tph2</i> negli alleli <i>Tph2Null</i> , <i>FloxedTph2</i> e <i>FloxedTph2</i> ^(FRT-neo-FRT)	47
3.3 Analisi dell'attività residua di Tph2 nei nuclei del <i>raphe</i> di animali <i>Tph2Null</i> -/-	52
3.4 Due distinte isoforme di mRNA del gene <i>Tph2</i> nel <i>raphe</i> di animali <i>Tph2Null</i> -/-	57
3.5 Analisi dell'attività residua di Tph2 nei nuclei del <i>raphe</i> di animali <i>Tph2Null</i> ^(FRT-neo-FRT) -/-	61
3.6 Analisi dell'attività residua di Tph2 nei nuclei del <i>raphe</i> di animali trans eterozigoti <i>Tph2Null/Tph2::eGFP</i> ^(FRT) +/- +/-	62
3.7 Analisi dello sviluppo dell'innervazione serotoninergica in topi <i>Tph2Null/Tph2::eGFP</i> ^(FRT) +/- +/-	64
3.8 Deplezione di 5-HT in maniera tempo-specifica a seguito di somministrazione di Tamoxifen in animali <i>FloxedTph2</i>	66
3.9 Analisi dell'innervazione serotoninergica in topi depleti di serotonina in età adulta	69

DISCUSSIONE	71
4.1 La rimozione del terzo esone del gene <i>Tph2</i> risulta in una drastica riduzione della sintesi di serotonina, ma non nella sua totale abrogazione	71
4.2 Difetti di crescita e alto tasso di mortalità perinatale nei mutanti <i>Tph2Null</i> -/-	73
4.3 Un'isoforma di splicing alternativo del trascritto del gene <i>Tph2Null</i> potrebbe essere responsabile della produzione di una proteina Triptofano Idrossilasi 2 con attività enzimatica residua	74
4.4 Analisi dell'effetto della cassetta PGK-neo	77
4.5 La riduzione della quantità di serotonina in seguito all'excisione del terzo esone del gene <i>Tph2</i> , risulta in un aumento delle fibre serotoninergiche a livello dell'ippocampo	78
4.6 La linea murina <i>FloxedTph2/Tph2::eGFP</i> +/- +/- può essere sfruttata per indurre temporalmente una riduzione della quantità di serotonina sintetizzata a livello dei neuroni del <i>raphe</i>	81
CONCLUSIONI	83
PROSPETTIVE FUTURE	85
RINGRAZIAMENTI	86
BIBLIOGRAFIA	87

RIASSUNTO

La serotonina, 5-idrossitriptamina (5-HT), è un neurotrasmettitore monoaminergico con una vasta distribuzione sia nei tessuti periferici che nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) dei mammiferi. A livello del SNC i neuroni che sintetizzano la serotonina si originano precocemente durante lo sviluppo embrionale, 11 giorni di gestazione (days post coitum, dpc) nel topo, e vanno a costituire i nuclei del *raphe*. Nonostante il loro esiguo numero rispetto ai neuroni totali presenti nel cervello, i neuroni serotoninergici innervano l'intero SNC. In questi neuroni la serotonina è sintetizzata a partire dall'L-triptofano, grazie all'attività catalitica della triptofano idrossilasi 2 (Tph2), enzima limitante per la sintesi di 5-HT. In linea con la vasta distribuzione delle innervazioni serotoninergiche, la 5-HT è implicata nella regolazione di numerosi processi fisiologici come sonno, umore, stress, appetito e comportamento sessuale.

Evidenze sperimentali sempre più numerose, tra cui l'importanza dell'apporto di 5-HT materna per il corretto sviluppo embrionale e la comparsa precoce dei recettori per la serotonina nell'embrione, corroborano l'ipotesi che la serotonina, ancora prima di svolgere la sua funzione di neurotrasmettitore, sia implicata nella regolazione di specifici processi durante lo sviluppo del SNC. In aggiunta molti dati suggeriscono che alterazioni della neurotrasmissione serotoninergica potrebbero essere alla base di patologie neuropsichiatriche con origine nello sviluppo come schizofrenia, autismo, disturbi emotivi, ansia, depressione e ritardo mentale. Grazie a modelli animali in cui la neurotrasmissione serotoninergica è alterata, è stato possibile osservare come il mantenimento dell'omeostasi della serotonina durante lo sviluppo embrionale sia essenziale per la corretta costituzione dei circuiti neuronali. Ad esempio, la generazione, nel nostro laboratorio, di una linea di topo knock-in (KI) *Tph2::eGFP*

(Enhanced Green Fluorescent Protein), in cui la sintesi di 5-HT cerebrale è abrogata, ha permesso di dimostrare che la serotonina è necessaria per il corretto sviluppo delle fibre serotonergiche.

Al fine di dissezionare il ruolo della serotonina in distinte finestre temporali durante lo sviluppo del SNC e durante la vita adulta, nel nostro laboratorio è stata recentemente generata una linea knock-out (KO) condizionale per il gene *Tph2*, in cui il terzo esone di *Tph2* è posto tra due siti *loxP* (*FloxedTph2*). Pertanto, incrociando questa linea con linee di topo che esprimono la ricombinasi *Cre* in maniera tempo- e spazio-specifica, è teoricamente possibile promuovere l'escissione del terzo esone che, in quanto composto da un numero di basi non multiplo di tre, causa la perdita della cornice di lettura del trascritto del gene *Tph2* e la produzione di una proteina priva del dominio catalitico.

Durante il mio internato di tesi, mi sono occupata della caratterizzazione della linea *FloxedTph2* per verificare che possieda i requisiti necessari per essere utilizzata in esperimenti di knock-out (KO) condizionale. Per effettuare questo tipo di analisi ho incrociato topi *FloxedTph2* con topi che esprimono la ricombinasi *Cre* sotto il controllo di un promotore ubiquitario ottenendo una linea, che è stata denominata "*Tph2Null*", in cui il terzo esone di *Tph2* è stato rimosso.

I mutanti *Tph2Null* mostrano, rispetto ai wild-type (wt) ed ai *Tph2Null* +/-, un'aumentata mortalità nelle prime due settimane di vita, ed una visibile riduzione del tasso di crescita; questi aspetti del fenotipo sono in linea con quanto osservato in animali depleti di serotonina nel SNC.

Esperimenti di immunistochemicali condotti su topi *Tph2Null* -/- hanno mostrato che la rimozione del terzo esone del gene *Tph2* risulta in una drastica riduzione della quantità di serotonina sintetizzata dai neuroni del *raphe*, nonostante un'analisi approfondita riveli la presenza di un esiguo quantitativo di 5-HT residua. Questo potrebbe essere spiegato ammettendo la presenza di un enzima *Tph2*, la cui attività catalitica sia estremamente ridotta ma non totalmente abrogata. Al fine

di indagare questa ipotesi i trascritti del gene *Tph2* presenti nel *raphe* di topi *Tph2Null* $-/-$ sono stati analizzati mediante un approccio di RT-PCR e successiva analisi di sequenza. È stata così rilevata la presenza di un'isoforma di splicing del trascritto del gene *Tph2*, priva sia del terzo sia del quarto esone (*Tph2* Δ 3 Δ 4), la quale potrebbe codificare per una proteina Tph2 con attività catalitica residua.

Al fine di mettere in evidenza le fibre serotoninergiche nel topo *FloxedTph2*, ho generato la linea tras-eterozigote *FloxedTph2/Tph2::eGFP* $+/-$ $+/-$. Questi animali consentono sia di ottenere una drastica riduzione tempo- e/o tessuto-specifica della sintesi di serotonina, sia di evidenziare i neuroni serotoninergici. Per verificare se in topi *FloxedTph2/Tph2::eGFP* $+/-$ $+/-$ l'escissione del terzo esone del gene *Tph2* risulta in una riduzione della sintesi di 5-HT analoga a quella osservata nei mutanti *Tph2Null* e se tale riduzione produce alterazioni nello sviluppo delle fibre serotoninergiche, ho generato la linea *Tph2Null/Tph2::eGFP* $+/-$ $+/-$. In questi animali, nonostante la presenza di un quantitativo residuo di serotonina, si osserva un evidente aumento delle innervazioni serotoninergiche a livello dell'ippocampo, in linea con il fenotipo evidenziato in topi completamente privi di 5-HT cerebrale. L'insieme di queste evidenze ci indica che la riduzione della sintesi di serotonina centrale ottenuta in seguito alla rimozione del terzo esone del gene *Tph2* è tale da produrre un fenotipo per molti aspetti in linea con quello dei KO convenzionali del gene *Tph2* e ci suggerisce che la linea *FloxedTph2* possa essere utilizzata in esperimenti di KO condizionale. Pertanto la linea *FloxedTph2/Tph2::eGFP* è stata impiegata in associazione con il sistema inducibile CMV-*CreER*^{T2}/Tamoxifen per ottenere una drastica riduzione dei livelli di 5-HT centrale a stadi post natali ed in animali adulti. La messa a punto di questo sistema, consentirà di studiare se l'abrogazione della sintesi di serotonina in topi adulti, in cui i circuiti serotoninergici si sono già costituiti, comporta alterazioni a carico del

fenotipo delle fibre serotoninergiche. In aggiunta, sarà possibile indagare a quali stadi durante lo sviluppo, l'apporto di un adeguato quantitativo di 5-HT neuronale sia essenziale per la corretta costituzione dei circuiti serotoninergici.

ABSTRACT

Serotonin, 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a monoaminergic neurotransmitter with a widespread distribution both in peripheral and central nervous system (CNS) in mammals. In mice, serotonergic neurons develop early during embryogenesis, at approximately 11 days of gestation (days post coitum, dpc) and collectively form *raphe* nuclei. Despite they are restricted in number as compared to the total number of brain neurons, serotonergic neurons are able to innervate the whole rostral brain as well as the spinal cord. In these neurons serotonin is synthesized from L-tryptophan through the catalytic activity of the tryptophan hydroxylase 2 (Tph2), which is also the rate-limiting enzyme for 5-HT synthesis. In line with the broad distribution of serotonergic innervation, serotonin is implicated in the modulation of numerous physiological processes, including control of sleep, mood, stress, appetite and sex behavior.

A growing number of evidences, including the importance of maternal 5-HT contribution for a correct embryo development, and the expression of serotonergic receptors early during embryogenesis, support the hypothesis that serotonin, before acting as neurotransmitter, could behave as growth regulator in specific events during CNS development. Furthermore, a large amount of data suggest that a dysregulation of serotonergic signaling may be at the origin of human neuropsychiatric disorders though to have a developmental origin, like schizophrenia, autism, affective disorders, anxiety, depression and mental retardation. Genetic models with an altered serotonergic signaling have contributed to unveil the importance of serotonin homeostasis during embryonic development for the correct constitution of neuronal circuitry was. For example, the recent generation in our lab of the *Tph2::eGFP* (Enhanced Green

Fluorescent Protein) knock-in (KI) mouse line, in which serotonin synthesis is abrogated, has allowed to observe that serotonin is necessary for the correct organization of serotonergic fibers.

In order to analyze serotonin role in different temporal windows during development as well as in adult mice, in our lab a conditional *Tph2* knock-out (KO) mouse line, namely *FloxedTph2*, in which the third exon of *Tph2* gene is flanked by two *loxP* sites, was generated. By crossing *FloxedTph2* mice with animals expressing *Cre* recombinase in a tissue- or a time-specific manner, it is possible to promote the excision of the third exon of *Tph2*, leading to the disruption of the open reading frame of the gene, and thus to the production of a truncated protein without the catalytic domain.

During my thesis I worked on the characterization of the *FloxedTph2* mouse line in order to verify if it is a suitable tool to be used in conditional KO experiments. In order to analyze if *Tph2* third exon excision leads to the disruption of serotonin synthesis, I crossbred *FloxedTph2* animals with mice expressing *Cre* recombinase under the control of an ubiquitous promoter obtaining a mouse line, called *Tph2Null*, in which the third exon of *Tph2* gene is removed.

Tph2Null mutants show an increased percentage of mortality during the first two weeks of live, and a visible reduction of growth rate as compared to wild-type and *Tph2Null* +/- mice; these aspects of *Tph2Null* mutant phenotype are consistent with what described in animals completely devoid of central serotonin.

Immunohistochemical experiments showed a dramatic reduction in the amount of serotonin synthesized by *raphe* neurons after the excision of *Tph2* third exon, even though a careful analysis revealed that a small 5-HT amount is still present.

This observation could be explained admitting the presence of a

Tph2 enzyme with a strongly reduced catalytic activity even though not completely abolished. In order to investigate this hypothesis *Tph2* gene transcript derived from *Tph2Null* mutants *raphe* were analyzed through an RT-PCR approach and subsequently by sequence analysis. This allowed the identification of a splicing isoform of *Tph2* transcript missing both third and fourth exon (*Tph2* Δ 3 Δ 4), which could encode for a Tph2 protein with residual catalytic activity. For the purpose of being able to highlight serotonergic fibers in *FloxedTph2* mice, I generated the *FloxedTph2/Tph2::eGFP* +/- +/- trans-heterozygous mouse line. These animals allow at the same time to induce a drastic reduction of central serotonin in a tissue- or time-specific manner, and to highlight the serotonergic system independently of 5-HT immunoreactivity. In order to evaluate if in *FloxedTph2/Tph2::eGFP* +/- +/- mice *Tph2* third exon excision leads to a reduction in 5-HT synthesis, similarly to that observed in *Tph2Null* mutants, and if this reduction induces alterations in serotonergic fibers development, I generated *Tph2Null/Tph2::eGFP* +/- +/- mice. In these animals, despite the presence of a residual small amount of serotonin, I observed a clear increase of serotonergic fibers that innervate hippocampus, in line with the phenotype observed in mice completely devoid of central 5-HT. All together these observations indicate that the reduction of serotonin obtained after *Tph2* third exon excision, results in a phenotype that resembles under several aspects the one observed in conventional *Tph2* KO mice, and suggest that *FloxedTph2* mouse line can be used in conditional KO experiments. For this reason, *FloxedTph2* knockout mouse line was used in combination with the CMV-*CreER*^{T2}/Tamoxifen inducible system, in order to obtain a dramatic reduction of central 5-HT levels in adult mice. This system will allow to study if a drastic reduction of serotonin synthesis in adult mice, when serotonergic circuitry is already established, may result in serotonergic fiber alterations. Furthermore, it will be interesting to

investigate at which stage of development the maintenance of appropriate 5-HT brain levels are necessary for a correct development of serotonergic circuitry.

INTRODUZIONE

1.1 Sintesi e metabolismo della serotonina

La 5-idrossitriptamina (5-HT), neurotrasmettitore noto con il nome di serotonina, è una monoammina sintetizzata a partire dall'aminoacido essenziale L-triptofano mediante due reazioni di riduzione.

- ✦ In primo luogo l'L-triptofano viene convertito in 5-idrossitriptofano (5-HTP) tramite una reazione di idrossilazione catalizzata dalla triptofano idrossilasi (Tph), enzima limitante nella sintesi della serotonina, capace di svolgere la sua azione catalitica in presenza di ossigeno (O_2), di ferro (Fe^{2+}) e dei cofattori tetraidrobiopterina (BH_4) e NADPH2 (Fitzpatrick, 1999).
- ✦ Il 5-idrossitriptofano (5-HTP) viene in seguito decarbossilato a 5-idrossitriptamina (5-HT) ad opera della L-aminoacidi-aromatici decarbossilasi (AADC) in presenza del cofattore piridossal fosfato (PLP).

Il catabolismo della serotonina prevede invece due reazioni ossidative:

- ✦ la prima consiste nella deaminazione della serotonina a 5-idrossi-indolo-acetaldeide ed è catalizzata dall'enzima monoamino-ossidasi A (MAO-A) implicato anche nella degradazione di altre monoamine come norepinefrina e dopamina (Holschneider *et al.*, 2001).
- ✦ la 5-idrossi-indolo-acetaldeide viene a sua volta ossidata ad acido 5-idrossindolacetico (5-HIAA), molecola idrosolubile che può essere espulsa con le urine. (Fig.1.1).

Una volta prodotta, la serotonina può essere accumulata in apposite vescicole sia a livello di neuroni, serotoninergici e non, che a livello di cellule dei tessuti periferici. L'accumulo vescicolare di 5-HT è possibile in presenza di un apposito trasportatore transmembrana che va sotto il

nome trasportatore vescicolare di monoamine (VMAT). Due distinte isoforme del trasportatore, VMAT1 e VMAT2, sono espresse rispettivamente, una nei neuroni in via di sviluppo e nei tessuti periferici, e l'altra nel SNC nei neuroni monoaminergici (Peter *et al.*, 1995; Erickson *et al.*, 1996).

Una molecola che svolge un ruolo fondamentale nel segnale serotoninergico è il trasportatore della serotonina, 5-HTT o SERT.

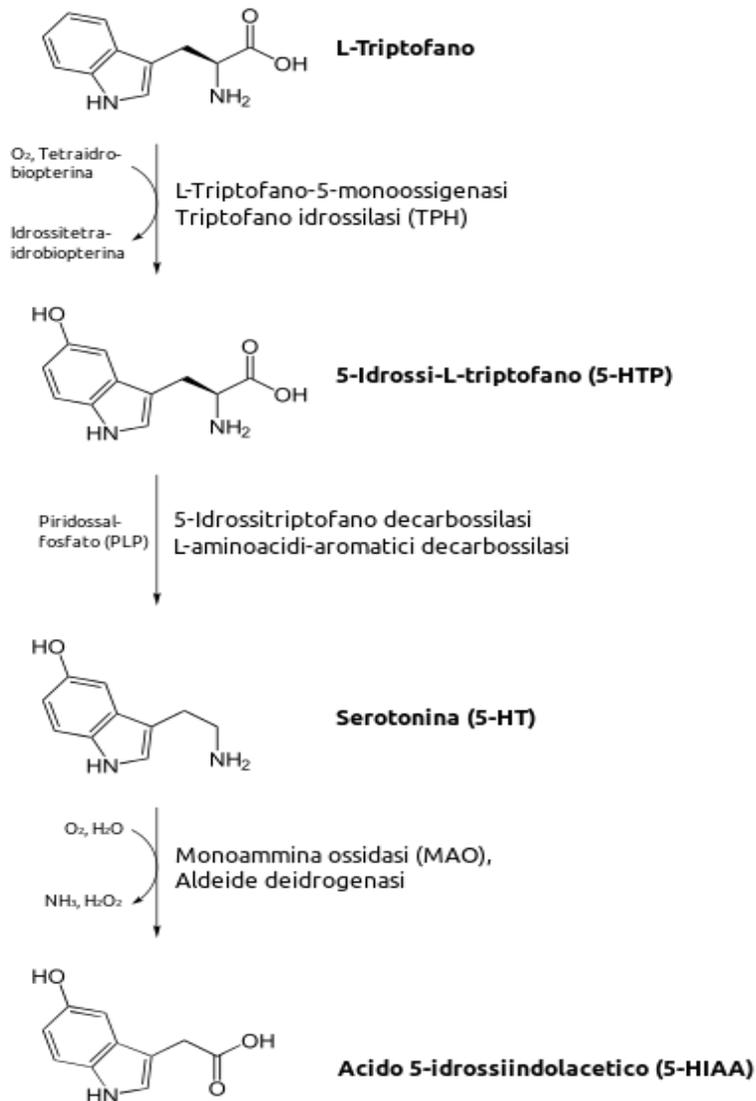


Figura 1.1: Sintesi e metabolismo della serotonina

Questo trasportatore consente alle cellule in cui è espresso di internalizzare la 5-HT presente nello spazio extracellulare. Nei tessuti periferici SERT è espresso da particolari tipi cellulari come le cellule cromaffini dell'intestino ed è presente nelle piastrine. A livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC) SERT è localizzato sia nelle terminazioni presinaptiche dei neuroni serotonergici, che nei dendriti vicini ai corpi cellulari contenenti serotonina. Dopo aver svolto la sua azione mediata dai recettori serotonergici, la serotonina in eccesso può essere rimossa dal vallo sinaptico grazie all'azione di SERT (Murphy e Lesch, 2008).

In virtù della sua azione modulatoria sul segnale serotonergico SERT è il target di numerose sostanze psicoattive, come psicostimolanti ed antidepressivi. Ad esempio gli inibitori specifici del ricaptaggio della serotonina (SSRI), come Fluoxetina, Paroxetina ed altri, agiscono principalmente bloccando l'azione del trasportatore SERT: questo comporta un aumento della 5-HT presente nel vallo sinaptico e di conseguenza un prolungamento della durata del segnale di questo neurotrasmettitore (Murphy e Lesch, 2008).

1.2 Distribuzione e funzioni della serotonina

Nei mammiferi la serotonina viene sintetizzata sia a livello del SNC che nei tessuti periferici rispettivamente da due distinte isoforme della triptofano idrossilasi, Tph2 e Tph1.

Nel cervello dei mammiferi i neuroni che sintetizzano la serotonina sono organizzati in una struttura del tronco dell'encefalo chiamata *raphe*. Tuttavia circa il 95% della 5-HT corporea è sintetizzata al di fuori dall'encefalo, principalmente dalle cellule cromaffini dell'intestino, dai neuroni del plesso mienterico e dalla ghiandola pineale (Cotè *et al.*, 2003). Quantitativi di serotonina molto minori, sono invece prodotti dalle cellule beta del pancreas, dalle cellule para-follicolari della tiroide, dalle cellule del cumulo ooforo, dalle radici dei gangli dorsali e dalle

papille gustative (Trowbridge *et al.*, 2011).

Oltre alle cellule che sintetizzano serotonina, alcune cellule dell'organismo esprimono, durante lo sviluppo, un fenotipo serotoninergico transiente: sono cioè in grado di internalizzare la 5-HT presente nello spazio extracellulare e di immagazzinarla grazie all'espressione rispettivamente di SERT e VMAT (Gaspar *et al.*, 2003). Negli organismi maturi SERT e VMAT sono espressi dalle piastrine, le quali accumulano la serotonina presente nel plasma per poi rilasciarla quando vengono attivate in seguito a danneggiamento dei vasi sanguigni. Allo stesso modo la serotonina è internalizzata da specifiche cellule della cripta intestinale, dei vasi polmonari e della tiroide, le quali sono in grado di metabolizzare il neurotrasmettitore rilasciato dalle cellule vicine (Gaspar *et al.*, 2003).

Oltre ad essere diffusa in modo ubiquitario nell'organismo dei mammiferi, la serotonina partecipa ad innumerevoli processi fisiologici. La sua azione è mediata dai recettori 5-HT_R espressi sia in tessuti non neurali che, nel sistema nervoso, a livello sia pre- che post-sinaptico (per un compendio si veda Hannon and Hoyer, 2008). I recettori della serotonina (5-HT_R) sono codificati da al meno 14 geni distinti, da cui però attraverso meccanismi di splicing alternativo, e di mRNA editing nel caso di 5-HT_{2C}, si originano 30 forme recettoriali distinte (Burns *et al.*, 1997). In base alla sequenza aminoacidica, ai meccanismi di trasduzione del segnale ed a caratteristiche farmacologiche questi recettori sono raggruppati in 7 famiglie (5-HT₁₋₇). Le classi 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ sono composte da recettori con 7 domini transmembrana accoppiati a proteine G. Questi recettori possono essere ulteriormente suddivisi in 4 gruppi in base al sistema di secondi messaggeri che utilizzano. Ad esempio i recettori 5-HT₁ sono associati a proteine G_{i/o}, e la loro attivazione inibisce la produzione di cAMP. 5-HT_{2R} sono invece associati a proteine G_q ed in presenza di 5-HT attivano la fosfolipasi D (PLC) facendo aumentare il

livello intracellulare di Ca^{2+} . Invece i recettori 5HT₄, 6 e 7 sono associati positivamente con proteine G_s, e promuovono la formazione di cAMP. Non è chiaro, con quale proteina G sia accoppiato 5HT_{5R}. 5-HT₃ è l'unica classe ad essere costituita da recettori ionotropici (per un compendio si veda Hannon and Hoyer, 2008).

Agendo sui recettori 5-HT_R, la serotonina influenza il funzionamento dell'apparato gastrointestinale (Kim e Camilleri, 2000), cardiovascolare (Thorin *et al.*, 1990; Alenina *et al.*, 2009) ed il ritmo respiratorio (Miyata *et al.*, 2000; Alenina *et al.*, 2009). Svolge inoltre un ruolo nella modulazione del dolore (Jann *et al.*, 2007; Savelieva *et al.*, 2009), nella termoregolazione (Alenina *et al.*, 2009), nel controllo del ciclo sonno-veglia (Alenina *et al.*, 2009) e dei ritmi circadiani (Morin, 1999).

A livello del SNC la serotonina è implicata sia nella formazione delle sinapsi durante lo sviluppo che nella plasticità sinaptica nell'adulto (Lesch e Wider, 2012), influenzando fenomeni cognitivi come apprendimento e memoria (Lane *et al.*, 2008). La serotonina influenza anche aspetti comportamentali come l'alimentazione (Ramos *et al.*, 2007), la vita sessuale (Hull *et al.*, 2004) e l'umore (Ruhè *et al.*, 2007).

Nell'uomo alterazioni a carico del sistema serotoninergico sono correlate a disturbi neuropsichiatrici, quali aggressività, ansia, depressione e schizofrenia; sembra inoltre che alterazioni dei livelli di 5HT durante la formazione dei circuiti neuronali, possano contribuire ad alcuni sintomi di patologie con origine nello sviluppo come Sindrome di Down e Autismo (Daubert e Cordon, 2010; Gaspar *et al.*, 2003).

L'ipotesi di un coinvolgimento della serotonina in disturbi neuropsichiatrici è rafforzata da dati farmacologici. Gli antidepressivi più diffusi sono infatti inibitori della ricaptazione della serotonina (SSRI): è stato dimostrato che questi farmaci sono capaci di stimolare

la neurogenesi ippocampale e la sintesi di neurotrofine a livello della corteccia, il che può spiegare perché iniziano ad avere effetto dopo periodi di somministrazione piuttosto lunghi (Santarelli *et al.*, 2003). Inoltre antagonisti di recettori 5-HT_{2A/2C}, sono usati come antipsicotici, mentre antagonisti di 5-HT_{1A}R come ansiolitici. Le allucinazioni e la psicosi indotte da alcuni agonisti dei recettori serotoninergici, come l'LSD, possono essere considerati un modello della reale sindrome da distorsione della realtà che riscontra in pazienti schizofrenici (Gaspar *et al.*, 2003).

1.3 Anatomina del sistema serotoninergico centrale

A livello del SNC i neuroni in grado di sintetizzare la serotonina, circa 26.000 nel SNC del topo e 300.000 nell'uomo, (Ishimura *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 1991) sono un numero esiguo rispetto al numero totale dei neuroni del SNC. Ciò nonostante riescono ad innervare l'intero SNC; ciascun neurone serotoninergico possiede infatti numerose proiezioni assionali con un numero elevato di collaterali (Jacobs e Azmitia, 1992).

A livello del SNC i neuroni che sintetizzano 5-HT sono localizzati nel tronco encefalico dove, insieme a neuroni non serotoninergici, formano nove nuclei (B1-B9) noti come nuclei del *raphe*. I nuclei del *raphe* vengono distinti in base al luogo di comparsa dei loro precursori, rispetto al ponte, in nuclei rostrali (B5-B9), che innervano la porzione anteriore dell'encefalo, ed in nuclei caudali (B1-B4) che proiettano fibre discendenti verso il midollo spinale (Jacobs e Azmitia, 1992; Wallace e Lauder, 1983). Il *raphe* rostrale è costituito dal nucleo lineare caudale (CLN; B8), il nucleo del *raphe* mediano (MRN; B8 e B5), il nucleo del *raphe* dorsale (DR; B6 e B7) ed dal nucleo del lemisco medio laterale (LML; B9). Fanno invece parte del *raphe* caudale il nucleo del *raphe* oscuro (NRO; B2), il nucleo del *raphe* pallido (NRP; B1 e B4), il nucleo del *raphe* magno (NRM; B3), alcune neuroni nella medulla

ventrolaterale che formano il nucleo laterale paragigantocellulare (LPGN), il nucleo reticolare intermedio (IRN; B1 e B3) ed i neuroni dell'area postrema (Jacobs e Azmitia, 1992) (Fig. 1.2).

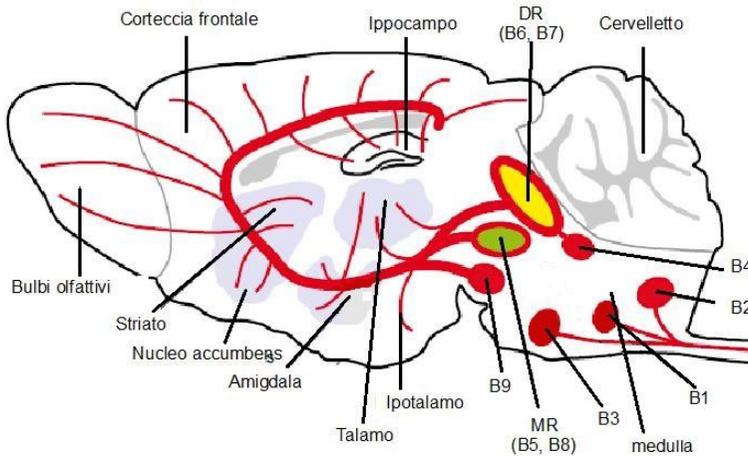


Figura 1.2: Il sistema serotonergico. I neuroni serotonergici nel SNC si raggruppano nei nuclei del raphe, B1-B9. I nuclei più caudali (B1-B3) nella medulla proiettano al midollo spinale e in periferia, mentre i gruppi del raphe più rostrali contengono i gruppi del raphe dorsale (B6 e B7) e i gruppi del raphe mediano (B5 e B8) e proiettano verso il SNC anteriore.

I neuroni serotonergici vengono specificati nella porzione ventrale del romboencefalo a stadi embrionali precoci: E9.5-E12 nel topo e durante il primo mese di gestazione nei primati (Levitt e Rakic, 1982; Briscoe *et al.*, 1999). A questo stadio di sviluppo il romboencefalo è suddiviso lungo l'asse antero-posteriore in segmenti noti come rombomeri (Lumsden e Keynes, 1989). I precursori serotonergici compaiono come due cluster distinti nei rombomeri r1-r3 ed r5-r7, mentre nel rombomero 4 non sembrano originarsi neuroni serotonergici, ma solo motoneuroni. Nel 2008, grazie a studi di "fate mapping", Jansen e Dymeki hanno dimostrato che i nuclei del *raphe* dorsale B4, B6 e B7 derivano interamente da r1, mentre i nuclei B8, B9, e B5 sono costituiti

da neuroni derivati da r1, r2 ed r3. I neuroni che andranno a costituire i nuclei del *raphe* caudale B1, B2 e B3 derivano invece dai rombomeri r5-r7 (Jensen *et al*, 2008). Nel topo i primi neuroni serotoninergici a comparire tra E9.5-E12 sono quelli derivati da r1, mentre i neuroni derivati dai rombomeri sia rostrali r2, r3, che caudali r5-r8, compaiono con un giorno di ritardo (Deneris e Wyler, 2012).

Dopo essersi organizzati all'interno dei nuclei del *raphe*, i neuroni serotoninergici cominciano a sviluppare le proprie proiezioni attraverso un processo che può essere suddiviso in tre fasi temporalmente distinte (Lidov e Molliver, 1982). La prima fase inizia piuttosto precocemente durante lo sviluppo embrionale e consiste nella formazione degli assoni serotoninergici lungo l'asse antero-posteriore del SNC. Durante la seconda fase, che procede fino al termine della gestazione, gli assoni dei neuroni che sintetizzano 5-HT si sviluppano fino a raggiungere tutte le strutture cerebrali che riceveranno innervazione serotoninergica. Infine, durante la terza fase che si prolunga per le prime tre settimane di vita, si assiste ad un'intensa arborizzazione degli assoni serotoninergici a livello delle aree bersaglio. Quest'ultima fase, che procede con intensità e tempistiche differenti in base alle aree innervate, consente di ottenere un'innervazione di complessità variabile nelle distinte aree cerebrali (Lidov e Molliver 1982).

1.4 Sviluppo del sistema serotoninergico

La regione del tubo neurale in cui i precursori dei neuroni serotoninergici vengono specificati è un'area tridimensionale determinata, lungo l'asse dorso-ventrale (D-V) e antero-posteriore (A-P), da gradienti di fattori morfogenetici diffusi a partire dalla regione in cui sono prodotti ed in grado di influenzare il destino delle cellule con cui vengono in contatto. Lungo l'asse A-P quest'area è determinata da fattori appartenenti alla famiglia dei "fibroblast growth factors" (FGFs):

nello specifico FGF4 e FGF8, secreti rispettivamente dalla stria primitiva e dalla regione al confine tra mesencefalo e rombencefalo ("midbrain – hindbrain organizing centre", MHO) (Ye *et al.*, 1998, Brodski *et al.*, 2003). FGF4 e FGF8 sono implicati nella specificazione rispettivamente del cluster caudale e rostrale di neuroni serotoninergici.

Lungo l'asse D-V l'area di specificazione dei precursori serotoninergici è invece determinata da Sonic hedgehog (Shh), prodotto dalla notocorda (Ye *et al.*, 1998; Hynes *et al.*, 2000).

Recentemente, grazie alla generazione di topi ingegnerizzati geneticamente ed all'analisi del loro fenotipo, è stato possibile identificare un insieme di fattori di trascrizione che, agendo in maniera sequenziale e/o simultanea, regolano il differenziamento dei neuroni serotoninergici e la loro specificità regionale. Tra questi *Nkx2.2* e *Ascl/Mash1* sono fattori di trascrizione necessari per specificare i precursori serotoninergici, mentre i geni *Gata2*, *Gata3*, *Lmx1b* e *Pet1* sono richiesti successivamente per il differenziamento terminale.

Direttamente a valle di Shh agisce infatti *Nkx2.2* (Briscoe *et al.*, 1999), un fattore di trascrizione necessario per la specificazione di tutti i neuroni serotoninergici del *raphe* ad eccezione di quelli derivati da r1, la cui specificazione è mediata da un fattore di trascrizione correlato: *Nkx6.1* (Vallstedt *et al.*, 2001). L'importanza dei geni *Nkx2.2* e *Nkx6.1* deriva dal fatto che sono a capo di una cascata di segnali molecolari che innesca la successiva attivazione dei geni *Gata2*, *Gata3*, *Lmx1b* e *Pet1*.

Un'altra via di segnalazione attiva nel rombencefalo e che sembra agire parallelamente a quella di *Nkx2.2* e *Nkx6.1* nella determinazione dei neuroni serotoninergici, è quella di *Ascl/Mash*. *Ascl/Mash* è un fattore di trascrizione espresso nei rombomeri r1-r7 ed è implicato sia nella specificazione dei motoneuroni che, in seguito, in quella dei neuroni serotoninergici. Infatti, pur essendo ancora attiva la via di

Nkx2.2, in topi *Mash* *-/-* non si originano neuroni serotonergici e manca completamente l'espressione dei fattori di trascrizione *Gata2*, *Gata3*, *Lmx1b* e *Pet1*, che agiscono a valle della via di segnalazione di *Ascl/Mash* (Pattyn *et al.*, 2004).

A valle di *Nkx2.2* e *Nkx6.1* viene attivata l'espressione di fattori di trascrizione "zinc-finger" *Gata2* e *Gata3*. *Gata2* è necessario per la formazione di tutti i neuroni serotonergici (Tsai *et al.*, 1994), mentre *Gata3*, pur essendo espresso in tutti i nuclei del *raphe* è necessario solo per la specificazione dei neuroni dei nuclei caudali; la sua azione è pertanto cluster-specifica (Pattyn *et al.*, 2004; van Doornick *et al.*, 1999).

A seguito di *Gata2* e *Gata3*, sia nei domini rostrali che caudali del *raphe*, inizia ad essere espresso *Lmx1b*, un fattore di trascrizione fondamentale affinché i neuroni serotonergici che si sono formati acquisiscano il corretto fenotipo neurochimico (Ding *et al.*, 2003).

Il gene *Pet1* è invece espresso in modo esclusivo nei neuroni serotonergici, e la sua espressione precede di circa un giorno l'inizio della sintesi di serotonina e la comparsa dei marcatori dei neuroni serotonergici terminalmente differenziati, come la triptofano idrossilasi (*Tph2*) ed il trasportatore della serotonina (SERT) (Hendricks *et al.*, 1999; Hendricks *et al.*, 2003). In topi *Pet1* *-/-* circa il 70% di neuroni serotonergici non riesce a portare a termine il differenziamento ed a produrre 5-HT, mentre nel rimanente 30%, in cui il neurotrasmettitore viene sintetizzato, si verifica una forte riduzione dei livelli di *Tph2*, di SERT, e del trasportatore vescicolare delle monoamine (VMAT2). Il fatto che il 30% circa di neuroni serotonergici, distribuiti in tutti i nuclei, riesca a differenziare in assenza di *Pet1*, ha portato ad ipotizzare che esista una eterogeneità tra neuroni serotonergici.

É stato inoltre dimostrato che l'espressione combinata di *Nkx2.2*, *Lmx1b* e *Pet1* è sufficiente a specificare neuroni serotonergici

ectopici nel midollo spinale di pollo, mentre ciò non si verifica promuovendo l'espressione ectopica di solamente uno o di due di questi geni. Tuttavia, la formazione di neuroni serotoninergici ectopici è circoscritta in una ristretta regione del midollo spinale; questa evidenza permette di ipotizzare che la presenza di ulteriori fattori, non ancora individuati, sia necessaria per lo sviluppo del fenotipo serotoninergico (Cheng *et al.*, 2003).

1.5 La serotonina nello sviluppo

Da tempo è noto che la serotonina è implicata in fenomeni di proliferazione cellulare, sopravvivenza, differenziamento neuronale, migrazione, sinaptogenesi e formazione dei circuiti neuronali (Gaspar *et al.*, 2003; Bonnin e Levitt, 2011). La capacità di 5-HT di stimolare la neurogenesi è stata inoltre dimostrata *in vivo* da Brezvon e colleghi, i quali hanno osservato una riduzione del numero di progenitori in divisione a livello del giro dentato dell'ippocampo e della zona sub-ventricolare nel cervello di ratto in seguito a somministrazione di p-clorofenilalanina (PCPA), un inibitore della triptofano idrossilasi e di conseguenza della sintesi di serotonina (Brezvon e Daszuta, 1999; Guold, 1999).

Una delle evidenze che ha spinto a credere che la serotonina possa svolgere un ruolo importante nello sviluppo, deriva dal fatto che i neuroni serotoninergici sono i primi ad essere specificati durante lo sviluppo embrionale dei mammiferi (Levitt e Rakic, 1982; Briscoe *et al.*, 1999) e che rilasciano serotonina dagli assoni ancora prima che questi abbiano raggiunto i propri bersagli (Gaspar *et al.*, 2003). Le fibre serotoninergiche raggiungono ad esempio il telencefalo proprio durante il picco di proliferazione e migrazione dei precursori corticali e continuano poi ad innervare la corteccia durante il suo sviluppo (Wallace e Lauder, 1983).

A stadi embrionali precoci, prima ancora che la 5-HT inizi ad

essere sintetizzata dai neuroni del *raphe*, la presenza di recettori 5-HT_{1A} e del trasportatore SERT, è stata osservata in organismi molto diversi tra loro come ricci di mare, pesci, anfibi e roditori (Colas *et al.*, 1995, Buznikov *et al.*, 2001; Hansson *et al.*, 1999). Inoltre nel topo, già a stadi embrionali precoci (E11), cellule del mesenchima craniale e della notocorda iniziano ad esprimere quello che viene definito “fenotipo serotoninergico transiente”, ovvero internalizzano la serotonina presente negli spazi extra-cellulari e la immagazzinano, grazie all'espressione di SERT e di VMAT (Lauder e Zimmerman, 1988; Shuey *et al.*, 1992). La serotonina in queste fasi precoci non può che derivare da una fonte esterna all'embrione: può trattarsi di 5-HT circolante nel sangue della madre (Cotè *et al.*, 2007), o sintetizzata a livello della placenta (Bonnin *et al.*, 2011). L'importanza della serotonina materna per lo sviluppo embrionale è stata dimostrata da Cotè e colleghi nel 2007 osservando il fenotipo di topi nati da madri “knock out” (KO) di *Tph1* deplete di serotonina circolante. Embrioni di madri *Tph1*^{-/-} presentano forti anomalie nello sviluppo sia cerebrale che dei tessuti periferici indipendentemente dal proprio genotipo: tali anomalie non compaiono invece in animali *Tph1*^{-/-} nati da genitori eterozigoti. Sembra pertanto che i difetti nello sviluppo osservati nella prole di femmine *Tph1*^{-/-} siano dovuti ad un insufficiente apporto di serotonina materna attraverso la placenta, durante lo sviluppo embrionale (Cotè *et al.* 2007).

Modelli murini privati di geni necessari per il mantenimento della corretta omeostasi del sistema serotoninergico si sono rivelati essenziali per investigare e meglio comprendere il ruolo di 5-HT nello sviluppo.

Un esempio chiaro dell'influenza della serotonina sullo sviluppo del SNC e nello specifico delle connessioni talamo-corticali, deriva da topi KO di *MAOA* o di *SERT*, geni implicati rispettivamente nella degradazione e nel re-uptake di 5-HT. In questi animali i livelli di

serotonina cerebrali risultano fortemente aumentati; ad esempio in topi *MAOA* *-/-* si osservano durante lo sviluppo precoce livelli di 5-HT cerebrale 9 volte maggiori rispetto ad animali wild-type (Cases *et al.*, 1995), che vengono però a normalizzarsi più avanti nello sviluppo quando inizia ad essere espresso *MAOB*. L'eccesso di serotonina nel sistema nervoso centrale di animali sia *MAOA* *-/-* che *SERT* *-/-* impedisce una corretta formazione della rappresentazione somatotopica delle vibrisse a livello della corteccia somatosensoriale (Cases *et al.*, 1996; Persico *et al.*, 2001). In aggiunta, una volta adulti, animali *MAOA* *-/-* sono caratterizzati da un'aumentata aggressività rispetto ai wild-type (Cases *et al.*, 1995), mentre in topi *SERT* *-/-* è stato osservato un fenotipo con tendenza alla depressione (Lira *et al.*, 2003) ed aumentati livelli di ansia (Ansorge *et al.*, 2004). La corretta formazione della rappresentazione somatotopica delle vibrisse a livello della corteccia somatosensoriale può comunque essere ripristinata in topi *MAOA* *-/-* e *SERT* *-/-* inibendo la sintesi di serotonina tramite somministrazione di PCPA durante la prima settimana postnatale (Cases *et al.*, 1996; Persico *et al.*, 2001). Interessante è il fatto che la somministrazione di PCPA a stadi embrionali o adulti non riesce a ripristinare la corretta rappresentazione somatotopica delle vibrisse nella corteccia somatosensoriale di topi *MAOA* *-/-*. Questa evidenza è un chiaro indice di come, per il corretto sviluppo del SNC, sia essenziale che l'omeostasi della serotonina venga mantenuta in specifiche finestre temporali durante lo sviluppo (Cases *et al.*, 1996).

Allo stesso modo il KO di *SERT* o la sua inattivazione farmacologica tramite somministrazione di SSRI nei primi giorni postnatali, è alla base di aumentati livelli di ansia e di comportamenti "depressive-like" nell'adulto (per un compendio si veda Homberg *et al.*, 2010), mentre l'inattivazione di *SERT* durante la vita adulta ha un effetto antidepressivo, tanto che gli antidepressivi più diffusi (SSRI) agiscono inibendo questo trasportatore.

Negli ultimi anni si sono inoltre resi disponibili numerosi modelli di topo definiti “iposerotoninergici” in cui, mediante l'inattivazione di geni coinvolti nella specificazione dell'identità dei neuroni serotoninergici (come *Lmx1b* e *Pet1*) o essenziali per la sintesi della serotonina stessa (come *Tph2*), i livelli di 5-HT cerebrale sono ridotti dal 80 al 99% rispetto ai wild-type. Apparentemente in contrasto con l'importanza ascritta al ruolo della serotonina nello sviluppo del SNC questi animali modello, pur con livelli estremamente ridotti di 5-HT cerebrale, raggiungono l'età adulta, sono fertili e non mostrano alterazioni evidenti della morfologia cerebrale. La mancata osservazione di malformazioni del SNC a livello anatomico e cellulare potrebbe essere spiegata sia ipotizzando un effetto compensatorio da parte della 5-HT materna o placentale, sia supponendo che questo neurotrasmettitore regoli processi fini durante la costituzione dei circuiti neuronali rilevabili solo mediante l'utilizzo di tecniche più sofisticate (Migliarini *et al.*, 2013). Tuttavia in topi depleti di 5-HT cerebrale sono state osservate alterazioni sia fisiologiche che comportamentali, variabili in intensità da lievi a gravi (Gaspar *et al.*, 2003; Trowbridge *et al.*, 2011).

Ad esempio in animali *Pet1* *-/-* sono state riscontrate sia alterazioni a livello del controllo respiratorio che anomalie comportamentali negli adulti, come aumentati livelli di ansia ed aggressività (Trowbridge *et al.*, 2011).

In animali *Tph2* *-/-* sono state osservate da diversi gruppi di ricerca alterazioni sia fisiologiche che comportamentali, come un marcato ritardo nella crescita, incuria materna e aumentata aggressività (Savelieva *et al.*, 2008; Alenina *et al.*, 2009; Migliarini *et al.*, 2009).

Nel loro insieme queste evidenze non solo avvalorano l'ipotesi di un ruolo regolativo della serotonina in molteplici aspetti dello sviluppo embrionale, ma principalmente mettono in luce come il mantenimento di una corretta omeostasi della 5-HT sia essenziale durante specifiche

finestre temporali. Sembra infatti che alterazioni dei livelli di serotonina in fasi critiche dello sviluppo possano influenzare la corretta formazione delle connessioni neuronali ed essere alla base di patologie neuropsichiatriche nell'adulto come ad esempio ansia e depressione (Gaspar *et al.*, 2003). Tuttavia, poiché la serotonina sembra influenzare distinti processi, ed agire in diverse finestre temporali durante lo sviluppo, ulteriori indagini sono necessarie per chiarire il ruolo di questo neurotrasmettitore sullo sviluppo embrionale e le ripercussioni che alterazioni della sua omeostasi possono avere sulla vita adulta. Per questo tra le prospettive future in questo ambito di ricerca appare di rilievo l'utilizzo di animali modello KO condizionali, che consentano l'abrogazione spazio e/o tempo specifica di geni importanti per lo sviluppo del sistema serotoninergico o per la sintesi della serotonina. Questi modelli potrebbero infatti fornire nuove informazioni sulle cascate molecolari attraverso cui si esplicano gli effetti della serotonina sullo sviluppo e l'impatto che hanno sulla vita adulta (Gaspar *et al.*, 2003).

1.6 Il gene *Tph2*

La reazione limitante la sintesi della serotonina è quella che converte l'L-triptofano in 5-idrossitriptofano. Questa reazione è catalizzata dalla triptofano idrossilasi (Tph), un enzima che appartiene, insieme alla fenilalanina idrossilasi (Pah) ed alla tirosina idrossilasi (Th), alla superfamiglia delle idrossilasi degli aminoacidi aromatici. Questi enzimi sono caratterizzati da una struttura omotetrameric, contengono un ione ferro (Fe^{2+}) e svolgono la loro azione catalitica in presenza di ossigeno e tetraidrobiopterina (Fitzpatrick, 1999).

Fino ai primi anni 2000 si credeva che, come le altre idrossilasi degli aminoacidi aromatici, Tph fosse codificato da un unico gene, attualmente noto come *Tph1*. *Tph1* è un gene di 11 esoni, localizzato sul cromosoma 11 nell'uomo e sul cromosoma 7 nel topo, vicino al

locus che codifica per la tirosina idrossilasi (Stoll *et al.*, 1990; Stoll e Goldmann, 1991). Nel 2003, però, in seguito alla realizzazione di un topo KO per *Tph1*, si è potuto osservare che l'inattivazione di questo gene comporta una drastica riduzione della 5-HT periferica, rispetto a topi wild-type, senza però alterare in alcun modo i livelli di serotonina cerebrale. È stato così individuato un secondo gene di 11 esoni localizzato sul cromosoma 12 nell'uomo e 10 nel topo, vicino al *locus Pah*, chiamato *Tph2* ed espresso in modo specifico nei neuroni del *raphe* e del plesso mienterico. *Tph2* codifica per una isoforma di triptofano idrossilasi, nota come Tph2 la quale presenta una elevata affinità di sequenza (65%) con Tph1, massima nella regione catalitica (83%) (Walter *et al.*, 2003). Proprio a causa dell'elevata omologia di sequenza, gli anticorpi normalmente utilizzati per identificare una delle due isoforme cross-reagivano anche con l'altra impedendo di distinguerle.

La maggiore differenza tra *Tph1* e *Tph2* consiste nel loro dominio di espressione. Tph1 è infatti responsabile della sintesi di serotonina nei tessuti periferici ed è espresso a livello della ghiandola pineale, considerata un tessuto periferico perchè posta all'esterno dalla barriera ematoencefalica, e nelle cellule enterocromaffini dell'intestino (Cotè *et al.*, 2003); più recentemente è stata evidenziata la presenza di Tph1 anche a livello della placenta (Bonnin *et al.*, 2011). Il gene *Tph2* è invece espresso nei neuroni del *raphe* e del plesso mienterico intestinale (Cotè *et al.*, 2003). In letteratura sono riportate evidenze contrastanti circa l'espressione di *Tph1* nel *raphe*. Nakamura, ad esempio osserva tramite ibridazione *in situ* (ISH) nei nuclei del *raphe* dorsale di ratti a P21, un picco di espressione di *Tph1*, che diminuisce fino a scomparire con il progredire della crescita. Tuttavia numerosi altri gruppi di ricerca hanno smentito la presenza di trascritti di *Tph1* a livello del *raphe* dei roditori (Walter *et al.*, 2003; Cotè *et al.*, 2003; Gutknecht *et al.*, 2009; Migliarini *et al.*, 2013).

Essendo Tph l'enzima limitante per la sintesi della serotonina, l'inattivazione dei geni *Tph1* o *Tph2* risulta essere uno strumento efficace per abrogare la sintesi della 5-HT.

Nel 2003 Cotè ha realizzato un topo KO per *Tph1* in cui la sintesi di serotonina nei tessuti periferici è abrogata. Grazie a questo topo modello sono stati confermati sia l'importanza della serotonina materna per il corretto sviluppo del feto (Cotè *et al.*, 2007) sia il ruolo della 5-HT periferica per lo sviluppo e per il corretto funzionamento cardiaco (Cotè *et al.*, 2003).

Negli ultimi anni sono stati realizzati da vari gruppi di ricerca modelli di topo in cui il gene *Tph2* è inattivato per KO o KI, oppure è stato modificato nella sua sequenza nucleotidica per mimare polimorfismi riscontrati nell'uomo. L'interesse che ha spinto alla realizzazione di questi modelli, deriva dalle molteplici evidenze che sostengono l'importanza della serotonina durante lo sviluppo del SNC (Gaspar *et al.*, 2003; Daubert e Condron, 2010) e che associano polimorfismi umani del gene *Tph2* a disturbi neuropsichiatrici come depressione maggiore (Zill *et al.*, 2004a), tendenze suicide (Zill *et al.*, 2004b), comportamento aggressivo (Kulikov *et al.*, 2005), disturbi affettivi (Harvey *et al.*, 2004), autismo (Coon *et al.*, 2005) e disturbi da deficit di attenzione/iperattività (ADHD). Ad esempio Zhang ha osservato, in una coorte di 87 individui, che 9 soggetti affetti da depressione maggiore possedevano una variante polimorfica del gene *Tph2*, chiamata G1463A o R441H, ed ha dimostrato che questa variante causa, in saggi *in vitro* su sistemi di coltura cellulare, una riduzione dell'80% nell'attività enzimatica di Tph2 rispetto all'enzima wild-type (Zhang *et al.*, 2005). Per studiare l'effetto in vivo della mutazione R441H, tre anni dopo nel laboratorio di Caron, è stato generato un modello murino che presenta una mutazione equivalente: in questo topo sono state osservate sia una marcata riduzione del livello di serotonina nel SNC che alterazioni comportamentali (Beaulieu

et al., 2008).

Topi KO per *Tph2* mostrano una quantità di serotonina cerebrale ridotta del 96-99% rispetto ad animali wild-type misurata mediante la tecnica della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) (Alenina *et al.*, 2009; Savelieva *et al.*, 2008; Gutknecht *et al.*, 2008; Migliarini *et al.*, 2009). Dato che la tecnica dell'immunoistochimica non evidenzia neuroni serotonina positivi nel *raphe* di animali *Tph2* *-/-* (Alenina *et al.*, 2009; Gutknecht *et al.*, 2008), sono state avanzate numerose ipotesi per spiegare la presenza del residuo di 5-HT cerebrale misurato per HPLC. Una possibile spiegazione potrebbe essere la presenza nel SNC di animali *Tph2* *-/-* di una molecola con un tempo di ritenzione simile alla 5-HT che la rende indistinguibile in analisi di HPLC; oppure la sintesi di un quantitativo minimo di serotonina da parte di idrossilasi di amminoacidi aromatici, diverse da *Tph2*, come la Pha (Gutknecht *et al.*, 2008). Un'ulteriore ipotesi è che il precursore 5-HTP prodotto in distretti periferici del corpo, raggiunga il cervello attraverso la barriera ematoencefalica e sia qui convertito in serotonina dalle AADC (Gutknecht *et al.*, 2012); questa ipotesi è però invalidata dalla presenza di una, sebbene ulteriormente ridotta, quantità residua di 5-HT misurata per HPLC nel cervello di topi KO sia per *Tph1* che per *Tph2* (Savelieva *et al.*, 2008).

La presenza di un solo allele *Tph2* funzionale appare invece sufficiente a garantire livelli di serotonina cerebrale analoghi a quelli di animali wild-type ed un invariato numero di neuroni positivi per 5-HT, come osservato in animali *Tph2* *+/-*. Tuttavia Alenina e collaboratori hanno osservato una lieve diminuzione nella concentrazione del metabolita 5-HIAA in alcune aree del cervello di topi *Tph2* *+/-*. Questa evidenza spinge a chiedersi se l'apparente mancanza di differenze tra il fenotipo di animali wild-type e quello di animali *Tph2* *+/-*, in cui l'attività di *Tph2* è ridotta del 50%, possa essere dovuta ad un effetto compensatorio che porta nell'eterozigote ad una diminuzione della 5-

HT degradata (Alenina *et al.*, 2009).

Nonostante la serotonina sia implicata in numerosi processi sia fisiologici che di sviluppo, in topi *Tph2* *-/-*, come anche in topi in cui sia *Tph1* che *Tph2* sono stati inattivati (Savelieva *et al.*, 2008), non sono state osservate alterazioni della morfologia cerebrale. I neuroni serotoninergici del *raphe* riescono a svilupparsi normalmente anche in assenza della 5-HT (Alenina *et al.*, 2009; Savelieva *et al.*, 2008; Gutknecht *et al.*, 2008; Migliarini *et al.*, 2013), continuano ad esprimere i marcatori serotoninergici, e mantenendo inalterate le proprie capacità elettrofisiologiche (Gutknecht *et al.*, 2012). Recentemente però, presso il laboratorio in cui ho svolto la tesi, è stato osservato che in topi *Tph2* *-/-* le fibre serotoninergiche risultano alterate rispetto ad animali wild-type. Il topo modello che ha consentito l'osservazione questo fenomeno, denominato *Tph2::eGFP*, è un topo in cui la sintesi di serotonina è stata abrogata tramite KI di eGFP nel gene *Tph2*: questo consente contemporaneamente all'inattivazione del gene *Tph2*, l'espressione e l'accumulo di eGFP nei neuroni serotoninergici. È stato così evidenziato che in topi mutanti *Tph2* *-/-* l'innervazione serotoninergica rimane inalterata a livello della corteccia, mentre si osservano sia una diminuzione del numero di varicosità a livello del nucleo paraventricolare del talamo che un aumento del numero di fibre che raggiungono il nucleo accumbens (NAs) e l'ippocampo (Migliarini *et al.*, 2013).

Nonostante l'assenza di serotonina a livello del SNC, topi *Tph2* *-/-* nascono rispettando il rapporto mendeliano atteso e, pur presentando alcune alterazioni fisiologiche e comportamentali, raggiungono l'età adulta e sono fertili (Alenina *et al.*, 2009; Gutknecht *et al.*, 2008, Migliarini *et al.*, 2013).

Un fenotipo analogo, se pur con alterazioni più gravi, si osserva in topi sia *Tph2* *-/-* che *Tph1* *-/-*, depleti di serotonina totale (Savelieva *et al.*, 2008). Queste evidenze spingono a supporre che l'apporto di

serotonina materna durante la vita fetale sia sufficiente per sopperire alla mancanza di 5-HT durante lo sviluppo precoce.

È stato tuttavia osservato un aumento della mortalità dei mutanti *Tph2* rispetto ad animali wild-type ed eterozigoti, durante le prime settimane di vita (Alenina *et al.*, 2009; Migliarini *et al.*, 2013). Inoltre, sebbene indistinguibili alla nascita dai fratelli, topi *Tph2* *-/-* mostrano già a partire dai primi giorni di vita, un ridotto tasso di crescita e di conseguenza una massa corporea minore rispetto agli eterozigoti ed ai wild-type; questo aspetto fenotipico tende però a farsi meno evidente dopo lo svezzamento e intorno ai 3 mesi di età i mutanti raggiungono il peso dei fratelli (Alenina *et al.*, 2009; Migliarini *et al.*, 2013). Non è ben chiaro se il ritardo nella crescita di animali *Tph2* *-/-*, che non mostrano difficoltà apparenti nel succhiare il latte né nella digestione, sia dovuto a malnutrizione o ad un effetto metabolico. È stata infatti osservata una riduzione della concentrazione di somatomedina C (Insulin growth factor1 (IGF1)) nel siero di topi *Tph2* *-/-* in fase di svezzamento, che raggiunge il livello dei controlli quando il topo raggiunge la normale massa corporea (Alenina *et al.*, 2009).

In conclusione, modelli KO di *Tph2* hanno consentito di evidenziare l'influenza della serotonina su funzioni fisiologiche ed aspetti comportamentali. Tra le funzioni fisiologiche influenzate dalla 5-HT si osservano: crescita corporea del topo nelle prime settimane di vita (Alenina *et al.*, 2009; Migliarini *et al.*, 2013), regolazione del ciclo sonno-veglia, controllo della pressione sanguigna, dei battiti cardiaci, del ritmo respiratorio (Alenina *et al.*, 2009) e percezione del dolore (Savelieva *et al.*, 2008). Da un punto di vista comportamentale è stato osservato che animali *Tph2* *-/-*, soprattutto maschi, sono più aggressivi dei topi wild-type, mentre le femmine *Tph2* *-/-* presentano una scarsa cura parentale e frequentemente cannibalizzano i cuccioli (Alenina *et al.*, 2009; Migliarini *et al.*, 2013). Tuttavia test comportamentali per valutare i livelli di ansia e depressione hanno fornito risultati in

contraddizione tra loro (Savelieva *et al.*, 2008).

1.7 La genetica molecolare nel topo ed il suo impiego come animale modello

Il topo (*Mus musculus*), in particolar modo da quando si sono rese disponibili le tecnologie che ne consentono la manipolazione genetica, si è rivelato un ottimo sistema modello per studiare il funzionamento e lo sviluppo di sistemi fisiologici complessi, come ad esempio il sistema nervoso.

Grazie alle tecniche di genetica molecolare del topo attualmente disponibili, il genoma murino può essere manipolato in modo estremamente preciso, a livello del singolo gene. Questo consente sia di studiare la funzione di specifici geni osservando il fenotipo indotto da alterazione o inibizione della loro espressione, sia di creare animali modello per patologie umane con componente genetica, modificando il genoma del topo.

Le linee transgeniche sono l'esempio più semplice di manipolazione genetica. Si tratta di topi in cui un frammento di DNA esogeno, munito di un proprio promotore e di un sito di poliadenilazione, è integrato in maniera casuale all'interno del genoma del topo. I domini di espressione del transgene dipendono dal tipo di promotore a cui è associato e possono pertanto essere stabiliti dallo sperimentatore. Ad esempio per ottenere un'espressione ubiquitaria del transgene vengono solitamente utilizzati promotori ubiquitari forti, come quello del citomegalovirus (CMV) o SV40, che consentono la produzione in tutti i tessuti di alti livelli di proteina. Per ottenere invece l'espressione in uno specifico tessuto, o ad un particolare stadio, occorre utilizzare un promotore attivo specificatamente in quel tessuto (tessuto-specifico) o a quello stadio.

Data la possibilità di stabilire il dominio di espressione del DNA esogeno, le linee transgeniche si sono dimostrate un ottimo strumento

per studiare la funzionalità di uno specifico gene attraverso la sua sovraespressione in specifici tessuti, la sua espressione ectopica, oppure ancora, in caso di geni espressi in maniera ubiquitaria, la sovraespressione a livello di specifici tessuti. L'espressione di geni reporter come *eGFP* o *LacZ*, che codifica per la β -galattosidasi, sotto controllo di un promotore tessuto-specifico, consente invece di marcare specificatamente la sottoclasse di cellule in cui il gene reporter è espresso e di seguirne il destino durante lo sviluppo (studi di "fate mapping").

Alcuni esempi di linee transgeniche sono la linea *CMV-Cre*, in cui il gene batterico per la ricombinasi *Cre* è espresso sotto il controllo trascrizionale di un promotore virale forte CMV. Oppure la linea *R2::Cre* in cui l'espressione del transgene è sotto il controllo di un enancher rombomero-specifico di *Hoxa2*: topi *r2::Cre* esprimono la ricombinasi *Cre* unicamente nelle cellule derivate dal rombomero 2 (Ren *et al.*, 2002; Pasqualetti *et al.*, 2007).

La tecnologia del *gene targeting* consente di manipolare il genoma di topo in modo estremamente specifico inattivando uno singolo gene ("knock-out", (KO)), sostituendo con DNA esogeno una porzione della sua sequenza codificante ("knock-in", (KI)) o ancora modificandone la sequenza con la precisione del nucleotide (KI). Rispetto alla transgenesi tradizionale, questa strategia offre allo sperimentatore il vantaggio di scegliere quale gene andare a mutare e quali modificazioni introdurre, in associazione alla domanda biologica posta. Lo sviluppo di questa tecnologia si è reso possibile grazie agli studi indipendenti di Mario Capecchi, Oliver Smithies e Sir Maritn J.Evans, insigniti del premio Nobel per la fisiologia e la medicina nel 2007.

La strategia del *gene targeting* si basa sulla possibilità di sostituire un frammento di DNA genomico con un vettore a DNA appositamente progettato sfruttando il fenomeno della ricombinazione omologa (Fig.

1.3). Tale vettore contiene un marcatore di selezione per l'identificazione delle staminali embrionali ricombinati. A tale proposito si utilizza una cassetta PGK-neo, in cui il gene che conferisce la resistenza all'antibiotico geneticina (G418) è regolato da un promotore costitutivo come quello della gliceraldeide-fosfato chinasi (PGK) (Capecchi, 2005; Lewandoski, 2001).

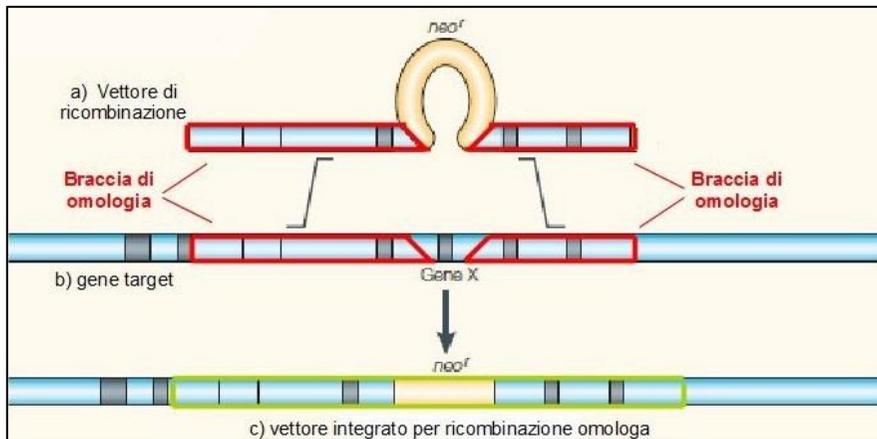


Figura 1.3: Integrazione del vettore di ricombinazione (a) tramite ricombinazione omologa. Il vettore di ricombinazione (a) possiede: due braccia di omologia con il gene bersaglio (b) evidenziate in rosso. La selezione positiva *neo* è inserita tra le due braccia di omologia. Nella maggioranza dei casi il vettore di ricombinazione si integra in maniera casuale nel genoma della cellula, mentre solo raramente riesce a fare ricombinazione omologa con il gene bersaglio. In quest'ultimo caso, il vettore di ricombinazione viene integrato nel genoma cellula insieme alla cassetta di selezione positiva *neo*: ciò consente a queste cellule di sopravvivere in terreni di coltura contenenti neomicina.

Numerosi studi hanno dimostrato che la presenza della cassetta di selezione PGK-*neo* nel *locus* bersaglio, può interferire con la regolazione trascrizionale del *locus*, causando così fenotipi inattesi nei topi KO (Pham *et al.*, 1996). Nel caso in cui lo scopo del *gene targeting* sia l'inattivazione di uno specifico gene, la presenza di una cassetta *neo* può essere sfruttata per ottenere l'inattivazione genica.

Nel caso però in cui lo scopo del *gene targeting* non sia l'inattivazione di un gene, ma una sua modificazione, occorre rimuovere la cassetta di selezione dall'allele ricombinato per impedire interferenze sulla trascrizione. Il metodo più valido per rimuovere la cassetta *neo* sfrutta la transgenesi binaria (si veda di seguito): la cassetta *neo* viene infatti posta tra due siti *FRT* e questo consente di promuoverne l'excisione in presenza della ricombinasi *flp* (Pham *et al.*, 1996; per un compendio si veda Lewandoski, 2001).

Nel laboratorio presso cui ho svolto l'internato di tesi, è stata recentemente generata una linea di topo KI di *eGFP* all'interno del locus *Tph2*, chiamata *Tph2::eGFP*. Una regione di 150 nucleotidi a valle del ATG del gene *Tph2* è stata sostituita con il cDNA *eGFP* inattivando così il gene. La cassetta di selezione *neo*, fiancheggiata da siti *FRT*, è inserita a valle del cDNA di *eGFP* con orientamento opposto rispetto alla trascrizione nel vettore di ricombinazione (fig. 1.4). Se la cassetta *neo* non viene rimossa, come accade nel topo *Tph2::eGFP^(FRT-neo-FRT)*, la sua presenza è sufficiente ad impedire la trascrizione di *eGFP*.

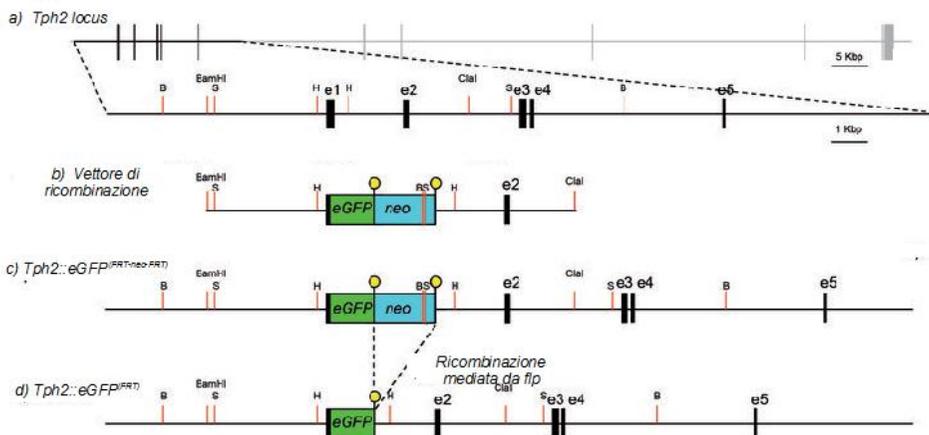


Figura 1.4: Strategia di gene targeting per la generazione dell'allele *Tph2::eGFP*. a) locus *Tph2*; b) vettore di ricombinazione utilizzato per

generare l'allele $Tph2::eGFP$; c) allele $Tph2::eGFP^{(FRT-neo-FRT)}$ ottenuto in seguito a ricombinazione omologa tra il vettore di ricombinazione ed il gene bersaglio; d) Allele $Tph2::eGFP^{(FRT)}$ in cui la cassetta di selezione PGK-neo può essere rimossa tramite ricombinazione mediata dalla ricombinasi *flp*.

La combinazione di transgenesi classica e di *gene targeting*, ha portato allo sviluppo di tecniche di transgenesi binaria, attraverso le quali è possibile regolare in modo tempo- e/o tessuto-specifica l'espressione di uno specifico gene. Queste tecniche consentono ad esempio di studiare l'effetto dell'inattivazione a stadi post-natali di geni la cui inattivazione precoce causa letalità embrionale. Grazie alla transgenesi binaria è inoltre possibile inattivare geni in modo tessuto specifico: questo è utile in caso di geni ad effetto pleiotropico, la cui inattivazione ubiquitaria non consente d'isolare l'effetto del gene in specifici tessuti o processi (per un compendio si veda Lewandoski, 2001; Zhang, 2012).

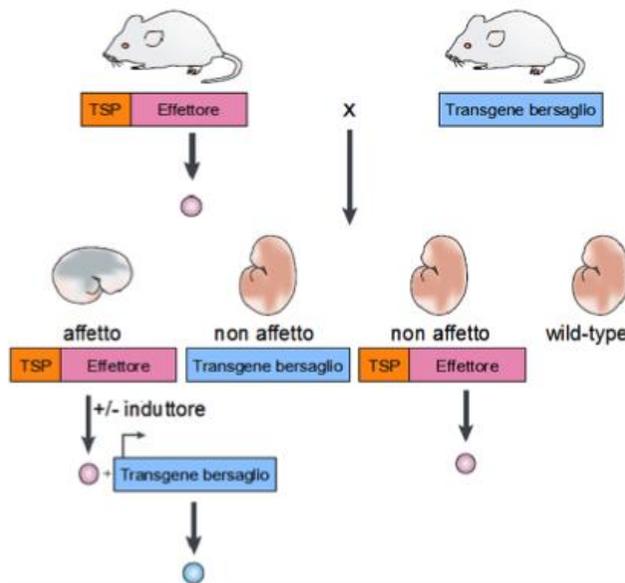


Figura 1.5: Transgenesi binaria nel topo. Il transgene “bersaglio” viene attivato grazie alla presenza del transgene “effettore”. In alcuni casi (per esempio quando l’“effettore” codifica per una ricombinasi sito specifica), l’“effettore” può anche inattivare il “target”. In molti sistemi binari, l’interazione dei due transgeni dipende dalla presenza di un induttore esogeno

che può agire sia attivando che inibendo l'attività dell'"effettore". TSP, "tissue specific promoter", promotore tessuto specifico.

Nei sistemi di transgenesi binaria la regolazione dell'espressione genica è ottenuta attraverso l'interazione di due geni: il gene "bersaglio" di cui si intende modulare l'espressione, opportunamente ingegnerizzato, ed il gene "'effettore'" il cui prodotto va ad agire direttamente sul gene "bersaglio" (Fig. 1.5).

Il sistema di transgenesi binaria più diffuso prevede l'utilizzo di ricombinasi sitospecifiche come la *Cre* e la *flp*: due enzimi appartenenti alla famiglia delle integrasi, che sono state isolate in natura rispettivamente dal batteriofago P1 (Sauer e Henderson, 1989) e dal lievito *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman *et al.*, 1991). Queste ricombinasi si prestano ad essere utilizzate *in vivo* non avendo bisogno né di cofattori né di proteine accessorie per esercitare la loro funzione. La ricombinasi che ha riscosso la massima diffusione nei sistemi di transgenesi binaria, grazie alla sua ottima capacità di funzionare *in vivo* in cellule di topo, è la *Cre*. Meno maneggevole si è rivelata invece la ricombinasi *flp* la quale, essendo estratta da lievito, ha un'attività enzimatica estremamente ridotta a 37°C. Tuttavia è stata recentemente ottenuta *in vitro* una variante termostabile di *flp* che consente di ottenere un'efficienza di ricombinazione *in vivo* paragonabile a quella ottenuta con la ricombinasi *Cre* (Buchholz *et al.*, 1998).

Le due ricombinasi sono in grado di riconoscere specifiche sequenze di DNA chiamate rispettivamente siti *loxP* o *FRT*, e di catalizzare tra questi siti tre diversi tipi di reazioni irreversibili in base all'orientamento ed alla posizione sul DNA dei siti *loxP* o *FRT*:

1. Inversione: i siti *loxP/FRT* si trovano sullo stesso filamento di DNA ed hanno direzioni opposte. Il prodotto della reazione è un'inversione del frammento di DNA "floxed"/"flipped" (Fig. 1.6a).
2. Traslocazione: i siti *loxP/FRT* si trovano su due filamenti diversi

di DNA. Il prodotto della reazione è una traslocazione cromosomica (Fig. 1.6b).

- Excisione: i siti loxP/FRT si trovano sullo stesso filamento ed hanno la stessa direzione. Il prodotto della reazione passa attraverso la formazione transiente di un'ansa tra i due siti, e la successiva excisione del frammento di DNA tra essi compreso. Il frammento exciso all'interno di una cellula viene rapidamente degradato rendendo la reazione di excisione irreversibile (Fig. 1.6c).

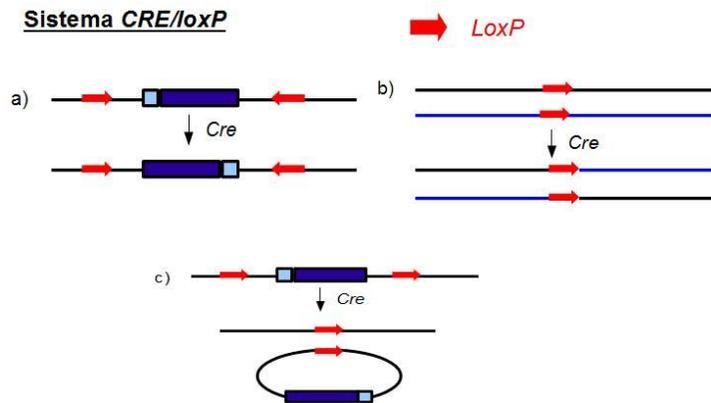


Figura 1.6: Rappresentazione schematica dei meccanismi d'azione della ricombinasi *Cre*. La freccia rossa indica i siti *loxP* e il loro orientamento. (a) inversione; (b) traslocazione; (c) excisione. Le stesse reazioni sono catalizzate anche dalla ricombinasi *flp* nel sistema *flp/FRT*

I siti *loxP* e siti *FRT* sono entrambi costituiti da due sequenze palindromiche di 13 nucleotidi ciascuna separate da una sequenza asimmetrica di 8 nucleotidi, detta "spacer", che conferisce direzionalità al sito: porzioni di DNA fiancheggiati da una coppia di siti *loxP* o *FRT* vengono definiti rispettivamente "floxed" o "fliped".

Nei sistemi di transgenesi binaria le ricombinasi *Cre* o *flp* sono

utilizzate come gene "effettore", mentre il gene "bersaglio" o una porzione di esso è stato "floxed" o "fliped" tramite un intervento di KI. I siti *loxP* o *FRT* vengono inseriti con uguale orientamento sullo stesso filamento di DNA bersaglio, in modo da consentire l'excisione della porzione di DNA "floxed" o "fliped" in presenza rispettivamente della ricombinasi *Cre* o *flp* (Gao *et al.*, 2004). Questi siti possono infatti essere inseriti per *gene targeting* all'interno di introni, o in alcuni casi a livello nella 3' o 5'UTR, di un gene senza influenzarne il livello di espressione (reviewed in Lewandoski, 2001).

Poiché i siti *loxP* o *FRT* vengono inseriti all'interno del gene "bersaglio" tramite KI, la loro integrazione per ricombinazione omologa comporta l'inserzione nel *locus* target anche della cassetta di selezione PGK-neo presente nel vettore di ricombinazione. Come noto la presenza della cassetta *neo* può influire sul tasso d'espressione dell'allele "floxed" o "fliped" in assenza dell'azione della ricombinasi *Cre* o *flp*. Si è pertanto diffuso l'utilizzo di un sistema combinato *Cre/flp* che consenta la rimozione della cassetta *neo* attraverso un processo di transgenesi binaria. La porzione di DNA che s'intende excidere viene posta tra due siti *loxP*, mentre la cassetta *neo* è inserita tra due siti *FRT*. In questo modo la cassetta *neo* può essere rimossa dal DNA grazie all'azione della *flp*, mentre l'excisione del frammento di gene "floxed" è mediata dalla *Cre*.

In conclusione le tecniche di transegenesi binaria consentono di inattivare un gene "bersaglio" in modo tessuto specifico o stadio specifico semplicemente utilizzando una ricombinasi posta sotto controllo di un promotore espresso rispettivamente in un determinato tessuto o ad un determinato stadio.

Negli ultimi anni si sono inoltre sviluppate strategie che consentono di indurre dall'esterno l'attivazione della *Cre* al tempo desiderato. È stato infatti generato un costrutto che codifica per una proteina chimerica costituita dalla ricombinasi *Cre* e da una versione

ingegnerizzata dal recettore degli estrogeni (ER), modificata affinché non riesca più a riconoscere il suo ligando naturale, il 17beta-estradiolo, ma sia responsiva unicamente a ligandi sintetici come il Tamoxifen o il 4-idrossitamoxifen non presenti fisiologicamente nel topo (Feil *et al.*, 1996; Zhang, 1996). In assenza del ligando del recettore degli estrogeni, la ricombinasi *Cre* non può svolgere la sua azione catalitica sul DNA, perché la proteina chimerica è legata da “heat-shock proteins” come Hsp90 e bloccata nel citoplasma. In seguito a somministrazione di Tamoxifen o 4-idrossitamoxifen, invece, il legame del farmaco al recettore ER provoca il distacco della proteina chimerica dalla Hsp90 e la sua migrazione nel nucleo dove la *Cre* può svolgere la sua azione catalitica (Chow *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2006).

1.8 Generazione dell'allele *FloxedTph2* (*FRT-neo-FRT*) e della linea *FloxedTph2* (*FRT-neo-FRT*)

Come ulteriore strumento per investigare il ruolo della serotonina nello sviluppo, nel laboratorio presso cui ho svolto la tesi è stata recentemente generata una linea di KO condizionale del gene *Tph2*, denominata *FloxedTph2*. La linea *FloxedTph2* è progettata per consentire l'inattivazione del gene *Tph2* in modo tessuto- o tempo-specifico, tramite un processo di transgenesi binaria che vede *Tph2* come gene “bersaglio” e la ricombinasi *Cre* come transgene “effettore”. Per questo nel *locus* genico di *Tph2* sono stati inseriti, tramite ricombinazione omologa in ES, due siti *loxP* con lo stesso orientamento, così che la regione “floxed” venga excissa in seguito a ricombinazione somatica *Cre*-mediata.

Poiché il *locus* di *Tph2* (Fig.1.7a) si estende per più di 100 kb e questo rende poco maneggevole floxare l'intera regione codificante, sono state condotte indagini *in silico* per individuare la regione genica in cui inserire i siti *loxP*. Tali indagini hanno portato alla scelta dell'esone 3 come candidato ideale per essere “floxed”: questo esone risulta

costituito da un numero di basi non multiplo di tre e di conseguenza in seguito alla sua excisione viene perduta la cornice di lettura del gene a valle.

Per generare il vettore di ricombinazione *FloxedTph2* è stato isolato un frammento di DNA genomico di 7.3 kb corrispondente alla porzione del gene *Tph2* che si estende dall'esone 3 all'esone 4 (frammento di restrizione NheI-Eco47III). Un sito *loxP* è stato inserito a valle del terzo esone nel sito HpaI. A monte del terzo esone, nel sito di restrizione unico NcoI, è stata invece inserita la cassetta PGK-neo fiancheggiata dalle sequenze *FRT* e *FRT-loxP* (Fig.1.7b). La cassetta PGK-neo è stata inserita con lo stesso orientamento rispetto alla trascrizione del gene *FloxedTph2* per impedire che si verifichino effetti di repressione della trascrizione dell'allele in cui è inserita, come riportato in letteratura (Wang *et al.*, 1999; Pasqualetti. *et al.*,2002; Migliarini *et al.*, 2013), ed è inoltre stata inserita tra due siti *FRT*, così che possa essere excisa in presenza della ricombinasi *flp*.

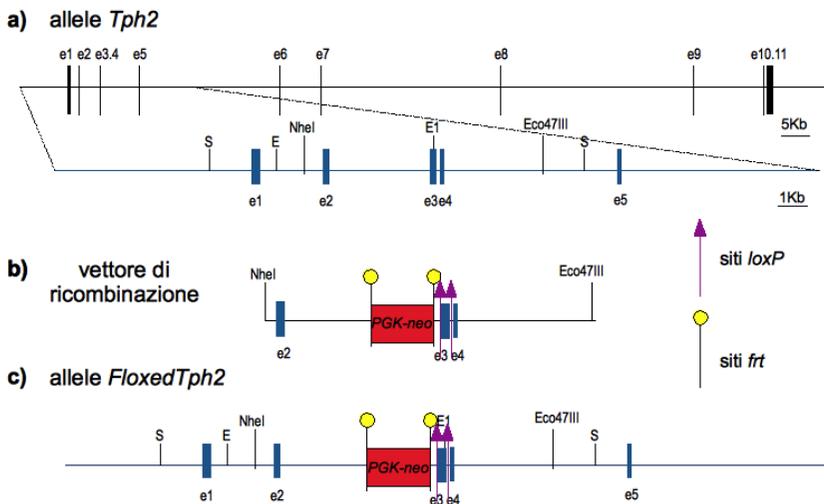


Figura 1.7 : Strategia di gene targeting per la generazione dell'allele *FloxedTph2*. La figura mostra il locus di *Tph2* (a), il vettore di ricombinazione (b) e l'allele *FloxedTph2*(*FRT-neo-FRT*) generato per ricombinazione omologa (c).

Il vettore di ricombinazione *FloxedTph2* così generato è stato quindi introdotto per elettroporazione in ES della linea di topo SV129, al fine di ottenere, tramite ricombinazione omologa, l'allele il *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) (Fig.1.7c). Tramite sothern blot è stato evidenziato un clone di ES in cui la ricombinazione omologa era avvenuta con successo.

Le ES derivate dal clone in cui il costrutto *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) si era integrato per ricombinazione omologa, sono state successivamente microiniettate in blastocisti ospiti permettendo la generazione della linea *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT).

1.9 Scopo della tesi ed approccio sperimentale

Il mio lavoro di tesi è consistito nel caratterizzare da un punto di vista fenotipico la linea *FloxedTph2*, che potrà in seguito essere utilizzata in esperimenti di KO condizionale, al fine di verificare se la rimozione del terzo esone del gene *Tph2* comporta o meno l'effettiva abrogazione della sintesi di serotonina.

Per poter caratterizzare la linea *FloxedTph2* in modo completo è stato necessario analizzare non solo l'effetto fenotipico dell'excisione del terzo esone di *Tph2*, ma anche verificare se la presenza della cassetta PGK-neo e dei siti *loxP* influenzano o meno il livello di trascrizione degli alleli *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) e *FloxedTph2*.

Per poter effettuare questo tipo di analisi, dalla linea *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) sono state derivate, tramite incrocio con topi che esprimono ubiquitariamente la ricombinasi *Cre* o la ricombinasi *flp*, tre varianti della linea, in cui sono stati rimossi rispettivamente l'esone 3 di *Tph2*, la cassetta PGK-neo o entrambi.

Per ottenere l'excisione della cassetta PGK-neo, animali *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) +/- sono stati incrociati con topi *ACTB::FLPe* generando così animali che portano in eterozigosi l'allele *FloxedTph2*^(FRT), chiamato per semplicità allele *FloxedTph2* (Fig. 1.8

c). La presenza di 5-HT a livello dei neuroni del *raphe* di animali *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) *-/-* e *FloxedTph2* *-/-* è stata analizzata per immunostochimica (IHC) (si veda “Materiali e Metodi”) al fine di valutare se la presenza rispettivamente della cassetta PGK-neo o dei siti *loxP*, abbia una qualche influenza sull'attività dell'allele rispettivamente *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) o *FloxedTph2*^(FRT).

A loro volta animali *FloxedTph2* *+/-* sono stati incrociati con topi *CMV-Cre* per ottenere un allele *Tph2* privato del terzo esone, che è stato denominato allele *Tph2Null* (fig. 1.8 d). Durante la mia tesi mi sono concentrata principalmente sull'analisi fenotipica di topi *Tph2Null* *-/-* in cui l'esone 3 del locus *Tph2* è deletato in modo costitutivo in ogni tessuto. Di fatto, se la rimozione del terzo esone di *Tph2* è effettivamente in grado di abrogare la sintesi 5-HT, il fenotipo di topi *Tph2Null* *-/-* dovrebbe risultare analogo a quello di KO convenzionali di *Tph2* (Migliarini *et al.*, 2013). Proprio per questo, basandomi su aspetti fenotipici attribuiti dalla letteratura al KO di *Tph2*, ho confrontato il peso corporeo e la percentuale di sopravvivenza nelle prime settimane di

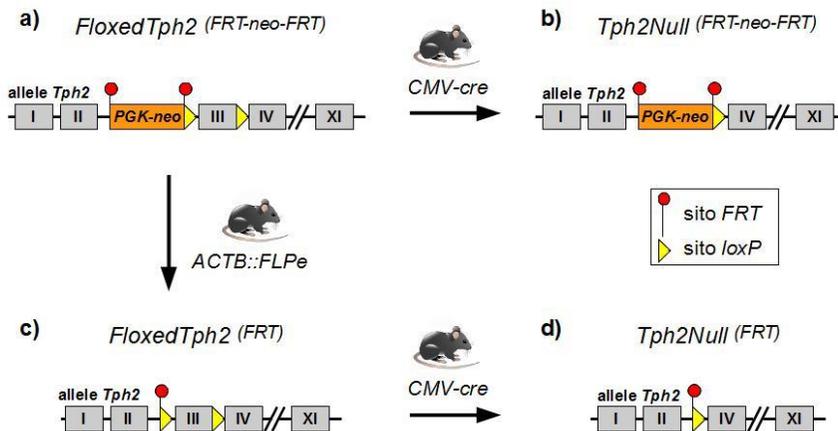


Figura 1.8: Generazione degli alleli *FloxedTph2*, *Tph2Null*^(FRT-neo-FRT), *Tph2Null*^(FRT). La figura mostra come diverse varianti dell'allele ingegnerizzato *FloxedTph2* vengono ottenute a partire dall'allele *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) (a). L'incrocio di animali *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) *+/-* con un topi che esprimono in modo costitutivo la ricombinasi *Cre* (*CMV-Cre*),

consente l'excisione del terzo esone e la generazione dell'allele $Tph2Null^{(FRT-neo-FRT)}$ (b). Invece incrociando topi $FloxedTph2^{(FRT-neo-FRT)}$ +/- con un topi che esprimono in modo costitutivo la ricombinasi *flp* ($ACTB::FLPe$) viene excisa la cassetta PGK-neo, generando l'allele $FloxedTph2^{(FRT)}$ (c). A loro volta se animali $FloxedTph2^{(FRT)}$ +/- con un topi $CMV-Cre$, si ottiene l'excisione del terzo esone e la generazione dell'allele $Tph2Null^{(FRT)}$ (d).

vita di topi $Tph2Null$ -/- rispetto ai wild-type. Ho inoltre investigato, tramite esperimenti di IHC condotti sia a stadi embrionali che post-natali, se nel *raphe* di animali $Tph2Null$ -/- è presente o meno sintesi della 5-HT.

In ultimo animali $FloxedTph2^{(FRT-neo-FRT)}$ +/- sono stati incrociati con topi $CMV-Cre$, ottenendo un allele, denominato $Tph2Null^{(FRT-neo-FRT)}$ (Fig. 1.8 b), privato del terzo esone ma che porta ancora la cassetta PGK-neo inserita all'interno del secondo introne.

Tra gli scopi per cui la linea $FloxedTph2$ è stata generata, di primaria importanza è la possibilità di analizzare se, abrogando la sintesi della serotonina in determinate fasi dello sviluppo o della vita adulta, si ottengono o meno alterazioni delle fibre serotoninergiche, simili a quelle osservati in topi mutanti della linea KO $Tph2::eGFP$. Al fine di poter condurre studi di questo tipo è essenziale poter evidenziare le fibre serotoninergiche indipendentemente dall'immunoreattività della serotonina: gli esperimenti di KO condizionale verranno pertanto condotti su animali trans eterozigoti, indicati con il nome di $FloxedTph2/Tph2::eGFP^{(FRT)}$ +/- +/- (Fig. 1.9 a). Questi topi possiedono sia un allele $FloxedTph2$ da cui è possibile rimuovere l'esone 3 in modo tempo-specifico tramite ricombinazione *Cre*-mediata, che un allele $Tph2::eGFP^{(FRT)}$ (Migliarini *et al.*, 2013). Come analisi preliminare all'utilizzo della linea $FloxedTph2/Tph2::eGFP^{(FRT)}$ +/- +/- , durante il mio internato di tesi, ho analizzato tramite IHC sezioni di *raphe* di animali $Tph2Null/Tph2::eGFP^{(FRT)}$ +/- +/- (Fig. 1.9 b) per verificare se la sintesi

di serotonina cerebrale risulta o meno abrogata. In animali transeterozigoti $Tph2Null/Tph2::eGFP^{(FRT)}$ +/- +/- ho inoltre analizzato il fenotipo delle fibre serotoninergiche che innervano l'ippocampo, sfruttando l'immunoreattività della eGFP.

In fine ho messo appunto esperimenti di KO condizionale in animali adulti $FloxedTph2/Tph2::eGFP^{(FRT)}$ +/- +/- sfruttando il sistema temporalmente inducibile $CMV-CreER^{T2}$; mediante questo sistema è infatti possibile indurre l'excisione del terzo esone di $Tph2$ ad un tempo stabilito dallo sperimentatore, mediante somministrazione di Tamoxifen.

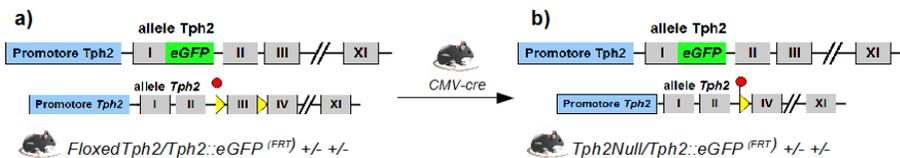


Figura 1.10: (a) Topi $FloxedTph2/Tph2::eGFP^{(FRT)}$ +/- +/- e (b). $Tph2Null/Tph2::eGFP^{(FRT)}$ +/- +/- Topi $FloxedTph2/Tph2::eGFP^{(FRT)}$ +/- +/- (a) possiedono un allele $FloxedTph2$ ed un allele $Tph2::eGFP^{(FRT)}$. Incrociando animali di questo tipo con topi che esprimono la ricombinasi $CMV-Cre$, si ottiene l'excisione del terzo esone dall'allele $FloxedTph2$, generando animali $Tph2Null/Tph2::eGFP^{(FRT)}$ +/- +/- che possiedono un allele $Tph2Null$ ed un allele $Tph2::eGFP^{(FRT)}$ (b).

MATERIALI E METODI

2.1 Animali

I topi sono stabulati in gabbie di plexiglas convenzionali, con cibo ed acqua ad libitum e mantenuti con un ciclo di luce/buio di 12/12h (“on 8:00, off 20:00”), a temperatura costante di 21-23°C.

I protocolli sperimentali sono stati condotti in accordo con il Comitato Etico dell'Università di Pisa, ed approvati dal Dipartimento Veterinario del Ministero della Salute.

2.2 Genotipizzazione

Dopo aver effettuato una biopsia a livello della coda degli animali transgenici di cui deve essere determinato il genotipo si procede all'estrazione del DNA genomico. Il tessuto è incubato in 400 µl di Tail Buffer e lasciato “over night” (o/n) a 50°C. Dopo un passaggio in centrifuga per rimuovere le parti di tessuto non digerite si procede alla precipitazione del DNA con isopropanolo. Il “pellet” di DNA così ottenuto viene successivamente lavato in etanolo 70%, e risospeso in TE (100 mM TRIS pH 8,1 mM EDTA).

Il genotipo delle diverse linee murine viene quindi verificato mediante la tecnica della PCR con oligonucleotidi specifici per le diverse linee transgeniche. La reazione di PCR viene condotta utilizzando il protocollo standard della DNA polimerasi GoTaq (Promega). I prodotti amplificati per PCR vengono successivamente fatti migrare su un gel di agarosio al 1% (peso/volume) e visualizzati ai raggi UV grazie ad una colorazione con etidio bromuro (EtBr).

*Soluzioni:***Tail Buffer**

Tris pH 8.5	100mM
NaCl	200mM
SDS	0.2%
EDTA	5mM
ProteinasiK	1 mg/ml

2.3 Prelievo embrioni

Allo scopo di stabilire con precisione lo stadio di sviluppo embrionale, gli animali vengono messi in incrocio al termine della fase di luce, ed il giorno successivo, vengono considerate gestanti allo stadio di 0,5 giorni *post coitum* (“days post coitum”, dpc) le femmine che presentano un “plug” vaginale. Una volta raggiunto lo stadio embrionale desiderato, le femmine gestanti vengono sacrificate tramite dislocazione celebrale e sottoposte a taglio cesario per asportare l'utero contenente gli embrioni. Una volta asportato, l'utero viene disposto in una piastra Petri contenente un tampone salino fosfato (PBS 1X) e con l'ausilio di uno stereomicroscopio e di pinze per microchirurgia, ciascun embrione viene liberato dagli annessi embrionali (sacco vitellino e amnios). Lo stadio di sviluppo embrione di ciascun embrione viene confermato utilizzando un atlante embrionale (“The Atlas of Mouse Development”, Matthew H. Kaufman). Da ciascun embrione viene quindi prelevato, tramite biopsia della coda, un campione di tessuto per la successiva genotipizzazione o, in alternativa, il DNA genomico per la genotipizzazione può essere estratto dai sacchi vitellini.

Nel caso di embrioni ad uno stadio di sviluppo successivo a 13.5 dpc ed in cui s'intende rilevare la presenza di serotonina tramite esperimenti di immunoistochimica, si procede con l'asportazione dell'encefalo mediante accurata dissezione. L'estrazione dell'encefalo

consente infatti un fissaggio più efficiente dei tessuti prevenendo così la degradazione dell' epitopo 5-HT.

Soluzioni:

Tampone fosfato salino (PBS):

NaCl	137mM
KCL	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

2.4 Estrazione DNA da sacco vitellino

Al fine di estrarre il DNA, un campione di sacco vitellino viene prelevato tramite biopsia, incubato in 100 µl di soluzione K-Buffer e lasciato digerire per 2 ore a 50°C. Dopodiché viene sottoposto a 15 minuti di shock termico a 100°C per inattivare la proteinasi K.

Soluzioni:

K-Buffer

Tris pH 8,3	10 mM
KCl	50 mM
MgCl	1.5 mM
Tween 20	0.5%
ProteinasiK	1 mg/ml

2.5 Preparazione dei tessuti per esperimenti di immunoistochimica

Prima di procedere con l'estrazione dell'encefalo, i tessuti di animali a stadi post-natali vengono lavati e fissati mediante la tecnica della perfusione trans-cardiaca effettuata con l'ausilio di una pompa peristaltica. Gli animali vengono anestetizzati tramite iniezione intraperitoneale di Avertina, dopodiché la cassa toracica viene aperta in modo da esporre il cuore, l'ago all'estremità in uscita della pompa peristaltica viene inserito nel ventricolo sinistro, la pompa attivata e l'arteria destra recisa all'attaccatura del cuore. I tessuti del topo vengono in un primo momento perfusi con la soluzione di lavaggio (1X PBS) ed in seguito con la soluzione di fissaggio (4% paraformaldeide (PFA) / 1X PBS). Dopo la perfusione, il cervello del topo viene asportato mediante dissezione e lasciato a post-fissare o/n a 4°C in una soluzione 4% PFA / 1X PBS in agitazione.

Per quanto riguarda invece sia gli embrioni interi che gli encefali embrionali, questi vengono fissati o/n a 4°C in una soluzione 4% PFA / 1X PBS in agitazione.

Dopo il fissaggio, i cervelli o gli embrioni, vengono tolti dalla soluzione di fissaggio e lavati in 1X PBS per circa un ora, dopodiché vengono inclusi in un gel di 2.5% agarosio e tagliati al vibratomo (Leica Microsystems) in sezioni di 50-100µm. Le sezioni vengono raccolte in appositi contenitori ("vial") contenenti o una soluzione permeabilizzante di 0.3% PBTr (1X PBS / 0.3% Triton X-100), in caso di tessuti embrionali, oppure di 0.5% PBTr (1X PBS / 0.5% Triton X-100) in caso di tessuti adulti.

2.6 Immunoistochimica in fluorescenza

Le sezioni di tessuto ottenute dal taglio al vibratomo vengono incubate in agitazione per almeno 90 minuti a temperatura ambiente ("room temperature", RT) in una soluzione di "blocking" (0.3%-0,5% PBTr /

0.5% siero di agnello inattivato). Dopodiché la soluzione di “blocking” viene rimossa e le sezioni vengono lasciate ad incubare o/n a 4°C in agitazione in una soluzione di “blocking” contenete l'anticorpo primario specifico per la proteina che s'intende rivelare. Le diluizioni degli anticorpi primari utilizzati sono le seguenti: “rabbit” anti-5-HT (Sigma) 1:500; “chicken” anti-eGFP (Aves Labs) 1:1000, “rabbit” anti-eGFP (Invitrogen) 1:2000. Il giorno seguente le sezioni vengono lavate per 4-5 ore in PBT 0.3%-0,5%, dopodiché vengono incubate in una soluzione di “blocking” contenente l'anticorpo secondario e lasciati o/n a 4°C. Le diluizioni degli anticorpi secondari utilizzati sono le seguenti: “goat” IgG “anti-rabbit” coniugato con Rhodamina “rodamine Red-X” (Invitrogen) 1:500; IgG “ati-chicken” coniugato con fluoresceina (Invitrogen) 1:500. Il giorno successivo le sezioni vengono lavate con PBT 0.3%-0.5% per circa 2 ore e successivamente incubate per 5 minuti a RT in buio in una soluzione che permette di marcare i nuclei delle cellule (DAPI (1:10000), PBT 0.3%-0.5%). Dopo essere state lavate 2-3 ore in PBT 0.3%-0.5%, le sezioni sono disposte su vetrini portaoggetti e successivamente montati con “Aqua Poly-Mount”.

2.7 Immunoistochimica con rivelazione in DAB e sistema di amplificazione “ABC-Kit” “Vectastain”

Nel caso di immunoistochimica con sistema di amplificazione “ABC Kit” “Vectastain” le sezioni ottenute dal taglio al vibratomo prima dell'aggiunta della soluzione di “blocking” vengono incubate al buio a RT in una soluzione 0.5% H₂O₂ / 1X PBS per 15-30 minuti al fine di inattivare le perossidasi endogene. Per questo tipo di immunoistochimica viene utilizzato un anticorpo secondario “anti-rabbit” coniugato con biotina (Vectastain) diluito 1:200. Dopo l'anticorpo secondario le sezioni vengono lavate per circa 4 ore in PBTr 0.3-0.5%, dopodiché vengono incubate per 2 ore in una soluzione “AB” (Avidina DH (Vectastain) 1:100 / Perossidasi H di

rafano biotinilata (Vectastain) 1:100 / 0.3-0.5% PBTr) precedentemente preparata e lasciata ad incubare per 30min. Dopo aver lavato le sezioni 2 volte per 30 minuti in PBTr 0.3-0.5%, il segnale viene rivelato in seguito ad incubazione di 5 + 5 minuti in una soluzione contenente il substrato cromogeno 3'3'-diaminobenzidina tatraidrocloride (DAB) (Sigma) (50 mM Tris buffer pH7.6 / 0,1% DAB / 0,024% H₂O₂). La DAB è un substrato cromogeno delle perossidasi ed in presenza di H₂O₂ forma un precipitato colorato. La sezioni vengono lavate in PBS 1X per rimuovere il substrato di reazione DAB, e sono quindi pronte per essere montate sui vetrini portaoggetti.

Soluzioni:

1M Tris buffer pH7.6

Tris HCl	76.9 mM
Tris Base	23.1 mM

2.8 Acquisizione ed elaborazione delle immagini

I preparati sono stati analizzati con un microscopio a fluorescenza "Eclipse E600" Nikon o con un macroscopio "MacroFluo microscope" Leica. Le immagini sono state acquisite con una telecamera digitale "DS-SMc" Nikon. Le tavole delle figure sono infine state ottenute impiegando un "software" di grafica tipo Photoshop.

2.9 Estrazione RNA totale

Animali adulti anestetizzati con iniezione intraperitoneale di Avertina vengono decapitati ed il *raphe* viene asportato rapidamente per impedire la degradazione dell'RNA. Il campione di tessuto asportato viene incubato in 1 ml di reagente Trizol che consente la degradazione dei tessuti mantenendo intatto l'RNA. Successivamente l'RNA viene

separato in fase acquosa mediante l'aggiunta di 200 μ l di Cloroformio. La fase acquosa viene quindi recuperata e l'RNA viene precipitato in isopropanolo, lavato in etanolo 75% e risospeso in acqua.

2.10 RT-PCR

Il cDNA viene ottenuto tramite una reazione di RT-PCR (reverse-trascrittasi PCR) catalizzata dalla trascrittasi inversa ImProm-II Reverse Trans-crittasi (Promega) usata secondo le indicazioni del produttore. Per la reazione di RT-PCR sono stati utilizzati oligonucleotidi esamerici random "random hexamer" (Promega). Come controllo negativo viene eseguita in parallelo una reazione, denominata RT-, in assenza della trascrittasi inversa.

Esempio di reazione condotta in 20 μ l:

Buffer di reazione (ImProm-II) 5x	4 μ l
MgCl ₂ (25mM)	2,4 μ l
Miscela di nucleotidi (dNTPs) (2,5mM)	8 μ l
Rnase-Inhibitor (40 UE/ μ l)	0.5 μ l
Esameri random (500 μ g/ml)	1 μ l
Trascrittasi inversa (ImProm-II)	1 μ l
RNA (500ng/ μ l)	2 μ l
Acqua a volume	

La quantità di cDNA ottenuta viene normalizzata in base al segnale dell'mRNA della beta-actina, ubiquitariamente espressa. Il cDNA della beta-actina viene amplificato in una reazione di PCR, che utilizza il protocollo standard della DNA polimerasi GoTaq (Promega), ed impostata con i seguenti parametri di ciclo: denaturazione a 94° C per

25 secondi, appaiamento a 60° C per 30 secondi ed allungamento a 72° C per 40 secondi (per 35 cicli).

Sequenza degli oligonucleotidi (“senso,” F, e “antisenso”, R) utilizzati per l'amplificazione della beta-actina.

β-actin

F: 5'-AGGTCATCACTATTGGCAACGA-3'

R: 5'-CCGATCCACACAGAGTACTTG-3'

2.11 PCR “esone-specifica”

Il cDNA totale viene amplificato in una reazione di PCR specifica per ogni esone del trascritto *Tph2* utilizzando il protocollo standard della DNA polimerasi GoTaq (Promega), con le seguenti impostazioni di ciclo: denaturazione a 94° C per 25 secondi, appaiamento a 60° C per 30 secondi ed allungamento a 72° C per 1 minuto (per 35 cicli). Questo tipo di PCR è fatta in 10 distinte reazioni in ciascuna delle quali vengono utilizzati un oligonucleotide “senso” complementare ad una sequenza interna al primo esone di *Tph2* ed uno oligonucleotide “antisenso” complementare ad una sequenza interna ad uno degli esoni di *Tph2* successivi al primo (Fig. 2.1). Ciò consente di verificare la presenza di trascritti *Tph2* maturi e di valutare se in tali trascritti sono presenti tutti gli esoni attesi. Nella figura 2.1 sono evidenziate le regioni di appaiamento sulla sequenza di DNA genomico di *Tph2* degli oligonucleotidi utilizzati.

Sequenza dei “primer” (“senso”, F, e “antisenso”, R) utilizzati per l'amplificazione “esone specifica” del cDNA di *Tph2*.

F 1: 5'-CAGTTCCTCCTTCATCTCTGC-3'

R 2: 5'-CGCTTTTCTTGTCCCTCGC-3'

R 3: 5'-CTCATTGAATTCCGTTTTGCCAC-3'

R 4: 5'-CGGTGAGAGCATCTGTCTAAC-3'

R 5: 5'-CTCCAGTACTTGGTCAGCAGG-3'
 R 6: 5'-GAGAGCTCCCGGAACACAAC-3'
 R 7: 5'-TCACTGTGAAGCCCAGATCGC-3'
 R 8: 5'-AGCAAACCTGGGATCCGCAAGC-3'
 R 9: 5'-TTGCAAAGGCCGAACTCGATT-3'
 R 10: 5'-ATTTACACACGCCTTGTCGG-3'
 R 11: 5'-GGTCCTGCACCACATTTCTCA-3'



Figura 2.1: rappresentazione schematica delle regioni di appaiamento dei "primer" utilizzati per la PCR esone specifica all'interno del locus genomico di *Tph2*.

2.12 Somministrazione dei farmaci

La Fluoxetina è stata somministrata nell'acqua da bere alle femmine gestanti a partire da 0.5 dpc fino al giorno del sacrificio. La quantità di Fluoxetina disciolta in acqua è stata calcolata tenendo conto del peso della femmina e della quantità di acqua bevuta in media ogni giorno al fine di ottenere una quantità di farmaco somministrata pari a 10mg/Kg/giorno (Santarelli *et al.*, 2003).

Il Tamoxifen è stato somministrato ad animali adulti stabulati in gabbia singola tramite iniezione intraperitoneale. Gli animali hanno ricevuto per ciascuna iniezione una quantità pari a 1mg di farmaco disciolto in olio di girasole. Gli animali di controllo, stabulati anch'essi in gabbia singola, hanno ricevuto iniezioni di olio di mais (solvente in cui viene disciolto il Tamoxifen) pari in numero ed effettuate con la stessa tempistica degli animali trattati con Tamoxifen. Sono stati testati due protocolli sperimentali: nel primo caso gli animali hanno ricevuto un'iniezione di Tamoxifen ogni 24 ore, per 5 giorni consecutivi, e sono

stati sacrificati dopo 3 settimane dal termine del trattamento. Nel secondo protocollo gli animali hanno ricevuto un'iniezione di Tamoxifen ogni 24 ore, per 7 giorni consecutivi, e sono stati sacrificati dopo 4 settimane.

RISULTATI

3.1 Generazione di topi mutanti *Tph2Null* *-/-*

Allo scopo di generare animali *Tph2Null* *-/-* sono stati incrociati tra loro topi *Tph2Null* *+/-* e successivamente gli animali nati sono stati genotipizzati mediante PCR utilizzando oligo specifici per discriminare i genotipi wild-type, *Tph2Null* *+/-* e *Tph2Null* *-/-*. Grazie a questo metodo è emerso che, alla nascita, i mutanti *Tph2Null* *-/-* costituiscono circa un quarto del numero totale dei nati, come atteso dal rapporto Mendeliano tra i genotipi. Questo dato consente di ipotizzare che la delezione del terzo esone nei *Tph2Null* *-/-* non sia causa di letalità embrionale. Tuttavia ho osservato che, durante le prime settimane di vita, la percentuale di sopravvivenza degli animali *Tph2Null* *-/-* diverge da quella di topi sia wild-type che *Tph2Null* *+/-* nati nelle stesse cucciolate (Fig 3.1a). In particolare, solo il 59% dei *Tph2Null* *-/-* nati vivi raggiunge la prima settimana di vita, mentre per i wild-type e i *Tph2Null* *+/-* la percentuale di sopravvivenza nel medesimo arco di tempo è rispettivamente del 97% e 93%. Cinque settimane dopo la nascita solo il 48% dei *Tph2Null* *-/-* è ancora vivo a fronte del 97% dei wild-type e del 92% dei *Tph2Null* *+/-*. Nonostante questa elevata mortalità nelle prime settimane di vita, i mutanti che sopravvivono raggiungono l'età adulta e sono fertili.

Un ulteriore aspetto interessante che ho potuto osservare è stato che, nonostante alla nascita i mutanti siano indistinguibili dai fratelli, già dopo pochi giorni i topi *Tph2Null* *-/-* mostrano una ridotta massa corporea rispetto ai wild-type ed ai *Tph2Null* *+/-* nati nelle stesse cucciolate. Per analizzare più in dettaglio questo aspetto ho monitorato il tasso di crescita di topi wild-type, *Tph2Null* *+/-* e *Tph2Null* *-/-* nei primi mesi di vita, controllando il peso con cadenza settimanale. È così emerso che il tasso di crescita medio nei mutanti *Tph2Null* *-/-* è drasticamente ridotto rispetto a wild-type e *Tph2Null* *+/-*, con la

massima differenza evidenziata intorno alle 4 settimane di vita (riduzione di circa il 60%, Fig. 3.1b).

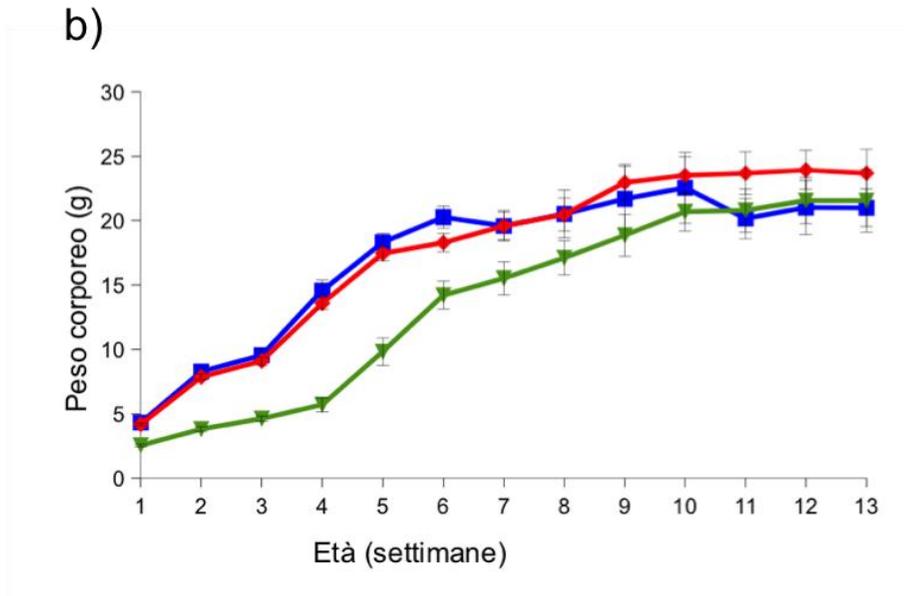
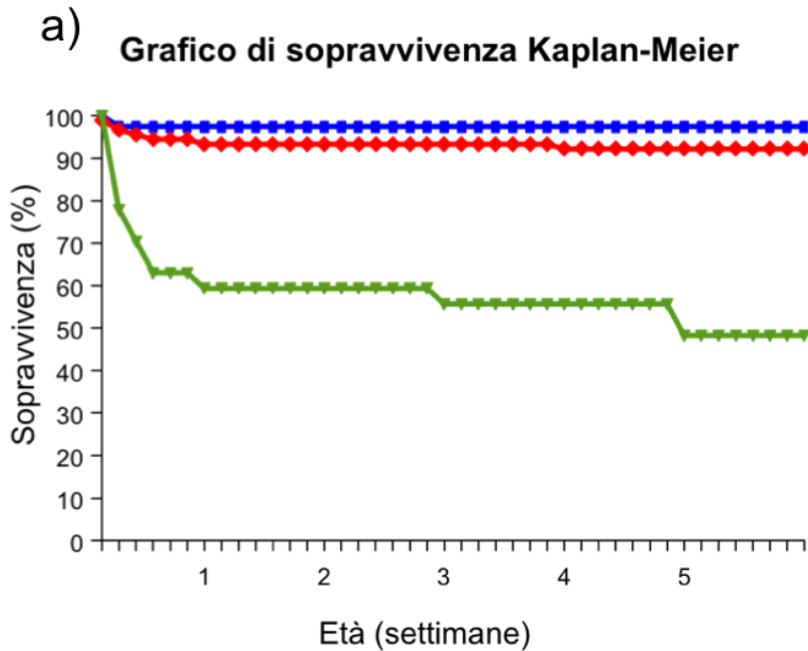


Figura 3.1: a) Grafico Kaplan-Maier in cui è mostrata la percentuale di sopravvivenza nelle prime 5 settimane di vita di animali wild-type (n=38),

Tph2Null +/- (n=90) e *Tph2Null* -/- (n=27); b) Curve di crescita in cui è mostrato l'andamento del peso nelle prime 13 settimane di vita di topi wild-type (n=29), *Tph2Null* +/- (n=86) e *Tph2Null* -/- (n=21).

Tuttavia, a partire dallo svezzamento, il tasso di crescita dei mutanti aumenta, ed intorno alle 11 settimane di vita il peso medio dei topi *Tph2Null* -/- sopravvissuti è paragonabile a quello dei wild-type e *Tph2Null* +/-.

E' interessante notare che l'alta mortalità e la riduzione del tasso di crescita osservate nei topi *Tph2Null* -/- durante le prime settimane di vita rispecchiano il fenotipo dei KO convenzionali di *Tph2* descritti in letteratura (Migliarini *et al.*, 2013; Alenina *et al.*, 2009).

3.2. Caratterizzazione del locus *Tph2* negli alleli *Tph2Null*, *FloxedTph2* e *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT)

Al fine di validare la linea *FloxedTph2* come KO condizionale per la sintesi della serotonina nel CNS, è stato necessario verificare se la delezione del terzo esone del gene *Tph2* provochi la deplezione della sintesi di 5-HT nel cervello. A questo scopo, mediante esperimenti di immunohistochimica utilizzando un anticorpo specifico contro la 5-HT, ho confrontato i livelli di serotonina presenti nei neuroni del *raphe* di animali *Tph2Null* -/- e wild-type a 30 giorni post-natale (P30). L'analisi di sezioni coronali del cervello di animali wild-type e *Tph2Null* -/- lungo l'intero asse antero-posteriore del rombencefalo ha mostrato che la rimozione del terzo esone del gene *Tph2* comporta la deplezione della sintesi di serotonina in tutti i nuclei del *raphe* dei mutanti (Fig. 3.2 d, i, p), rispetto ai controlli (Fig. 3.2 a, f, m). Tuttavia, un'analisi dettagliata dei preparati mi ha permesso di evidenziare, in alcuni neuroni del *raphe* di animali *Tph2Null* -/-, un segnale residuo di 5-HT, che può essere meglio osservato in immagini acquisite aumentando l'ingrandimento ed il tempo di acquisizione dell'immagine (Fig. 3.2 e, l, q). Questo segnale residuo è solitamente localizzato nei nuclei del

raphe in cui l'immunoreattività alla serotonina appare più forte anche negli animali wild-type. A partire da queste evidenze è pertanto possibile ipotizzare che la rimozione del terzo esone del gene *Tph2* produca una riduzione sostanziale e generalizzata dei livelli di serotonina, la cui sintesi però non risulta completamente abrogata come nel KO convenzionale e resta rilevabile per immunistoichimica solo nelle cellule in cui la quantità di 5-HT prodotta è superiore alla soglia di sensibilità della tecnica.

Al fine di caratterizzare in dettaglio la linea *FloxedTph2* è stato necessario osservare se la presenza dei siti *loxP* o della cassetta PGK-neo influenzino il livello di trascrizione degli alleli rispettivamente *FloxedTph2* e *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT). A tale riguardo, evidenze sperimentali hanno dimostrato che la presenza di sequenze esogene di DNA all'interno del genoma di animali knock-out, quali ad esempio le cassette di resistenza ad antibiotici, può modificare l'espressione dei geni posti in prossimità risultando in fenotipi non spiegabili dalla soppressione del solo gene di interesse (Pham *et al.*, 1996).

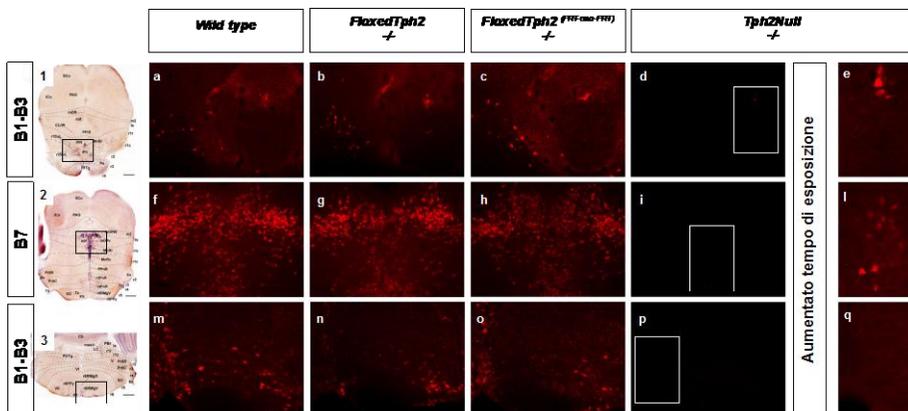


Figura 3.2: Esperimenti di immunistoichimica in fluorescenza mostrano i livelli di serotonina in sezioni coronali di *raphe* di animali wild-type (a, f, m), *FloxedTph2*^{-/-} (b, g, n), *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT)^{-/-} (c, h, o) e *Tph2Null*^{-/-} (d-e, i-l, p-q) sacrificati a P30. Le immagini mostrate corrispondono a sezioni rappresentative lungo l'asse rostro-caudale e sono disposte in modo che le

regioni rostrali compaiano nella riga in alto nel pannello (a-e), le mediane nella riga centrale (f-l) e le caudali in basso (m-q): il nome dei nuclei mostrati in ciascuna riga è indicato sulla sinistra. (1-3) Immagini in campo chiaro a basso ingrandimento (Puelles *et al.*, 2012) che mostrano i livelli, sull'asse rostro-caudale, dei nuclei mostrati in ciascuna riga (a-q): i rettangoli neri evidenziano le regioni le *raphe* fotografate (a-q).

I livelli di serotonina presenti nei nuclei del *raphe* di animali *FloxedTph2* *-/-* (b, g, n) e *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) *-/-* (c, h, o) sono paragonabili a quelli dei wild-type (a, f, m). Al contrario, in topi *Tph2Null* *-/-* (d, i, p) si osserva la quasi totale mancanza del segnale di immunofluorescenza contro la serotonina: è tuttavia possibile notare un segnale residuo nelle acquisizioni ottenute a maggior ingrandimento e con un più lungo tempo di esposizione (e, l, q, corrispondenti alle regioni evidenziate dal rettangolo bianco in d, i, p).

Barra di scala: 100µm(a-d, f-i, m-p), 50µm (e, l, q).

A tale scopo ho analizzato, mediante immunohistochimica, i livelli di serotonina presenti a P30 nei nuclei del *raphe* di animali *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) *-/-* e *FloxedTph2* *-/-*, confrontandoli con quelli wild-type. L'analisi ha mostrato che i livelli di 5-HT in animali *FloxedTph2* *-/-* (Fig.3.2 b, g, n) sono paragonabili a quelli dei controlli (Fig. 3.2 a, f, m), permettendo di ipotizzare che la presenza dei siti *loxP* intorno al terzo esone del gene *Tph2* non infici l'attività dell'allele. Allo stesso modo, l'analisi dei livelli di serotonina in animali *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) *-/-* (Fig. 3.2 c, h, o) non ha mostrato differenze significative rispetto ai controlli wild-type (Fig. 3.2 a, f, m). Tuttavia, questa evidenza non sembra sufficiente ad escludere l'ipotesi che l'allele *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) possa essere un allele ipomorfo. Infatti, l'attività dell'allele *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) potrebbe essere ridotta solo lievemente a causa dalla presenza della cassetta PGK-neo, ed il fenotipo ipomorfo potrebbe non essere evidenziabile a stadi adulti poiché i livelli di serotonina accumulati nei neuroni del *raphe* sono elevati e possono pertanto mascherare la presenza di lievi variazioni nella quantità di 5-HT sintetizzata. Per verificare quest'ipotesi ho ripetuto l'esperimento di immunohistochimica su embrioni a 12.5 giorni di gestazione (*days post coitum*, dpc; Fig. 3.3), dato che a questo

stadio embrionale non si è ancora verificato un sostanziale accumulo di serotonina nei neuroni del *raphe*.

L'analisi ha mostrato una lieve diminuzione dei livelli di serotonina negli embrioni *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) *-/-* rispetto ai wild-type, che potrebbe essere attribuita ad una diminuzione del livello di trascrizione dell'allele dovuta alla presenza della cassetta PGK-neo (Fig. 3.3). L'insieme di queste evidenze permette di ipotizzare che l'allele *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) sia un allele ipomorfo, ma che la sua attività sia solo lievemente ridotta rispetto a quella wild-type; di conseguenza il fenotipo risulta visibile solo a stadi embrionali precoci, mentre a stadi tardivi l'accumulo della 5-HT maschera la differenza osservata.

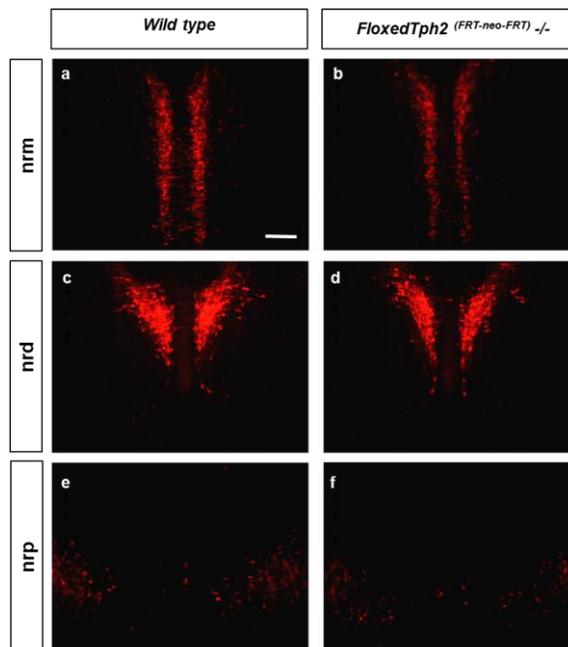


Figura 3.3: Segnale di immunofluorescenza della serotonina in sezioni coronali di *raphe* di embrioni *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) *-/-* (b, d, f) allo stadio di 12.5 dpc, rispetto ad embrioni wild-type (a, c, e) allo stesso stadio. Sono mostrate sezioni rappresentative lungo l'asse rostro-caudale in cui si osservano i nuclei del *raphe* mediano (nrm) (a-b), i nuclei del *raphe* dorsale (nrd) (c-d) ed nuclei del *raphe* pallido (nrp)(e-f). Barra di scala: 100 μ m.

Per spiegare la diminuzione dei livelli di 5-HT osservati negli animali nel cui genoma è presente la cassetta PGK-neo, ho analizzato mediante RT-PCR il *raphe* di animali *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) -/- per verificare se fossero presenti trascritti *Tph2* maturi contenenti la cassetta PGK-neo. A questo scopo ho estratto e retrotrascritto l'RNA totale dal *raphe* di topi adulti *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) -/-, e sottoposto il cDNA così ottenuto a una reazione di PCR esone-specifica, tecnica che consente di evidenziare diverse isoforme del trascritto (si veda “materiali e metodi”) (fig. 3.4a). La PCR esone-specifica ha prodotto amplificati identici a partire da cDNA *wild-type* e *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) -/-. Inoltre, per rilevare la presenza di eventuali RNA contenuti la cassetta PGK-neo, ho condotto altre tre reazioni di PCR. Nella prima reazione ho utilizzato oligonucleotidi complementari a sequenze interne alla cassetta PGK-neo; nella seconda, un oligonucleotide “senso” interno alla cassetta PGK-neo ed un “antisenso” complementare ad una sequenza interna all'esone 3. Infine, nella terza reazione ho utilizzato un oligonucleotide “senso” complementare ad una sequenza interna al secondo esone ed uno “antisenso” interno alla cassetta PGK-neo (fig. 3.4b). La prima e la seconda reazione di PCR hanno prodotto un amplificato della grandezza attesa, mentre la terza reazione non ha prodotto nessun amplificato. Se ne può dedurre che nel *raphe* di animali *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) -/- siano presenti trascritti del gene *Tph2* che contengono ancora la cassetta PGK-neo. Tuttavia non è chiaro se tali trascritti siano ottenuti a partire dal promotore forte PGK, oppure se si tratti di trascritti intermedi non ancora maturi ottenuti a partire dal promotore di *Tph2*.

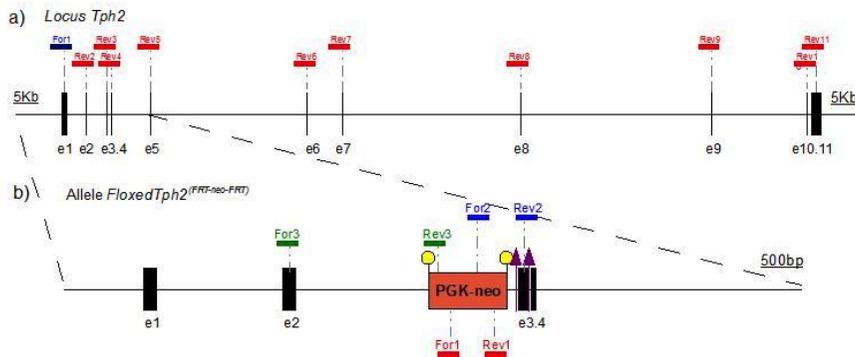


Figura 3.4: L'immagine mostra (a) le regioni di appaiamento all'interno del locus di *Tph2* degli oligonucleotidi utilizzati per la PCR esone-specifica e (b) le regioni di appaiamento, sull'allele *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT), degli oligonucleotidi utilizzati per analizzare la presenza di RNA *Tph2* contenenti la cassetta PGK-neo.

3.3 Analisi dell'attività residua di *Tph2* nei nuclei del *raphe* di animali *Tph2Null* *-/-*

Il fenotipo di mutanti *Tph2Null*, per quanto concerne mortalità e tasso di crescita nei primi mesi di vita, rispecchia quello osservato nei KO convenzionali di *Tph2*. Tuttavia, analisi di immunistochemica P30 hanno evidenziato la presenza di 5-HT residua nei neuroni serotonergici di topi *Tph2Null* *-/-*. Mi sono pertanto chiesta se la triptofano idrossilasi 2, prodotta a partire da un gene *Tph2* privato del terzo esone, mantenga un'attività residua rilevabile durante tutta la vita dell'animale, o se si tratti di un fenomeno stadio-specifico.

A questo scopo ho analizzato più in dettaglio, mediante esperimenti di immunistochemica, la presenza di serotonina in sezioni coronali di *raphe* di animali *Tph2Null* *-/-* agli stadi di P2, P14 e P60 (Fig. 3.5). L'analisi di questi stadi, in associazione con quella effettuata a P30, offre un quadro generale della vita post-natale del topo, dai giorni immediatamente successivi alla nascita all'età adulta.

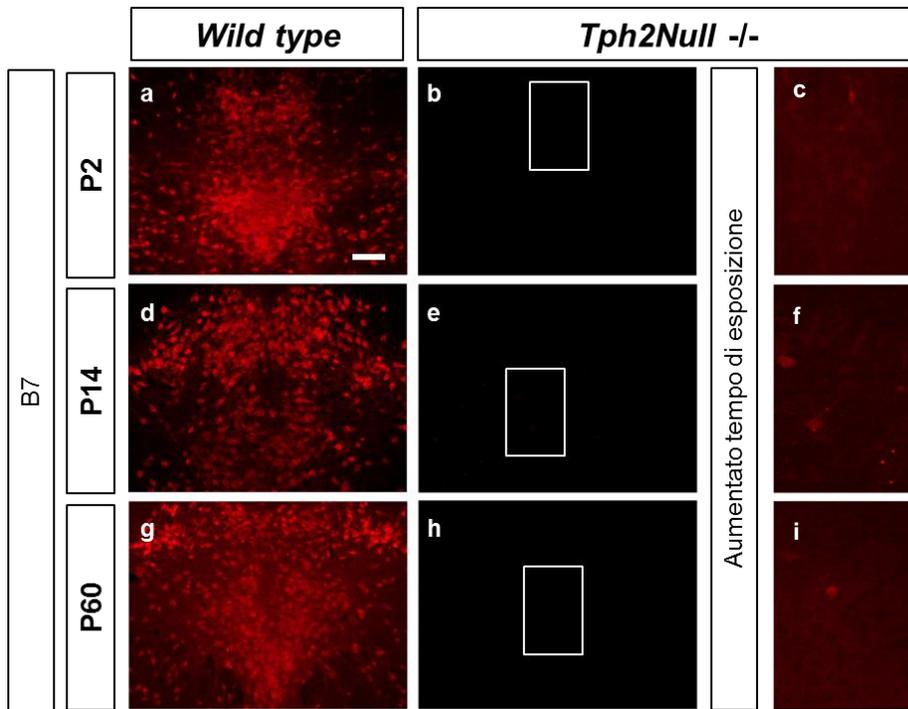


Figura 3.5: Esperimenti di immunohistochimica in fluorescenza mostrano i livelli di serotonina in sezioni coronali del nucleo del *raphe* dorsale B7 di animali wild-type (a, d, g) e *Tph2Null -/-* (b-c, e-f, h-i) sacrificati a P2 (a-c), P14 (d-e) e P60 (g-i). Nella colonna di destra (c, f, i) sono mostrate foto, realizzate a maggiore ingrandimento e con un tempo di esposizione più lungo, delle regioni evidenziate con un rettangolo bianco in b, e, h. A tutti gli stadi post natali mostrati, si osserva in animali *Tph2Null -/-* (b, e, h) una drastica riduzione del livello di serotonina evidenziata per immunohistochimica rispetto ai wild-type (a, d, g). Un segnale di 5-HT residuo è comunque visibile aumentando l'ingrandimento ed il tempo di esposizione dell'acquisizione (c, f, i). Barra di scala: 100 μ m (a-b, d-e, g-i), 50 μ m (c, f, i).

Analogamente a quanto osservato nei mutanti *Tph2Null -/-* sacrificati a P30, anche a P2, P14 e P60 (Fig. 3.5b-c, e-f, h-i) i livelli di serotonina nei topi mutanti risultano drasticamente ridotti rispetto ai livelli wild-type (Fig. 3.5a, d, g), nonostante un segnale molto basso di 5-HT a livello di singoli neuroni sia visibile aumentando l'ingrandimento e il tempo di acquisizione dell'immagine. Tali evidenze permettono di ipotizzare che la deplezione di 5-HT negli animali *Tph2Null -/-* venga

mantenuta durante tutta la vita post natale.

Poiché è riportato in letteratura che la sintesi di serotonina inizia precocemente durante lo sviluppo (Gaspar *et al.*, 2003), ho effettuato esperimenti di immunohistochimica volti ad evidenziare la presenza di 5-HT in sezioni coronali di embrioni *Tph2Null* *-/-*, *Tph2Null* *+/-* e wild-type a 12.5 e 14.5 dpc (Fig 3.6). La decisione di includere embrioni eterozigoti nell'esperimento (Fig 3.6 b, f, l, p), è stata presa al fine di mettere in risalto eventuali differenze tra il livello di serotonina presente in topi *Tph2Null* *+/-* e quella presente nei wild-type. Infatti, se è noto dalla letteratura che animali adulti *Tph2* *+/-* mostrano un fenotipo indistinguibile da quello di animali wild-type, è anche vero che eventuali differenze tra questi due genotipi risulterebbero più facilmente apprezzabili a stadi embrionali precoci, quando non si è ancora verificato un accumulo massiccio di 5-HT da parte dei neuroni serotoninergici. I livelli di serotonina in embrioni *Tph2Null* *+/-*, sia a 12 dpc (Fig 3.6 b, f) che a 14 dpc (Fig 3.6 l, p), non appaiono significativamente diversi da quelli wild-type. Se ne deduce che un solo allele *Tph2* sia sufficiente a garantire la sintesi di normali livelli di serotonina.

Per quanto concerne gli embrioni *Tph2Null* *-/-*, gli esperimenti di immunohistochimica a 12.5 dpc hanno evidenziato la totale assenza del segnale di 5-HT nei nuclei caudali del *raphe* (dati non mostrati) e nel nucleo mediano (Fig 3.6 c), mentre nei nuclei del *raphe* dorsale (Fig 3.6 g-h) è stato possibile osservare alcuni neuroni contenenti un quantitativo di serotonina rilevabile.

A 14.5 dpc, gli esperimenti di immunohistochimica hanno confermato la deplezione di 5-HT nel cervello dei mutanti *Tph2Null*. Tuttavia, è stato possibile osservare un quantitativo residuo di serotonina in neuroni distribuiti tra i diversi nuclei del *raphe* di embrioni *Tph2Null* *-/-* (Fig. 3.6 m-n, q-r), particolarmente evidenti a livello dei nuclei del *raphe* dorsale (Fig. 3.6 q-r). Questo risultato appare in linea

con il fatto che i neuroni del *raphe* dorsale sono tra i primi a differenziare e costituiscono i nuclei serotonergici a maggiore densità cellulare.

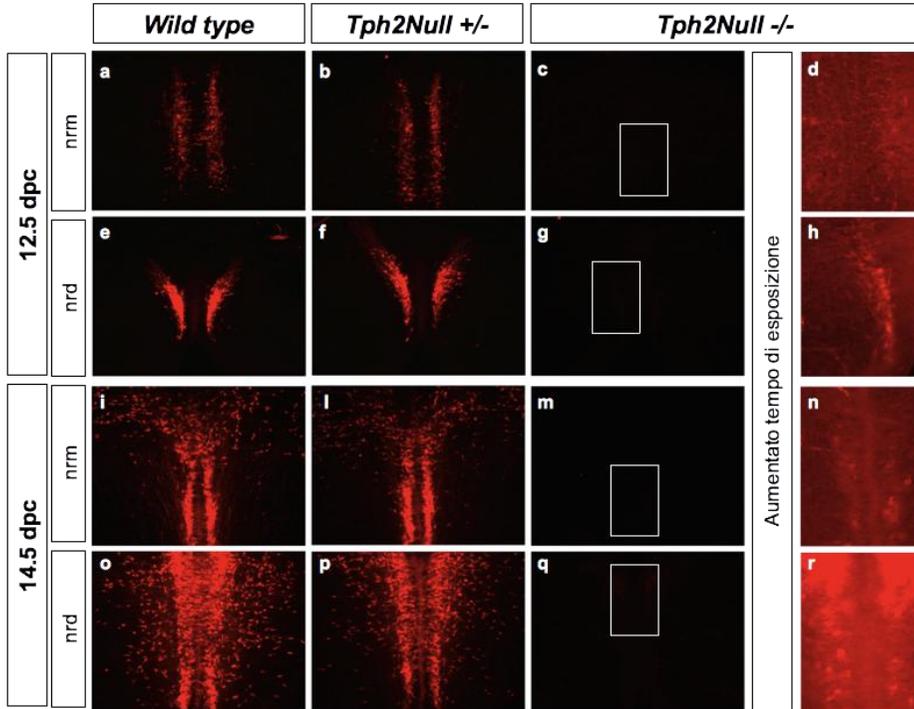


Figura 3.6: Esperimenti di immunistochemica in fluorescenza mostrano i livelli di serotonina in sezioni coronali dei nuclei del raphe di embrioni wild-type (a, e, i, o), *Tph2Null +/-* (b, f, l, p) e *Tph2Null -/-* (c-d, g-h, m-n, q-r) a 12.5 dpc (a-h) e 14.5 dpc (i-r). Nella colonna di destra (d, h, n, r) sono riportate foto realizzate a maggiore ingrandimento con un tempo di esposizione più lungo, delle regioni evidenziate con un rettangolo bianco nelle immagini relative a sezione di *raphe* di embrioni *Tph2Null -/-* c,g,m,q. Il segnale di immunofluorescenza per la serotonina risulta invariato tra gli embrioni wild-type (a, e, i, o) e gli embrioni *Tph2Null +/-* (b,f, l, p), sia a 12.5 dpc (a-h) che a 14.5 dpc (i-r). Il segnale appare invece drasticamente ridotto negli embrioni mutanti (c-d, g-h, m-n, q-r). nrm: nuclei del raphe mediano; ndr: nuclei del raphe dorsale. Barra di scala: 100µm(a-c, e-g, i-m, o-q), 50µm (d, h, n, r).

Poiché agli stadi embrionali di 12.5 e 14.5 dpc, la barriera ematoencefalica non si è ancora completamente formata e le fonti di serotonina per l'embrione a stadi precoci sono costituite anche dalla 5-

HT di origine placentale e materna, mi sono chiesta se la serotonina evidenziata nel *raphe* di embrioni *Tph2Null* *-/-* fosse prodotta dai neuroni serotoninergici dell'embrione o se derivasse da fonti esterne. È possibile infatti ipotizzare che la serotonina materna/placentale presente nel sangue dell'embrione possa raggiungere il cervello ed essere successivamente captata dai neuroni serotoninergici del *raphe* grazie al trasportatore della 5-HT (SERT). Al fine di verificare questa ipotesi ho analizzato se un trattamento con fluoxetina, inibitore specifico di SERT, influisce sulla presenza di serotonina nei neuroni del *raphe* di embrioni *Tph2Null* *-/-*. A questo proposito, ho incrociato femmine *Tph2Null* *+/-* con maschi *Tph2Null* *+/-*. Due gruppi di femmine in cui ho osservato la formazione del “plug” vaginale (che per convenzione viene fatto coincidere con lo stadio gestazionale di 0.5 dpc) sono state trattate con 10mg/kg al giorno di fluoxetina o con H₂O ed utilizzate come controllo. Le femmine sono quindi state sacrificate allo stadio di 14.5 dpc, e gli embrioni *Tph2Null* *-/-*, ottenuti sia da femmine trattate che di controllo, sono stati sottoposti ad esperimenti di immunostochimica anti-serotonina. Il confronto di sezioni coronali del *raphe* di embrioni *Tph2Null* *-/-* trattati (Fig 3.7 c-d, g-h), e non trattati (Ctrl) (Fig 3.7 a-b, e-f) ha messo in evidenza livelli paragonabili di immunoreattività alla serotonina, sia nei nuclei del *raphe* mediano (Fig 3.7 a-d) che in quelli del *raphe* dorsale (Fig 3.7 e-h).

Questo risultato permette di ipotizzare che il segnale residuo di serotonina osservato nel *raphe* degli embrioni *Tph2Null* *-/-* non sia dovuto a serotonina materna o di origine placentale internalizzata dai neuroni, ma al neurotrasmettitore effettivamente prodotto da questi ultimi grazie ad un attività residua di Tph2.

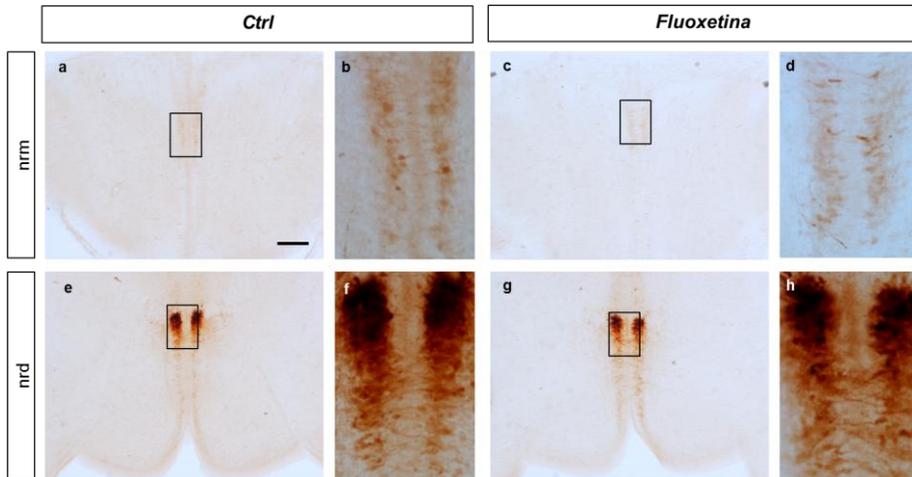


Figura 3.7: Confronto del livello di serotonina tra embrioni *Tph2Null* $-/-$ sottoposti a trattamento con fluoxetina (c-d, g-h), ed embrioni di controllo non trattati provenienti dalla stessa cucciolata (a-b, e-f). Il segnale della serotonina è stato evidenziato mediante esperimenti di immunohistochemica in sezioni coronali dei nuclei del *raphe* mediano (a-d) e del *raphe* dorsale (e-h) di embrioni *Tph2Null* $-/-$ allo stadio di 14.5 dpc (a-h). Le immagini b, d, f, h, rappresentano un ingrandimento delle regioni evidenziate con il rettangolo nero nelle figure a, c, e, g. nrm: nuclei del *raphe* mediano; nrd: nuclei del *raphe* dorsale; Ctrl: controllo. Barra di scala: 200 μ m (a, c, e, g), 40 μ m (b, d, f, h).

3.4 Due distinte isoforme di mRNA del gene *Tph2* nel *raphe* di animali *Tph2Null* $-/-$

La presenza di neuroni serotoninergici positivi per 5-HT nei topi *Tph2Null* $-/-$, mi ha spinto a chiedermi se fosse presente, nel *raphe* di questi animali, un RNA messaggero di *Tph2* che potesse codificare per una proteina con attività enzimatica residua.

Ho pertanto estratto l'RNA totale dal *raphe* di animali adulti wild-type e *Tph2Null* $-/-$ e, dopo aver ottenuto il cDNA da ciascun campione mediante una reazione di retrotrascrizione, ho sottoposto i due campioni ad una reazione di PCR esone-specifica (si veda "Materiali e Metodi"), mediante la quale è possibile verificare la presenza di diverse isoforme del trascritto del gene *Tph2*. Poiché *Tph2* possiede 11 esoni, ho preparato 10 distinti campioni di reazione, utilizzando un

oligonucleotide “senso”, comune a tutti, localizzato nell’esone 1, e, per ciascun campione, un oligonucleotide “antisenso” interno a ciascuno degli 11 esoni del gene, così da poterne marcare la presenza (Fig. 3.8a).

La PCR specifica per discriminare la presenza del trascritto fino al terzo esone non ha fornito, come atteso, alcun prodotto di amplificazione a partire dal cDNA *Tph2Null* *-/-* (Fig. 3.8b, ex1-ex3, I2). Analogamente, la reazione di PCR condotta a partire da cDNA *Tph2Null* *-/-* per visualizzare il trascritto fino al quarto esone genera un amplificato che dalla corsa elettroforetica risulta essere più corto di circa 200 paia di basi (pb) rispetto all'amplificato ottenuto dal cDNA wild-type (Fig. 3.8b, ex1-ex4, I1-I2). La differenza di lunghezza tra i due amplificati può essere attribuita al fatto che i trascritti estratti dal *raphe* di topi *Tph2Null* *-/-* mancano del terzo esone del gene *Tph2*, il quale si estende appunto per 184pb. Le altre 7 reazioni di PCR, condotte su cDNA *Tph2Null* *-/-* utilizzando oligonucleotidi “antisenso” interni rispettivamente all'esone 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, hanno prodotto due amplificati di diversa lunghezza. La corsa elettroforetica evidenzia infatti due bande distinte, che risultano rispettivamente più corte di circa 200pb e 300pb rispetto alla banda ottenuta nelle medesime reazioni dal cDNA wild-type (Fig. 3.8b, ex1-ex5...11, I1-I2). La banda ad altezza maggiore è giustificabile, analogamente a quanto visto per l'amplificazione degli esoni 1-4, con l'assenza del terzo esone del trascritto *Tph2*. Poiché il quarto esone della *Tph2* è lungo 101pb, ho ipotizzato che la banda più bassa potesse essere il risultato dell'amplificazione di trascritti, presenti nei *Tph2Null* *-/-* come forme alternative di splicing, privi sia del terzo che del quarto esone. Per verificare quest'ipotesi, gli amplificati ottenuti dal cDNA *Tph2Null* *-/-* utilizzando oligonucleotidi interni al primo ed al quinto esone del gene *Tph2*, sono stati clonati all'interno di vettori plasmidici e sequenziati. Il sequenziamento ha confermato che i due amplificati corrispondono

esattamente alla sequenza del cDNA di *Tph2* da cui mancano rispettivamente o l'esone 3 (*Tph2* Δ 3), o sia l'esone 3 che l'esone 4 (*Tph2* Δ 3 Δ 4).

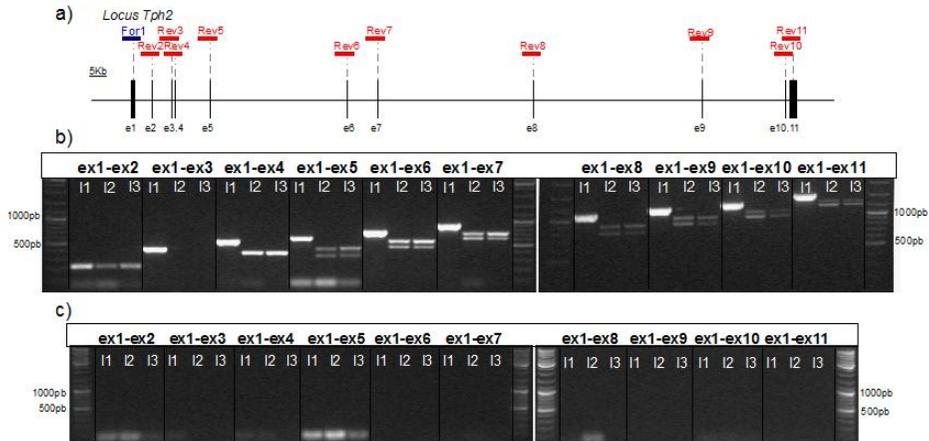


Figura 3.8: Amplificazione per PCR esone-specifica del cDNA del gene *Tph2*. a) Rappresentazione schematica delle regioni di appaiamento, all'interno del locus genomico di *Tph2*, degli oligonucleotidi utilizzati per la PCR esone-specifica. b) foto del gel di agarosio al 1% (peso/volume) su cui sono stati fatti migrare gli amplificati ottenuti per PCR esone-specifica. Le linee nere verticali separano tra di loro i prodotti ottenuti nelle 10 diverse miscele di reazione: in alto sono indicate le regioni amplificate in ciascuna miscela di reazione, ad esempio “ex1-ex2” indica che l'amplificazione è stata ottenuta utilizzando un oligonucleotide “senso” complementare ad una sequenza interna al primo esone di *Tph2* ed un oligonucleotide “antisense” interno al secondo, “ex1-ex3” che per l'amplificazione sono stati utilizzati oligonucleotidi interni al primo ed al terzo esone. Con il simbolo “11” è indicato l'amplificato ottenuto a partire da cDNA wild-type, con “12” l'amplificato ottenuto a partire da cDNA *Tph2Null* $-/-$, mentre con “13” viene indicato l'amplificato ottenuto a partire da cDNA *Tph2Null/Tph2::eGFP* $+/-$. c). Controllo negativo: foto del gel di agarosio al 1% (peso/volume) su cui sono stati fatti migrare gli amplificati ottenuti utilizzando come substrato di PCR il prodotto della reazione di retrotrascrizione di controllo priva di RNA.

La presenza, nel *raphe* di topi *Tph2Null* $-/-$, di un trascritto di *Tph2* Δ 3 Δ 4 privato sia del terzo che del quarto esone, suscita particolare interesse. Infatti, se l'excisione del terzo esone di *Tph2* comporta la perdita della cornice di lettura del trascritto a valle

dell'esone rimosso, la perdita concomitante dell'esone 3 (184pb) e dell'esone 4 (101pb) è in grado di ripristinare la cornice di lettura. Questo potrebbe, in linea teorica, risultare nella produzione di una proteina Tph2 tronca, ma capace di un'attività catalitica residua, se pur ridotta.

Per verificare che le due distinte isoforme del trascritto potessero essere prodotte dallo stesso allele *Tph2Null*, ho estratto RNA totale dal *raphe* di animali trans-eterozigoti *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-*, che portano un allele *Tph2Null* ed un allele *Tph2::eGFP^(FRT)* precedentemente dimostrato non produrre alcun trascritto *Tph2* (Migliarini *et al.*, 2013). Dopo aver retrotrascritto l'RNA ho messo a punto la medesima reazione di PCR esone-specifica utilizzando come substrato il cDNA così ottenuto (Fig. 3.8b, ex1-ex2...11, l3). Questa reazione di PCR esone-specifica, ha prodotto la medesima tipologia di amplificati ottenuti a partire dal cDNA *Tph2Null* *-/-*. Sembra pertanto che entrambe le forme di splicing abbiano luogo sullo stesso trascritto primario in grado di generare sia il trascritto *Tph2Δ3* che il trascritto *Tph2Δ3Δ4*. Sarà interessante verificare, se queste due isoforme siano prodotte in distinti neuroni del *raphe*, oppure se sia possibile osservarle entrambe all'interno di una stessa cellula. In questo caso potremo analizzare se entrambe le isoforme *Tph2Δ3Δ4* e *Tph2Δ3* del trascritto siano presenti in tutti i neuroni serotonergici del *raphe* di topi *Tph2Null* *-/-*, o solo una sottoclasse di essi. Per analizzare questi aspetti sono in corso esperimenti di doppia ibridazione *in situ* che consentono di evidenziare e distinguere i trascritti *Tph2Δ3* e *Tph2Δ3Δ4*. Questo è possibile utilizzando due sonde oligonucleotidiche di uguale lunghezza, una complementare ad una sequenza interna al primo esone, che consente di marcare tutti i trascritti del gene *Tph2*, ed una complementare ad una sequenza interna all'esone 4, che marca tutti i trascritti tranne *Tph2Δ3Δ4*. In questo modo, nel *raphe* di topi *Tph2Null* *-/-*, l'isoforma *Tph2Δ3* viene

evidenziata dalla colocalizzazione del segnale delle due sonde, mentre il segnale della sola sonda interna al primo esone marca i trascritti *Tph2* Δ 3 Δ 4.

3.5 Analisi dell'attività residua di *Tph2* nei nuclei del *raphe* di animali *Tph2Null*^(FRT-neo-FRT) -/-

Dagli esperimenti condotti risulta che la rimozione del terzo esone del gene *Tph2* non abroga completamente la sintesi di serotonina centrale; inoltre ho osservato che la presenza della cassetta di selezione PGK-neo sembra ridurre, se pur in modo lieve, l'attività dell'allele *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT). Pertanto mi sono chiesta se nei nuclei del *raphe* di animali *Tph2Null*^(FRT-neo-FRT) -/-, i quali portano in omozigosi un allele *Tph2* da cui è stato rimosso il terzo esone, ma in cui è ancora presente la cassetta PGK-neo, la sintesi di serotonina fosse completamente abrogata o fortemente ridotta come nei mutanti *Tph2Null*. La quantità di 5-HT evidenziata mediante la tecnica dell'immunoistochimica nel *raphe* di animali *Tph2Null*^(FRT-neo-FRT) -/- risulta drasticamente ridotta rispetto ai controlli, analogamente a quanto osservato in mutanti *Tph2Null*, ma non completamente abrogata (Fig 3.9, b-c).

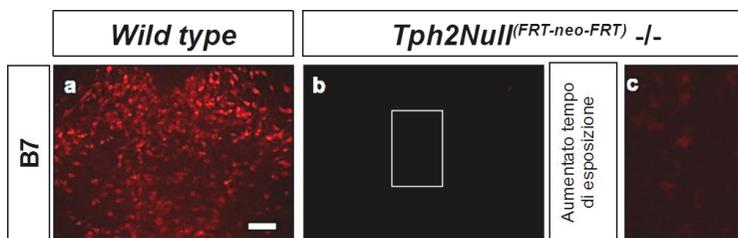


Figura 3.9: Livelli di serotonina messi in evidenza mediante immunoistochimica in sezioni coronali del *raphe* di topi wild-type (a) e *Tph2Null*^(FRT-neo-FRT) -/- (b-c) sacrificati a P14. Nel mutante si osserva una drastica riduzione dei livelli di 5-HT, sebbene neuroni serotonina positivi siano visibili nelle foto realizzate aumentando l'ingrandimento ed il tempo di

esposizione (c; corrispondente alla regione evidenziata dal rettangolo bianco in b). Barra di scala: 100µm(a-b), 50µm (c).

Sarà interessante analizzare, mediante un approccio di RT-PCR e PCR esone specifica, se nel *raphe* dei mutanti *Tph2Null*^(FRT-neo-FRT), come in topi *Tph2Null* *-/-*, sia presente l'isoforma Δ3Δ4 del trascritto del gene *Tph2*.

3.6 Analisi dell'attività residua di Tph2 nei nuclei del *raphe* di animali trans-eterozigoti *Tph2Null/Tph2::eGFP*^(FRT) +/- +/-

Avendo dimostrato che nella linea *Tph2Null* la sintesi di 5-HT nel SNC è quasi completamente abrogata, ho voluto investigare se la linea knockout condizionale *FloxedTph2* possa essere utilizzata per abrogare o ridurre drasticamente, in modo spazio- e/o tempo-specifico, la sintesi di serotonina nei neuroni del *raphe*. Questa linea potrebbe essere ad esempio utilizzata per studiare se la deplezione di 5-HT neuronale a specifici stadi di sviluppo embrionale o post-natale del topo, possa influire sulla distribuzione delle fibre serotoninergiche, analogamente a quanto osservato nel topo *Tph2::eGFP* *-/-*. Per condurre un'analisi di questo tipo occorre poter evidenziare con facilità le fibre serotoninergiche indipendentemente dalla presenza di 5-HT. Pertanto ho generato una linea di animali trans-eterozigoti che possiedono un allele *Tph2::eGFP*^(FRT), in cui l'espressione di *Tph2* è sostituita da quella di eGFP, ed un allele *FloxedTph2* in cui può essere promossa l'excisione del terzo esone in seguito a ricombinazione Cre-mediata. Questa linea, indicata con il nome di *FloxedTph2/Tph2::eGFP*^(FRT) +/- +/-, consente quindi di visualizzare il sistema serotoninergico, grazie alla presenza della eGFP, in seguito alla deplezione tempo- e/o spazio-specifica di 5-HT. Tuttavia, il residuo di serotonina che ho osservato nei neuroni del *raphe* di topi *Tph2Null* *-/-* potrebbe, in linea teorica, influenzare lo sviluppo delle fibre risultando in un fenotipo diverso da quello osservato in topi

Tph2::eGFP^(FRT) -/-. Pertanto, prima di procedere con gli esperimenti di KO condizionale mi sono chiesta se, in presenza di un solo allele *Tph2Null* fosse ancora rilevabile un'attività residua di Tph2, e se, in quest'ultimo caso, il quantitativo minimo di serotonina sintetizzata risultasse un fenotipo analogo a quello di animali *Tph2::eGFP^(FRT) -/-*, oppure fosse sufficiente a garantire un normale sviluppo delle fibre serotoninergiche.

Per analizzare questi aspetti ho incrociato topi *Tph2Null +/-* con animali *Tph2::eGFP^(FRT) +/-* e ho visualizzato, mediante esperimenti di immunostochimica, i livelli di serotonina nel *raphe* di topi trans-eterozigoti *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-*. Nella figura 3.10 è mostrato il segnale della serotonina evidenziato mediante immunostochimica su sezioni coronali del *raphe* di topi *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* sacrificati a P14 (Fig. 3.10 b-c, e-f) e di embrioni *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* allo stadio di 14.5 dpc (Fig. 3.10 h-i, m-n). Come controlli sono stati utilizzati animali *Tph2::eGFP^(FRT) +/-* provenienti dalle stesse cucciolate (Fig. 3.10 a, d, g, l), in cui i livelli di serotonina sono paragonabili a quelli di animali wild-type (Migliarini *et al.*, 2013). L'esperimento di immunostochimica ha evidenziato come, nonostante una drastica riduzione del livello di serotonina nel *raphe* dei topi trans-eterozigoti, sia ancora presente un segnale di 5-HT residuo, visibile in singole cellule distribuite nei diversi nuclei. È pertanto possibile dedurre che la presenza di un solo allele *Tph2Null* sia sufficiente a garantire un'attività residua della Tph2 simile a quella osservata in animali *Tph2Null -/-*.

In conclusione, la linea *FloxedTph2* potrà essere sfruttata per ridurre drasticamente, anche se non per abolire completamente, la sintesi di 5-HT neuronale in modo spazio- o tempo-specifico.

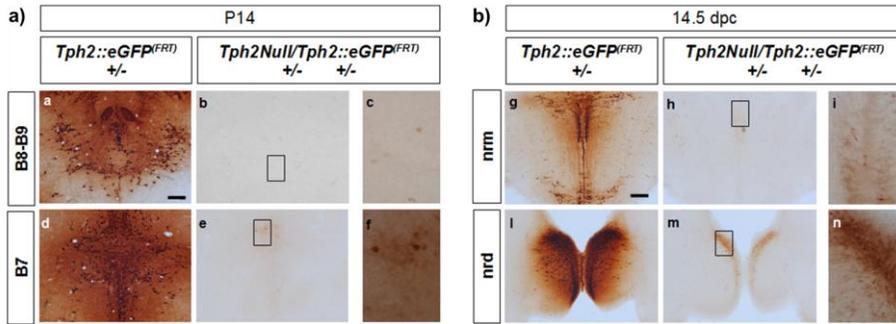


Figura 3.10: Esperimenti di immunohistochemica mostrano i livelli di serotonina in sezioni coronali di *raphe* di topi *Tph2::eGFP^(FRT)/+/-* (a, d, g, l) e *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT)/+/- +/-* (b-c, e-f, h-i, m-n) sacrificati a 14 giorni post natale (a-f) o allo stadio embrionale di 14.5 dpc (g-n). Nella colonna di destra di ciascun pannello (c, f, i, n) sono mostrate foto a maggiore ingrandimento corrispondenti alle regioni evidenziate con un rettangolo nero nelle immagini delle sezioni del topo *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT)/+/- +/-* (b, e, h, m). Si osserva, sia allo stadio embrionale che a 14 giorni post natale, una drastica riduzione del livello di 5-HT in tutti i nuclei del *raphe* del trans eterozigote; tuttavia permane un segnale residuo di serotonina localizzato a livello di singoli neuroni. Barra di scala: 200 μ m (a-b, d-e, g-h, l-m), 40 μ m (c, f, i, n).

3.7 Analisi dello sviluppo dell'innervazione serotoninergica in topi *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT)/+/- +/-*

Abbiamo osservato che nei neuroni serotoninergici di animali *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT)/+/- +/-* l'attività catalitica della Tph2 è ridotta drasticamente, sebbene non completamente annullata, e questo risulta nella produzione di un quantitativo residuo di serotonina. Ci siamo pertanto domandati quale fosse il fenotipo osservabile a livello delle fibre serotoninergiche in topi con un quantitativo così ridotto di serotonina. Ovvero se in topi *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT)/+/- +/-* la distribuzione delle fibre serotoninergiche rispecchiasse quella osservata in topi *Tph2::eGFP^(FRT)/-/-* totalmente privi di 5-HT neuronale, oppure se il livello di serotonina prodotta fosse sufficiente a garantire un normale sviluppo della circuiteria serotoninergica.

Ho pertanto evidenziato le fibre serotonergiche nel cervello di topi adulti *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* (Fig. 3.11 b, f, i) e ho utilizzato come controllo topi *Tph2::eGFP^(FRT) +/-* (Fig. 3.11 a, e, h). Le fibre serotonergiche sono state visualizzate in sezioni parasagittali di cervello mediante esperimenti di immunohistochimica utilizzando un anticorpo specifico per la eGFP. Ho concentrato la mia analisi all'ippocampo, regione anatomica che nel mutante *Tph2::eGFP* ha mostrato una iperinnervazione più elevata (Migliarini *et al.*, 2013).

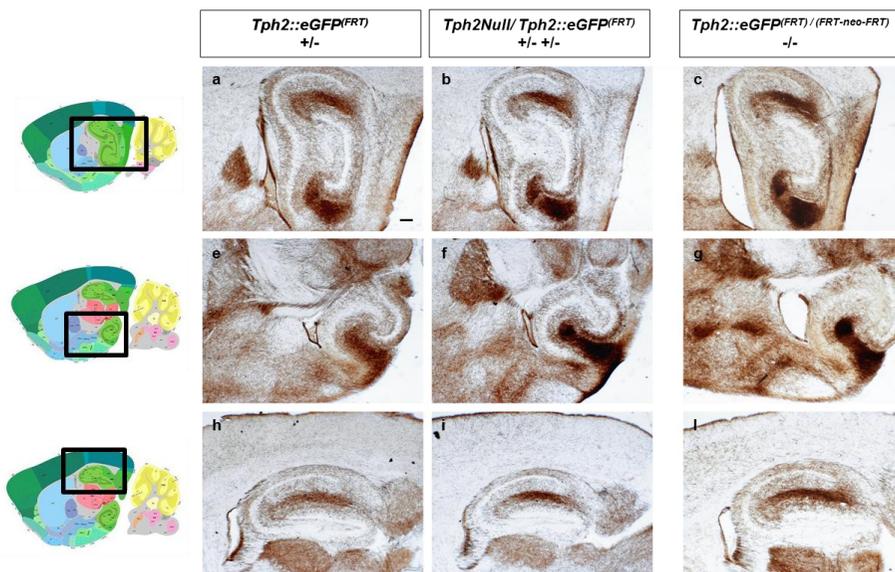


Figura 3.11: Innervazione dell'ippocampo da parte delle fibre serotonergiche evidenziata mediante immunohistochimica anti-eGFP, in sezioni parasagittali del cervello di animali adulti *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* (b, f, i) e *Tph2::eGFP^(FRT) +/-* (a, e, h). Nella colonna di destra (c, g, l) sono riportate foto che mostrano l'innervazione serotonergica dell'ippocampo evidenziata con la medesima tecnica, in sezioni parasagittali paragonabili del cervello di un topo *Tph2::eGFP^(FRT)/(FRT-neo-FRT) -/-*. Sulla sinistra, rappresentazioni del cervello di topo in sezioni parasagittali (“Allen brain Atlas”), mostrano le aree che compaiono nelle foto a-l, evidenziate mediante un rettangolo nero. Nel topo *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* (b, f, i) si osserva un aumento dell'innervazione dell'ippocampo da parte delle fibre serotonergiche rispetto al controllo *Tph2::eGFP^(FRT) +/-* (a, e, h): questo aumento è maggiormente evidente nell'ippocampo ventrale (f), rispetto al dorsale (i). La distribuzione delle fibre osservata nel topo *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* appare inoltre

paragonabile a quella osservabile nel topo *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-*. Barra di scala: 200µm (a-c), 250µm (e-l)

Ho osservato un chiaro aumento delle fibre serotoninergiche che innervano l'ippocampo anche in topi *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* (Fig. 3.11 b, f, i) rispetto agli eterozigoti *Tph2::eGFP^(FRT) +/-* (Fig. 3.11 a, e, h). Questo aumento appare più marcato nell'ippocampo ventrale (Fig. 3.11 e-f) rispetto al dorsale (Fig. 3.11 h-i). Inoltre, la distribuzione delle fibre serotoninergiche evidenziata nell'ippocampo di topi *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-*, rispecchia quella precedentemente osservata in animali *Tph2::eGFP^(FRT) / (FRT-neo-FRT) -/-* (Fig. 3.11 c, g, l).

Questo dato sembra pertanto indicare che, nonostante il quantitativo di 5-HT residua nei nuclei del *raphe* di topi *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* sia ancora presente un fenotipo a carico dello sviluppo delle fibre, come osservato nel modello *Tph2::eGFP^(FRT) / (FRT-neo-FRT) -/-*.

3.8 Deplezione di 5-HT in maniera tempo-specifica a seguito di somministrazione di Tamoxifen in animali *FloxedTph2*

Poiché gli animali *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* mostrano un'alterazione delle fibre serotoninergiche nell'ippocampo analoga a quella osservata nel KO *Tph2::eGFP^(FRT) / (FRT-neo-FRT) -/-*, la linea KO condizionale *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* può essere utilizzata per studiare se la deplezione di 5-HT in specifici momenti dello sviluppo o della vita adulta del topo possa interferire sullo sviluppo delle fibre serotoninergiche.

Prima di analizzare questi aspetti, ho testato un protocollo sperimentale di KO tempo-specifico, al fine di verificare la possibilità di ridurre i livelli di serotonina neuronale in modo tempo-specifico, sfruttando l'allele *FloxedTph2*. A questo scopo sono stati generati animali *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT)/CMV-CreER^{T2} +/- +/- +/-*, i quali esprimono in maniera ubiquitaria la proteina di fusione *CreER^{T2}*, costituita da una ricombinasi *Cre* fusa ad un recettore degli estrogeni

responsivo al Tamoxifen. È noto che la somministrazione di Tamoxifen induce la traslazione della proteina di fusione nel nucleo, consentendo alla ricombinasi *Cre* di mediare l'excisione della sequenza di DNA "floxed" (si veda il capitolo "Introduzione"). In un primo piano sperimentale il Tamoxifen è stato somministrato ad animali adulti *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) /CreER^{T2} +/- +/- +/-* per via intraperitoneale per cinque giorni consecutivi (si veda "Materiali e Metodi"). Gli animali sono quindi stati sacrificati 3 settimane dopo la fine del trattamento ed i livelli di serotonina sono stati evidenziati in sezioni coronali di *raphe* utilizzando la tecnica dell'immunoistochimica (Fig. 3.12, 2).

Come controllo per verificare il corretto funzionamento del sistema inducibile *CMV-CreER^{T2}*, sono stati valutati, nel medesimo esperimento di immunoistochimica, i livelli di serotonina nel *raphe* di 3 animali. Nello specifico:

- ✦ un animale *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) /CMV-CreER^{T2} +/- +/- +/-* trattato con olio di semi di mais (solvente in cui è disciolto il tamoxifen) agli stessi "time point" dell'animale a cui è stato somministrato il Tamoxifen. Questo animale costituisce un controllo per verificare che il fenotipo osservato nel topo *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) /CMV-CreER^{T2} +/- +/- +/-* trattato con Tamoxifen, sia effettivamente indotto dal trattamento farmacologico.
- ✦ un animale *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* trattato con Tamoxifen, per verificare che il trattamento farmacologico non interferisca con l'espressione di eGFP.
- ✦ un animale *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* trattato con olio di semi di mais.

Il piano sperimentale testato (Fig. 3.12, 1) è in grado di ridurre in maniera evidente la quantità di serotonina sintetizzata nei neuroni del *raphe* (Fig. 3.12, 2 b, d), nonostante i livelli residui di

neurotrasmettitore risultino visibilmente maggiori di quelli osservati in animali *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-*.

Per comprendere se il fenotipo osservato fosse dovuto all'efficienza del trattamento, ho modificato il piano sperimentale, somministrando Tamoxifen per sette giorni consecutivi, e sacrificando l'animale a 4 settimane dal termine del trattamento (Fig. 3.12, 3). Questo tipo di trattamento è risultato in grado di produrre una riduzione più marcata dei livelli di serotonina nel *raphe* degli animali *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) /CMV-CreER^{T2} +/- +/- +/-* trattati (Fig. 3.12, 4 f, h).

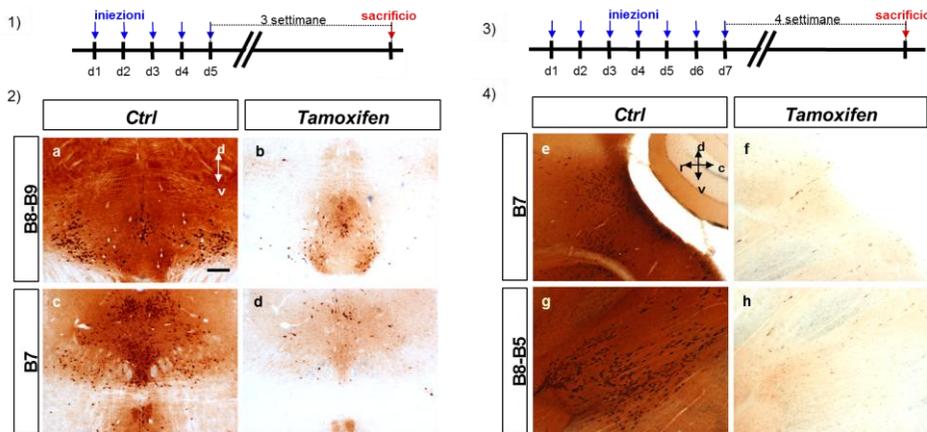


Figura 3.12: 1) e 3) piani sperimentali di somministrazione di Tamoxifen. 2) Serotonina residua in sezioni coronali dei nuclei del *raphe* di un animale adulto in seguito ad excisione tempo-specifico del terzo esone di *Tph2*, ottenuta somministrando Tamoxifen come indicato nel piano sperimentale in 1) (2 b, d), messa a confronto con la serotonina evidenziata in sezioni paragonabili di un animale di controllo (2 a, c). 3) Esperimenti di immunohistochemica evidenziano i livelli di serotonina in sezioni parasagittali del *raphe* di un topo adulto *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT)/CMV-CreERT +/- +/- +/-* trattato con Tamoxifen, come indicato nel piano sperimentale in 3) (4 f, h) e nel rispettivo controllo (4 e, g). d1, giorno 1; d2, giorno2; d3, giorno3; d4, giorno 4; d5, giorno5; d6, giorno6; d7, giorno7; Ctrl: topo di controllo adulto *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* trattato con Tamoxifen secondo i piani sperimentali mostrati in 1) e 3); Tamoxifen: topo adulto *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT)/CMV-CreERT +/- +/- +/-* sottoposto a trattamento con Tamoxifen, come indicato nei piani sperimentali in 1) e 3). Barra di scala: 200 μ m.

Tale dato conferma che è possibile avvalersi di animali modello *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT)/CMV-CreER^{T2} +/- +/- +/-* per indurre una drastica riduzione del quantitativo di serotonina nei neuroni del *raphe* in maniera tempo-specifica. In aggiunta, variazioni nel protocollo di somministrazione del Tamoxifen potranno essere testate al fine di ottenere diversi gradi di deplezione della sintesi di 5-HT.

3.9 Analisi dell'innervazione serotoninergica in topi depleti di serotonina in età adulta

Avendo dimostrato la possibilità di ridurre drasticamente la quantità di serotonina prodotta dai neuroni del *raphe* in topi adulti *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT)/CMV-CreER^{T2} +/- +/- +/-* mediante somministrazione di Tamoxifen, il passo successivo è stato indagare se la mancata sintesi di un adeguato quantitativo di 5-HT in età adulta risultasse in una qualche alterazione a carico delle fibre serotoninergiche. Pertanto in animali sottoposti ad adeguato trattamento con Tamoxifen (Fig. 3.13, 1) le fibre serotoninergiche sono state evidenziate sfruttando l'immunoreattività della eGFP. Dati preliminari, risultati al presente da un singolo esperimento, mostrerebbero un aumento dell'innervazione serotoninergica a livello dell'ippocampo, evidente soprattutto nell'ippocampo ventrale, in topi in cui la sintesi di serotonina è stata abrogata in età adulta (Fig. 3.13, 2).

Nonostante ulteriori analisi debbano necessariamente essere condotte prima di poter giungere a conclusioni di alcun tipo, questa prima osservazione ci sprona a procedere su questa linea di indagine. Di fatto, se altri dati confermassero che l'abrogazione della sintesi di 5-HT in età adulta risulta in alterazioni della circuiteria serotoninergica, questo indicherebbe che, anche una volta terminato lo sviluppo, il sistema serotoninergico mantiene una plasticità tale da essere suscettibile a variazioni della quantità di neurotrasmettitore prodotto.

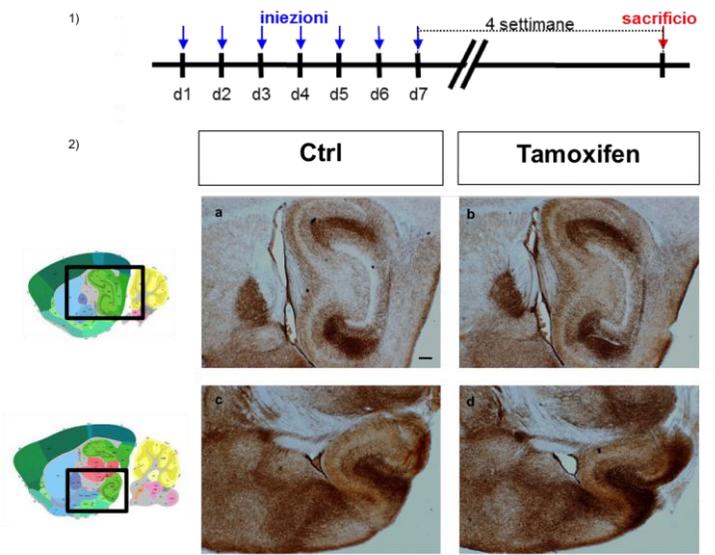


Figura 3.13: 1) Piano sperimentale di somministrazione di Tamoxifen. 2) Fibre serotoninergiche a livello dell'ippocampo evidenziate grazie all'immunoreattività della eGFP. Nell'animale in cui la sintesi di serotonina è stata abrogata in età adulta (2 b, d) si osserva un aumento delle fibre serotoninergiche che innervano l'ippocampo, rispetto al controllo (2 a, c). L'aumento di fibre appare particolarmente evidente a livello dell'ippocampo ventrale (2 c-d). d1, giorno 1; d2, giorno2; d3, giorno3; d4, giorno 4; d5, giorno5; d6, giorno6; d7, giorno7; Ctrl: topo di controllo adulto *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* trattato con Tamoxifen secondo il piano sperimentale mostrato in 1; Tamoxifen: topo adulto *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT)/CMV-CreERT +/- +/- +/-* sottoposto a trattamento con Tamoxifen, come indicato nel piano sperimentale in 1) e 3); ID: ippocampo dorsale; IV; ippocampo ventrale. Barra di scala: 200mm (a-b), 250mm (c-d).

DISCUSSIONE

4.1 La rimozione del terzo esone del gene *Tph2* risulta in una drastica riduzione della sintesi di serotonina, ma non nella sua totale abrogazione

Nel laboratorio presso cui ho svolto la tesi è stata recentemente generata la linea di topo *FloxedTph2* come strumento per indurre l'inattivazione del gene *Tph2* con modalità tempo- o tessuto-specifica (si veda "introduzione"). È stato pertanto necessario caratterizzare la linea *FloxedTph2* da un punto di vista funzionale: in prima istanza, ho valutato se la rimozione del terzo esone del gene *Tph2* risulta effettivamente nell'abrogazione della sintesi di serotonina. Inoltre, per poter utilizzare la linea *FloxedTph2* in esperimenti di KO condizionale tempo-specifico, è stato necessario assicurarsi che prima dell'excisione *Cre*-mediata del terzo esone, l'allele *FloxedTph2* risulti in un fenotipo identico a quello di un animale wild-type.

Confrontando in esperimenti di immunohistochimica la quantità di serotonina prodotta dai neuroni del *raphe* di topi *FloxedTph2* *-/-* e di animali wild-type ho potuto verificare che la presenza dei siti *loxP*, non inficia la funzionalità dell'allele *FloxedTph2*. Questo dato indica che la linea *FloxedTph2* produce un quantitativo normale di serotonina e che quindi può essere paragonabile ad un animale wild-type.

L'effetto dell'excisione del terzo esone del gene *Tph2* è stato invece valutato in animali *Tph2Null* *-/-*. I distinti esperimenti di immunohistochimica che ho condotto su topi *Tph2Null* *-/-* a diversi stadi di sviluppo post natale ed embrionale (12.5 dpc, 14.5 dpc, 2 giorni post natale (P2), P14, P30 e P60) hanno evidenziato una drastica riduzione nel quantitativo di serotonina prodotta dai neuroni del *raphe* di questi animali rispetto a topi wild-type. Tuttavia, a tutti gli stadi analizzati, è stata evidenziata la presenza in un residuo di 5-HT in singoli neuroni o in gruppi di neuroni, distribuiti tra diversi nuclei del *raphe*, e localizzati

principalmente nelle regioni in cui la quantità di serotonina rilevata mediante immunistochemica appare molto forte in animali wild-type. Tale evidenza ci induce a supporre che in seguito all'excisione del terzo esone del gene *Tph2*, non venga prodotto un allele ad attività nulla, bensì un allele ipomorfo con attività drasticamente ridotta. Pertanto l'attività residua di *Tph2* sarà rivelabile solo in quei neuroni in cui in condizioni basali viene prodotto un quantitativo elevato di 5-HT, ed in cui, di conseguenza, anche in seguito ad una forte riduzione dell'attività dell'allele *Tph2*, si riesce a produrre un quantitativo di neurotrasmettitore superiore alla soglia di sensibilità della tecnica di immunistochemica.

In aggiunta, poiché è noto che la barriera ematoencefalica nel topo si forma intorno ai 12 giorni post-natali (Ribatti *et al.*, 2006) e che durante lo sviluppo precoce l'embrione sfrutta ampiamente fonti di serotonina materna e placentale (Bonnin and Levitt, 2011), non deve essere esclusa a priori l'ipotesi che la serotonina osservata nei neuroni del *raphe* di embrioni *Tph2Null* *-/-* possa derivare da fonti esterne. Tuttavia, l'inibizione farmacologica del trasportatore selettivo della serotonina (SERT), non è risultata né nella perdita né in una diminuzione del segnale residuo: questa serotonina sembra pertanto essere prodotta nei neuroni serotoninergici degli embrioni stessi. In alternativa il dato potrebbe essere spiegato ipotizzando una mancata azione del farmaco sul trasportatore degli embrioni: infatti poiché la Fluoxetina viene somministrata alla madre disciolta in acqua da bere, non è possibile verificare con i mezzi a nostra disposizione la dose realmente assunta dagli embrioni. Tuttavia, la letteratura riporta numerosi esempi in cui il dosaggio di Fluoxetina somministrato a femmine gravide risulta analogo a quello utilizzato per l'esperimento o di poco superiore (12mg/kg al giorno, a fronte dei 10mg/kg al giorno somministrati). Sarà pertanto necessario ripetere l'esperimento aumentando la dose di Fluoxetina somministrata.

4.2 Difetti di crescita e alto tasso di mortalità perinatale nei mutanti *Tph2Null* -/-

Una diminuzione del peso corporeo e del tasso di crescita rispetto ai wild-type ed ai *Tph2Null* +/- può essere osservata nei mutanti *Tph2Null* -/- già pochi giorni dopo la nascita; tale differenza raggiunge il suo massimo intorno a 4 settimane, per poi scomparire quando il topo raggiunge i 2 mesi di età. Questo aspetto fenotipico rispecchia quello descritto in letteratura per topi *Tph2* -/- (Alenina *et al.*, 2009; Savelieva *et al.* 2008; Migliarini *et al.*, 2013). Non è tutt'oggi nota la causa del ridotto tasso di crescita osservato in animali depleti di serotonina neuronale, che potrebbe essere associato a difetti metabolici, a difetti nutritivi, o alla compresenza di entrambi i fattori. L'ipotesi di una sotto nutrizione appare screditata dal fatto che Migliarini e collaboratori hanno osservato la presenza di un quantitativo normale di latte nello stomaco dei mutanti (Migliarini *et al.*, 2013), e dall'evidenza che il difetto di crescita permane anche in assenza di competizione con i fratelli (Alenina *et al.*, 2009). L'ipotesi di un difetto metabolico è invece supportata dal fatto che Alenina e collaboratori hanno evidenziato una marcata riduzione della concentrazione del fattore di crescita isulina-simile (IGF1) nel siero di topi *Tph2* -/- durante la fase post natale; inoltre i livelli di IGF1 raggiungono quelli riscontrati in topi wild-type quando il peso dei mutanti ritorna nella norma (Alenina *et al.*, 2009).

In aggiunta, durante le prime settimane di vita si osserva, rispetto ai wild-type ed agli eterozigoti, un aumento percentuale della mortalità nei mutanti *Tph2Null* -/- che appare in linea con il fenotipo descritto in topi KO per *Tph2* (Migliarini *et al.*, 2013; Alenina *et al.*, 2009). Non sono riportate in letteratura evidenze che possono contribuire a spiegare la mortalità prematura di questi animali, e non è da escludersi che i difetti nella crescita siano una delle cause.

Possiamo pertanto concludere che, nonostante nei nuclei del *raphe* di topi *Tph2Null* *-/-* sia stata dimostrata la produzione di quantitativo minimale di serotonina si osserva un fenotipo paragonabile a quello osservato nel modello di KO convenzionale.

4.3 Un'isoforma di splicing alternativo del trascritto del gene *Tph2Null* potrebbe essere responsabile della produzione di una proteina Triptofano Idrossilasi 2 con attività enzimatica residua

Per spiegare la presenza del quantitativo di serotonina residuo osservato nel *raphe* di topi *Tph2Null* *-/-* potrebbe essere ipotizzata una espressione di *Tph1* a livello del *raphe* (Nakamura *et al.*, 2006). Tuttavia, la presenza di 5-HT residua è stata evidenziata a vari stadi della vita post natale di topi *Tph2Null* *-/-* (P2, P14, P30, e P60) e questo non è conforme con quanto descritto da Nakamura e collaboratori, i quali riportano nei nuclei del *raphe* dorsale di ratti a P21 un picco di espressione di *Tph1* che scompare con la crescita. Inoltre, numerosi gruppi di ricerca, tra cui il nostro, hanno recentemente smentito la presenza di trascritti di *Tph1* nel *raphe* di roditori (Walter *et al.*, 2003; Cote *et al.*, 2003; Gutknecht *et al.*, 2009). E' pertanto da escludersi l'ipotesi che la serotonina osservata nel *raphe* di topi *Tph2Null* *-/-* sia dovuta all'azione catalitica di *Tph1*.

In letteratura sono riportate evidenze di modelli murini KO per il gene *Tph2* in cui analisi di HPLC hanno rilevato la presenza di un quantitativo residuo di serotonina cerebrale (2-4% dei livelli presenti in animali wild-type), non rilevabile mediante la tecnica dell'immunoistochimica (Alenina *et al.*, 2008; Savelieva *et al.*, 2008; Gutknecht *et al.*, 2008; Migliarini *et al.*, 2013). Per spiegare questa evidenza è stato ipotizzato che la serotonina potesse essere sintetizzata grazie a idrossilasi di amminoacidi aromatici diverse da *Tph2*, come la Pha (Gutknecht *et al.*, 2008), oppure potesse derivare dal precursore 5-HTP prodotto nei distretti periferici del corpo, che,

dopo aver raggiunto il cervello viene convertito in serotonina dalle AADC (Gutknecht *et al.*, 2012). Queste ipotesi potrebbero in parte contribuire a spiegare il fenotipo osservato in topi *Tph2Null* *-/-*. Tuttavia altri fattori devono essere alla base di questo fenotipo: infatti, per quanto drasticamente ridotta, la quantità di serotonina osservata in animali *Tph2Null* *-/-*, risulta maggiore di quella descritta negli esempi di modelli murini KO per il gene *Tph2*, al punto da essere rilevabile per immunistoichimica.

Mi sono pertanto chiesta se nel *raphe* di topi *Tph2Null* *-/-* potesse essere presente un'attività residua della triptofano idrossilasi 2. Questa ipotesi sembra essere supportata dalla presenza, di due isoforme distinte del trascritto del gene *Tph2* che ho identificato a seguito di estrazione di RNA totale, retrotrascrizione ed analisi per PCR esone-specifica dei cDNA così ottenuti. Oltre alla isoforma attesa, indicata con il nome *Tph2* Δ 3 e la cui sequenza corrisponde alla regione codificante del gene *Tph2* priva della regione corrispondente al terzo esone, ho evidenziato una isoforma più corta del trascritto. Quest'ultima, indicata con il nome *Tph2* Δ 3 Δ 4, è risultata in seguito a sequenziamento identica alla sequenza codificante del gene *Tph2* da cui mancano le regioni corrispondenti al terzo ed al quarto esone. La perdita del quarto esone potrebbe essere stata prodotta in seguito ad un evento di splicing alternativo. Si può supporre che questo evento di splicing alternativo venga per qualche ragione innescato in alcuni dei trascritti da cui è stato rimosso il terzo esone del gene: non sono stati infatti individuati trascritti del gene *Tph2* privi del quarto esone in topi wild-type.

La decisione di "floxare" l'esone 3 derivava dall'evidenza che la sua rimozione comporta la perdita della cornice di lettura del trascritto, con la conseguente formazione di un codone di stop della traduzione subito a valle dell'esone exciso. Questo risulta nella produzione di una proteina *Tph2* tronca, di soli 98 aminoacidi, priva del dominio

regolatore, del dominio catalitico e del dominio di oligomerizzazione (Mernea *et al.*, 2011; Carkaci-Salli *et al.*, 2006); si può pertanto ipotizzare che tale proteina abbia perduto la capacità di mediare la sua attività enzimatica. Viceversa trascritti *Tph2 Δ 3 Δ 4* risultano codificare per una proteina Tph2 tronca, priva della quasi totalità del dominio regolatore ACT, ma in cui il dominio di oligomerizzazione viene mantenuto ed il dominio catalitico è presente e, se bene privo di un frammento di 28 aminoacidi all'estremità N-terminale, mantiene gli aminoacidi essenziali per l'iterazione con il cofattore ferro. La perdita di una porzione della proteina può risultare in alterazioni nella struttura dell'enzima che ne riducono l'attività catalitica; in aggiunta sembra che nel dominio ACT perduto siano contenuti putativi siti di interazione con il triptofano (Protein-NCBI). L'insieme di queste evidenze ci indica che la proteina tradotta a partire dal trascritto *Tph2 Δ 3 Δ 4* potrebbe mantenere un'attività catalitica residua, seppur fortemente ridotta.

Queste evidenze potrebbero spiegare la provenienza del quantitativo assai ridotto di 5-HT osservata nel *raphe* di animali *Tph2Null* *-/-*. Sarà tuttavia necessario verificare se la proteina Tph2 Δ 3 Δ 4 è ancora realmente capace di mediare la sua azione catalitica e di quanto tale attività risulti ridotta rispetto alla proteina wild-type. A questo scopo abbiamo progettato di produrre una proteina a partire dal trascritto *Tph2 Δ 3 Δ 4* e di testarne l'efficienza catalitica *in vitro*.

Resta inoltre da valutare se le due isoforme *Tph2 Δ 3 Δ 4* e *Tph2 Δ 3* siano prodotte in distinti neuroni del *raphe*, oppure se sia possibile osservarle entrambe all'interno di una stessa cellula ed, in quest'ultimo caso, se entrambe le isoforme del trascritto siano presenti in tutti i neuroni serotoninergici del *raphe* di topi *Tph2Null* *-/-*, o solo in una sottoclasse di essi. Per analizzare questi aspetti verrà a breve realizzata una doppia ibridazione *in situ* utilizzando due sonde di uguale lunghezza: una complementare ad una sequenza interna al

primo esone del gene *Tph2*, ed una interna al quarto.

4.4 Analisi dell'effetto della cassetta PGK-neo

All'interno del secondo introne dell'allele *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) è inserita la cassetta PGK-neo la quale può interferire con la trascrizione dell'allele "floxed" compromettendone l'attività wild-type in assenza di ricombinazione *Cre*-mediata (Lewandoski, 2001; Ren *et al.*, 2002).

L'analisi per immunostochimica di embrioni allo stadio di 12.5 dpc ha evidenziato una lieve diminuzione nella concentrazione del neurotrasmettitore nei nuclei del *raphe* di embrioni *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) *-/-* rispetto ai wild-type: questa sottile differenza non è invece stata osservata in topi adulti. Di fatto allo stadio embrionale di 12.5 dpc, non essendosi ancora verificato un consistente accumulo di 5-HT nei neuroni del *raphe*, è possibile apprezzare eventuali variazioni nel quantitativo di serotonina sintetizzata. Trattandosi di un fenomeno di lieve intensità, non è possibile giungere a conclusioni precise circa l'interferenza della cassetta neo sulla funzionalità dell'allele *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) ed ulteriori indagini sarebbero necessarie. Tuttavia questo aspetto non risulta di primaria importanza, dato che, per lo scopo ultimo di indagare il ruolo della serotonina nello sviluppo del SNC verrà utilizzata la linea *FloxedTph2* in cui la cassetta PGK-neo è stata rimossa mediante ricombinazione "in vivo" *Flp*-mediata. Infatti, l'utilizzo in esperimenti di KO condizionale della linea *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) rispetto alla linea *FloxedTph2*, non produrrebbe alcun vantaggio: è stato di fatto osservato che mutanti *Tph2Null*^(FRT-neo-FRT) *-/-*, in cui è presente la cassetta PGK-neo, ma il terzo esone dell'allele *Tph2* è stato exciso, presentano un fenotipo analogo a quello di topi *Tph2Null* *-/-*.

In seguito ad estrazione di RNA, retrotrascrizione e PCR esone-specifica, è stata osservata, nel *raphe* di topi *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) *-/-*,

la presenza di numerosi trascritti di lunghezza analoga ai trascritti del gene *Tph2* wild-type. In questi trascritti la cassetta PGK-neo è sicuramente stata rimossa in seguito al processo di maturazione in quanto la sua presenza avrebbe impedito, per come è stato impostato l'esperimento, la produzione di amplificati. Sono stati tuttavia trovati RNA contenenti sia la cassetta neo che il terzo esone del gene *Tph2*, la cui presenza può avere due diverse spiegazioni: può trattarsi di RNA trascritti a partire dal promotore forte PGK della cassetta neo, oppure di RNA non ancora maturi trascritti dal promotore del gene *Tph2*. Questa seconda ipotesi potrebbe essere testata in una reazione di PCR utilizzando un oligonucleotide "senso" complementare ad una sequenza interna al secondo introne del gene *Tph2*, ed un oligonucleotide "antisenso" complementare alla cassetta neo.

Resta da analizzare se, in animali *Tph2Null*^(FRT-neo-FRT) -/- siano presenti, come nei mutanti *Tph2Null* le isoforme *Tph2Δ3* e *Tph2Δ3Δ4* del trascritto del gene: in questo caso la presenza di quest'ultima isoforma potrebbe giustificare il quantitativo residuo di serotonina osservato.

In futuro analisi quantitative potrebbero essere utilizzate per valutare se nel *raphe* di topi *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) -/- i trascritti privi della cassetta PGK-neo siano presenti in quantità paragonabile ai trascritti del gene *Tph2* presenti in animali wild-type. In questo modo potremmo verificare se la cassetta PGK-neo induce o meno una riduzione dell'espressione dell'allele *FloxedTph2*^(FRT-neo-FRT) rispetto all'allele *Tph2* wild-type .

4.5 La riduzione della quantità di serotonina in seguito all'excisione del terzo esone del gene *Tph2*, risulta in un aumento delle fibre serotoninergiche a livello dell'ippocampo

Studi condotti sia su organismi vertebrati che invertebrati, sostengono l'ipotesi che la serotonina sia un'importante regolatrice,

durante lo sviluppo del SNC, della crescita dei neuriti e della costituzione delle connessioni neuronali (per compendio si veda Daubert and Condron, 2010). Recentemente, nel laboratorio presso cui ho svolto la tesi, la generazione della linea di topo “knock-in” *Tph2::eGFP* mediante la quale è possibile evidenziare le fibre serotoninergiche indipendentemente dall'immunoreattività della serotonina, ha reso possibile visualizzare i circuiti serotoninergici in animali privi di 5-HT neuronale. È stato così dimostrato che in assenza di serotonina si verifica una palese alterazione delle fibre serotoninergiche in diverse aree del cervello rostrale. Infatti, nonostante venga mantenuta una normale distribuzione delle terminazioni serotoninergiche a livello della corteccia e dello striato, si assiste sia ad una evidente diminuzione dell'innervazione serotoninergica nel nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo e nel nucleo paraventricolare del talamo, che ad un aumento sostanziale delle fibre che innervano l'ippocampo ed il nucleo accumbens (Migliarini *et al.*, 2013). Grazie a queste evidenze è stato dimostrato che la serotonina è essenziale durante lo sviluppo del SNC per regolare in modo fine la costituzione dei circuiti assonali dei neuroni serotoninergici, e che la sua azione può esplicarsi sia nella promozione che nell'inibizione della crescita, a seconda dei distretti innervati.

L'immunoreattività della eGFP in sezioni parasagittali dell'encefalo di topi *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* ha evidenziato un aumento di fibre serotoninergiche a livello dell'ippocampo. Tale aumento appare maggiore nell'ippocampo ventrale rispetto al dorsale e rispecchia pienamente il fenotipo osservato in topi *Tph2::eGFP^(FRT) / (FRT-neo-FRT) -/-*. Questo indica che nonostante la presenza di un quantitativo residuo di 5-HT, le fibre serotoninergiche si sviluppano come in totale assenza di serotonina. Tale dato risulta estremamente importante perché ci indica che è effettivamente possibile sfruttare la linea *FloxedTph2* per

analizzare il fenotipo delle fibre serotoninergiche in seguito ad induzione di un KO condizionale della serotonina.

In aggiunta, l'analisi delle fibre serotoninergiche dovrà essere estesa ad altre aree del cervello e resa quantitativa attraverso analisi densitometriche.

Da un'analisi preliminare sembra inoltre che le fibre serotoninergiche nei trans-eterozigoti *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT)* +/- +/- continuino ad innervare tutte le aree cerebrali come accade nei topi *Tph2::eGFP^(FRT)* +/- . Questo ci spinge ad ipotizzare che le alterazioni osservate non siano dovute ad un riarrangiamento delle fibre, ma bensì ad un aumento o ad una diminuzione dell'arborizzazione terminale degli assoni a livello delle aree bersaglio, descritta come "terza fase" dello sviluppo dei circuiti serotoninergici da Lidov e Molliver (Lidov and Molliver, 1982). Questa ipotesi sembra essere confermata da alcune evidenze riportate per la linea *Tph2::eGFP*: è stato infatti osservato che la comparsa delle anomalie di innervazione nelle diverse aree cerebrali, combacia temporalmente con la fase di differenziamento terminale nelle distinte regioni bersaglio.

Nonostante non siano noti i meccanismi molecolari attraverso cui la serotonina regola lo sviluppo delle arborizzazioni terminali degli assoni serotoninergici, in topi *Tph2::eGFP* -/- è stato osservato un aumento dei livelli del fattore neurotrofico BDNF nell'ippocampo, coincidente con lo stabilirsi della iperinnervazione (Migliarini *et al.*, 2013). Questo dato sembra indicare che la mancanza di 5-HT possa agire promuovendo un aumento dell'espressione di BDNF, il quale a sua volta favorisce una aumentata crescita delle arborizzazioni serotoninergiche a livello dell'ippocampo. Anche in topi transeterozigoti *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT)* +/- +/- potranno essere analizzati i livelli di BDNF nell'ippocampo per verificare se l'azione di questo fattore neurotrofico possa contribuire al fenotipo osservato.

4.6 La linea murina *FloxedTph2/Tph2::eGFP +/- +/-* può essere sfruttata per indurre temporalmente una riduzione della quantità di serotonina sintetizzata a livello dei neuroni del *raphe*

In seguito ad esperimenti di immunistoichimica ho osservato che è possibile indurre in animali adulti una drastica riduzione della quantità di serotonina sintetizzata dai neuroni del *raphe*, sfruttando la linea murina *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* in associazione con il sistema inducibile *CMV-CreER^{T2}/Tamoxifen*. Due distinte varianti del piano sperimentale di KO tempo-specifico, differenti tra loro per numero di somministrazioni di Tamoxifen ed il tempo intercorso tra il termine del trattamento ed il sacrificio dell'animale, sono state testate, e sono risultate in un diverso grado di inibizione della sintesi di serotonina. È stato ad esempio osservato che un trattamento con Tamoxifen per cinque giorni consecutivi, associato a sacrificio dell'animale dopo 3 settimane dalla fine del trattamento, risulta in una riduzione dei livelli di 5-HT neuronale che può essere stimata corrispondere ad una diminuzione di circa un 80% rispetto ai livelli osservati nei wild-type. Un fenotipo di questo tipo può essere spiegato ammettendo l'incapacità del quantitativo di Tamoxifen somministrato di promuovere in tutti i neuroni del *raphe* l'excisione del terzo esone di *Tph2* nel tempo intercorso tra la somministrazione del farmaco ed il sacrificio dell'animale. Infatti, aumentando la quantità di farmaco somministrato ed il tempo trascorso prima del sacrificio, è stato possibile ridurre la quantità di serotonina evidenziabile nel *raphe* ad un livello paragonabile a quello osservato in animali *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-*.

Queste evidenze aprono le porte a numerose prospettive di studi futuri. In prima istanza la quasi completa abrogazione della sintesi di serotonina in animali adulti, associata all'analisi del fenotipo delle fibre serotoninergiche, consente di osservare se anche in animali adulti, in cui il sistema serotoninergico è già completamente sviluppato,

drastiche variazioni nei livelli di 5-HT alterano la circuiteria serotoninergica. Ulteriori esperimenti verranno condotti per validare il dato preliminare in base al quale l'abrogazione della sintesi di 5-HT in età adulta sembra indurre un aumento delle fibre serotoninergiche a livello dell'ippocampo. Se questo dato fosse confermato, ciò indicherebbe che, anche a differenziamento terminato, il sistema serotoninergico rimane plastico e responsivo all'autoregolazione mediata dal neurotrasmettitore serotonina.

Se invece il dato non fosse confermato, sarebbe interessante indagare fino quale stadio dello sviluppo post-natale del topo una drastica riduzione dei livelli di serotonina risulta in alterazioni della circuiteria serotoninergica, utilizzando il sistema *CMV-CreER^{T2}/Tamoxifen* per abrogare la sintesi di 5-HT a vari stadi.

In fine sarà interessante analizzare, mediante appositi test, se alterazioni del sistema serotoninergico indotte durante lo sviluppo post-natale influiscano sul fenotipo comportamentale di topi adulti, prestando particolare attenzione alla comparsa di fenotipi "anxiety-like" e "depressive-like".

In fine, il sistema inducibile *CMV-CreER^{T2}/Tamoxifen*, potrebbe essere sfruttato, in seguito ad opportuni aggiustamenti del piano di somministrazione del farmaco, per ottenere modelli murini con un differente grado di attività residua di *Tph2*. Sebbene non rientrino tra gli interessi più immediati di questa ricerca, tali animali modello potrebbero trovare delle applicazioni nello studio di patologie neuropsichiatriche umane. Sono infatti note associazioni tra disturbi emotivi e polimorfismi del gene umano *Tph2* (Zhang *et al.*, 2004; Zill *et al.*, 2004; Beaulieu *et al.*, 2008), alcuni dei quali risultano in una diminuzione dell'80% dell'attività enzimatica della triptofano idrossilasi 2 (Zhang *et al.*, 2005).

CONCLUSIONI

- La rimozione, in seguito a ricombinazione *Cre*-mediata, del terzo esone del gene *Tph2* risulta in una drastica riduzione della quantità di serotonina prodotta dai neuroni del *raphe*, pur non abrogandone completamente la sintesi.
- La rimozione del terzo esone del gene *Tph2* induce la produzione di una isoforma di splicing alternativo del trascritto del gene *Tph2*, in cui l'esone 4 viene perduto (denominata *Tph2* Δ 3 Δ 4). Il trascritto *Tph2* Δ 3 Δ 4 potrebbe dare origine ad una triptofano idrossilasi 2 capace di un'attività enzimatica residua la quale potrebbe essere responsabile della sintesi del quantitativo di serotonina osservato nel *raphe* di topi *Tph2Null* $-/-$ e *Tph2Null/Tph2::eGFP^(FRT)* $+/-$ $+/-$.
- I mutanti *Tph2Null*, nonostante la presenza di un quantitativo minimo di 5-HT nel *raphe* presentano un fenotipo che rispecchia, sotto molteplici aspetti, quello osservato in animali completamente depleti di serotonina, come ad esempio un aumento della mortalità nelle prime settimane di vita, un ridotto tasso di crescita, ed un aumento dell'innervazione serotoninergica a livello dell'ippocampo. Queste evidenze ci suggeriscono che la linea *FloxedTph2* può essere utilizzata in esperimenti di

KO condizionale.

- La linea murina *FloxedTph2/Tph2::eGFP^(FRT) +/- +/-* , in associazione con il sistema temporalmente inducibile *CMV-CreER^{T2}*, può essere sfruttata per indurre, in seguito a trattamento con Tamoxifen, una drastica riduzione della sintesi di serotonina nei neuroni del *raphe*. L'utilizzo di questa strategia consentirà di analizzare l'importanza della serotonina centrale durante distinte fasi della vita post-natale del topo.

PROSPETTIVE FUTURE

- ⤴ Verificare se le isoforme *Tph2Δ3Δ4* e *Tph2Δ3* del trascritto del gene *Tph2*, sono prodotte in distinti neuroni del *raphe*, o se sono presenti entrambe a livello di singole cellule.

- ⤴ A partire dai trascritti *Tph2Δ3* e *Tph2Δ3Δ4*, sintetizzare le rispettive proteine, *Tph2Δ3* e *Tph2Δ3Δ4*, e saggiarne l'attività catalitica in vitro.

- ⤴ Indurre una riduzione drastica dei livelli di serotonina cerebrale in topi adulti e durante fasi intermedie dello sviluppo postnatale del topo avvalendosi del sistema inducibile *CMV-CreER^{T2}/Tamoxifen*, ed analizzare se vengono prodotte alterazioni nella circuiteria serotoninergica.

- ⤴ Valutare mediante specifici test comportamentali la presenza di fenotipi “anxiety-like” e “depressive-like” in topi in cui i livelli di serotonina sono stati drasticamente ridotti durante specifiche fasi dello sviluppo post-natale del topo, o della vita adulta.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei rivolgere un ringraziamento speciale a Barbara Pelosi, titolare del progetto sulla linea *FloxedTph2* e responsabile degli esperimenti, per avermi permesso di affiancarla durante il lavoro e per avermi insegnato con infinita pazienza il “mestiere” della biologia.

Grazie a Massimo Pasqualetti per avermi accolto nel suo gruppo di ricerca e per aver guidato il progetto sulla linea *FloxedTph2*.

Vorrei ringraziare anche Sara Migliarini ed Elisa Brilli per essere sempre state disponibili ad aiutarmi in qualunque momento. Grazie anche ad Andrea, Federica e Giacomo, a Cinzia Valente per la cura degli animali ed a Giulia Pacini per aver generato il costrutto *FloxedTph2*.

BIBLIOGRAFIA

Alenina, N., Kikic, D., Todiras, M., Mosienko, V., Qadri, F., Plehm, R., Boye, P., Vilianovitch, L., Sohr, R., Tenner, K. et al. (2009). Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 10332-10337.

Ansorge M.S., Zhou M., Lira A., Hen R., Gingrich J.A. (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science*. **306**, 879–881.

Baker, K.G., Halliday, G.M., Halasz, P., Hornung, J.P., Geffen, L.B., Cotton, R.G., Törk, I. (1991) Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain. *Synapse* **7**, 301–320.

Beaulieu, J. M., Zhang, X., Rodriguiz, R. M., Sotnikova, T. D., Cools, M. J., Wetsel, W. C., Gainetdinov, R. R. and Caron, M. G. (2008). Role of GSK3beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **29**, 1333-1338.

Bonnin, A., Golden, N., Chen, K., Wilson, M.L., King, J., Shih, J.C., Blakely, R.D., Deneris, E.S., Levitt, P. (2011). A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature*. **472**, 347-350.

Bonnin, A., Levitt, P. (2011). Fetal, Maternal and Placental Sources of Serotonin and New Implications for Developmental Programming of the Brain. *Neuroscience*. **197**, 1-7.

Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T.M., Rubenstein, J. L. and Ericson, J. (1999). Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* **398**, 622-627.

Brezun, J.M., Daszuta, A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*. **89**, 999-1002.

Brodski, C., Weisenhorn, D. M., Signore, M., Sillaber, I., Oesterheld, M., Broccoli, V., Acampora, D., Simeone, A. And Wurst W. (2003). Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. *J. Neurosci*. **23**, 4199-4207.

Buchholz, F., Angrand, P.O. & Stewart, A.F. (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis.

Nature Biotechnol. **16**, 657–662

Burns, C.M., Chu, H., Rueter, S.M., Hutchinson, L.K., Canton, H., Sanders-Bush, E., Emeson, R.B. (1997). Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* **15**, 303-8.

Buznikov, G. A., Lambert, H. W. and Lauder, J. M. (2001). Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res.* **305**, 177-86.

Cases, O., Vitalis, T., Seif, I., De Maeyer, E., Sotelo, C. and Gaspar, P. (1996). Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* **16**, 297-307.

Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Muller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J.C., and De Maeyer, E. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* **268**, 1763–1766.

Carkaci-Salli, N., Flanagan, J. M., Martz, M. K., Salli, U., Waltherf, D. J., Bader, M., Vrana K. E. (2006) Functional Domains of Human Tryptophan Hydroxylase 2 (hTPH2) *J. Biol. Chem.* **281**, 28105-28112.

Capecchi M.R. (2005). Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, **6**, 507-12.

Cheng, L., Chen, C. L., Luo, P., Tan, M., Qiu, M., Johnson, R. and Ma, Q. (2003). Lmx1b, Pet-1, and Nkx2.2 coordinately specify serotonergic neurotransmitter phenotype. *J. Neurosci.* **23**, 9961-9967.

Chow, L.M.L., Tian, Y., Weber, T., Corbett, M., Zuo, J., Baker, S.J. (2006). Inducible Cre recombinase activity in mouse cerebellar granule cell precursors and inner ear hair cells. *Dev. Dyn.*, **235**, 2991-2998.

Colas, J. F., Launay, J.M., Kellermann, O., Rosay, P. and Maroteaux, L. (1995). Drosophila 5-HT₂ serotonin receptor: coexpression with fushi-tarazu during segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5441-5445.

Coon, H., Dunn, D., Lainhart, J., Miller, J., Hamil, C., Battaglia, A., Tancredi, R., Leppert, M.F., Weiss, R., McMahon, W. (2005). Possible association between autism and variants in the brain-expressed tryptophan hydroxylase gene (TPH2). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **135B**, 42-46.

Côté, F., Fligny, C., Bayard, E., Launay, J. M., Gershon, M. D., Mallet, J. and Vodjdani G. (2007). Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 329-334.

Côté, F., Thévenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoche, M. A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., Dandolo, L., Hamon, M., Mallet, J. and Vodjdani, G. (2003). Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 13525-13530.

Daubert, E. A. and Condron, B. G. (2010). Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends Neurosci.* **33**, 424-34.

Deneris, E.S., Wyler, S.C. (2012) Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. *Nat Neurosci.* **15**, 519-27.

Ding, Y. Q., Marklund, U., Yuan, W., Yin, J., Wegman, L., Ericson, J., Deneris, E., Johnson, R. and Chen, Z. F. (2003). Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. *Nat. Neurosci.* **6**, 933-938.

Erickson, J. D., Schafer, M. K., Bonner, T. I., Eiden, L. E. and Weihe, E. (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5166-5171.

Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., Chambon, P., (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 10887-10890.

Fitzpatrick, P. F. (1999). Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 355-381.

Gaspar, P., Cases, O. and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci.* **4**, 1002-1012.

Gould, E. (1999). Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology.* **21**, 46S-51S.

Gutknecht, L., Waider, J., Kraft, S., Kriegebaum, C., Holtmann, B., Reif, A., Schmitt, A., Lesch, K.P. (2008). Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice. *J*

Neural Transm. **115**, 1127-1132.

Gutknecht L., Araragi N., Merker S., Waider J., Sommerlandt F.M., Mlinar B., Baccini G., Mayer U., Proft F., Hamon M., Schmitt A.G., Corradetti R., Lanfumey L., Lesch K.P. (2012). Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification. *PLoS One*, **7**. e43157

Hannon, J., Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res.* **195**, 198-213.

Hansson, S. R., Mezey, E. and Hoffman, B. J. (1999). Serotonin transporter messenger RNA expression in neural crest-derived structures and sensory pathways of the developing rat embryo. *Neuroscience* **89**, 243-265.

Harvey, M., Shink, E., Tremblay, M., Gagné, B., Raymond, C., Labbé, M., Walther, D.J., Bader, M., Barden, N. (2004). Support for the involvement of TPH2 gene in affective disorders. *Mol Psychiatry*. **9**, 980-981.

Hendricks, T. J., Francis, N., Fyodorov, D. and Deneris, E. S. (1999). The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *J. Neurosci.* **19**, 10348-10356.

Hendricks, T. J., Fyodorov, D.V., Wegman, L. J., Lelutiu, N. B., Pehek, E.A., Yamamoto, B., Silver, J., Weeber, E. J., Sweatt, J. D. and Deneris, E.S. (2003). Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* **37**, 233-247.

Holschneider, D.P., Chen, K., Seif, I., Shih, J.C. (2001). Biochemical, behavioral, physiologic, and neurodevelopmental changes in mice deficient in monoamine oxidase A or B. *Brain Res Bull.* **56**, 453-62.

Hull, E. M., Muschamp, J. W. and Sato, S. (2004). Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol. Behav.* **83**, 291-307.

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

Homberg, J.R., Schubert, D., Gaspar, P. (2010). New perspectives

on the neurodevelopmental effects of SSRIs. *Trends Pharmacol Sci.* **31**, 60–65.

Ishimura, K., Takeuchi, Y., Fujiwara, K., Tominaga, M., Yoshioka, H., Sawada, T. (1988). Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* **91**, 265–270.

Jacobs, B.L., Azmitia, E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* **72**, 165-229.

Jann, M. W. and Slade, J. H. (2007). Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression. *Pharmacotherapy* **27**, 1571-1587.

Jensen, P., Farago, A.F., Awatramani, R.B., Scott, M.M., Deneris, E.S., Dymecki, S.M. (2008). Redefining the serotonergic system by genetic lineage. *Nat Neurosci.* **11**, 417-419.

Kim, D. Y. and Camilleri, M. (2000). Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 2698-2709.

Kulikov, A.V., Osipova, D.V., Naumenko, V.S., Popova, N.K. (2005). The C1473G polymorphism in the tryptophan hydroxylase-2 gene and intermale aggression in mice. *Dokl Biol Sci.* **402**, 208-210.

Lane, H. Y., Liu, Y. C., Huang, C. L., Hsieh, C. L., Chang, Y. L., Chang, L., Chang, Y. C. and Chang, W. H. (2008). Prefrontal executive function and D(1), D(3), 5-HT(2A) and 5-HT(6) receptor gene variations in healthy adults. *J. Psychiatry Neurosci.* **33**, 47-53.

Lauder, J.M., Zimmerman, E.F. (1988). Sites of serotonin uptake in epithelia of the developing mouse palate, oral cavity, and face: possible role in morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol.* **8**, 265-276.

Lesch, K.P., Waider, J. (2012). Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron.* **76**, 175-91.

Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2**, 743-55.

Levitt, P. and Rakic, P. (1982). The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey. *Brain Res.* **256**, 35-57.

- Lidov, H. G. and Molliver, M. E.** (1982). Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res Bull* 9, 559-604.
- Lira A., Zhou M., Castanon N., Ansorge M.S., Gordon J.A., Francis J.H., Bradley-Moore M., Lira J., Underwood M.D., Arango V., Kung H.F., Hofer M.A., Hen R., Gingrich J.A.** (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry*. 54, 960-71.
- Lumsden A., Keynes R.** (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, 424-428.
- Mernea, M., Calborean, O., Tita., A., Mihailescu, D.F.** (2011). PRO206SER and ARG441HIS mutations influence on human Tryptophan Hydroxylase 2 activity- a molecular modeling study. *Revue Roumaine de Chimie*. 8, 833-841
- Miyata, M., Ito, M., Sasajima, T., Ohira, H., Sato, Y. and Kasukawa, R.** (2000). Development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension is attenuated by a serotonin receptor antagonist. *Lung*. 178, 63-73.
- Migliarini, S., Pacini, G., Pelosi, B., Errico, F., Lunardi, G., Usiello, A. and Pasqualetti, M.** (2009). Tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) knockout mice reveal a critical role for brain serotonin (5-HT) in postnatal development and in adult behaviour. *Society for Neuroscience, Chicago* 61.3/N36.
- Migliarini, S., Pacini, G., Pelosi, B., Lunardi, G., Pasqualetti M.** (2013) Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation. *Mol Psychiatry* 18, 1106-18.
- Morin, L.P.** (1999). Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med*. 31, 12-33.
- Murphy, D. L. and Lesch, K. P.** (2008). Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nat Rev Neurosci*. 9, 85-96.
- Nakamura, K., Sugawara, Y., Sawabe, k., Ohashi, A., Tsurui, H., Xiu, Y., Ohtsuji, M., Lin, Q. S., Nishimura, H., Hasegawa, H., Hirose, S.** (2006) Late Developmental Stage-Specific Role of Tryptophan Hydroxylase 1 in Brain Serotonin Levels. *The Journal of*

Neuroscience. **26**, 530–534

O'Gorman, S., Fox, D.T. and Wahl, G.M. (1991) Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*. **251**, 1351-5.

Pattyn, A., Simplicio, N., van Doorninck, J. H., Goridis, C., Guillemot, F. and Brunet, J. F. (2004). *Ascl1/Mash1* is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci*. **7**, 589-595.

Pasqualetti, M., Díaz, C., Renaud, J.S., Rijli, F.M., Glover J.C. (2007) Fate-mapping the mammalian hindbrain: segmental origins of vestibular projection neurons assessed using rhombomere-specific *Hoxa2* enhancer elements in the mouse embryo. *The Journal of Neuroscience*. **27**, 9670–9681

Pasqualetti, M., Ren, S.Y., Poulet, M., LeMeur, M., Dierich, A., Rijli, F.M. (2002). A *Hoxa2* knockin allele that expresses EGFP upon conditional Cre-mediated recombination. *Genesis*. **32**, 109–111.

Persico, A.M., Mengual, E., Moessner, R., Hall, F.S., Revay, R.S., Sora, I., Arellano, J., DeFelipe, J., Gimenez-Amaya, J.M., Conciatori, M., Marino, R., Baldi, A., Cabib, S., Pascucci, T., Uhl, G.R., Murphy, D.L., Lesch, K.P., Keller, F. (2001). Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J Neurosci*. **21**, 6862-6873.

Peter, D., Liu, Y., Sternini, C., de Giorgio, R., Brecha, N. and Edwards, R. H. (1995). Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J. Neurosci*. **15**, 6179-6188.

Pham C.T., MacIvor D.M., Hug B.A., Heusel J.W., Ley T.J. (1996). Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**,13090-5.

Ramoz, N., Versini, A. and Gorwood, P. (2007). Eating disorders: an overview of treatment responses and the potential impact of vulnerability genes and endophenotypes. *Expert Opin Pharmacother*. **8**, 2029-44.

Ren, S.Y., Pasqualetti, M., Dierich, A., Le Meur, M., Rijli, F.M. (2002). A *Hoxa2* Mutant Conditional Allele Generated by Flp- and Cre-Mediated Recombination. *Genesis*. **32**, 105–108

Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Artico, M. (2006) Development of the Blood-Brain Barrier: A Historical Point of View. *Anat Rec B New Anat.* **289**, 3-8

Ruhé, H. G., Mason, N. S. and Schene, A. H. (2007). Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol. Psychiatry.* **12**, 331-359.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O, Belzung, C. and Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.* **301**, 805-809.

Sauer, B. and Henderson, N. (1989) Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res* **17**, 147-61.

Savelieva, K. V., Zhao, S., Pogorelov, V. M., Rajan, I., Yang, Q., Cullinan, E. and Lanthorn, T. H. (2008). Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One* **3**, e3301.

Shuey, D.L., Sadler, T.W., Lauder, J.M. (1992). Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors.

Stoll, J. and Goldman D. (1991). Isolation and structural characterization of the murine tryptophan hydroxylase gene. *J. Neurosci. Res.* **28**, 457-465.

Stoll, J., Kozak, C. A. and Goldman, D. (1990). Characterization and chromosomal mapping of a cDNA encoding tryptophan hydroxylase from a mouse mastocytoma cell line. *Genomics* **7**, 88-96.

Thorin, E., Capdeville, C., Trocklé, G., Wiernsperger, N. and Atkinson, J. (1990). Chronic treatment with naftidrofuryl attenuates the development of vascular hypersensitivity to serotonin in the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* **16**, 54-7.

Tian, Y., James, S., Zuo, J., Fritsch, B., Beisel, K.W. (2006). Conditional and inducible gene recombineering in the mouse inner ear. *Brain Res.*, **1091**, 243-254

Trowbridge, S., Narboux-Nême, N., Gaspar, P. (2011). Genetic

models of serotonin (5-HT) depletion: what do they tell us about the developmental role of 5-HT? *Anat Rec (Hoboken)*. **294**, 1615-23.

Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W. and Orkin, S. H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. **15**, 221-226.

Vallstedt, A., Muhr, J., Pattyn, A., Pierani, A., Mendelsohn, M., Sander, M., Jessell, T.M., Ericson, J. (2001). Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification. *Neuron*. **31**, 743-755.

van Doorninck, J. H., van Der Wees, J., Karis, A., Goedknecht, E., Engel, J. D., Coesmans, M., Rutteman, M., Grosveld, F. and De Zeeuw, C. I. (1999). GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei. *J. Neurosci*. **19**, RC12.

Wallace, J. A. and Lauder J. M. (1983). Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* **10**, 459-479.

Walther, D. J., Peter, J. U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H. and Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* **299**, 76.

Wang, Y., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W. (1999). Antiprogestin regulable gene switch for induction of gene expression in vivo. *Methods Enzymol.* **306**, 281-294.

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

Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A.M., Sablitzky, F., Littlewood, T.D., Reth, M. (1996). Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **24**, 543-548.

Zhang, X., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R. and Caron, M. G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* **305**, 217.

Zhang, X., Gainetdinov, R.R., Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Burch, L.H., Williams, R.B., Schwartz, D.A., Krishnan, K.R., Caron, M.G. (2005). Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron*. **45**, 11-16.

Zhang, J., Zhao, J., Jiang, W.J., Shan, X.W., Yang, X.M., Gao, J.G. (2012). Conditional gene manipulation: Cre-ating a new biological era. *J Zhejiang Univ Sci B.* **13**, 511-24.

Zill, P., Baghai, T. C., Zwanzger, P., Schüle, C., Eser, D., Rupprecht, R., Möller, H. J., Bondy, B. and Ackenheil, M. (2004a). SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Mol Psychiatry* **9**, 1030-1036.

Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Möller, H.J., Bondy, B., Ackenheil, M. (2004b). Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. *Biol Psychiatry.* **56**, 581-586.