

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali

Tesi di Dottorato di Ricerca in Biologia, Patologia e Igiene  
Ambientale in Medicina Veterinaria.

XXVI ciclo - triennio 2011-12/2013-14

"Le neurotrofine e i loro specifici recettori  
nel cervello di *Danio rerio*."

Coordinatore:

Prof. Giuseppe Cringoli

Tutor:

Prof.ssa Luciana Castaldo

Cotutor:

Prof.ssa Carla Lucini

Dott.ssa Claudia Gatta

*A nonna Grazia e nonno Carmine,  
invisibili ma mai assenti.*

# INDICE

<b>Riassunto</b>	3
<b>Summary</b>	5
<b>Cap. 1 - <i>Danio rerio</i></b>	7
Utilizzo dello zebrafish come sistema modello	7
Il cervello di zebrafish: una visione d'insieme	10
<b>Cap. 2 - Neurotrofine</b>	25
Produzione delle neurotrofine	26
I recettori delle neurotrofine	28
Attività biologica delle neurotrofine	29
Filogenesi delle neurotrofine	31
<b>Cap. 3 Neurogenesi</b>	33
La neurogenesi nell'adulto e i metodi per studiarla	33
La neurogenesi nell'adulto: un confronto tra mammiferi e zebrafish	39
La glia radiale e la neurogenesi	43
La neurogenesi nel cervello di zebrafish adulto. Regione telencefalica	45
Altri siti di neurogenesi nel cervello di zebrafish adulto	
<b>Cap. 5 Materiali e metodi</b>	50
Western blotting (WB)	50
Preparazione dei campioni per l'analisi immunostochimica	50

Zebrafish wildtype	52
Reazioni di immunocitochimica in singola marcatura	52
Reazioni di immunofluorescenza in doppia marcatura	52
Zebrafish transgenici	54
Osservazioni microscopiche	54
Controlli	54
<b>Cap. 6 - Risultati</b>	<b>55</b>
Analisi immunochimica	55
Analisi immunocitochimica. Singola marcatura	55
Analisi immunocitochimica. Doppia marcatura	61
Analisi immunocitochimica in zebrafish transgenici	62
Tabelle	63
Tavole	74
Legenda delle tavole	101
<b>Cap. 7 - Discussioni</b>	<b>105</b>
Caratterizzazione immunochimica degli anticorpi	105
Localizzazione neuronale della neurotrofina e relativo recettore	106
Localizzazione non-neuronale	109
Conclusioni...e future prospettive	112
<b>Bibliografia</b>	<b>113</b>

# RIASSUNTO

Le neurotrofine comprendono una famiglia di fattori trofici che agiscono sulla moltiplicazione, il differenziamento e la sopravvivenza di numerose popolazioni neuronali durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico. Nell'encefalo dell'adulto, queste proteine sono indispensabili per il mantenimento della plasticità neuronale e della funzionalità cerebrale. Deficits o sovra espressione delle neurotrofine comportano infatti malattie neurodegenerative e disordini psichiatrici. Le neurotrofine sono fortemente conservate durante la filogenesi dei Vertebrati, specialmente per quanto riguarda il dominio C-terminale. La loro azione è mediata da una classe di recettori con dominio intracitoplasmatico tirosin-chinasi (Trks), rimasti immutati nella gran parte dei Vertebrati.

Lo scopo della presente ricerca è lo studio delle neurotrofine e dei loro specifici recettori nel Danio rerio o zebrafish, un pesce teleosteo universalmente adottato come specie modello, inizialmente per studi della genetica dello sviluppo e più recentemente per lo studio di innumerevoli patologie in campo umano, comprese le malattie neurodegenerative. Il cervello di zebrafish, e dei pesci teleostei in genere, rappresenta inoltre un materiale estremamente interessante per lo studio della neurogenesi adulta e dei processi riparativi poiché in tali animali il tasso di neurogenesi adulta è molto più elevato e diffuso che nei mammiferi e di conseguenza anche i processi riparativi dopo un danno cerebrale sono estremamente potenti.

Lo studio è stato condotto su zebrafish adulti di entrambi i sessi mediante metodiche immunochimiche e immunocitochimiche dirette alla caratterizzazione del nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4) e dei recettori TrkA, TrkB e TrkC .

L'analisi immunochimica, effettuata mediante western blotting, ha evidenziato in omogenati di cervello la presenza di bande assimilabili ai pesi molecolari previsti per le neurotrofine e i loro recettori Trks di zebrafish.

L'analisi immunocitochimica è stata effettuata tramite marcatura semplice su sezioni paraffiniche e marcatura doppia in fluorescenza su sezioni ottenute al vibratomo. Tali metodiche hanno rivelato un'ampia e spesso intensa positività a tutte le neurotrofine e loro recettori estesa a tutte le regioni del cervello di zebrafish. La positività è localizzata in neuroni, sia nel soma che nei dendriti/assoni, nella parete vasale e anche in diversi citotipi con caratteristiche gliali. Tale distribuzione si basa sia sulle caratteristiche morfologiche dei citotipi positivi sia sull'uso di markers cellulari specifici. La

co-presenza in numerose regioni cerebrali e nuclei della neurotrofina e del corrispettivo recettore Trk ha portato ad ipotizzare interessanti modalità di azione paracrina e/o autocrina. Inoltre, la localizzazione delle neurotrofine e dei recettori in popolazioni cellulari con caratteristiche gliali spesso è stata osservata in aree di intensa neurogenesi, portando a formulare l'ipotesi, specie per il BDNF, di un coinvolgimento di queste molecole in tali processi. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dall'utilizzo di due tipi di zebrafish transgenici, il primo per la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) e il secondo per la nestina gentilmente donati dal Prof. U. Strahle dell' Istituto di Tossicologia e Genetica, Forschungszentrum, Karlsruhe Germany.

Concludendo, la presente ricerca dimostra l'importante coinvolgimento delle neurotrofine nella biologia del cervello di questa specie modello diffusa in innumerevoli laboratori. Pertanto, oltre agli immediati interessanti risultati, rappresenta anche una base preliminare per futuri studi, rivolti alla neurogenesi nell'adulto e a processi riparativi cerebrali, con possibili ricadute sulle ricerche delle malattie neurodegenerative in campo umano.

## SUMMARY

Neurotrophins include a family of growth factors acting on proliferation, differentiation and survival of developing neuronal populations belonging to both central and peripheral nervous system. Particularly in the postnatal brain, they regulate plasticity and stability of synapses in the CNS, and the complex brain circuitry that regulates behavior. Under- or over-expression of neurotrophins cause neurodegenerative and psychiatric disorders. Neurotrophin signals are transduced by a class of receptors (Trks) with intracytoplasmic tyrosine-kinase domain. All neurotrophins and Trk receptors are well conserved during vertebrate phylogenesis.

The aim of this study is to investigate neurotrophins and their Trk receptors in zebrafish or *Danio rerio*, a teleost fish used in laboratories throughout the world as animal model. It was originally employed for genetic developmental studies and, more recently, for human diseases purposes, including neurodegenerative pathologies. The brain of zebrafish, as in other fish, is extremely interesting for studies regarding adult neurogenesis and reparative processes, due to its high levels of neuronal precursor proliferation and differentiation, which are many times greater than in mammals.

Immunochemical and immunocytochemical analysis have been used to investigate the presence and localization of nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4 (NT-4) and their specific receptors (TrkA, TrkB, TrkC). Western blottings analysis, performed on zebrafish brain homogenates, showed bands corresponding to expected molecular weights for zebrafish neurotrophins and Trk receptors. Single and double immunocytochemical labeling were carried out on microtomic paraffinic or vibratome agarose sections. Slides were observed at light or confocal microscope. Immunoreactivity to all tested neurotrophins and Trk receptors was widely diffused throughout the zebrafish brain. Particularly, it was localized in neurons and their dendrites/axons, in vessel walls and in different cell populations with glial characteristics. Generally, cell identification was made on morphological criteria and by means of specific markers.

The pattern of distribution of immunoreactivity, such as close proximity or colocalization of neurotrophin/ receptor, suggested an autocrine or paracrine mode of action and the presence of immunolabeling in numerous fibers is likely due to active retrograde and/or anterograde transport. Furthermore, their localization in cell populations with glial properties has been occurred in several neurogenic niches, leading to the hypothesis that these neurotrophic factors might play roles in regulating adult neurogenesis of zebrafish brain. Particularly for BDNF, often it was colocalized with S100 $\beta$  (a glial marker) and PCNA (proliferative marker) in cells of proliferative areas. These

results were further confirmed by using two zebrafish transgenic lines: *gfap-gfp* and *nestin-gfp* zebrafish, kindly provided by Prof. U. Strahle of Toxicology and Genetic Institute, Forschungszentrum, Karlsruhe, Germany.

In conclusion, the research gives ample morphological evidence regarding the involvement of neurotrophins in many biological functions, mostly cell proliferation, of zebrafish brain and represents a useful and promising starting point for future studies devoted to adult neurogenesis and brain repair.



# CAPITOLO 1

## *DANIO RENIO*

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

Il *Danio rerio*, originario del sud-est asiatico (Pakistan, India, Bangladesh, Nepal e Myanmar), vive in torrenti, canali, fossati per l'irrigazione ed acquitrini; esso è comune anche nelle acque tranquille e stagnanti, specialmente nei campi di riso. Si nutre prevalentemente di vermi, mosche, piccoli crostacei ma anche larve di insetto, tanto che in alcune zone viene usato per il controllo delle zanzare (Barman, 1991). Il corpo del *Danio rerio* (Fig.1) è affusolato, più formoso nelle femmine che nei maschi, con una testa di piccole dimensioni, un muso appuntito ed una bocca leggermente inclinata, sulla quale sono presenti un paio di barbigli, muniti di sensori gustativi, che pendono ventralmente e che possono essere accompagnati da un secondo paio di barbigli rostrali.

Le dimensioni si attestano sui 4-6 cm (coda esclusa), i maschi raggiungono una lunghezza massima di 5-5.5cm, con uno spessore del corpo che non supera il centimetro. Della lunghezza totale del corpo solo il 10-15% è rappresentato dalla testa. Il dorso è di colore olivastro con la presenza di una livrea mentre il ventre è bianco argenteo. I fianchi presentano un'alternanza tra decise linee orizzontali di colore oro e blu con l'aggiunta dell'argento nelle femmine, da cui deriva il nome zebrafish. Lo zebrafish è dotato di una pinna dorsale, una caudale ed una anale nonché di pinne pari pettorali e pelviche. Tutte le pinne sono sostenute da raggi molli. Il numero dei raggi è : 10 nelle pinne pettorali, 7 nelle pelviche; 8 nella dorsale; 13 nell'anale e 23 nella caudale. Tali valori possono però presentare delle variazioni individuali. La pinna caudale e la pinna anale sono striate di bianco e di blu, la dorsale è blu orlata di bianco, le altre pinne sono olivastre. Inoltre la pinna dorsale e le pinne pelviche sono spostate posteriormente in modo da permettere una rapida accelerazione durante il nuoto. Le mascelle dello zebrafish sono prive di denti, mentre sul V arco branchiale sono presenti denti faringei, disposti su 2-3 file, che consentono di sminuzzare il cibo nella parte posteriore della cavità oro-faringea.

Lo zebrafish ha una durata di vita di circa cinque anni. Nel periodo riproduttivo la femmina aumenta notevolmente di volume per la presenza delle uova, infatti produce alle 200-300 uova in un



Fig. 1. *Danio rerio*

### **Classificazione**

Regno: Animalia

Phylum: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordine: Cypriniformes

Famiglia: Cyprinidae

Sottofamiglia: Danioninae

Genere: *Danio*

Specie: *rerio*

singolo processo di accoppiamento. Dopo un vivace corteggiamento costituito da insistenti inseguimenti della femmina da parte del maschio (a volte anche da parte di due o più maschi), si verifica l'espulsione all'unisono dei gameti per la fecondazione esterna. Lo sviluppo avviene ad una temperatura compresa tra i 26 e i 28°C, anche se la temperatura dell'acqua dei suoi habitat naturali può variare tra 25 e i 32°C. La prima divisione di segmentazione avviene dopo ¾ d'ora dalla fecondazione (hpf) e nel giro di 24 ore già si possono osservare caratteristiche morfologiche ben distinte. La semplice osservazione al microscopio permette di riconoscere i placodi olfattivi, gli occhi, gli orbitali, gli otoliti, l'epifisi, i somiti, i dotti pronefrici, i precursori delle cellule del sangue ed il sistema vascolare. Inoltre l'utilizzo di anticorpi o marker specifici permette di evidenziare un sistema nervoso ben organizzato e definito, seppur più semplice rispetto a quello dei mammiferi.

Nelle 48 hpf si può osservare una pompa cardiaca e la dinamica delle cellule del sangue. Analogamente marcatori molecolari opportuni consentono di evidenziare un apparato gastrointestinale in formazione che può essere riconoscibile morfologicamente solo al quinto giorno.

### **Utilizzo dello zebrafish come sistema modello**

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

Le principali caratteristiche che suggeriscono l'utilizzo dello zebrafish come organismo modello sono:

- piccole dimensioni (3-6cm per l'adulto), che consentono di allevare fino a 10 individui per litro d'acqua;
- fecondazione esterna, che permette un agevole studio e manipolazione dell'uovo e dell'embrione [osservazione in toto dei primi stadi di sviluppo, possibilità di microiniettare RNA (gain of function e dominant negative), DNA (transgenesi) e coloranti attivabili con il laser (lineage studies)];
- grande capacità proliferativa
- trasparenza dell'embrione che consente di effettuare studi di citochimica *in toto*, come ibridazione in situ e immunolocalizzazione, e di fisiologia cellulare *in vivo*, come calcium imaging e cell specific patch clamp;
- genoma completamente sequenziato, con la conseguente possibilità di utilizzare le tecnologie della biologia molecolare e cellulare al fine di: indurre mutazioni puntiformi su singoli geni, isolare mutanti, effettuare il trapianto di cellule ed eliminare selettivamente attività geniche specifiche;
- l'allevamento dello zebrafish è più economico rispetto a quello del topo. Non solo i costi di mantenimento, ma anche le quantità di prodotto utilizzate per effettuare le analisi, spiegano la sua forte diffusione nell'utilizzo a scopo di ricerca (Westerfield, 1999).

Zebrafish è oggi ampiamente utilizzato come organismo modello in diversi campi di ricerca. Nel passato era un vertebrato modello soprattutto nel campo della ricerca dell'evoluzione e della genetica (Hill et al., 2005), mentre ora, sta crescendo l'importanza del suo utilizzo anche in altri campi. La possibilità dell'utilizzo di mutanti chimicamente indotti, di ablazioni funzionali e la creazione di pesci transgenici ha portato lo zebrafish ad assumere un ruolo sempre più rilevante come sistema modello per diverse patologie umane. In particolare, risulta un valido modello per malattie ematologiche (leucemia linfoblastica acuta), tumori (melanoma), cardiopatie, miopatie (distrofia muscolare), patologie renali, oculari e del sistema nervoso centrale ( per una review vedi Santoriello e Zon, 2012). Particolarmente per queste ultime patologie, è stato notato un alto livello di conservazione tra i geni umani implicati in malattie neurodegenerative e i loro ortologhi dello zebrafish. Infatti in modelli di zebrafish per il parkinsonismo recessivo, *Parkin* o *Pink1* knockdown, si è osservata la perdita di neuroni dopaminergici; mentre in modelli di zebrafish per l'atrofia spinale muscolare recessiva, la perdita della funzione di *Smn 1* ha causato difetti assonali motori. Inoltre, aspetti patologici di alcune malattie sono state replicate da transgenici over-esprimenti la proteina umana mutante, come la Tau, Huntingtin, e SOD1 (per una review vedi Bandmann e Burton, 2010). Gli zebrafish quindi, sono stati usati per lo studio di malattie neurodegenerative creando modelli transgenici in cui è stata indotta una specifica patologia. Infatti, la capacità di esaminare il decorso di un processo patologico in vivo e in tempo reale è un particolare punto di forza dei modelli di zebrafish. Sebbene ci siano evidenti differenze nella fisiologia dei pesci e degli esseri umani che potrebbero influenzare l'esito fenotipico delle malattie nei modelli di zebrafish, il pesce zebra offre il vantaggio di essere facilmente manipolabili geneticamente e chimicamente (per una reviews vedi Lieschke e Currie, 2007) il che lo rende un organismo importante, oltre ai modelli murini, da utilizzare nella ricerca sulle malattie.

## Il cervello di zebrafish: una visione d'insieme

In accordo con la classica suddivisione anatomica, il sistema nervoso centrale (SNC) dello zebrafish (Fig. 2, 3) può essere diviso in senso antero-posteriore, in: telencefalo, diencefalo, mesencefalo, romboencefalo e midollo spinale. Come in tutti i teleostei, il cervello dello zebrafish è dominato dall'ampio tetto ottico del mesencefalo. Inoltre nel romboencefalo sono presenti lobi vagali e facciali specifici dei ciprinidi, che ricevono impulsi gustativi dall'ampio numero di bottoni gustativi presenti in questi pesci (Wullimann et al., 1996).

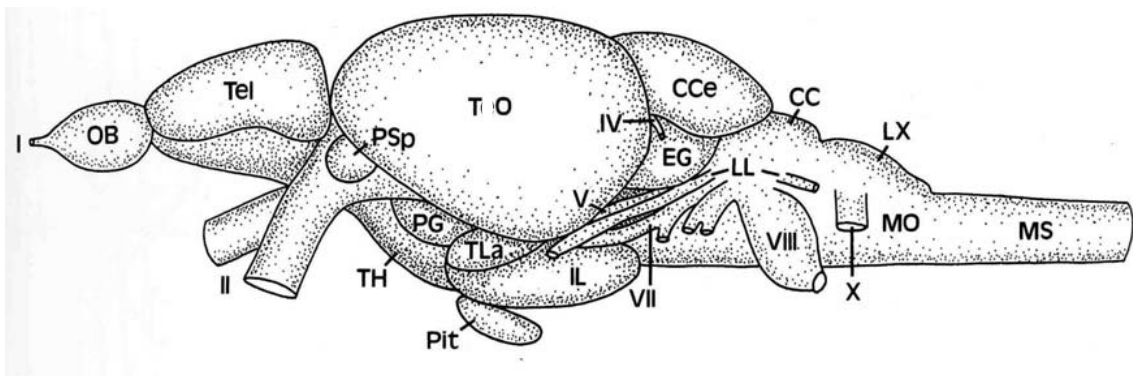


Fig. 2. Visione laterale dell'encefalo di zebrafish

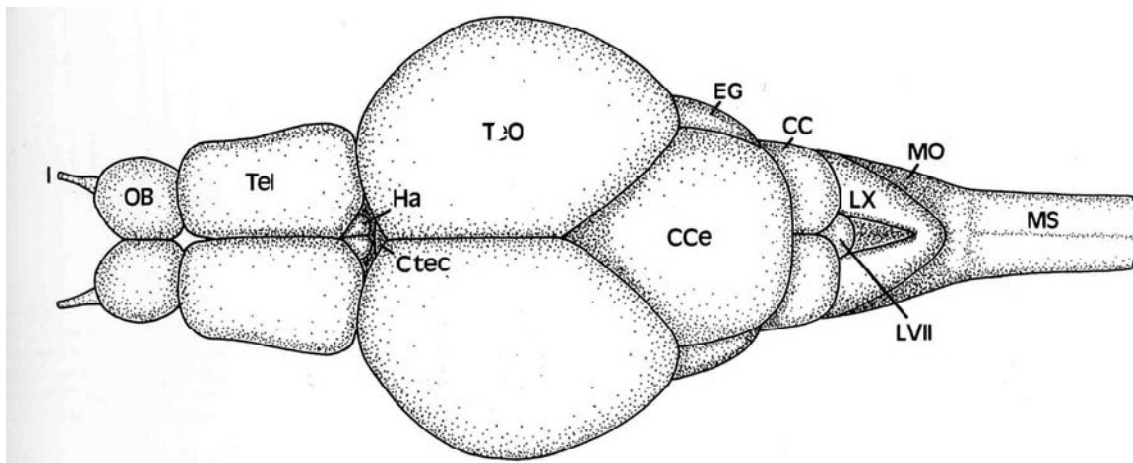


Fig. 3. Visione dorsale dell'encefalo di zebrafish adulto

## Telencefalo

Nei teleostei, l'architettura del telencefalo (Tel) è profondamente diversa da quella degli altri gruppi di vertebrati (Nieuwenhuys & Meek, 1990) nei quali gli emisferi telencefalici si sviluppano per un processo di evaginazione ed ispessimento di due porzioni rostrali del tubo neuronale embrionale per cui ogni emisfero contiene un diverticolo laterale del ventricolo iniziale. Nei pesci Attinopterigi, ed in particolare nei teleostei (incluso lo zebrafish), la lamina del tetto del telencefalo embrionale si estende lateralmente ed in conseguenza le lamine alari pari, che formano le pareti degli emisferi, si espandono in direzione lateroventrale con un processo chiamato eversione (Fig. 4). La porzione più rostrale del telencefalo costituisce la coppia di bulbi olfattori.

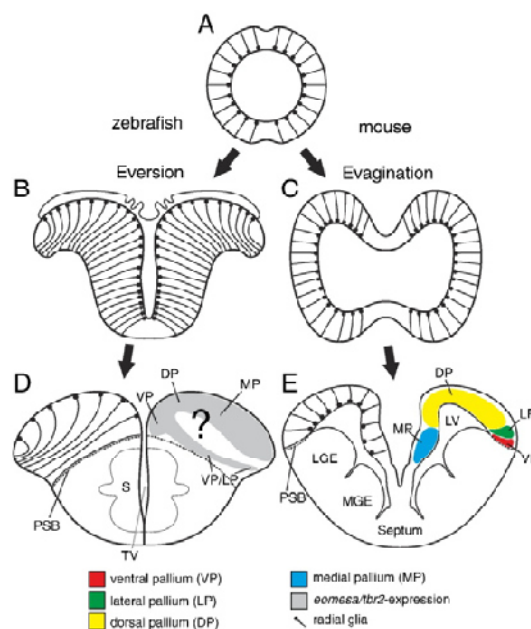


Fig.4. Sviluppo del telencefalo: confronto tra teleostei (B, D) e mammiferi (C, E) (23)

### Bulbi olfattori

I bulbi olfattori (OB) formano una coppia di sporgenze rostrali del telencefalo, interconnesse ad esso attraverso due tratti secondari di fibre olfattorie: il tratto olfattorio laterale (LOT) e mediale (MOT). Il tratto olfattorio laterale entra nell'area dorsale del telencefalo più rostralmente rispetto al tratto olfattorio mediale il cui ingresso avviene nella porzione ventrale e risulta essere più caudale. Ogni bulbo olfattorio consiste di quattro lamine che, dalla periferia alla parte profonda, sono:

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

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

#### Area dorsale del telencefalo

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

#### Area ventrale del telencefalo

L'area ventrale telencefalica è divisa in nuclei, in posizione periventricolare, e quindi in contatto con il rivestimento ependimale mediale del ventricolo (nuclei dorsali (Vd), ventrali (Vv), sopracommissurale (Vs) e post-commissurale (Vp)] e nuclei che si sono allontanati in vario grado dal ventricolo (il nucleo centrale (Vc) e laterale (Vl), il nucleo endopeduncolare dorsale (ENd) e ventrale (ENv)). I nuclei periventricolare dorsale e ventrale sono posti caudalmente alla commissura anteriore. Il nucleo dorsale è contiguo caudalmente al nucleo sopracommissurale, che a sua volta è contiguo al nucleo post-commissurale. Un nucleo periventricolare chiamato Vn in altri teleostei, non è presente nell'area telencefalica ventrale di zebrafish. Nel telencefalo rostrale tra i nuclei migrati dell'area ventrale sono presenti il nucleo centrale commissurale (Vc) ed il nucleo laterale (Vl). Mentre il nucleo centrale è posto immediatamente lateralmente al nucleo dorsale, il nucleo laterale è migrato verso la periferia del cervello. E' inoltre assente nello zebrafish (Wulliman et al., 1996) un distinto nucleo intermedio dell'area ventrale, descritto in altri teleostei come un'estensione laterale del nucleo post-commissurale.

### Tratti telencefalici e commisure

La commissura anteriore è divisa in una porzione dorsale che giace ventralmente al nucleo supracommissurale dell'area ventrale del telencefalo, ed una porzione ventrale che poggia dorsalmente sulla regione preottica. Nel telencefalo precommissurale, diversi fascicoli convergono rostro-caudalmente e tendono a fondersi tra di loro, formando i fasci prosencefalico laterale (LFB) e prosencefalico mediale (MFB) che si estendono nel diencefalo. Il tratto olfattorio mediale (MOT) entra ventralmente nell'area ventrale del telencefalo e decorre caudalmente, lateralmente al nucleo ventrale, a livello della commissura anteriore. Il tratto olfattorio laterale (LOT) entra nell'area dorsale del telencefalo più rostralmente e decorre lateralmente al margine ventrale della zona posteriore dell'area dorsale del telencefalo.

### **Diencefalo (incluso il sinencefalo e il pretetto)**

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

### Area preottica

L'area preottica racchiude il ventricolo diencefalico più rostrale (DiV) e può essere suddivisa in una serie ventrale di nuclei preottici parvocellulari ed una serie dorsale di nuclei preottici magnocellulari. Il nucleo preottico parvocellulare anteriore (PPa) si estende rostralmente in posizione ventrale rispetto al telencefalo. PPa è sostituito nel diencefalo dal nucleo preottico parvocellulare posteriore (PPp). Il nucleo soprachiasmatico (SC) si trova in posizione ventro-laterale rispetto a quest'ultimo. Dorsalmente al nucleo parvocellulare preottico posteriore emerge un nucleo magno cellulare preottico (PM), seguito più caudalmente dalla porzione gigantocellulare del nucleo preottico magno cellulare (PMg). Non è evidente dal punto di vista morfologico nello zebrafish una porzione parvocellulare del nucleo preottico magnocellulare, come descritto nel goldfish (Braford & Northcutt, 1983).



### Epitalamo

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

### Talamo dorsale

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

### Talamo ventrale

La porzione rostrale del talamo ventrale (VT), che si estende più caudalmente di quello dorsale, è posta sotto la porzione rostrale del nucleo abenulare. Il talamo ventrale è posto ventralmente al talamo dorsale solo nella sua estensione caudale. Il talamo ventrale consiste di un nucleo intermedio (I), di un nucleo ventromediale (VM) e di un nucleo ventrolaterale (VL). Anche il nucleo rostro laterale (R) di Butler and Saidel (1991) è presente nello zebrafish.

### Tubercolo posteriore

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

### Ipotalamo

Come negli altri teleostei, l'ipotalamo dello zebrafish è di gran lunga la porzione più estesa dell'area diencefalica ed include una zona caudale, una dorsale e una ventrale. Mentre le zone ventrale e quella caudale formano gran parte della porzione tuberale mediale dell'ipotalamo (TH), la zona dorsale è ulteriormente estesa lateralmente ed include i lobi appaiati inferiori o laterali (IL)

dell'ipotalamo. Questi sono separati dalla porzione tuberale dell'ipotalamo attraverso un profondo solco ventrale. Le tre zone ipotalamiche presentano primariamente masse cellulari periventricolari affiancate da nuclei separati migrati. La zona ipotalamica ventrale, con il nucleo periventricolare (Hv), si estende più rostralmente. Il nucleo tuberale anteriore (ATN) e il nucleo ipotalamico laterale (LH) sono situati lateralmente a questa. Più caudalmente, emerge la zona ipotalamica dorsale che forma i recessi ventricolari latero-caudali appaiati (LR) circondati da masse di cellule periventricolari (Hd). Il nucleo diffuso (DIL) e il nucleo centrale (CIL) del lobo inferiore sono presumibilmente migrati da queste masse cellulari periventricolari.

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

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

### Sinencefalo

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

### Pretetto

IL pretetto è una delle regioni più variabili nel cervello dei teleostei (Wullimann et al., 1991). Seguendo la descrizione di Braford e Northcutt (1983), è possibile riconoscere un pretetto periventricolare, uno centrale e uno superficiale. Il numero e la morfologia dei nuclei del pretetto superficiale e centrale nello zebrafish chiaramente rappresenta un pattern ridotto rispetto all'organizzazione del pretetto nei teleostei, in quanto sono assenti il nucleo corticale come quello glomerulare. Il pretetto superficiale è racchiuso nel tratto ottico ed include un nucleo parvocellulare (PSP) ed un nucleo magnocellulare (PSM). Il PSM è contiguo caudalmente al nucleo pretettale posteriore (PO). Il nucleo pretettale centrale (CPN) si ritrova dorsalmente al PSM e al PO. Il nucleo pretettale accessorio (APN) è situato dorso-lateralmente al nucleo pretettale posteriore. Qualche volta due nuclei addizionali sono considerati parte del pretetto: il nucleo ottico accessorio dorsale (DAO), ventralmente adiacente al PSM e al PO, e il nucleo ottico accessorio ventrale (VAO),

situato più ventromedialmente. Il VAO è molto largo nello zebrafish a confronto con gli altri ciprinidi.

### Tratti diencefalici e commisure

Iniziando nel telencefalo, entrambi i fasci prosencefalici, laterale e mediale, si estendono come tratti distinti nel diencefalo, quello laterale è dorsale all'area preglomerulare e quello mediale si avvicina al nucleo tuberale posteriore. Ventralmente alla regione preottica anteriore, i nervi ottici (nervo ottico ON, II) interdigitano nel chiasma ottico (CO) e raggiungono la zona contro laterale del cervello. Dietro il chiasma, le fibre ottiche sono convenzionalmente chiamate tratti ottici (OT), composti dal tratto ottico dorso mediale (DOT) e ventrolaterale (VOT). Il DOT corre dorsalmente lungo la superficie laterale delle regioni preottiche e talamiche verso il tetto ottico, mentre il VOT corre caudalmente lungo il margine ventrale del tetto ottico.

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

La commissura abenulare corre attraverso i due nuclei abenulari dorsali.

Immediatamente caudale al chiasma ottico si trova la larga commissura post-ottica (Cpop=commissura sopraottica). Le commisure minore e trasversale, nello zebrafish, non sono così chiaramente separate come nelle altre specie e sono incluse nella commissura post-ottica. Ventralmente alla commissura post-ottica, la commissura orizzontale (Chor) attraversa la linea mediana nella zona ipotalamica ventrale.

I tratti che formano le commisure orizzontali decorrono caudalmente su ogni lato dell'encefalo, ventrale all'area preglomerulare, al disotto della quale girano prima dorsalmente e poi rostralmente verso l'estremità anteriore del tetto ottico. Una terza commissura encefalica, la commissura del tubercolo posteriore (Ctub) (Herrick, 1948), si estende al nucleo tuberale posteriore. La commissura posteriore (Cpost) è situata nella regione precedentemente trattata come sinencefalo.

## **Mesencefalo**

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

### Tetto ottico

La nomenclatura degli strati del tetto ottico è in accordo con la descrizione del tetto ottico fatta da Northcutt (1983) nel Carassio, un pesce della Famiglia *Ciprinidae* come lo zebrafish. Il tetto ottico (TO) è la struttura più complessa del cervello di zebrafish. Questo può essere suddiviso in quindici strati raggruppati, dal ventricolo alla superficie esterna, in quattro zone: la zona grigia periventricolare (PGZ), la zona bianca profonda (DWZ), la zona centrale (CZ), e la zona superficiale grigia e bianca (SWGZ) (Fig. 5).

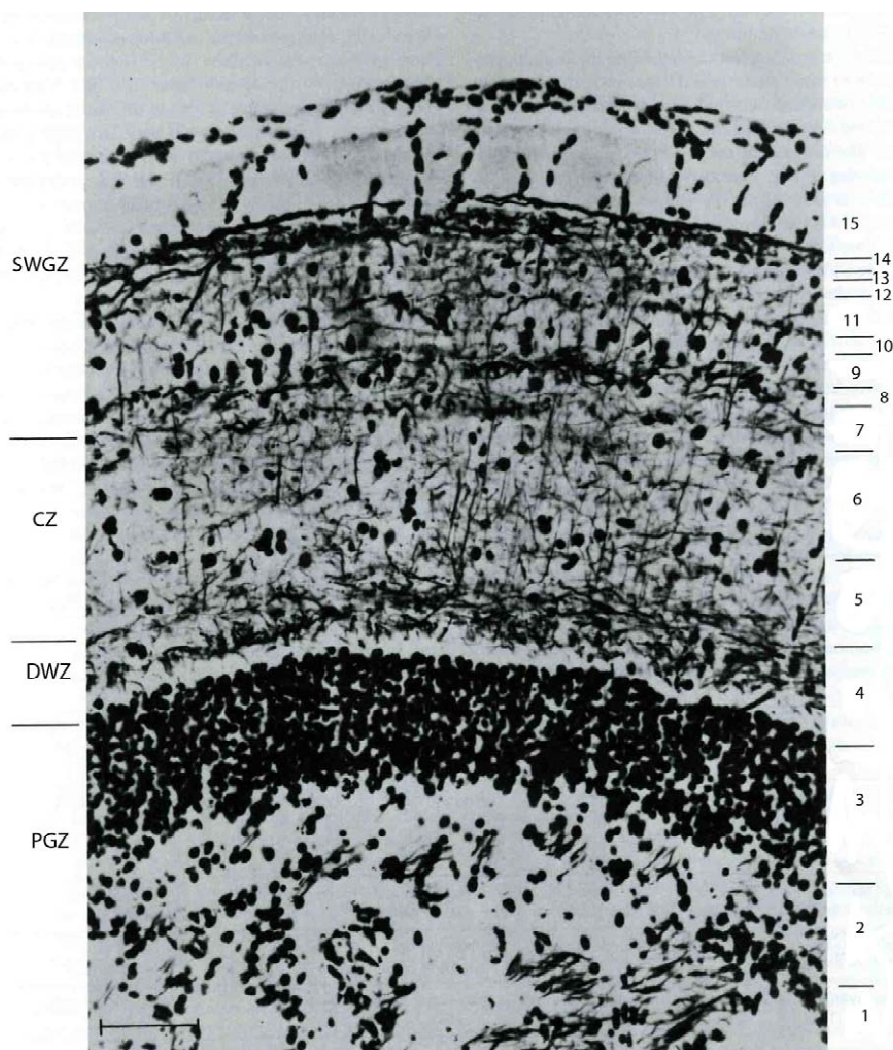


Fig. 5. Sezione trasversale del tetto ottico del Carassio, colorato attraverso il metodo Bodian. Sul lato sinistro sono indicate le quattro zone (PGZ: zona grigia periventricolare; DWZ: zona bianca profonda; CZ: zona centrale; SWGZ: zona superficiale bianca e grigia); sul lato destro sono raffigurati gli strati che compongono le singole zone. Barra d'ingrandimento = 50  $\mu$ m.

La zona grigia periventricolare è composta da 3 distinti strati:

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

II) uno strato fascicolare, caratterizzato dalla presenza di fibre aggregate in fascicoli che costituiscono la principale via tectale discendente ad ascendente;

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

La zona bianca profonda, caratterizzata da un singolo strato (IV), è formata da fibre afferenti ed efferenti tectali, da neuroni piramidali e da grandi neuroni multipolari. I neuroni piramidali presentano dendriti che si ramificano nella zona bianca profonda e nella zona centrale; i neuroni multipolari, presenti in tutta la zona bianca profonda, irradiano lunghi dendriti in tutti i piani. La zona centrale può essere suddivisa in 3 strati: uno strato profondo (V) ed uno superficiale (VII) che presentano un'alta densità di prolungamenti cellulari e fibre mieliniche; uno strato centrale (VI) con una concentrazione di fibre più bassa. I neuroni presenti sono per la maggior parte neuroni fusiformi bipolari anche se è possibile osservare neuroni piramidali e neuroni orizzontali multipolari.

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

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

### Toro semicircolare

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

### Tegmento

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

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

## **Romboencefalo (metencefalo e mielencefalo)**

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

### Cervelletto

Come in tutti i teleostei, il cervelletto dello zebrafish può essere suddiviso in tre regioni: corpo (CCe), valvola (Vam) e lobo vestibololaterale (Fig. 6). In particolare, la valvola del cervelletto

include una suddivisione mediale e due laterali, mentre il lobo vestibolo laterale include il lobo mediale caudale (LCa) e le eminenzie granulari.

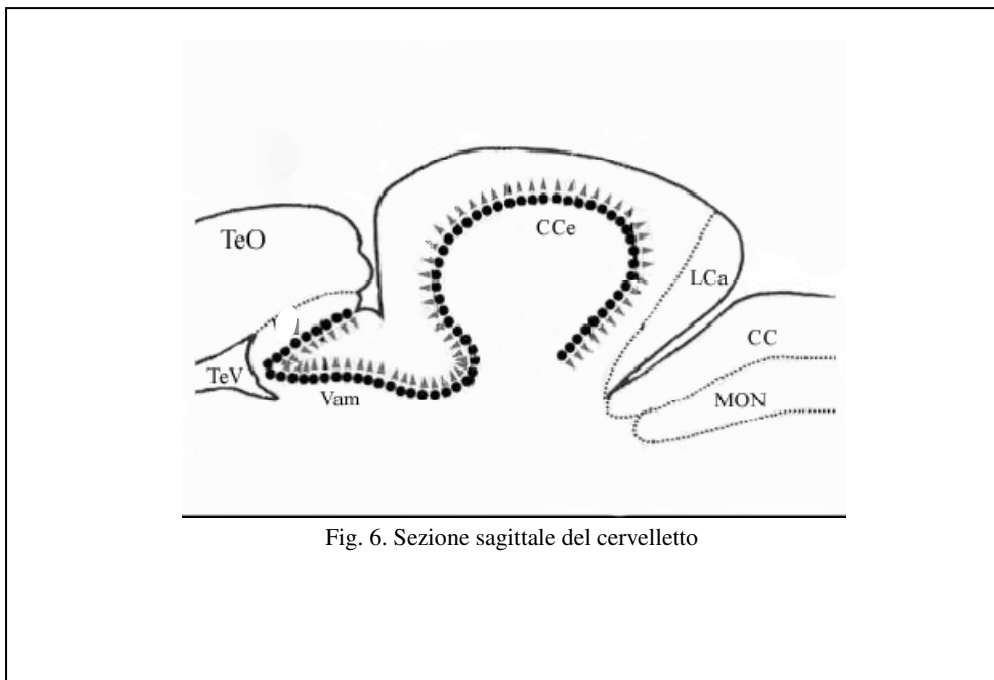


Fig. 6. Sezione sagittale del cervelletto

La struttura microscopica del cervelletto dello zebrafish differisce da quello degli altri vertebrati. Il confine tra lo strato molecolare e quello granulare non è ben definito, essendo alcune cellule dello strato granulare presenti sulla superficie della valvola e del corpo del cervelletto (Wulliman et al., 1996). I dendriti delle cellule di Purkinje si estendono in direzione della superficie del cervelletto e gli assoni invece di fuoriuscire dalla corteccia terminano localmente nelle vicinanze di neuroni efferenti (cellule euridendroidi) che sono gli equivalenti dei neuroni cerebellari nucleari presenti nei mammiferi (Meek et al., 1998). Sebbene la valvola si estenda fino al ventricolo del tetto, le sue caratteristiche istologiche (presenza di uno strato granulare e di uno molecolare, maggiore aggregazione tra le cellule del Purkinje e le cellule euridendroidi) e il suo contatto con il midollo allungato stabilito a livello caudale non lasciano dubbi sul fatto che questa sia parte integrante del cervelletto. Mentre sia il lobo vestibolo-laterale che il corpo del cervelletto hanno un loro omologo negli altri vertebrati, la valvola del cervelletto è presente unicamente nei pesci Attinopterigi (Nieuwenhuys, 1967; Wulliman & Northcutt, 1988; 1989). Infine, il cervelletto dello zebrafish, come quello degli altri teleostei, mostra considerevoli capacità rigenerative (Zupanc, 2008).

### Midollo allungato

Nuclei motori e sensoriali primari.

Il midollo allungato contiene i nuclei motori e sensoriali del nervo trigemino (V), abducente (VI), facciale (VII), ottavo (VIII), glossofaringeo (IX) e vago (X). I nervi anteriore e posteriore della linea laterale (ALLN/PLLN) sono separati dagli altri nervi craniali. Due distinti nuclei motori del trigemino, sono posti uno dorsalmente al fascicolo longitudinale laterale (NVmd) e l'altro al margine ventro-laterale di questo fascicolo (NVmv). I nuclei sensoriali del trigemino descritti nello zebrafish (Puzdrowski, 1988) comprendono: il nucleo istmico sensoriale primario del trigemino (NVs) posto più rostralmente ed in posizione immediatamente caudale rispetto al nucleo gustativo secondario; il nucleo sensoriale poco delineato della radice discendente del trigemino (NDV), posto più caudalmente, a livello del margine medio-dorsale della radice discendente del trigemino (DV); il nucleo funicolare mediale (MFN), terzo nucleo sensoriale del trigemino, che emerge nella porzione terminale del midollo allungato.

Il nervo abducente ha due popolazioni di neuroni motori separate: il nucleo motorio rostrale e la sua radice (VIr) situati a livello della formazione reticolare superiore; il nucleo motorio caudale (NVic) con la sua radice (VIc) a livello della formazione reticolare intermedia. Le due radici, si fondono e decorrono rostralmente, al di fuori del midollo allungato,. La radice sensoriale del nervo facciale (VII<sub>s</sub>) entra nel tronco encefalico insieme al nervo anteriore della linea laterale, si porta medialmente e caudalmente per terminare nel lobo facciale (LVII). Il nucleo motorio facciale (NVII<sub>m</sub>) è posto ventralmente alla radice sensoriale facciale e dorsalmente alla commissura ventrale romboencefalica e alla formazione reticolare intermedia.

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



dorsalmente intorno alla radice discendente del trigemino. Dorsalmente alle fibre arcuate interne, è presente un altro nucleo connesso all'ottavo, il nucleo secondario dell'ottavo (SO). La radice del nervo glossofaringeo (IX) che è perifericamente in contatto con il primo arco branchiale, entra ventralmente rispetto al secondo tratto gustativo. Mentre i suoi nuclei sensoriali formano un'aggregazione cellulare (LIX) in posizione intermedia tra il lobo vagale e quello facciale, i suoi nuclei motori non formano un nucleo separato, ma sono contenuti nella colonna visceromotrice insieme ai neuroni motori del nervo vago (NXm). Il nervo vago, caratterizzato da un ampio diametro superficiale, innerva i rimanenti archi branchiali e trasporta le informazioni gustative che sono processate nel lobo vago (LX). Nello zebrafish ci sono due nuclei sensoriali in relazione con i nervi della linea laterale: il nucleo ottavolaterale mediale ed il nucleo ottavolaterale caudale. L'esteso nucleo ottavolaterale mediale (MON) è posto nella porzione encefalica più dorsale sopra i nuclei dell'ottavo; esso è coperto da uno strato molecolare chiamato cresta cerebellare (CC). Il nucleo ottavolaterale caudale è più piccolo e si estende lateralmente al lobo vagale e al lobo facciale.

### Formazione reticolare

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

## **Midollo spinale**

Il midollo spinale decorre dal foramen magnum del neurocranio per tutta la colonna vertebrale entro lo speco vertebrale delimitato dai processi neurali delle vertebre. In una sezione di midollo spinale di zebrafish, si può notare esternamente una zona “bianca” e più internamente una zona centrale “grigia” con la forma ad Y rovesciato. Al centro vi è il canale ependimale.

Latero-dorsalmente e latero-ventralmente dal midollo spinale si dipartono le radici dei nervi spinali. La radice dorsale comprende fibre sensitive e una piccola componente visceromotrice. La radice ventrale comprende solo fibre motrici. Le radici dorsali e ventrali confluiscono in un nervo misto che successivamente si divide in un ramo dorsale ed un ramo ventrale.

## CAPITOLO 2

# NEUROTROFINE

Le neurotrofine sono una famiglia di polipeptidi strutturalmente simili, con un ruolo fondamentale nella regolazione della sopravvivenza, differenziazione e funzione di diverse popolazioni neuronali. La famiglia delle neurotrofine comprende il Nerve Growth Factor (NGF), il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), la Neurotrofina-3 (NT-3), la Neurotrofina-4 (NT-4) e la Neurotrofina-6 (NT-6).

Il primo membro della famiglia identificato è stato l'NGF, fattore di crescita neuronale evidenziato nel corso di esperimenti di trapianto di sarcoma murino in embrioni di pollo quale fattore diffusibile dal tessuto trapiantato che determinava crescita e differenziamento di cellule nervose nell'ospite (Levi-Montalcini et al., 1954). Questa scoperta portò successivamente alla formulazione di un'ipotesi neurotrofica (Purves, 1988) basata sull'assunto che la sopravvivenza dei neuroni dipendeva dall'apporto di un fattore trofico prodotto e rilasciato da tessuti bersaglio ovvero da tessuti innervati da popolazioni di neuroni sensibili a questi fattori. Dalle terminazioni nervose i fattori neurotrofici potevano raggiungere, tramite trasporto retrogrado, il corpo neuronale su cui esercitavano un effetto trofico e di sopravvivenza durante lo sviluppo embrionale (Purves, 1986; Lindsay, 1996).

Successivamente alla scoperta dell' NGF altri fattori neurotrofici sono stati identificati e i loro effetti sono risultati notevolmente più ampi di quanto descritto inizialmente. Così, nel 1982 il BDNF è stato purificato dal cervello di suino, grazie al suo ruolo di promuovere sopravvivenza di una sottopopolazione di neuroni dei gangli della radice dorsale (Barde et al., 1982). Nonostante la diversa origine e la distinta specificità neuronale, BDNF è risultato essere strettamente correlato all' NGF. Il terzo membro della famiglia delle neurotrofine, la NT-3 è stato identificato pochi anni più tardi (Hohn et al., 1990). NT-4 è stato isolato prima nella vipera e in *Xenopus* (Hallböök et al., 1991) e poi identificato nel DNA genomico umano e di ratto (Ip et al., 1992) quale omologo a NT-4 di *Xenopus* / vipera. Una quinta neurotrofina, chiamata NT-5 (Berkemeier et al., 1991; 1992) e clonata da quella umana, presenta una localizzazione cromosomica e un profilo di attività che indicano che NT-5 è ortologo di NT-4 (Berkemeier et al., 1992). Infine, la neurotrofina NT -6 stata clonata solo dal teleosteo *Xiphophorus maculatus* (Götz et al., 1994) e non è espressa in altri vertebrati. Scoperte successive hanno suggerito l'esistenza di una neurotrofina NT-7, clonata nella carpa (Lai et al., 1998) e in zebrafish (Nilsson et al., 1998), tipica dei pesci. Tuttavia, Dethleffsen e colleghi (2003) hanno evidenziato che i geni per NT-6 e NT-7, inizialmente considerati diversi, si

sono evoluti da un singolo gene ancestrale, generato da una singola duplicazione di un gene ancestrale NGF.

L'interesse per le neurotrofine non è mai diminuita nel corso degli anni, anzi accanto alla ricerca sugli effetti dei fattori neurotrofici, ulteriori studi hanno fatto luce sui relativi meccanismi di azione come il trasporto anterogrado e il rilascio presinaptico. Le neurotrofine presentano azioni su distinti o parzialmente sovrapposti sottoinsiemi di neuroni periferici e centrali (per una review vedi Eide et al., 1993; Ibáñez, 1995). Singoli neuroni possono essere sensibili a più di una neurotrofina in un dato momento, o in tempi successivi dello sviluppo. Inoltre, le azioni dei fattori neurotrofici non sono limitate a neuroni in sviluppo in quanto possono agire sia su neuroblasti in divisione che su neuroni maturi che hanno stabilito contatti sinaptici stabili. Quindi, le neurotrofine hanno profonde influenze, che vanno dallo sviluppo, alla differenziazione, alla manutenzione e plasticità della funzione del cervello durante tutta la vita. La perdita del potere di regolazione e funzione delle neurotrofine può esporre il sistema nervoso a rischio di cattivo funzionamento cognitivo ed a degenerazione.

### **Produzione delle neurotrofine**

I geni delle neurotrofine presentano un'organizzazione comune: codificano tutti per precursori pre-pro-neurotrofinici trasportati all'interno del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) sotto forma di peptidi costituiti da 240-260 amminoacidi, che vengono glicosilati e ulteriormente processati per essere secreti come proteine omodimeriche mature (lunghezza monomero: 118-129 aa, peso molecolare di circa 12 kDa) (Halban and Irminger, 1994; Merighi, 2002; Presley et al., 1997).

L'analisi della sequenza genica indica che queste proteine sono inizialmente sintetizzate come precursori di 31-35 kDa che presentano il motivo precursore: Arg-Xaa-(Lys/Arg)-Arg (Bresnahan, 1990), dove Xaa sta per Ser nel proNGF e proNT-4/5, Val nel proBDNF e Arg nel proNT-3. Il taglio proteolitico necessario per la formazione di proteine mature ed attive viene effettuato nelle cisterne trans del Golgi (trans-Golgi network, "TGN") ad opera dell'enzima "FURIN" o nei granuli secretori immaturi ad opera di enzimi chiamati convertasi, appartenenti alla famiglia delle serin-proteasi (Seidah et al., 1996). All'interno del reticolo trans del Golgi si possono generare due differenti tipi di vescicole a seconda che il meccanismo di secrezione sia costitutivo o regolato (Merighi, 2002). I granuli secretori della via costitutiva sono di piccole dimensioni (diametro: 50-100 nm) e si fondono con la membrana plasmatica per liberare il loro contenuto in assenza di qualsiasi specifico meccanismo di attivazione (Halban e Irminger, 1994; Hokfelt et al., 2000; Harter

e Reinhard, 2000). Questa via costitutiva è presente in tutti i tipi di cellule ed è indipendente dai livelli intracellulari di  $Ca^{++}$ . Invece la via regolata è costituita da vescicole relativamente grandi (diametro: 100-300 nm) che si fondono con la membrana plasmatica a seguito di un aumento della concentrazione intracellulare di  $Ca^{++}$  (Lang et al., 2001). In particolare, studi sui neuroni dell'ippocampo sono stati effettuati per spiegare i meccanismi della secrezione neuronale regolata del BDNF. Questi studi hanno permesso di documentare l'aumento del contenuto di BDNF nel surnatante di colture cellulari tramite test ELISA. Infatti la depolarizzazione indotta da glutammato o da  $K^+$  50 mM (Canossa et al., 1997; Griesbeck et al., 1999) determina un notevole aumento della concentrazione intracellulare di  $Ca^{++}$  che causa il rilascio di BDNF dalle vescicole secretorie. Altri esperimenti effettuati su neuroni del sistema nervoso periferico (SNP) in coltura hanno evidenziato che una scarica di stimoli elettrici extracellulari (500 pulsazioni di 20-50 Hz ad intervalli di 20 secondi per 30/60 minuti) provoca un accumulo di BDNF nello spazio extracellulare, mentre un pattern di stimolazione con una frequenza più bassa è inefficace (Balkowiec e Katz, 2000). Questi dati suggeriscono che la secrezione di BDNF è dipendente da alte concentrazioni intracellulari di  $Ca^{++}$  che possono essere raggiunte a seguito di stimoli elettrici ad alta frequenza (Hartmann et al., 2001).

I monomeri di ogni neurotrofina condividono molte caratteristiche chimiche comuni:

- hanno un peptide segnale che segue il codone di inizio;
- hanno una pro-regione che include il sito di glicosilazione e quello del clivaggio proteolitico seguito dalla sequenza matura;
- hanno numero di basi (118-120 aa) e grandezza molecolare simili (13,2-15,9 kDa), sequenza primaria simile per il 50% o più, punto isoelettrico intorno a 9-10;
- hanno una struttura tridimensionale determinata da due coppie di catene antiparallele con 6 residui di cisteina formanti 3 ponti disolfuro indicati come motivo cistina. Le neurotrofine, infatti, appartengono alla "Cysteine-Knot Superfamily", un vasto gruppo di proteine aventi in comune un core contenente tre ponti disolfuro intracatena.
- esistono unicamente come dimeri: il monomero non è sufficientemente stabile, mentre con la dimerizzazione si forma un core idrofobico sufficiente alla stabilizzazione della struttura proteica (White et al., 1996).

In particolare NGF è costituito da 3 subunità a, b, g che interagiscono per formare un complesso 7S del peso di circa 27 kDa che con due catene identiche di 118 aminoacidi. Questo complesso dimerico è responsabile dell'attività trofica dell'NGF (Maness et al., 1994), ma anche il monomero promuove attività di crescita.

BDNF è una proteina dimerica di 28 kDa costituita da 2 sub-unità di 14 kDa correlate strutturalmente all'NGF. Il precursore proBDNF viene scisso in una proteina matura di 14 kDa ed una forma minore tronca di 28 kDa.

NT-3 è un polipeptide di 199 aminoacidi, che nel ratto presenta un'identità aminoacidica del 57 % con NGF e un'identità aminoacidica del 58 % con BDNF. Tuttavia, nonostante questa omologia strutturale, NT-3 ha una attività biologica distinta e caratteristiche spazio-temporali diverse da entrambi NGF e BDNF (Robinson et al., 1995).

La proteina precursore di NT-4, fatta di 236 aminoacidi, viene processata nella forma matura in una proteina di 123 aminoacidi (Hallböök et al., 1991; Hallböök et al., 1999).

La struttura del precursore di NT-6 è formata di 286 aminoacidi e contiene un dominio di base supplementare di 22 residui di aminoacidi tra i residui di cisteina 2 e 3. La corrispondente regione in NGF forma un anello sulla superficie proteica (Götz et al., 1994). Questo dominio potrebbe essere responsabile dell'interazione di NT-6 con l'eparina che determina il rilascio di NT-6 dalla superficie cellulare e dalla matrice extracellulare (Götz et al., 1994).

## **I recettori delle neurotrofine**

Le neurotrofine attivano due differenti tipi di recettore di superficie per la trasduzione del segnale (per una review vedi Schecterson e Bothwell, 2010):

- 1) i recettori Trks (chinasi tropomiosina-connessa) appartenenti alla famiglia di recettori tirosin chinasi
- 2) il recettore p75, un membro della superfamiglia dei recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNF).

p75, il primo recettore ad essere scoperto, è stato identificato come recettore a bassa affinità per l'NGF, ma successivamente è stato dimostrato che lega anche le altre neurotrofine con affinità simile (Rodriguez - Tebar et al., 1991; Frade e Barde, 1998). p75 è un membro della superfamiglia dei recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNF) ed è costituito da un dominio extracellulare che presenta quattro motivi ricchi di cisteina (CR1-CR4), un dominio transmembrana ed un dominio citoplasmatico simile a quello presente in altri membri di questa famiglia. Nel dominio extracellulare il residuo di cisteina presente in posizione 279, altamente conservato, è legato post-traduzionalmente con un residuo di acido palmitico attraverso un legame tioestere, servendo probabilmente per il riconoscimento proteina-proteina e per la localizzazione cellulare (Barker et al., 1994).

Tre distinti geni codificanti i TRks sono stati studiati nei vertebrati: TrkA, TrkB e TrkC (per una review vedi Huang e Reichardt, 2003). Questi sono recettori transmembrana di circa 140 kDa hanno dominio extracellulare contenente due gruppi ricchi di cisteina seguiti da tre gruppi ricchi di leucina (LRR1-3) e da due domini immunoglobulina-simili (Ig-like), un singolo dominio transmembrana (Schneider e Schweiger, 1991) ed un dominio intracitoplasmatico tirosin-chinasi circondato da alcune tirosine che servono come siti di attacco dipendenti dalla fosforilazione di adattatori ed enzimi citoplasmatici (Reichardt, 2006). Così il principale meccanismo di azione, una volta che il recettore Trk abbia legato una neurotrofina, è l'attivazione mediante fosforilazione delle chinasi presenti nel dominio intracitoplasmatico. La fosforilazione promuove il segnale, formando siti di legame per gli adattatori proteici che accoppiano questi recettori alle cascate di trasduzione di segnali intracellulari, portando nell'attivazione di alcuni fattori di trascrizione che alterano l'espressione genica. La specificità di legame dei recettori Trk è fortemente determinata dal secondo dominio Ig-like ed ogni recettore Trk lega il corrispondente ligando attraverso una diversa sequenza specifica (Urfer et al., 1995, 1998). Ogni NT lega uno specifico recettore Trk, in particolare NGF attiva TrkA, BDNF e NT-4/5 attivano TrkB e NT-3 attiva TrkC (Kaplan e Miller, 2000); per quanto riguarda p75 studi in vitro hanno dimostrato come questo recettore legghi preferenzialmente la forma immatura delle NTs (Lee et al., 2001).

Il recettore p75 se coespresso con i recettori Trks aumenta l'affinità di legame delle diverse NTs per i loro specifici recettori. Il segnale di p75 è tuttavia duplice, in quanto innesca un segnale che regola la sopravvivenza cellulare, ed un secondo segnale con attività apoptotica. In condizioni fisiologiche il legame delle NTs mature ai recettori Trks e p75 promuove la sopravvivenza cellulare, poichè il segnale di sopravvivenza mediato da Trk sopprime il segnale pro-apoptotico proveniente da p75 ed agisce sinergicamente col segnale antiapoptotico proveniente da p75 (Dobrowsky et al., 1995; Mazzoni et al., 1999; Aloyz et al., 1998; Maggirwar et al., 1998; Hamanoue et al., 1999). Negli stati patologici invece predomina il segnale pro-apoptotico proveniente da p75. L'apoptosi è innescata quando non si ha più una situazione di equilibrio tra i due recettori, perchè p75 è up-regolato o perchè è aumentata la concentrazione della proNT, che da studi in vitro è dimostrato legarsi ed attivare preferenzialmente p75 (Lee et al., 2001).

### **Attività biologica delle neurotrofine**

Le neurotrofine sono fundamentalmente coinvolte nella regolazione della sopravvivenza e differenziazione delle popolazioni neuronali durante lo sviluppo (Levi-Montalcini, 1987; Davies,

1994; Lewin e Barde, 1996; Chao, 2003) ed inoltre continuano a modellare la struttura e funzione neuronale nel corso della vita (Schnell et al., 1994; Thoenen, 1995; Bonhoeffer, 1996; Prakash et al., 1996). L'NGF influenza le dimensioni del soma neuronale, la complessità dendritica (Ruit et al., 1990), il numero e le dimensioni dei contatti sinaptici nel cervello (Garofalo et al., 1992). Altre neurotrofine possono avere effetti simili su popolazioni diverse del sistema nervoso centrale e cambiamenti morfologici a lungo termine possono interferire con la connettività funzionale (Lisman e Harris, 1993; Pierce e Lewin, 1994). Neurotrofine come BDNF e NT-3 producono un rapido aumento della forza sinaptica nella sinapsi neuro-muscolare, nonché un aumento delle correnti post-sinaptiche eccitatorie nei neuroni dell'ippocampo (Jacobi et al., 2010). Inoltre, le neurotrofine rappresentano candidati forti nella regolazione continua della plasticità dei sistemi cerebrali durante la vita embrionale, perinatale e adulta. Questo è particolarmente vero per il BDNF, una molecola chiave nel controllo della neurogenesi, che influenza la proliferazione cellulare all'interno della zona neurogenica del cervello dei mammiferi (Bath e Lee, 2010), e contribuisce al processo di migrazione dei neuroblasti (per una review vedi Bath e Lee, 2010). Ben consolidato è anche il ruolo delle neurotrofine nei processi di rigenerazione. Infatti, è stato notato che la secrezione di neurotrofine nel sistema nervoso aumenta in seguito a lesioni: la secrezione di BDNF e NGF aumenta notevolmente nei neuroni depolarizzati da acido cainico nell'ippocampo (Zafra et al., 1990) o in seguito a lesioni ischemiche (Lindvall et al., 1992). Inoltre sebbene cellule di Schwann, fibroblasti, e mastociti attivati, normalmente sintetizzano NGF, in seguito a traumi indotti queste cellule aumentano la produzione di neurotrofine (per una review vedi Levi-Montalcini et al., 1996). Tra tutte le neurotrofine, le azioni del BDNF in neuroni centrali sono state meglio caratterizzate. Modeste variazioni dei livelli di BDNF o alterazione di espressione di un singolo nucleotide nel gene BDNF sono correlate a differenze neuro anatomiche e cambiamenti comportamentali nell'uomo e in modelli murini, quali: anomalo comportamento alimentare, alterazioni della memoria episodica, e suscettibilità a disturbi neuropsichiatrici di ansia e depressione (Lyons et al., 1999; Egan et al., 2003; Chen et al., 2006; Castren e Rantamaki, 2010; Russo et al., 2009).

La modifica nella regolazione e funzione di tutti i membri della famiglia delle neurotrofine mette il sistema nervoso a rischio di disfunzione cognitiva e degenerazione. Nell'invecchiamento cerebrale e nelle patologie neurodegenerative, c'è un fragile equilibrio tra il sostegno del fattore neurotrofico e la disfunzione. Molte testimonianze evidenziano la forte implicazione di fattori neurotrofici e neurotrofine nella disfunzione del sistema nervoso centrale (per una review vedi Connor e Dragunow, 1998). Non è chiaro se le alterazioni nell'espressione delle neurotrofine e dei loro recettori siano primarie o secondarie ai cambiamenti neuropatologici associati a ciascun disordine. Infatti, mentre non è stato stabilito se quelle alterazioni precedono lo sviluppo della malattia, è



possibile che le alterazioni osservate nelle neurotrofine o nei recettori possano essere coinvolti nella patogenesi primaria di specifiche patologie neurodegenerative (per una review vedere Connor e Dragunow, 1998). Sulla base di queste osservazioni, i membri della famiglia delle neurotrofine potrebbero avere un potenziale ruolo terapeutico nella prevenzione e/ o nella riduzione di perdita neuronale e atrofia che si verificano nell' invecchiamento neuronale e nelle patologie neurodegenerative quali la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington o la sclerosi laterale amiotrofica (SLA).

### **Filogenesi delle neurotrofine**

Le Neurotrofine e i loro recettori Trk rappresentano buoni esempi di molecole che guidano i cambiamenti esperienza-dipendenti che coinvolgono la selezione neuronale, la sopravvivenza e la plasticità all'interno del sistema nervoso. Così, i geni che guidano tale cambiamenti sono soggetti a selezione ed i geni codificanti neurotrofine hanno subito cambiamenti molecolari nel corso dell'evoluzione.

Gli studi di evoluzione molecolare hanno evidenziato che le neurotrofine sono altamente conservate nell'evoluzione dei vertebrati. Neurotrofine ed i loro recettori Trk sono stati identificati in molti vertebrati compresi rettili, anfibi, pesci, uccelli e mammiferi (per una review vedi Hallböök et al., 2006), mentre NT-4 non è stato trovato in pollo (l'unica specie di uccelli il cui genoma completo è attualmente disponibile) (Hallböök et al., 1991) e NT-6 è stato isolato solo nei pesci (Götz et al., 1994). Un'analisi filogenetica delle neurotrofine e della famiglia dei recettori Trk è stata eseguita sia su sequenze aminoacidiche mature sia su sequenze nucleotidiche di organismi selezionati in diversi stadi evolutivi (Hallböök et al., 1991; van Kesteren et al., 1998.; Hallböök et al., 1999; Lanave et al., 2007). L' analisi conferma l'ipotesi che le neurotrofine si siano evolute precocemente nella storia dei vertebrati, durante i due turni duplicazione del genoma che hanno caratterizzato l' origine e l'evoluzione dei vertebrati (Hallböök et al., 2006). Quest' evidenza è stata ulteriormente confermata dallo studio sull'analisi filogenetica del BDNF (Tettamanti et al., 2010), in cui la sequenza codificante per la proteina BDNF è stato studiata in 36 differenti vertebrati, dai mammiferi ai pesci, per valutare se la selezione evolutiva abbia giocato un ruolo fondamentale nell'evoluzione delle neurotrofine (Tettamanti et al., 2010). Il DNA del BDNF ha subito un certo grado di pressione selettiva nell'evoluzione molecolare durante la filogenesi dei vertebrati, raggruppando insieme le specie appartenenti alla stessa classe. Una pressione selettiva sembra sia responsabile della separazione dei mammiferi da altre classi. I mutanti derivano da mutazioni

puntiformi per delezione/inserzione, soprattutto in teleostei. Regioni differentemente conservate sono riconosciute lungo le sequenze corrispondenti a differenti parti del trascritto.

Nei pesci, la conoscenza delle neurotrofine è ancora piuttosto limitata. Solo di recente, diverse ricerche, sostenute da analisi filogenetica, hanno rivolto l'attenzione al ruolo biologico delle neurotrofine, utilizzando i pesci come modello alternativo ai roditori, per cui progressi significativi sono stati ottenuti nel campo della neurobiologia dei pesci e delle neurotrofine.

## CAPITOLO 3

# NEUROGENESI

La neurogenesi è il processo attraverso il quale le Cellule Staminali Neurali (NSCs) durante lo sviluppo generano neuroni maturi e funzionali. Esso ha inizio con la divisione asimmetrica del precursore e termina solo una volta che il nuovo neurone, completamente differenziato ed integrato, è in grado di sopravvivere e svolgere le proprie funzioni.

Secondo la definizione classica, le NSCs sono cellule dotate di tre caratteristiche principali (Gage, 2000):

1. self-renewal illimitato;
2. proliferazione ma con un ciclo cellulare molto dilatato nel tempo;
3. multipotenza, ovvero capacità di generare cellule in grado di differenziarsi nei diversi citotipi derivati dal neuro-ectoderma [neurone, astrocita, oligodendrocita].

### **La neurogenesi nell'adulto e i metodi per studiarla**

La neurogenesi nell'adulto fa riferimento alla continua genesi di nuovi neuroni nel SNC per tutto l'arco della vita, ricapitolando il set di eventi proprio della neurogenesi nello sviluppo embrionale. L'idea che il Sistema Nervoso Centrale [SNC] esaurisca il proprio potenziale neurogenico nelle fasi precoci dello sviluppo post-embriale è stata considerata per lungo tempo dalla comunità scientifica come un assioma della neurobiologia. Solo gli studi pionieristici di Altman e Das (1965, 1967) con H3-timidina fornirono le prime evidenze anatomiche della presenza di neuroni di nuova genesi nel cervello di ratto adulto: tali neuroni di neo-formazione furono rinvenuti nel giro dentato dell'ippocampo (Altman e Das, 1965), nella neocorteccia (Altman, 1966) e nel bulbo olfattivo (Altman, 1969). Nel 1970 l'articolo di Kaplan (Kaplan e Hinds, 1977) riconfermò la presenza, già documentata da Altman, di proliferazione cellulare nel bulbo olfattivo e nel giro dentato di ratto adulto (3 mesi d'età) fornendo però anche la dimostrazione, con immagini di microscopia elettronica, che tali cellule erano, almeno morfologicamente, neuroni. Solo dagli anni '90 è stata riconosciuta come scientificamente valida la tesi della *neurogenesi nell'adulto*, ovvero della continua genesi di nuovi neuroni, in fasi successive allo sviluppo embrionale e peri-natale, in tutte le specie di vertebrati, a partire da cellule staminali neuronali adulte (aNSCs).

Le tappe e i metodi che hanno incrementato nell'ultimo trentennio l'interesse per la neurogenesi nell'adulto sono molteplici:

1. Nel 1983 Nottebohm dimostrò che nel nucleo del canto del canarino esiste un fenomeno di neurogenesi stagione-dipendente (Goldman e Nottebohm, 1983). Egli riuscì in seguito a caratterizzare tale fenomeno anche dal punto di vista funzionale: osservò, infatti, una corrispondenza temporale tra l'estensione del repertorio melodico degli uccelli e il picco della neurogenesi. Questo fu il primo di una serie di studi volti all'indagine, *in vivo*, della presenza e del grado di attività di eventuali aree neurogeniche nel cervello di un animale adulto.

2. Negli anni '90 furono introdotti metodi innovativi per condurre saggi di proliferazione quali l'uso di retrovirus e la marcatura con 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) che consentirono di isolare dal cervello adulto cellule con caratteristiche di staminalità e di caratterizzarle *in vitro*, come cellule in grado di proliferare e differenziare in neuroni, astrociti e oligodendrociti. In particolare, BrdU è un marker specifico della sintesi di DNA, quindi la sua incorporazione nel DNA permette di identificare cellule in fase S e neoformate.

3. Impiego di marcatori proteici della neurogenesi per il riconoscimento dello stadio differenziativo. Anche se non si dispone a tutt'oggi di una batteria di marcatori in grado di identificare univocamente le NSCs, l'ormai prossimo completamento della decodificazione del trascrittoma e proteoma di tali cellule fa sperare di poter di raggiungere presto tale obiettivo.

Diversi markers sono oggi di uso comune per lo studio della neurogenesi (Fig. 7) e tra essi ricordiamo GFAP, S100 $\beta$ , Msh1, Dcx, PCNA e nestina.

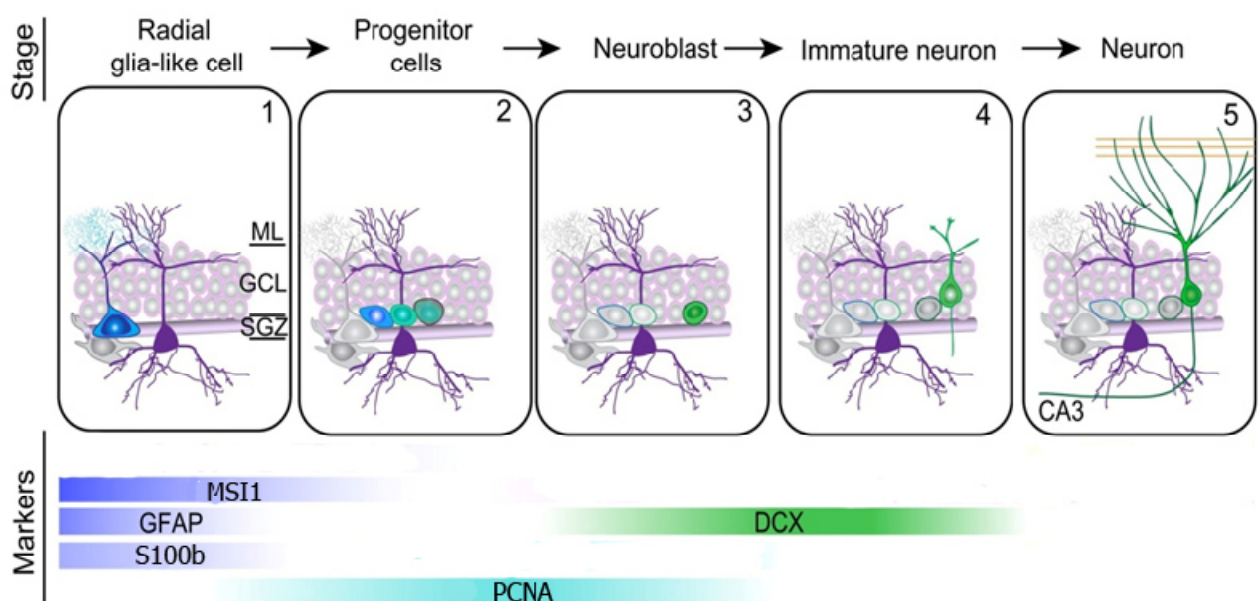


Fig. 7 Successione temporale dell'espressione di alcuni marcatori molecolari della Neurogenesi (Ming e Song, 2011)

### Glial Fibrillary Acidic Protein

La Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) è la principale proteina dei filamenti intermedi (IF) di tipo III del SNC quale marcatore comune degli astrociti maturi e della glia radiale. La GFAP ha dimensioni di 8-12nm, ed è composta da tre domini: testa N-terminale, bastoncino centrale (altamente conservato), coda C-terminale. La sua espressione è finemente regolata da un promotore con un'organizzazione molto complessa, in cui alla regione responsabile dell'espressione basale si affiancano numerosi siti di legame per fattori di trascrizione differenziale. Nel sistema nervoso in sviluppo, GFAP è espressa nelle NSC della zona ventricolare (Chapouton et al., 2007) e il suo grado di espressione aumenta gradualmente con il procedere della differenziazione degli astrociti, fino a che i livelli di GFAP non eccedono quelli di vimentina, la principale proteina degli IF nel cervello embrionale. E' stato dimostrato un aumento dell'espressione di GFAP con l'invecchiamento causato dall'incremento del tasso di trascrizione piuttosto che del numero di cellule astrocitarie, le quali tuttavia hanno dimensioni maggiori. Ciò rende la GFAP un biomarcatore dell'invecchiamento nel cervello di mammifero. Questo è un fenomeno fisiologico che ha inizio dal raggiungimento del pieno sviluppo dell'animale e sembra causato dal danno ossidativo (Morgan et al., 1999), conosciuto come gliosi reattiva. Fermo restando il ruolo chiave della GFAP nel mantenimento dell'integrità del network degli IFs negli astrociti, è stato dimostrato il suo coinvolgimento in molti altri processi cellulari che sono di seguito elencati (Middeldorp e Hol, 2011) (Fig. 8):

- motilità e migrazione cellulare: le cellule GFAP<sup>-/-</sup> hanno motilità estremamente ridotta;
- proliferazione cellulare: inibendo l'espressione di GFAP si determina un maggior numero di cellule proliferanti ed un minor numero di cellule differenziate;
- traffico vescicolare e autofagia;
- interazioni astrocita-neurone: la GFAP è coinvolta nella modulazione, ad opera degli astrociti, di alcune funzioni neuronali, (plasticità neuronale, genesi di sinapsi, crescita dei processi neuritici, re-uptake dei neurotrasmettitori, recycling di recettori e produzione di neurotrasmettitori);
- formazione della barriera emato-encefalica;
- mantenimento della guaina mielinica con l'invecchiamento;
- gliosi reattiva associata a danni meccanici, chimici e metabolici e all'invecchiamento.

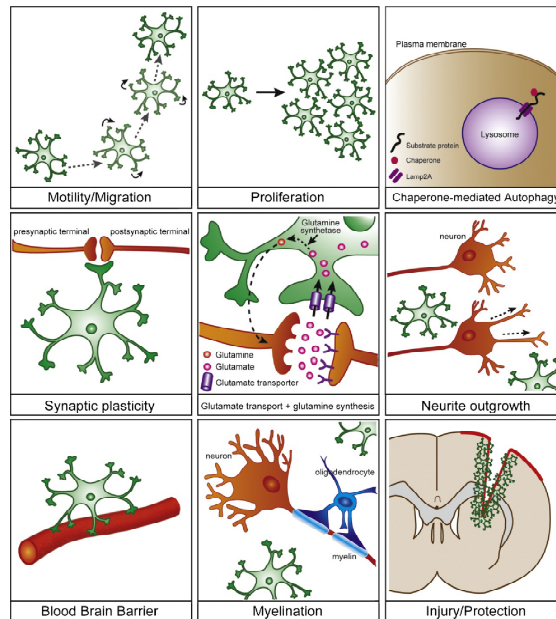


Fig. 8 Rassegna schematica dei fenomeni cellulari nel cervello in cui è coinvolta GFAP (Middeldorp e Hol, 2011)

### S100β

Nell'ambito della super-famiglia delle proteine leganti il calcio, le proteine S100β rappresentano la più grande famiglia caratterizzata dal dominio con struttura a helix-loop-helix (EF) in grado di legare uno ione Ca<sup>++</sup>. Le S100β sono proteine acide, secrete o accumulate nel citoplasma, di piccole dimensioni (9-14kDa), contenenti due domini EF (uno al C- e uno all'N-terminale) non identici tra loro. Mentre il dominio C-terminale è peculiare per il legame al Ca<sup>++</sup>, il dominio N-terminale ha una struttura specifica nelle proteine S100β e mostra bassa o talvolta nulla affinità di legame per il Ca<sup>++</sup>. La famiglia S100β si è evoluta solo recentemente con la comparsa dei vertebrati (non sono stati trovati geni omologhi nel genoma degli invertebrati). Nell'uomo sono stati riportati 20 membri che condividono il 40-60% d'identità della sequenza amminoacidica mentre nei teleostei sono stati individuati 14 membri, di cui 8 con un omologo nei mammiferi (Donato, 2001). Le proteine S100β sono in grado di agire a più livelli, sia nel comparto intra- che extra-cellulare per cui la loro azione può essere schematizzata con le seguenti regolazioni (Marenholz et al., 2004):

1. omeostasi del Ca<sup>++</sup> intracellulare con effetto sulla modulazione del signalling intracellulare dipendente dal Ca<sup>++</sup> o sul controllo dell'attività di proteine Ca<sup>++</sup>-dipendenti che sono coinvolte soprattutto nell'organizzazione del citoscheletro, nell'attività trascrizionale e nello stato di fosforilazione delle proteine (via chinasi);

2. omeostasi del  $Zn^{++}$  e  $Cu^{++}$ , derivante dall'affinità delle proteine S100 $\beta$  anche per questi ioni metallici, importante nel prevenire la neuro-degenerazione indotta da titoli elevati di  $Cu^{++}$  nel tessuto nervoso;
3. interazione  $Ca^{++}$  dipendente/indipendente con target proteici spesso coinvolti nella progressione del ciclo cellulare;
4. signalling extracellulare simile alle citochine con azione sui recettori transmembrana RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products) e attivazione a valle della via delle MAP chinasi o della via NF- $\kappa$ B.

Le S100 $\beta$  nella forma attiva costituiscono omo- o etero-dimeri; la loro composizione in subunità è cellula- e tessuto- specifica riflettendo un pattern spaziale di espressione differenziale dei paraloghi. Il gene s100 $\beta$  è espresso in una varietà di cellule e tessuti: nel muscolo, nei vasi, nel sistema digerente, nella pelle, nel tessuto adiposo. La proteina S100 $\beta$  costituisce in particolare un marker specifico delle cellule gliali del SNC (cellule dell'astroglia ma anche oligodendrociti) e del SNP (cellule di Schwann). Nel tessuto nervoso S100 $\beta$  è coinvolto nell'organizzazione strutturale del citoscheletro, nello sviluppo e nella plasticità neuronale e nella crescita assonale. Inoltre è noto da tempo il ruolo chiave di questa proteina nello sviluppo del sistema nervoso attraverso la regolazione sincrona e parallela della differenziazione neurale e della proliferazione della glia al fine di mantenere questi due fenomeni in equilibrio (Selinfreund et al., 1991).

### *Musashi1, Msh1*

Le RNA-binding proteins (RBP) svolgono un ruolo di primo piano nelle vie che regolano la proliferazione e la scelta del destino cellulare. Le due principali famiglie di neural-specific RBPs sono le Elav e le Musashi. L'espressione delle proteine Elav è ristretta ai neuroni post-mitotici, mentre quella delle proteine Musashi è evidente nei progenitori neurali multipotenti proliferanti del SNC in sviluppo e nelle aNSCs e scompare rapidamente in seguito alla differenziazione (Sakakibara e Okano, 1997). Queste proteine possiedono due Domini RNA-Binding (RBD) all'N-terminale, altamente conservati (Sakakibara et al., 2001). Il primo gene appartenente alla famiglia di Musashi fu isolato in *Drosophila*, in cui determina divisione asimmetrica dei precursori neuronali e corrette scelte differenziative. In seguito, nei vertebrati, furono isolati i geni omologhi quale *Msi1*, un elemento chiave per preservare la staminalità dei progenitori neurali indifferenziati e regolare la scelta del destino differenziativo (Sakakibara e Okano, 1997). *Msi1* esercita la sua funzione legando la regione 3'UTR dell'mRNA di p21WAF1 regolando negativamente la sua espressione a livello

post-trascrizionale (Battelli et al., 2006). Questo gene codifica per un inibitore delle cyclin-dependent-kinase (Cdk) e svolge un ruolo di rilievo del controllo del destino differenziativo poiché determina il timing dell'uscita del precursore dal ciclo cellulare: la repressione post-trascrizionale della sua espressione induce l'aumento, indipendente da p53, dell'attivazione dei complessi ciclina/Cdk associati alla fase S e quindi dei livelli di fosforilazione di Rb. L'mRNA di *msi1* è a sua volta target di proteine omologhe delle Elav nei mammiferi (Ratti et al., 2006), HuB, HuC e HuD che a livello neuronale legano l'RNA messaggero in una regione ricca in A/U presente nel 3'UTR e sono in grado di agire a livello post-trascrizionale, come modulatori positivi dell'espressione genica.

### Double-cortin

Doublecortin (Dcx) è una proteina associata ai microtubuli. il cui significato funzionale è legato alla migrazione dei neuroblasti. Nel SNC la sua espressione è specifica dei neuroblasti in migrazione (Gleeson et al., 1998) coerentemente con la sua funzione nell'organizzazione dei microtubuli del citoscheletro. Nel SNC dell'adulto Dcx è espresso transitoriamente e limitatamente alle nIPCs e ai neuroblasti; infatti l'immunoreattività per Dcx cala bruscamente fino a scomparire non appena ha inizio l'espressione dei marcatori dei neuroni maturi (Brown et al., 2003). Dcx non solo è un valido marcatore di neurogenesi, ma permette anche di quantificare il tasso di neurogenesi che risulta correlato al suo livello di espressione (Couillard-Despres et al., 2005).

### PCNA

Il proliferating cell nuclear antigen (PCNA) è una molecola proteica di 36 Kd, individuata nelle cellule eucariotiche e conservata evolutivamente. Questa proteina sintetizzata all'inizio della fase G1 e S del ciclo cellulare, funziona come cofattore della DNA-polimerasi  $\delta$  per cui regola la duplicazione e la riparazione del DNA, nonché la progressione nel ciclo cellulare. All'inizio della fase S, il PCNA è presente nel nucleo ed è assente dal nucleolo; nella tarda fase S si ritrova invece anche nel nucleolo. Il gene PCNA codifica per due varianti di trascrizione: una è coinvolta nella replicazione del DNA ed è localizzata preferenzialmente nel nucleolo mentre l'altra non sembra coinvolta nella sintesi. E' interessante notare che, poichè la seconda forma si degrada in presenza di solventi apolari, nei tessuti inclusi in paraffina non è rilevabile e perciò si visualizza la sola isoforma che regola la proliferazione cellulare (Kurki et al., 1986).



## Nestina

La nestina è un proteina dei IF ad alto peso molecolare (240 kDa), strutturalmente caratterizzata da un dominio di testa (N-terminale) più corto e un dominio di coda (C-terminale) più lungo di tutte le proteine dei IF. Steinert et al. (1999) hanno dimostrato che la nestina forma in vitro omodimeri e omotetrameri; essa non forma IF da sola ma si assembla preferenzialmente con la vimentina purificata o con la proteina del IF di tipo IV internexin per formare eterodimeri coiled-coil. I IF sono espressi soprattutto nel citoscheletro delle cellule nervose e sono implicati nella crescita radiale dell'assone. La nestina viene espressa nelle cellule in divisione durante gli stadi precoci di sviluppo nel sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP) (Lothian e Lendahl, 1997), nei tessuti miogenici ed in altri tessuti. Raggiunto il differenziamento, la nestina viene downregolata ed è rimpiazzata dalle proteine dei IF tessuto-specifiche. In particolare durante la neurogenesi e la gliogenesi, la nestina è rimpiazzata dai IF specifici del tipo cellulare, e.g. neurofilamenti e GFAP. Tuttavia in organismi adulti, la nestina è presente in precursori neuronali della zona sottoventricolare che risulta essere una nicchia neurogenica (Morshead et al., 1994). Inoltre l'espressione di nestina viene reindotta nell'adulto in situazioni patologiche, come la formazione della cicatrice gliale dopo danno al SNC e durante la rigenerazione di tessuto muscolare danneggiato. La nestina quindi è un marker ideale per studiare la neurogenesi.

## **La neurogenesi nell'adulto: un confronto tra mammiferi e zebrafish**

Nonostante la neurogenesi nell'adulto sia ormai dimostrata, a partire dagli uccelli, in tutti i taxa dei vertebrati, studi comparati evidenziano una marcata riduzione del potenziale neurogenico nell'adulto nel corso dell'evoluzione dai pesci ai mammiferi (Götz et al., 2002). I pesci rappresentano quindi straordinari modelli per lo studio della neurogenesi dell'adulto. Essi permettono l'analisi dettagliata delle zone di neurogenesi, dei segnali d'induzione e del microambiente nelle nicchie, che regolano il differenziamento/indifferenziamento delle Staminali Neurali Adulte [aNSCs], la sopravvivenza e l'integrazione dei neuroni di nuova genesi (Chapouton et al., 2007).

Nei Mammiferi le Cellule aNSCs sono NSC che si trovano nel tessuto nervoso già differenziato dell'individuo adulto, in microambienti detti “*nicchie neurogeniche*”. Shofield propose il concetto di “*nicchia di cellule staminali*” (Elman, 1973) come una regione di tessuto somatico (cellule e matrice extracellulare) che ospita una o più cellule staminali ed è in grado di regolarne il pattern intrinseco di maturazione agendo, con segnali estrinseci, sul delicato equilibrio tra il mantenimento

di uno stato di quiescenza e la produzione di progenie cellulare differenziata (Schofield, 1978). Le nicchie di cellule staminali hanno una struttura tipica (Spradling et al., 2001) (Fig. 9).

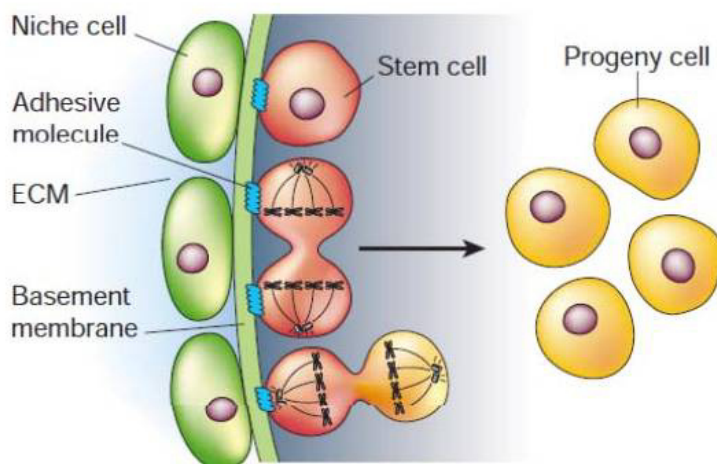


Fig. 9 Struttura caratteristica di una nicchia di cellule staminali (Spradling et al., 2001).

Un monostrato di cellule di origine endoteliale (in verde) secerne una membrana basale sul lato rivolto verso le cellule staminali (in rosso). Questa membrana regola il flusso di segnali pro/anti-differenziativi diretto alle cellule staminali, sequestrando o attivando fattori solubili presenti nella Matrice Extra Cellulare (MEC) ed inoltre, essendo un substrato di ancoraggio cellulare, può causare una diversa esposizione a determinanti di differenziazione nelle due cellule figlie prodotte dalla divisione orientata della cellula staminale. L'attivazione e la differenziazione delle cellule staminali non sono regolate unicamente da segnali solubili ma anche da interazioni cellula/cellula: in particolare è stato dimostrato che l'intima associazione tra cellule staminali e cellule endoteliali è essenziale per il corretto funzionamento della nicchia.

Le due principali nicchie neurogeniche del cervello di mammifero adulto sono la zona sottoventricolare (SVZ) dei ventricoli laterali, che genera i neuroni dei bulbi olfattori, e la zona sottogranulare (SGZ) dell'ippocampo deputata alla produzione dei neuroni dello strato granulare del giro dentato (DG) (Taupin and Gage, 2002). La SVZ si trova nel ventricolo laterale del telencefalo ed è la principale fonte di neurogenesì nell'adulto (Fig. 10). In questa nicchia, si trovano cellule proliferanti simili alla glia radiale (RG-like) [B cells] dalle quali si originano i Precursori Trans-Amplificanti (TAPs) [C cells]. I TAPs vanno incontro a un burst proliferativo e la loro progenie differenzia in neuroblasti [A cells]. I neuroblasti, quindi, migrano ordinatamente lungo il Rostral Migratory Stream (RMS) verso lo strato glomerulare del bulbo olfattivo (OB), dove differenziano terminalmente in interneuroni (Whitman e Greer, 2009), principalmente neuroni glomerulari GABAergici.

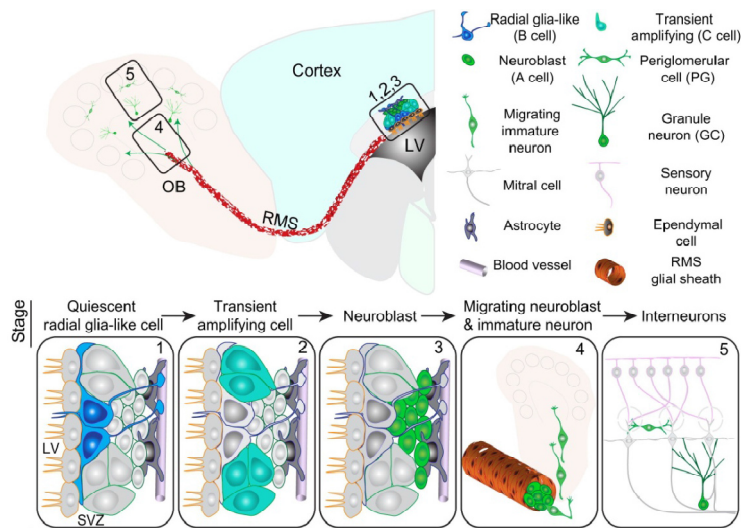


Fig. 10. Neurogenesi associata alla Sub-Ventricular Zone in cervello adulto di topo (Ming e Song, 2011)

Una seconda area, contenente precursori proliferanti, si trova nello strato sottogranulare più interno del Giro Dentato (DG) dell'ippocampo (Grandel et al., 2006) (Fig. 11). Qui precursori con morfologia RG-like (Type1 cells) generano progenitori intermedi (Type2 cells) dai quali origineranno neuroblasti (Type3 cells). Diversamente da quanto avviene nella SVZ, nella SGZ i neuroblasti non devono migrare per lunghe distanze poiché si integrano come interneuroni glomerulari GABAergici nello strato granulare del DG: coerentemente con la maggiore prossimità del target d'integrazione i neuroblasti iniziano a maturare precocemente e i pochi che sopravvivono alle prime due settimane si dimostrano completamente integrati e funzionali.

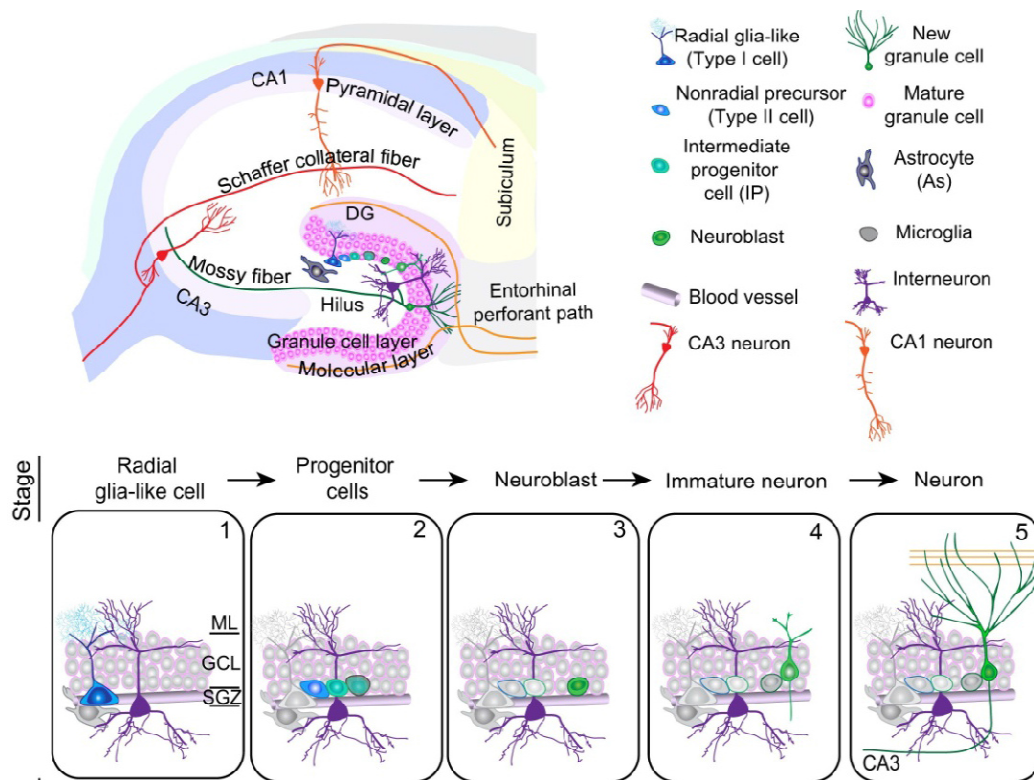


Fig. 11 Neurogenesi associata alla Sub-Granular Zone nel cervello adulto di topo (Ming e Song, 2011)

Oltre alle suddette zone, la neurogenesi nell'adulto di roditori e primati non umani è stata recentemente riportata anche in altre regioni del cervello, come il prosencefalo basale, striato, amigdala, substantia nigra, la sostanza bianca sottocorticale, e più di recente, l'ipotalamo (per una review vedi Schmidt et al., 2013).

Nel cervello dei pesci telostei adulti è presente un potenziale proliferativo di gran lunga maggiore di quello dei mammiferi. In pratica, al suo interno nascono circa 6000 cellule ogni 30 min. La fonte di tale elevata neurogenesi è rappresentata dalla persistenza, nel parenchima cerebrale, di cellule neuro-epiteliali non differenziate e nicchie di neurogenesi spazialmente ristrette. A tutt'oggi, lungo l'asse rostro-caudale, sono presenti 16 distinte aree di neurogenesi (Grandel et al., 2006) distribuite principalmente nelle superfici ventricolari ma anche in alcune aree del parenchima (Fig.12). Alcune di queste nicchie sono comprese in regioni equivalenti a quelle dei mammiferi (SVZ e SGZ). Inoltre, il pattern spaziale delle aree neurogeniche è identico nello zebrafish di 6 mesi (15% life-span) e di 30 mesi (75% life-span) (per una review vedi Schmidt et al., 2013).

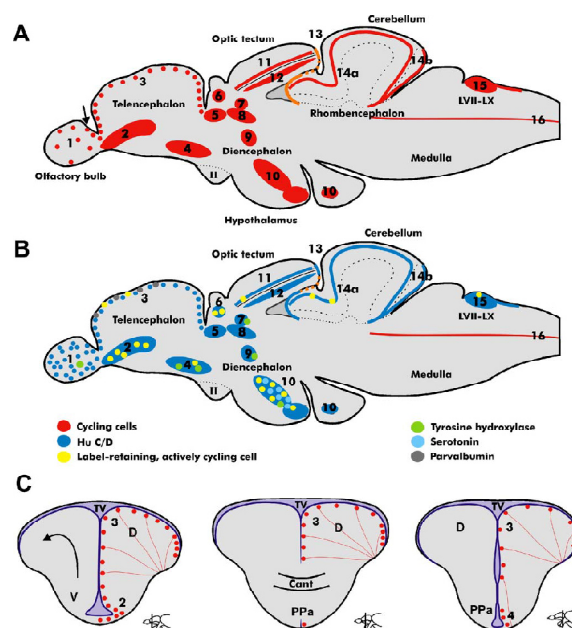


Fig. 12 Sezioni trasversali di cervello di teleosteo adulto in cui sono poste in evidenza le aree proliferative (PCNA+) e le aree di neurogenesi (HuC/D+) (Grandel et al., 2006).

## La Glia radiale e la neurogenesi

La glia radiale (RG) è un tipo cellulare non neuronale presente nel SNC dei vertebrati nel corso dello sviluppo embrionale. Inizialmente a queste cellule fu attribuito il solo ruolo di guidare, lungo i loro processi, la migrazione dei neuroblasti verso i siti target d'integrazione; negli ultimi dieci anni, invece, sempre maggiori prove hanno indotto a considerare le cellule della RG quali fonte di precursori neuronali nel SNC dell'embrione e dell'adulto.

Le cellule della RG presentano una morfologia bipolare: il corpo cellulare risiede verso la parete ventricolare mentre un lungo processo raggiunge la superficie piaie. Sono cellule mitoticamente attive e nel corso del ciclo cellulare vanno incontro a migrazione nucleare intercinetica (Campbell e Götz, 2002) con uno spostamento del soma lungo l'asse cellulare in modo da , raggiungere la posizione più ventricolare in fase S e quella più apicale in fase M. Le cellule della RG esprimono marcatori astrocitari (Campbell e Götz, 2002) quali GFAP, Astrocyte-Specific Glutammate Transporter (GLAST), Nestin, Brain Lipid-Binding Protein (BLBP), Glutamine Synthetase (GS) e S100 $\beta$ . L'espressione di questi markers inizia con la differenziazione della RG dal neuroepitelio embrionale.

Esperimenti *in vitro* (Malatesta et al., 2000) e *in vivo* (Anthony et al., 2004) hanno dimostrato chiaramente l'origine comune delle cellule gliali e neuronali da precursori della RG. Con un

esperimento di fate-mapping (Kriegstein e Alvarez-Buylla, et al., 2011) in cui l'espressione della ricombinasi Cre è stata posta sotto il controllo del promotore della BLBP è stato infatti documentato, *in vivo*, che neuroni di proiezione, interneuroni e cellule gliali derivano tutti da cellule della RG. La RG rappresenta dunque il pool unico di progenitori neurali e gliali nel SNC nel corso di tutto lo sviluppo, sebbene ancora non sia stato chiarito se esista in essa un'eterogeneità intrinseca. Sia nella retina sia nella corteccia è stato dimostrato che il destino differenziativo delle NSCs è strettamente collegato al pattern spazio-temporale secondo cui avviene il differenziamento (Shen Q. et al., 2006). Nel corso della neurogenesi, una singola NSC, dividendosi asimmetricamente, genera delle neural Intermediate Progenitor Cells (nIPCs) le quali evolvono in neuroblasti. Le nIPCs acquisiscono un destino differenziativo specifico integrando i segnali intrinseci, derivanti da programma di trascrizione differenziale dipendente dal tempo (misurato in numero di divisioni cellulari pregresse) ed i segnali estrinseci, quali Notch-Delta e SonicHedgehog (Shh). Specificamente la via di segnalazione Notch, attivata dal contatto tra RG e nIPCs, favorisce la quiescenza della RG e blocca l'espressione dei geni proneurali *hes1* e *hes5* (Del Bene et al., 2008). Nei teleostei la RG, detta ependimoglia, persiste anche nel SNC dell'adulto, nel quale mancano però astrociti e cellule ependimali. Nei mammiferi, invece, la RG scompare in seguito al raggiungimento del pieno sviluppo del SNC, tranne alcune eccezioni quali la glia di Bergmann nel cervelletto e la glia di Müller nella retina. I precursori neurali nelle due principali nicchie neurogeniche dei mammiferi sono tuttavia estremamente simili alla RG dei pesci poiché, in aggiunta ai requisiti di staminalità, possiedono tutti i tratti distintivi della RG. Pertanto la neurogenicità della glia viene mantenuta nell'adulto: le aNSCs, infatti, sono cellule con caratteristiche gliali, che derivano dalle divisioni asimmetriche della RG nel corso della neurogenesi embrionale, e non si differenziano ma mantengono il loro potenziale proliferativo e neurogenico per una considerevole parte della vita dell'animale.

I principali fattori responsabili del mantenimento dello stato indifferenziato delle aNSCs sono fattori intrinseci, tra cui SRY-related homeobox 2 (*Sox2*), ed estrinseci, in particolare Notch-Delta e SonicHedgehog (Shh). *Sox2* è un fattore di trascrizione (TF) già noto per il suo ruolo chiave nel mantenimento dello stato indifferenziato nelle cellule staminali embrionali (ESCs) e come componente del cocktail per l'induzione di Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *Sox2* è specificamente espresso nella RG embrionale, nelle aNSCs sia della SVZ (cellule B) (Suh et al., 2007) che nella SGZ (cellule di tipo 1) (Breunig et al., 2007), partecipando all'equilibrio tra segnali pro/anti-differenziativi e pertanto svolgendo un ruolo centrale nel controllo dello stato differenziativo delle aNSCs. Anche la presenza di Shh, di cui è già ampiamente nota la funzione di morfogeno e fattore di crescita, è indispensabile per la genesi e il mantenimento dei pools di aNSCs

(Machold et al., 2003). Numerose evidenze indicano il *ciglio primario*, una struttura cellulare peculiare comune alla RG embrionale e alle aNSCs, quale sito di segnalazione per Shh e altri morfogeni (Han et al., 2008). Quest' organello è presente in singola copia specificamente nei tipi cellulari indicati ma, fasci di ciglia appartenenti a più cellule, si raccolgono e protrudono nel lume ventricolare al centro di una girandola (pinwheel) formata da cellule endodermali. Una drastica riduzione della neurogenesi in entrambe le nicchie del SNC adulto si verifica impedendo la formazione del ciglio primario e della relativa aggregazione.

### **La neurogenesi nel cervello di zebrafish adulto. Regione telencefalica**

L' ambiente cellulare delle nicchie staminali periventricolari di zebrafish presenta un rivestimento endodermale discontinuo, simile a quanto riportato nei rettili e uccelli, mentre nei mammiferi lo strato endodermale è continuo. Più in particolare, in zebrafish, lo strato endodermale è limitato al tetto del ventricolo telencefalico e alle regioni dorsomediali delle zone proliferative (D e Dm). Nel telencefalo, inoltre, le aree proliferative differiscono per la presenza di diversi tipi di cellule ciliate. Le aree D, Vd, Dm e Dl contengono cellule staminali multiciliate mentre le cellule staminali presso la cavità ventricolare dell'area Vv sono prive di ciglia. Anche l'indice di proliferazione varia lungo l'asse rostro caudale del telencefalo: mentre la proliferazione cellulare può essere rilevata in tutta la zona periventricolare rostrale, nelle aree più caudali del telencefalo la proliferazione si limita a sottodomini distinti. Le zone proliferative differiscono anche per il tasso di formazione di nuove cellule. La regione con maggiore attività proliferativa si trova nel subpallium mediale (Vv) (per una review vedi Schmidt et al., 2013). Questa regione, a differenza delle altre zone proliferative, è costituita quasi esclusivamente da cellule non ciliate positive alla bromodeossiridina (BrdU) e negative all' S100 $\beta$ , con neuroni che formano lo strato più profondo della nicchia. In questa regione, in contrasto con le altre nicchie di cellule staminali, non sono presenti cellule quiescenti. Inoltre, solo le cellule nella parte dorsale di Vv esprimono S100 $\beta$ . Questa regione è omologa al SVZ dei mammiferi e genera, per lo più, neuroni che attraverso il flusso migratorio rostrale arrivano al bulbo olfattivo. Tuttavia, in contrasto con quanto si verifica in mammiferi, questa regione genera anche neuroni che si depositano nel parenchima adiacente. Tassi più bassi di proliferazione sono stati segnalati in altre regioni ventricolari con livelli talvolta più elevati nella zona posteriore dell'area telencefalica dorsale (Dp), equivalente alla zona SGZ dell'ippocampo dei mammiferi. Alcune cellule proliferanti sono state rilevate anche in tutto il parenchima (per una review vedi

Schmidt et al., 2013). L'analisi mediante opportuni markers ha dimostrato che queste cellule sono precursori degli oligodendrociti (OPC) che danno origine a oligodendrociti maturi.

Come descritto nel paragrafo precedente, le cellule protagoniste della neurogenesi di Zebrafish adulto sono le cellule della RG. Con l'uso di marcatori che mettono in evidenza la proliferazione, quale espressione del proliferating cell nuclear antigen (PCNA), o che rilevano l'incorporazione dell'analogo della timidina BrdU, si possono distinguere due classi di cellule della RG: quelle che sono in uno stato di quiescenza (cellule di tipo I, BrdU-, PCNA -, GFAP +, S100 $\beta$  +, BLBP +) e quelle che presentano un lento ciclo cellulare (cellule di tipo II, BrdU+, PCNA+, GFAP +, S100 $\beta$ +, BLBP +). Inoltre, i geni *Her/Hes*, quali *her3*, *her4*, *her5*, *her6*, *her8a* e *her15*, generalmente caratterizzano le cellule della glia radiale quiescenti piuttosto che quelle attive proliferanti (per una review vedi Schmidt R. et al., 2013).

Le cellule di tipo I, ovvero le cellule gliali quiescenti, sono la maggioranza. Le cellule staminali di tipo II possono dividersi simmetricamente e asimmetricamente per auto-rinnovarsi e generare le cellule di tipo III. Quest'ultime continuano a proliferare, attivando marcatori di geni neurali, come PSA-NCAM e il gene proneurale ASCL1, ed eventualmente s'incanalano nello streaming migratorio rostrale oppure migrano dalla zona periventricolare in zone più profonde del parenchima. La proporzione relativa di cellule staminali proliferanti e quiescenti può essere modificata interferendo con la segnalazione Notch in quanto l'attivazione dell'espressione Notch conduce le cellule staminali in uno stato quiescente (Fig. 13) (Itoh et al., 2003) Quindi, il mantenimento delle cellule staminali neurali nell'adulto sembra impiegare un meccanismo simile a quello osservato nell'embrione, in cui l'inibizione laterale Notch–mediata mantiene un pool di cellule staminali neurali embrionali per la produzione di neuroni, come i neuroni motori secondari (Itoh et al., 2003). Anche i segnali di Fgf regolano la proliferazione cellulare nel dominio periventricolare (Vv), ma non in domini proliferativi dorsali, (Ganz et al., 2010). Questi dati evidenziano le differenze tra le nicchie di cellule staminali nel telencefalo e i segnali Fgf nei punti ventrali e dorsali come potenziali cause del tasso di proliferazione superiore nella zona ventrale proliferativa. Da tempo è stato ritenuto che i lunghi processi delle cellule della RG possano essere utilizzati come impalcatura per neuroni neoformati che migrano dalla zona periventricolare (per una review vedi Schmidt et al., 2013) verso la superficie piaie. Tuttavia, l'osservazione che i neuroni di più recente formazione sembrano stabilirsi in aree subperiventricolari (Kroehne et al., 2011), suggerisce che la maggioranza dei neuroni neoformati nel cervello di zebrafish adulto non migra verso la superficie piaie come avviene in molti tipi di neuroni nel cervello di embrioni di pesce (Peukert et al., 2011) o di topo (Nadarajah et al., 2001).



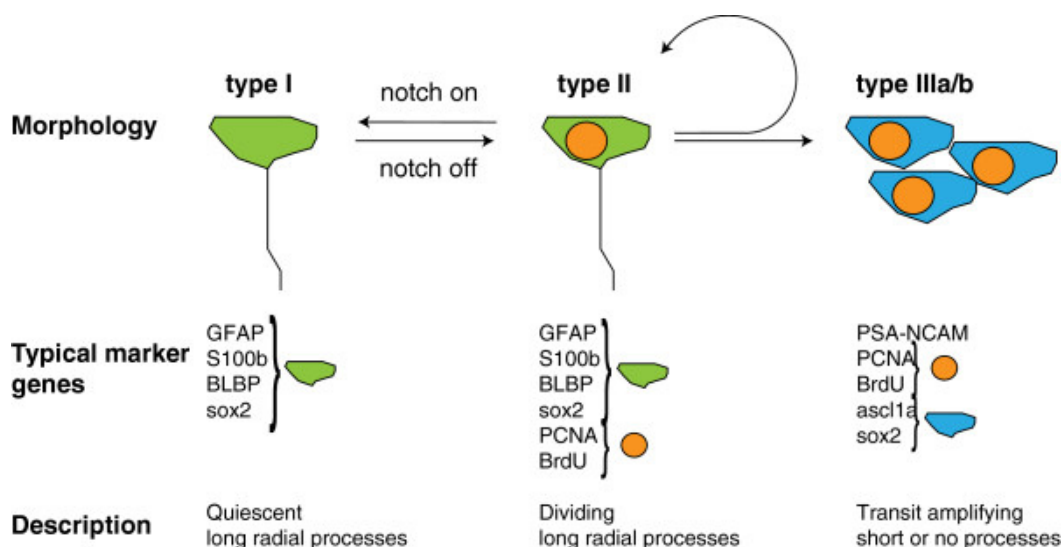


Fig. 13 I più comuni tipi di cellule proliferative nelle nicchie di cellule staminali del telencefalo. Sono indicati i markers di ciascuno dei tre principali tipi cellulari. Notch regola la trasformazione della glia radiale proliferativa di tipo II in cellule della glia radiale quiescenti di tipo I.

### Altri siti di neurogenesi nel cervello di zebrafish adulto

Anche se le nicchie di cellule staminali del telencefalo adulto sono le più intensamente studiate per le omologie con le nicchie neurogeniche dei mammiferi, diversi studi sono stati dedicati ad altre regioni proliferative del cervello che mostrano elevata neurogenesi. Nel cervelletto i progenitori neuronali riconoscibili per l'espressione di nestina, Sox2, Msh1, presentano proprietà neuroepiteliali, esprimendo ZO-1,  $\beta$ -catenina,  $\gamma$ -tubulina, e proteine chinasi C (aPKC) ma non esprimono markers della glia radiale. La nicchia staminale cerebellare, tuttavia, contiene anche cellule della glia che esprimono GFAP, vimentina e BLBP. Queste cellule sembrano agire come impalcatura per la migrazione delle cellule progenitrici piuttosto che come cellule staminali (Fig. 14) (per una review vedi Schmidt et al., 2013).

Un altro sito neurogenico si trova al confine tra il tegmento mesencefalico e romboencefalico (Chapouton et al., 2006): questa regione esprime il transgene her5:gfp in cellule che formano un grappolo ristretto nel ventricolo al confine mesencefalo/romboencefalo. Queste cellule her5:gfp positive soddisfano diverse caratteristiche generali delle cellule staminali neurali. Una sottopopolazione di cellule her5:gfp ha un ciclo cellulare lento, esprime marcatori di cellule staminali come GFAP, BLBP, Sox2 e Musashi e può differenziarsi in neuroni e cellule della glia (Chapouton et al., 2006) per cui assomiglia alle cellule di tipo II della nicchie telencefaliche.

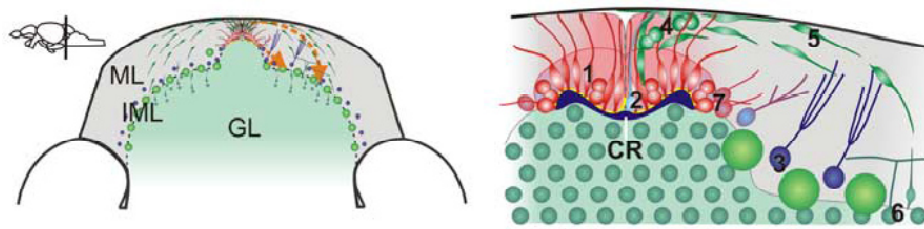


Fig. 14 Schema riassuntivo della nicchia nel cervelletto di zebrafish adulti. 1, progenitori polarizzati (rosso) con giunzioni limitate alla linea mediana del cervelletto dorsale (linea gialla). I progenitori sono affiancati medialmente e lateralmente da due popolazioni di glia non proliferante (2-3). 2, Cellule della glia con una morfologia radiale (azzurro) si trovano vicino alla linea mediana. 3, Cellule gliali di Bergmann si alternano nella IML (blu scuro). 4, I progenitori danno luogo alla migrazione dei precursori dei granuli (verde scuro) che inizialmente migrano dorsolateralmente. Durante questa prima fase, i precursori dei granuli ancora proliferano. 5, Dopo aver raggiunto la meninge, i precursori dei granuli passano ad una morfologia unipolare e iniziano a migrare ventrolateralmente al GL. 6, i precursori dei granuli migrano nella GL. 7, Cellule gliali di Bergmann sono generate dalla porzione laterale della nicchia delle cellule staminali.

CR, Recessus cerebellare, GL, strato di cellule dei granuli, IML, strato intermedio, ML, strato molecolare. (Kaslin et al., 2009)

Nel tetto ottico di zebrafish adulto, esistono cellule proliferanti lungo il margine mediale, laterale e caudale del PGZ. Le cellule in proliferazione in questa regione esprimono PCNA, Sox2, MSI1, ma non esprimono marcatori gliali. Esse mostrano caratteristiche neuroepiteliali, quali l'espressione di ZO-1,  $\gamma$ -tubulina e aPKC. La marcatura con BrdU ha mostrato che queste cellule possono differenziarsi in neuroni glutammatergici o GABAergici, oligodendrociti e RG, e quindi rappresentano un pool di cellule progenitrici multipotenti. Similmente all'architettura della nicchia staminale cerebellare, le cellule della RG non proliferative esprimono markers gliali come GFAP, BLBP ed S100 $\beta$  e sono adiacenti alle cellule gliali neuroepiteliali progenitrici proliferanti (Fig. 15) (Ito et al., 2010). Inoltre, cellule della RG proliferante possono essere rilevate nello strato piú profondo di PGZ. Sebbene l'analisi di queste nicchie staminali, in confronto alle nicchie telencefaliche sia piú limitata, i risultati suggeriscono che l'architettura delle diverse nicchie di cellule staminali nel cervello di zebrafish differisca in modo significativo, cosa che può riflettere differenze del potenziale neurogenico delle differenti aree cerebrali (per una review vedi Schmidt et al., 2013).

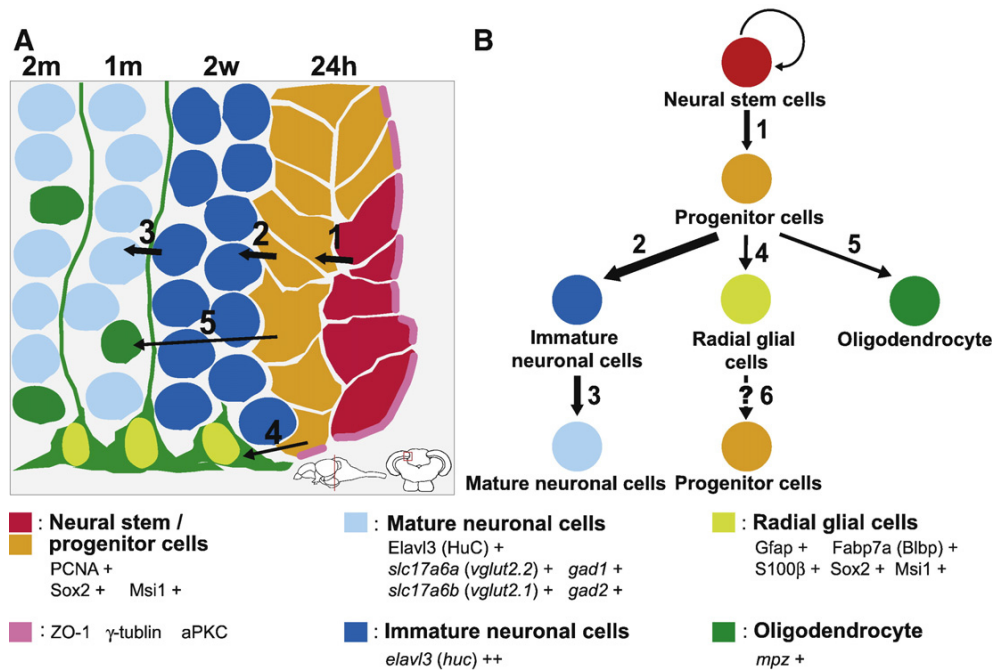


Fig.15 Disegni schematici della linea cellulare delle cellule neurali staminali/progenitrici nel PGZ nel tetto ottico dello zebrafish adulto. (A ) Distribuzione di cellule staminali neurali (rosso), le cellule progenitrici (arancione), cellule neuronali immature (blu scuro), mature cellule neuronali (azzurro), cellule gliali radiali (verde chiaro), e oligodendrociti (verde scuro) nel PGZ del tetto ottico di zebrafish adulto (B) linea cellulare di cellule neurali staminali / progenitrici nel tetto ottico di zebrafish adulto. 1: Le cellule staminali neurali nella regione mitotica del PGZ del ventricolo generano cellule progenitrici. 2: La maggior parte delle cellule progenitrici si differenziano in cellule neuronali immature che mostrano una forte espressione *elavl3* circa 2 settimane dopo la divisione cellulare finale. 3: Quando la forte espressione di *elavl3* in cellule neuronali immature si riduce, e si differenziano neuroni maturi glutamatergici e GABAergici. 4: Alcune cellule progenitrici si differenziano in cellule della glia radiale almeno 2 settimane dopo la divisione cellulare finale. 5: Una piccola porzione di cellule progenitrici si differenziano in oligodendrociti. 6: cellule gliali radiali mantengono espressione di staminali neurali / marcatori di cellule progenitrici, quindi, si suppone che queste cellule possiedono il potenziale delle cellule progenitrici.

## CAPITOLO 5

### MATERIALI E METODI

#### Wester-blotting (WB)

Cervelli di zebrafish e di topo (controlli positivi) sono stati omogenati usando Tissue LyzerII (Qiagen, Chatsworth, CA) in 100 µl di buffer di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40, 1 µg/ml Leupeptid, 1 µg/ml Aprotimin, 1 µg/ml Pepstatin A, 0.25% Sodium deoxycholate, 1 mM NaF) homogenized a 13,200 rpm at 4°C. Le concentrazioni proteiche sono state determinate usando BCA Protein Assay kit (ThermoScientific, Pittsburgh, PA). I campioni contenenti circa 3 µg/µl di proteine sono stati denaturati incubandoli a 95 °C in 0.1% di sodium dodecil solfato (SDS), 1 mM Beta mercaptoethanol in Tris-HCl pH 6.8 e separate per elettroforesi su gel SDS (SDS PAGE) di poliacrilamide al 15% e 7,5% (rispettivamente per recettori Trks e neurotrofine), in una camera mini-Protean Tetra Cell (BioRad, Hercules, CA) at 4 °C con 90V per 2 hours. Le proteine sono state poi trasferite su membrane di nitrocellulosa Hybond-ECL (Amersham, Arlington Heights, IL), usando il sistema MiniProtean (BioRad) per 45 min a 400 mA a 4°C. Rosso ponceau è stato impiegato per valutare il trasferimento delle proteine. Marcatori pre-marcati (Page Ruler, Fermentas, Burlington, ON, Canada) e marcatori di proteine biotinilate (Cell Signaling, Beverly, MA) sono stati impiegati. Le membrane sono state tagliate e incubate in TBS/Tween 5% dry milk per 1 ora, successivamente incubate con anticorpi primari (Tab. 1) e anticorpo anti-actina, monoclonale in topo 1:10000 (DM 1A, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) overnight (ON) a 4°C. Successivamente sono state incubate in horseradish peroxidase (HRP)-coniugato all'anticorpo secondario (Cell Signaling) 1:1000 e anti biotina HRP-conjugated (#7075, Cell Signaling) per visualizzare il marker in una concentrazione al 5% di latte TBS/T per 1 ora a temperatura ambiente. Analoga procedura è stata applicata per l'incubazione con l'anticorpo anti-actina. La marcatura della proteina è stata rivelata usando Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer, Norwalk, CT) e acquisite usando using ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare, Milwaukee).

## **Preparazione dei campioni per l'analisi immunocitochimica**

Per l'indagine immunocitochimica sono stati utilizzati sei zebrafish wildtype adulti di entrambi i sessi e di età compresa tra i sei mesi ed un anno, prelevati dalla nostra colonia di animali, nonché zebrafish transgenici *Nestin:gfp* e *gfap:gfp* ottenuti dal Prof. U. Strahle dell'Istituto di Tossicologia e Genetica, Forschungszentrum, Karlsruhe Istituto di Tecnologia, Karlsruhe, Germany. Tutti i protocolli sperimentali, utilizzati per questa tesi, sono stati condotti secondo le direttive europee dell'European Communities Council del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) ed approvati dai comitati istituzionali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Prima di procedere ai prelievi dei campioni, tutti gli zebrafish wild type sono stati anestetizzati con 0.1% di etil 3- aminobenzoate, metanosulfonate (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA).

La testa degli zebrafish wildtype, tagliata a livello del margine posteriore dell'opercolo, è stata fissata mediante immersione in liquido di Bouin per 24-48 ore a temperatura ambiente (t.a.). I campioni sono stati disidratati in una serie ascendente di alcool (dall'etanolo a 70° fino all'etanolo assoluto) ed immersi in metilbenzoato per 48 ore per poi essere trasferiti in una soluzione di benzene/paraffina 50/50 a 62°C per 30', e quindi successivamente immersi in paraffina pura in stufa sottovuoto, sempre a 62°C. I campioni opportunamente orientati in blocchetti di paraffina sono stati lasciati solidificare a t.a.

I campioni, così inclusi, sono stati tagliati al microtomo per ottenere sezioni seriate trasversali, sagittali ed orizzontali di 7 µm di spessore. Tutte le sezioni, montate su vetrini con albumina glicerinata, sono state essiccate in stufa a 37°C per una notte. Alcune sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina al fine di ottenere informazioni generali sulla morfologia del cervello di zebrafish. Le altre sezioni sono state trattate con metodica immunocitochimica di semplice e doppia marcatura. Per la singola marcatura è stato utilizzato il sistema di rilevazione in luce (IHC) EnVision e per la fluorescenza (IF) in doppia marcatura è stato utilizzato il protocollo di Wang et al., (2011).

Gli zebrafish transgenici sono stati anestetizzati con Tricaine prima di essere sacrificati (Westerfield, 2007). I cervelli sono stati fissati in paraformaldeide al 4% overnight e, dopo disidratazione in serie ascendente di metanolo (MeOH), conservati a 22°C. I campioni sono stati orientati ed inclusi in agarosio al 3%. Le reazioni di immunocitochimica sono state eseguite su sezioni free-floating di 50 µm tagliate al vibratome (Polaron H1200 vibrating microtome, Biorad), come descritto da Adolf et al. (2006).

## *Zebrafish wildtype.*

### **Reazioni di immunoistochimica in singola marcatura.**

Le sezioni seriate di zebrafish wildtype sono state utilizzate per reazioni di immunoistochimica in singola marcatura usando il metodo EnVision+System-horseradish anti-perossidasi (HRP) (Dako, Santa Barbara, CA, Usa, cod.K400311-2). Questo sistema di rivelazione si basa sull'utilizzo di un polimero marcato con HRP e coniugato con una IgG goat anti-rabbit.

In dettaglio, le sezioni, dopo essere state sparaffinate in xilolo e reidratate in serie discendente di etanolo (da 100° fino a 70°), sono state trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 20 min. a t.a., per bloccare le perossidasi endogene, e poi incubate in camera umida a 4° C per 24 ore con anticorpi primari diretti contro i recettori utilizzati unito a siero normale di capra (NGS) (VECTOR Lab. Inc., Burlingame, CA, USA, cod. S-1000). Come marcatore neuronale è stato utilizzato l' anticorpo monoclonale per il PGP 9.5 (Tab. 1), per mettere in evidenza le cellule del Purkinje invece, è stato usato l'aldolasi C (Tab. 1), mentre per le neurotrofine ed i rispettivi specifici recettori sono stati utilizzati anticorpi policlonali ottenuti in coniglio (Tab. 1). Le sezioni sono state quindi lavate in PBS (tre lavaggi da 5 min. ognuno), e di nuovo incubate con l'EnVision per 30 min. a t.a. Al fine di visualizzare i siti immunoreattivi, dopo ulteriori lavaggi in PBS, le sezioni sono state trattate con una soluzione fresca di 10 µg di 3,3-tetraidroclore di diaminobenzidina (DAB) (Sigma–Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA, cod. D5905) in 15 ml di Tris buffer a 0.5M a pH 7.6, contenente 1.5 ml di 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. E' stata utilizzata DAB come cromogeno perché il prodotto di reazione colorato è insolubile in acqua o alcool e quindi i vetrini possano essere disidratati, montati con i metodi convenzionali e conservati a lungo.

### **Reazioni di immunofluorescenza in doppia marcatura**

Sezioni di cervello di zebrafish wildtype sono state utilizzate per reazioni di immunofluorescenza in doppia marcatura adoperando, come sistema di rilevazione un fluorocromo rosso, cianina 3 (Cy3) coniugato ad un amplificatore di segnale, la tiramide (TSA) (Pelkinelmen SAT 704A001EA) per il primo anticorpo e Alexafluor 488 coniugato con streptavidin (Jackson Immunoresearch, 016-540-084) per il secondo anticorpo. In dettaglio, le sezioni sparaffinate in xilolo e reidratate in serie discendente di etanolo (100° fino a 70°), sono state trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 20 min. a t.a., per bloccare le perossidasi endogene e quindi incubate per 30 min. in siero normale di asino (NDS) (Jackson

Immunoresearch, 017-000-121) miscelato all'anticorpo primario policlonale (Tab. 1). Le sezioni, lavate in PBS (due lavaggi da 5 min. ognuno), sono state successivamente incubate con anticorpo secondario donkey anti rabbit IgG (H+L) coniugato con horseradish anti-perossidasi (DAR HRP) (Jackson immunoresearch, 711-035-132) per 30 min. Dopo due ulteriori lavaggi, le sezioni sono state di nuovo incubate per 10 min. con Cy3 coniugata con tiramide e lavate in PBS (due lavaggi da 5 min. ognuno). Quindi le sezioni sono state incubate per 30min. con siero normale di capra (NGS) e hanno subito un trattamento con avidin-biotin blocking kit (Vector laboratories SP-2001), 15min. in avidina e 15min. in biotina, prima di essere incubate in piastre umide a 4°C overnight con il secondo anticorpo primario. Il giorno seguente le sezioni sono state incubate per 2 ore con anticorpo secondario biotilinato goat anti-rabbit (Vector laboratories BA-1000), sciacquate in PBS (due lavaggi da 5 min. ognuno), incubate per altre due ore con Alexafluor 488 streptavidin e risciacquate in PBS (due lavaggi da 5 min. ognuno). I preparati sono stati quindi montati con PBS e glicerolo.

**Tabella 1: anticorpi**

<b>Anticorpo</b>	<b>Codici</b>	<b>Fonte</b>	<b>Origine</b>	<b>Diluizione</b>
<b>NGF (H-20)</b>	sc-548	SantaCruz Byotecnology	Policlonale in coniglio (Rp)	1:300 IHC 1:500 WB
<b>NT-3 (N-20)</b>	sc-547	SantaCruz Byotecnology	Policlonale in coniglio (Rp)	1:200 IHC 1:500 WB
<b>NT-4 (N-20)</b>	Sc-545	SantaCruz Byotecnology	Policlonale in coniglio (Rp)	1:200 IHC 1:500 WB
<b>BDNF (N-20)</b>	sc-546	SantaCruz Byotecnology	Policlonale in coniglio (Rp)	1:200 IHC 1:10 IF 1:500 WB
<b>Trk A (763)</b>	sc-118	SantaCruz Byotecnology	Policlonale in coniglio (Rp)	1:100 IHC 1:500 WB
<b>Trk B (794)</b>	sc-12	SantaCruz Byotecnology	Policlonale in coniglio (Rp)	1:100 IHC 1:5 IF 1:500 WB
<b>Trk C (798)</b>	Sc-117	SantaCruz Byotecnology	Policlonale in coniglio (Rp)	1:100 IHC 1:500 WB
<b>S100B</b>	Z 0311	Dako	Policlonale in coniglio (Rp)	1:400 IHC 1:50 IF
<b>PCNA (FL-261)</b>	sc-7907	SantaCruz Byotecnology	Policlonale in coniglio (Rp)	1:200 IHC 1:20 IF
<b>P0</b>	LS-C164617	LifeSpan BioSciences	Policlonale in coniglio (Rp)	1:500 IHC 1:50 IF
<b>PGP 9.5</b>	7863-2004	AbD serotel	Monoclonale in mouse	1:500 IHC
<b>Adolasi C (N-14)</b>	Sc-12065	SantaCruz Byotecnology	Policlonale in pecora (Rp)	1:150 IHC

### ***Zebrafish transgenici.***

Le sezioni al vibratomo di cervello di zebrafish transgenici *Nestin:gfp* e *gfap:gfp* sono state utilizzate per reazioni di immunohistochimica in fluorescenza singola: le sezioni free-floating sono state inizialmente incubate per 2h in siero normale di asino (NDS) e poi incubate con anticorpo primario policlonale BDNF diluito 1:20 per 72 ore. Le sezioni, dopo lavaggio in PBS (due lavaggi da 30 min. ognuno), sono state incubate con anticorpo secondario DAR HRP (Jackson immunoresearch, 711-035-132) per 2h e risciacquate in PBS (due lavaggi da 30 min. ognuno); infine sono state incubate per 2h con Cy3 coniugato con tiramide (Pelkinelmen, SAT 704A001EA) e lavate in PBS (due lavaggi da 30 min. ognun). I preparati sono stati quindi montati con PBS e glicerolo.

### **Osservazione microscopiche**

Tutti i preparati sono stati osservati a microscopio Nikon Eclipse 90i. Le immagini acquisite sono state catalogate mediante un software (NIS-Elements 4.20).

### **Controlli**

Controlli negativi sono stati effettuati sostituendo l'anticorpo primario con siero normale o PBS oppure assorbendo l'anticorpo primario con un eccesso del peptide omologo (fino a 25µg/ml) e eterologo (fino a 50 µg/ml) ( sc-648 P per NGF, sc-547 P per NT-3, sc-545 P per NT-4, sc-546 P per BDNF, sc-118 P per TrkA, sc-12 P per TrkB, sc-117 P per TrkC, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).



# CAPITOLO 6

## RISULTATI

### Analisi immunochimica

#### Western blotting

NGF, NT-3, NT-4, BDNF e relativi recettori TrkA, TrkC, TrkB sono stati riconosciuti da anticorpi prodotti contro sequenze interne degli antigeni di origine umana mediante esperimenti di western blotting. Per ciascun anticorpo, sono stati impiegati omogenati di cervello di topo come controllo positivo. L'anticorpo per l'NGF riconosce una banda di 22 kDa (Tav. 1); l'anticorpo per l'NT-3 riconosce una banda di 30 kDa (Tav. 1); l'anticorpo per l'NT-4 riconosce una banda di 30 kDa (Tav. 1); l'anticorpo per il BDNF riconosce una banda di 14 kD (Tav. 1) e una di 28 kDa, entrambe migrate alla stessa altezza delle bande di topo; l'anticorpo per il TrkA riconosce una banda di 140 kDa (Tav. 1), migrata alla stessa altezza della banda di topo; l'anticorpo per il TrkC riconosce una banda di 145 kDa (Tav. 1), migrata alla stessa altezza della banda di topo; l'anticorpo per il TrkB riconosce una banda di 145 kDa (Tav. 1), migrata alla stessa altezza della banda di topo.

L'anticorpo per l'actina ha visualizzato per ogni reazione una banda corrispondente al suo peso molecolare (dati non mostrati).

### Analisi immunocitochimica. Singola marcatura

Le regioni e i nuclei del cervello di zebrafish sono stati identificati tramite colorazione istochimiche (Luxol fast blue) e immunocitochimiche con l'impiego di un anticorpo monoclonale specifico per il PGP 9.5 di zebrafish, che ha permesso di evidenziare la distribuzione di neuroni e fibre nei diversi distretti encefalici (Tav. 2a-c) e con l'impiego di un anticorpo per l'aldolasi C per identificare specificamente le cellule di Purkinje (dati non mostrati). Tali colorazioni sono state effettuate su sezioni contigue a quelle utilizzate per la localizzazione delle neurotrofine e dei loro recettori. Per la nomenclature delle strutture neuroanatomiche ci si è attenuti a quella adottata da Wullimann et al., 1996.

## NGF

I risultati sono riassunti in tabella 2.

*Telencefalo.* Nei bulbi olfattori sono state visualizzate fibre positive nello strato glomerulare (GL) (Tav. 3a) e neuroni intensamente positivi e fibre nello strato cellulare esterno (ECL). Nel telencefalo dorsale (Tav. 3b), le zone laterale (Dl), dorsale (Dd), mediale (Dm), posteriore (Dp) e il nucleo teniae (NT) presentano una intensa rete di fibre positive che avvolge neuroni negativi dello strato più superficiale. Inoltre, nella zona mediale (Dm) e centrale (Dc) (Tav. 3b), numerosi neuroni tondeggianti e con scarso citoplasma, sono risultati intensamente positivi. Nel telencefalo ventrale (Tav. 3b) piccoli neuroni e fibre positive sono presenti nella zona dorsale (Vd), centrale (Vc) e ventrale (Vv).

*Diencefalo.* Cellule debolmente positive sono state osservate lungo la parete del complesso pineale. Nel talamo, numerose ad intense fibre positive decorrono lungo i nuclei intermedio (I), ventromediale (VM) e ventrolaterale (VL) (Tav. 4a). Nel nucleo periventricolare del tubercolo posteriore (TPp) si osservano neuroni e alcune fibre positive (Tav. 4b). In entrambi i nuclei preglomerulari, laterale (PGl) e mediale (PGm), sono presenti, soprattutto lungo il margine, neuroni positivi inframezzati da esili fibre (Tav. 4b). Alcune fibre positive si osservano anche nel corpo mammillare (CM) (Tav. 4c). Nell'ipotalamo neuroni intensamente immunopositivi sono dispersi nel nucleo diffuso del lobo inferiore (DIL) (Tav. 4c, d). Nel pretetto, grandi neuroni intensamente positivi sono diffusi soprattutto al margine del n. pretettale superficiale magnocellulare (PSm) (Tav. 4e), alcuni piccoli neuroni debolmente positivi, circondati da una densa rete di fibre, sono presenti nel n. pretettale superficiale parvocellulare (PSp) (Tav. 4e).

*Mesencefalo.* Nel tetto ottico (TO) numerose fibre immunoreattive appaiono distribuite in tutti gli strati (Tav. 4f). Nella zona superficiale bianca e grigia (SWGZ) si possono osservare nella posizione più interna anche grandi neuroni fusiformi (Tav. 4f) da cui si diramano prolungamenti che si dirigono sia nella parte superficiale che profonda del tetto ottico. Inoltre, poche cellule positive si osservano nella zona periventricolare grigia (PGZ). Nei tori longitudinali (TL) si apprezza un estesa rete di fibre positive. Nei tori semicircolari (TS) sono visibili numerose fibre sparse (Tav. 4b). Nel tegmento neuroni positivi sono presenti nel griseum centrale (GC) mentre numerosi neuroni e fibre sono distribuiti nella formazione reticolare superiore (SRF).

*Romboencefalo.* Numerose cellule di Purkinje nel corpo (CCe) e nella valvola (Vam) del cervelletto (Tav. 5a) risultano intensamente positive e presentano un albero dendritico ben sviluppato nello strato molecolare (Tav. 5a, b). Piccole cellule positive risultano disperse nello strato granulare (Tav. 5a, b). Una densa rete di fibre positive è presente nelle eminenze granulari (EG) (Tav. 5b), soprattutto verso il margine esterno. Nel midollo allungato, nel rafe superiore (SR)

e nel n. ottavolaterale mediale (MON) (Tav. 5b) sono stati evidenziati neuroni e fibre. Nella formazione reticolare intermedia (IMRF) sono risultati distribuiti numerosi neuroni positivi inframezzati da una estesa rete di fibre.

### TrkA

I risultati sono riassunti in tabella 3.

*Telencefalo.* Nei bulbi olfattori fibre positive sono presenti nel GL (Tav. 6a). Nel telencefalo dorsale piccoli neuroni positivi, tondeggianti e con scarso citoplasma, sono più addensati nella zona Dl e Dm, sparsi nella Dd (Tav. 6a, b). Nella zona Dc sono intensamente positivi fibre e soprattutto neuroni (Tav. 6b), spesso raggruppati, grandi, ovali e con prolungamenti citoplasmatici. Sul margine della zona Dm e Dd si osserva uno strato di cellule intensamente positive (Tav. 6a, b), appiattite, morfologicamente simili a cellule endodiali, seguite più internamente da una rete lassa di fibre ad andamento parallelo alla superficie. Sul margine della zona Dl cellule positive di forma triangolare presentano un prolungamento che si estende verso l'interno del parenchima (Tav. 6a, b). Nelle zone Vd e Vv del telencefalo ventrale sono presenti rari piccoli neuroni debolmente positivi, mentre, fibre sottili si intrecciano nella sola zona Vc (Tav. 6b).

*Diencefalo.* La presenza di Trk A è apprezzabile in tutto il complesso pineale, con particolare intensità nel peduncolo della ghiandola pineale. Nel tubercolo posteriore numerosi neuroni positivi sono distribuiti nei nuclei PGI e PGM. Piccoli neuroni positivi sono localizzati nella zona ventrale dell'ipotalamo periventricolare (Hv). Numerose fibre sono visibili nel n. del fascicolo mediale longitudinale (NMLF).

*Mesencefalo.* Lungo tutti gli strati del TO decorrono fibre positive variamente orientate. Nello zona più interna della PGZ, numerose cellule strettamente addensate risultano positive. Nel TL è presente una rete di fibre intensamente positiva. Infine, nel n. interpeduncolare (NIn) del tegmento è osservabile una densa concentrazione di fibre altamente reattive (Tav. 7a, a<sup>2</sup>).

*Romboencefalo.* Nello strato granulare di tutto il cervelletto è osservabile un'intensa rete di fibre positive, soprattutto nella Vam. Rare fibre sono altresì diffuse nello strato molecolare di tutto il cervelletto, ed inoltre cellule positive allungate sono evidenziabili lungo la linea mediana dello strato molecolare del CCe (Tav. 7a, a<sup>1</sup>). Nello strato delle cellule di Purkinje sono osservabili rare cellule debolmente positive. Nel midollo allungato fibre positive sono disposte alla periferia del n. anteriore dell'ottavo (AON).

### NT-3

I risultati sono riassunti in tabella 4.

*Telencefalo.* Nel ventricolo del telencefalo dorsale, lungo il margine della zona Dl e Dm sono evidenti cellule positive di forma triangolare con prolungamenti diretti verso l'interno del parenchima. Nel telencefalo ventrale lungo il margine della zona Vv sono distribuite cellule positive appiattite, mentre, rare fibre positive sono sparse lungo il margine delle zone Vd e Vv.

*Diencefalo.* Nel talamo ventrale si osservano alcuni neuroni e fibre positivi nel nucleo VL. Nell'ipotalamo fibre positive variamente orientate decorrono nel nucleo DIL. Nel pretetto si osservano fibre debolmente positive e piccoli neuroni nel n. ottico accessorio ventrale (VAO). Fibre positive decorrono nel tratto ottico ventrolaterale (VOT).

*Mesencefalo.* Nel TO fibre positive decorrono nella zona centrale (CZ) e nella zona bianca profonda (DWZ) (Tav. 8a, b). Alcune piccole cellule positive sono presenti nella regione più interna della PGZ (Tav. 8a, b). Fibre positive sono presenti nel NIn (Tav. 8b). In alcuni casi l'endotelio vasale presenta immunopositività.

*Romboencefalo.* Nel cervelletto le cellule di Purkinje e i loro dendriti appaiono intensamente positivi (Tav. 8a-c<sup>1</sup>). Anche lo strato molecolare della Vam e del CCe mostra un'intensa immunoreattività, in fibre e piccole cellule (Tav. 8a-c<sup>1</sup>).

### TrkC

I risultati sono riassunti in tabella 5.

*Telencefalo.* Sul margine delle zone Dm e Dd vi è uno strato di cellule intensamente positive, appiattite, morfologicamente simili a cellule ependimali (Tav. 9a). Sul margine delle zone Dl, Dm (Tav. 9a) e Vv (Tav. 9a) sono, inoltre evidenti cellule di forma triangolare con un prolungamento che si estende verso l'interno del parenchima.

*Diencefalo.* Neuroni grandi, appartenenti al n. preottico magnocellulare (PM) (Tav. 9b, c) e neuroni più piccoli appartenenti al n. preottico parvocellulare posteriore (PPp) (Tav. 9c) sono fortemente positivi. Da essi si diramano lunghi e larghi assoni.

### NT-4

I risultati sono riassunti in tabella 6.

*Telencefalo.* Nei bulbi olfattori sono visibili numerose fibre, particolarmente addensate nel GL (Tav. 10a). Fibre immunoreattive sono presenti in tutto il telencefalo, ma appaiono particolarmente addensate nelle zone Dm, Dd (Tav. 10a, b) e Vv (Tav. 10a). Sul margine della zona Dm e Dd si osserva uno strato di cellule intensamente positive (Tav. 10a, b), appiattite,

morfologicamente simili a cellule ependimali. Più internamente a queste vi è uno strato di fibre positive (Tav. 10a, b) forma una rete lassa.

*Diencefalo.* Numerose fibre positive sono presenti in tutta la regione, ma risultano particolarmente addensate nell'area preottica (Tav. 10c, d). Nell'ipotalamo alcuni neuroni sono disseminati nella zona periventricolare dell'Hv. Nel nucleo PSp si osservano fibre positive generalmente diffuse (Tav. 10e).

*Mesencefalo.* Numerose fibre decorrono in tutto il TO e nei TL. In particolare, nella componente bianca SWGZ si osserva una rete di fibre particolarmente densa e intensamente positiva (Tav. 10e, f; 11a). Inoltre anche la DWZ presenta fibre positive (Tav. 10f; 11a). Piccole cellule positive sono presenti nella regione più interna dello PGZ (Tav. 10f). Nel tegmento sono diffuse fibre immunoreattive (Tav. 11a).

*Romboencefalo.* Nel cervelletto le cellule di Purkinje e i loro dendriti appaiono intensamente positivi (Tav. 11a-c), e lo strato molecolare mostra una rete di fibre intensamente immunoreattive (Tav. 11b, c). Nel midollo allungato scarse fibre positive appaiono disperse; in particolare, intensa reattività si osserva nel tratto cerebellare posteriore (PC) (Tav. 11c).

### BDNF

I risultati sono riassunti in tabella 7.

*Telencefalo.* Nei bulbi olfattori alcune fibre positive decorrono nel tratto olfattorio mediale (MOT) e nel GL. Lungo tutto il ventricolo telencefalico si allineano cellule appiattite e affusolate e cellule triangolari con l'apice rivolto verso il parenchima telencefalico, da cui si osservano spesso prolungamenti che attraversano lo spessore del telencefalo (Tav. 12a, b). Lungo la periferia delle zone Dl, Dde Dm vi è un sottile strato di fibre addensate attorno a cellule negative. Inoltre, nel telencefalo dorsale, nella zona Dm sono presenti neuroni positivi (Tav. 12a). Nel telencefalo ventrale alcuni neuroni positivi sono sparsi nelle zone Vd e Vv (Tav. 12b).

*Diencefalo.* Analogamente al ventricolo telencefalico, anche lungo i margini del ventricolo diencefalico si allineano cellule triangolari con l'apice rivolto verso il parenchima, da cui partono prolungamenti che attraversano l'intero spessore del talamo e confluiscono ai suoi margini a contatto con il tratto ottico (Tav. 13a). Nell'area preottica, alcuni piccoli neuroni sono presenti nel n. soprachiasmatico (SC) (Tav. 13b). Il complesso pineale è risultato intensamente positivo, soprattutto le cellule del sacco dorsale (Tav. 12b). Nel talamo dorsale, piccoli neuroni positivi sono distribuiti nel n. talamico centrale posteriore (CP) (Tav. 14a). Nel talamo ventrale, il nucleo VM presenta neuroni e fibre positive e il nucleo VL soprattutto un addensamento di fibre (Tav. 13b). Nel tubercolo posteriore alcuni neuroni sono visibili nell'organo paraventricolare (PVO). Piccoli

neuroni sono distribuiti nella zona dell'ipotalmo periventricolare dorsale (Hd) e ventrale (Hc) (Tav. 14b). Nel sinencefalo cellule particolarmente intense e allungate si osservano a livello dell'organo subcommissurale (SCO) (Tav. 13b; 14a). Nel pretetto numerose fibre sparse sono distribuite nei nuclei preottici PPa, Ppp e PM.

Infine, fibre intensamente positive risultano addensate nel VOT (Tav. 13b; 14a).

*Mesencefalo.* Nel TO alcune fibre decorrono DWZ (Tav. 14a, b) e alcune piccole cellule positive sono presenti nella regione più interna della PGZ (Tav. 14a). I TL mostrano una rete di sottili fibre positive. Piccole cellule positive sono allineate lungo il bordo del ventricolo (Tav. 14b). Inoltre alcune cellule alla base del nucleo NIn (Tav. 15a, a<sup>1</sup>) mostrano lunghi processi che decorrono lungo l'intero spessore del tegmento, raggiungendo il margine del ventricolo.

*Romboencefalo.* Nel cervelletto il BDNF risulta fortemente espresso nelle fibre decorrenti lungo l'intero strato molecolare e talora in alcune cellule (Tav. 15a, a<sup>1</sup>, b, b<sup>1</sup>). Lungo la linea mediana del corpo del cervelletto si possono osservare alcune cellule allungate, fortemente positive (Tav. 15a<sup>1</sup>).

Nel midollo allungato, lungo il bordo del ventricolo, sono distribuite piccole cellule positive (Tav. 15a, b). Fibre positive sono visibili lungo il rafe inferiore (IR) e nel fascicolo longitudinale mediale (MLF) (Tav. 15b).

### TrkB

I risultati sono riassunti in tabella 8.

*Telencefalo.* Nei bulbi olfattori fibre positive sono osservate nel GL e nello strato delle fibre olfattorie primarie (POF) (Tav. 16a); inoltre alcuni neuroni positivi, dispersi nell' ECL (Tav. 16a, a<sup>1</sup>) presentano spesso prolungamenti che decorrono verso il GL. Lungo il margine ventricolare del telencefalo si osservano piccole cellule positive con prolungamenti rivolti verso il parenchima (Tav. 16b-c). Inoltre fibre positive decorrono lungo il fascicolo laterale LFB.

*Diencefalo.* Nel complesso pineale, il peduncolo del sacco dorsale risulta fortemente positivo mentre la parete del sacco presenta solo alcune cellule debolmente positive (Tav. 16c, c<sup>1</sup>). In tutte le regioni del diencefalo si osservano fibre sparse, che nella zona ipotalamica Hc (Tav. 17a) appaiono particolarmente addensate. In quest'ultima sono stati osservati anche alcuni neuroni positivi. In fine, fibre positive notevolmente addensate si evidenziano nel VOT.

*Mesencefalo.* Nel TO si osservano piccole cellule positive nella regione più interna della PGZ e neuroni di forma affusolata con lunghi prolungamenti nella CZ e nella SWGZ (Tav. 17a). Nel tegmento numerose fibre positive sono state osservate nei nuclei oculomotore (NIII) nel

fascicolo longitudinale mediale (NMLF), nel fascicolo longitudinale laterale (LLF) (Tav. 17a) e nella commessura ansulata (Cans).

*Romboencefalo.* Nel cervelletto numerose fibre decorrono in tutti gli strati delle diverse regioni del cervelletto e una debole positività è riscontrabile anche nelle cellule di Purkinje (Tav. 17b). Nello strato molecolare del corpo del cervelletto, in posizione mediale, si osservano alcune cellule positive allungate e strettamente raggruppate (Tav. 17b, b<sup>1</sup>). Nel midollo allungato sono presenti fibre positive nel tratto cerebellare posteriore, nell'MLF, nell' LLF e nella commessura ventrale (Cven). Alcuni neuroni sparsi sono visibili nella formazione reticolare inferiore IRF.

### **Analisi immunocitochimica. Doppia marcatura**

#### *BDNF/TrkB*

Il BDNF e il suo recettore specifico risultano colocalizzati in cellule allineate lungo il margine ventricolare del telencefalo delle zone Dl, Dd, Dm (Tav. 18a, a<sup>2</sup>) Vv e Vd (Tav. 18b, b<sup>2</sup>). Nel diencefalo, la positività risulta coespressa nelle fibre del VOT (Tav. 18c, c<sup>2</sup>). Infine, nel tetto ottico si può osservare la contemporanea presenza di BDNF e Trk B in piccole cellule della PGZ (Tav. 18d, d<sup>2</sup>).

#### *TrkB/P<sub>0</sub>*

Nel tetto ottico, si osserva colocalizzazione tra il TrkB e il marcatore oligodendrocitico P<sub>0</sub> in alcune cellule dello strato profondo della PGZ (Tav. 19a, a<sup>2</sup>). Nel tegmento i fascicoli longitudinali mediale (Tav. 19b, b<sup>2</sup>) e laterale sono entrambi positivi ai due marcatori. Tale colocalizzazione si riscontra anche nei fascicoli del midollo allungato.

#### *BDNF/S100β/PCNA*

Su sezioni contigue sono state effettuate colorazioni di doppia marcatura alternate BDNF/S100β, S100β/PCNA, BDNF/PCNA.

Le cellule che rivestono tutti i ventricoli del cervello di zebrafish sono S100β positive. Esse su base morfologica si possono suddividere in due citotipi: alcune cellule sono appiattite e affusolate, altre sono triangolari, con l'apice, rivolto verso il parenchima telencefalico, da cui spesso si dipartono prolungamenti che attraversano lo spessore della parete encefalica. Una larga percentuale di entrambi i tipi cellulari mostra colocalizzazione BDNF/S100β (Tav. 20a-d<sup>2</sup>) e S100β/PCNA (Tav.

21a-d<sup>2</sup>). Infine, alcune delle cellule positive al BDNF poste lungo i ventricoli telencefalico (Tav. 22a-b<sup>2</sup>) e romboencefalico (Tav. 2c-2c<sup>2</sup>) sono risultate anche PCNA positive.

Inoltre a livello diencefalico si osserva colocalizzazione BDNF/S100 $\beta$  in piccole cellule positive nell'SCO (Tav. 20d-d<sup>2</sup>), in piccoli neuroni di forma affusolata con lunghi prolungamenti nel CP (Tav. 23a-a<sup>2</sup>) e in alcune cellule alla base del nucleo NIn con lunghi processi (Tav.23d-d<sup>2</sup>) che raggiungono il margine del ventricolo. Infine, nel tetto ottico si osserva colocalizzazione BDNF/S100 $\beta$  (Tav. 23b-b<sup>2</sup>) e S100 $\beta$ /PCNA (Tav. 23c-c<sup>2</sup>) nelle cellule della PGZ.

### **Analisi immunocitochimica in Zebrafish transgenici**

#### **BDNF in *gfap:gfp***

Coespressione di BDNF e *gfap:gfp* è stata osservata soprattutto in: a) cellule allineate lungo i margini dei ventricoli del telencefalo ventrale (Tav. 24a-d) del diencefalo (Tav. 25a-b<sup>5</sup>) del mesencefalo e del romboencefalo (Tav. 26a, c), inoltre, coespressione è stata osservata nella regione basale di cellule raggruppate nell'organo subcommessurale (Tav. 25b- b<sup>5</sup>) che presentano lunghi prolungamenti estesi nei tori longitudinali (Tav. 25b- b<sup>5</sup>) e in alcune cellule alla base del nucleo NIn con lunghi processi (Tav. 26a, b).

#### **BDNF in *nestin:gfp***

Coespressione di BDNF e *nestin:gfp* è stata evidenziata in cellule distribuite lungo tutti i ventricoli encefalici (Tav. 27a-f) e sono sempre strettamente ravvicinate. In tali cellule l'immunoreattività al BDNF e la positività *nestin:gfp* sono prevalentemente localizzate in aree citoplasmatiche diverse, con una coespressione soprattutto nell'area marginale del citoplasma.



<b>Tabella 2: NGF</b>			
<i>TELENCEFALO</i>			
Bulbi olfattori	strato glomerulare	GL	Fibre
	s. cellulare esterno	ECL	Fibre
Telencefalo dorsale	dorso-lateral	DI	Fibre
	dorso-dorsale	Dd	Fibre
	dorso-mediale	Dm	Neuroni e fibre
	dorso-centrale	Dc	Neuroni e fibre
	dorso-posteriore	Dp	Fibre
Telencefalo ventrale	ventro-dorsale	Vd	Neuroni e fibre
	ventro-centrale	Vc	Neuroni e fibre
	ventro-ventrale	Vv	Neuroni e fibre
<i>DIENCEFALO</i>			
Epitalamo	complesso pineale	SD	Cellule
Talamo	n. intermedio	I	Fibre
	n. ventromediale	VM	Fibre
	n. ventrolaterale	VL	Fibre
Tubercolo posteriore	n. tubercolo posteriore	TPp	Neuroni e fibre
	n. preglomerulare laterale	PGl	Neuroni e Fibre
	n. preglomerulare mediale	PGm	Neuroni e Fibre
	corpo mamillare	CM	Fibre
Ipotalamo	n.diffuso del lobo inferiore	DIL	Neuroni
Pretetto	n. pretettale superficiale parvocellulare	PPp	Neuroni e fibre
	n. pretettale superficiale magnocellulare	PSm	Neuroni e fibre

<i>MESENCEFALO</i>			
Tetto ottico	zona periventricolare grigia	PGZ	Cellule e fibre
	zona bianca profonda	DWZ	Fibre
	zona centrale	CZ	Fibre
	zona superficiale bianca e grigia	SWGZ	Neuroni e fibre
Tori longitudinali		TL	Fibre
Tori semicircolari		TS	Fibre
Tegmentum	griseum centrale	GC	Neuroni fibre
	formazione reticolare superiore	SRF	Neuroni fibre
<i>ROMBOENCEFALO</i>			
Cervelletto	strato molecolare		Fibre
	strato cell. Purkinje		Cellule
	strato granulare		Cellule e fibre
Midollo allungato	rafe superiore	SR	Neuroni e fibre
	n. ottavolaterale mediale	MON	Neuroni fibre
	formazione reticolare intermedia	IMRF	Neuroni fibre

<b>Tabella 3: TrkA</b>			
<i>TELENCEFALO</i>			
Bulbi olfattori	strato glomerulare	GL	Fibre
Telencefalo dorsale	dorso-lateral	DI	Neuroni, fibre e cellule
	dorso-dorsale	Dd	Neuroni, fibre e cellule
	dorso-mediale	Dm	Neuroni, fibre e cellule
	dorso-centrale	Dc	Neuroni fibre
	n.entopeduncolare Dorsale	ENd	Fibre
Telencefalo ventrale	ventro-dorsale	Vd	Neuroni e fibre
	ventro-centrale	Vc	Fibre
	ventro-ventrale	Vv	Neuroni fibre
<i>DIENCEFALO</i>			
Epitalamo	Complesso pineale	SD	Cellule
Tubercolo posteriore	n. preglomerulare laterale	PGl	Neuroni fibre
	n. preglomerulare mediale	PGm	Neuroni e fibre
Ipotalamo	N.periventricolare ventrale	Hv	Neuroni
Sinencefalo	n. fascicolo mediale longitudinale	NMLF	Fibre
<i>MESENCEFALO</i>			
Tetto ottico	zona periventricolare grigia	PGZ	Cellule e fibre
	Zzna bianca profonda	DWZ	Fibre
	zona centrale	CZ	Fibre
	zona superficiale bianca e grigia	SWGZ	Fibre
Tori longitudinali		TL	Fibre
Tegmento	N.interpeduncolare	NIn	Fibre

<i>ROMBOENCEFALO</i>			
Cervelletto	strato molecolare		Fibre
	strato cell. purkinje		Cellule e fibre
	strato granulare		Fibre
Midollo allungato	n. anteriore dell'ottavo	AON	Fibre

<b>Tabella 4: NT-3</b>			
<i>TELENCEFALO</i>			
Telencefalo dorsale	dorso-laterale	DI	Cellule fibre
	dorso-dorsale	Dd	Cellule fibre
	dorsale-mediale	Dm	Cellule fibre
Telencefalo ventrale	dorsale	Vd	Fibre
	ventrale	Vv	Cellule fibre
<i>DIENCEFALO</i>			
Talamo ventrale	n. ventrolaterale	VL	Neuroni fibre
Pretetto	n. ottico accessorio ventrale	VAO	Neuroni fibre
Tratto ottico ventrolaterale		VOT	Fibre
Ipotalamo	n. diffuso lobo inferiore	DIL	Fibre
<i>MESENCEFALO</i>			
Tetto ottico	zona periventricolare gigia	PGZ	Fibre
	zona centrale	CZ	Fibre
	zona bianca profonda	DWZ	Cellule
Tegmento	n. interpeduncolare	NIn	Fibre
<i>ROMBOENCEFALO</i>			
Cervelletto	valvola	Vam	Fibre
	corpo	CCe	Fibre
	Strato purkinje		cellule

<b>Tabella 5: TrkC</b>			
<i>TELENCEFALO</i>			
Telencefalo dorsale	dorso-laterale	DI	Cellule
	dorso-dorsale	Dd	Cellule
	dorso-mediale	Dm	Cellule
Telencefalo ventrale	ventro-ventrale	VV	Cellule
<i>DIENCEFALO</i>			
Area preottica	N.preottico parvocellulare posteriore	PPp	Neuroni e fibre
	N.magnocellulare	PM	Neuroni e fibre

<b>Tabella 6: NT-4</b>			
<i>TELENCEFALO</i>			
Bulbi olfattori	S. glomerulare	GL	Fibre
Telencefalo dorsale	dorso-medial	Dm	Cellule e fibre
	dorso-dorsale	Dd	Cellule e fibre
Telencefalo ventrale	ventro-ventrale	Vv	Fibre
<i>DIENCEFALO</i>			
Area preottica			Fibre
Ipotalamo	zona periventricolare ventrale	Hv	Neuroni e fibre
Pretetto	n. parvocellulare	PSp	Fibre
<i>MESENCEFALO</i>			
Tetto ottico	zona periventricolare grigia	PGZ	Cellule
	zona bianca profonda	DWZ	Fibre
	zona centrale	CZ	Fibre
	zona superficiale bianca e grigia	SWGZ	Fibre
Tori longitudinal		TI	Fibre
Tegmento			Fibre
<i>ROMBOENCEFALO</i>			
Cervelletto	strato molecolare	Sm	Fibre
	strato cellule Purkinje	Sp	Cellule
Midollo allungato	Tratto cerebellare posteriore	PC	Fibre

<b>Tabella 7: BDNF</b>			
<i>TELENCEFALO</i>			
Bulbi olfattori	tratto olfattorio mediale	MOT	Fibre
	strato glomerulare	Gl	Fibre
Telencefalo dorsale	dorso-laterale	DI	Cellule
	dorso-dorsale	Dd	Cellule
	dorso-mediale	Dm	Cellule e neuroni
Telencefalo ventrale	ventro-dorsale	Vd	Neuroni e fibre
	ventro-ventrale	Vv	Neuroni e fibre
<i>DIENCEFALO</i>			
Area preottica	n. soprachiasmatico	SC	Neuroni
Epitalamo	complesso pineale	SD	Cellule
Talamo dorsale	n. talamico centrale posteriore	CP	Neuroni
Talamo ventrale	n. ventromediale	VM	Neuroni e fibre
	n. ventrolaterale	VL	Fibre
Tubercolo posteriore	organo paraventricolare	PVO	Cellule
Ipotalamo	n. periventricolare dorsale	Hd	Cellule
	n. periventricolare caudale	Hc	Cellule
sinencefalo	organo subcommissurale	SCO	Cellule
Pretetto	n. preottico parvocellulare anteriore	PPa	Fibre
	n. preottico parvocellulare posteriore	PPp	Fibre
	n. preottico magnocellulare	PM	Fibre
Tratto ottico	tratto ottico ventrolaterale	VOT	Fibre

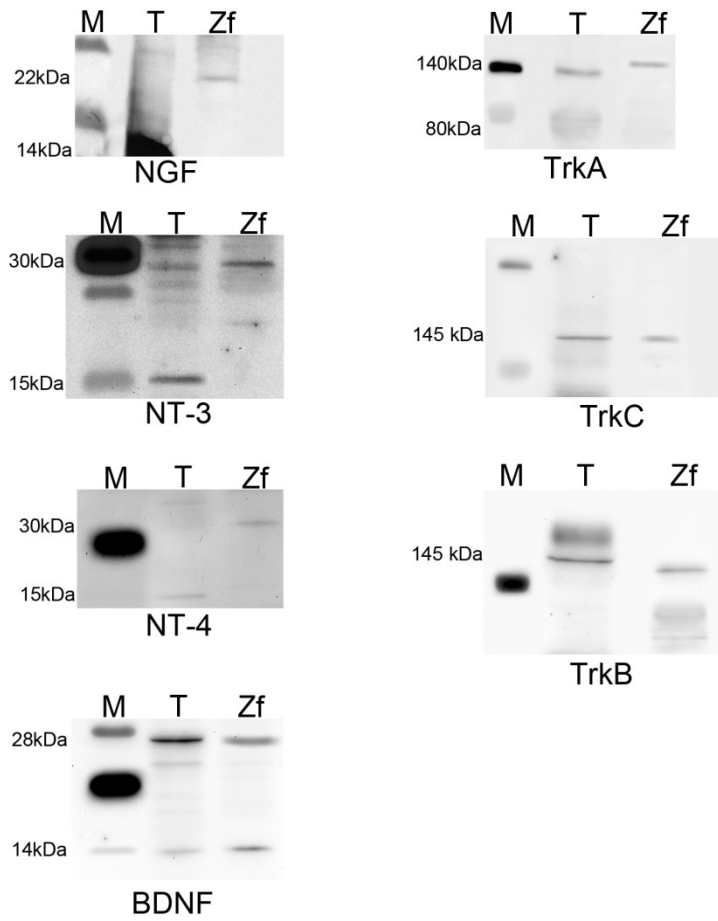


<i>MESENCEFALO</i>			
Tetto ottico	zona periventricolare grigia	PGZ	Cellule
	zona bianca profonda	DWZ	Fibre
Tori longitudinali		TL	Fibre
Tegmento	n. interpeduncolare	NIn	Cellule e fibre
<i>ROMBOENCEFALO</i>			
Cervelletto	strato molecolare	Sm	Cellule e fibre
Midollo allungato	rafe inferiore	IR	Fibre
	fascicolo longitudinale mediale	MLF	Fibre

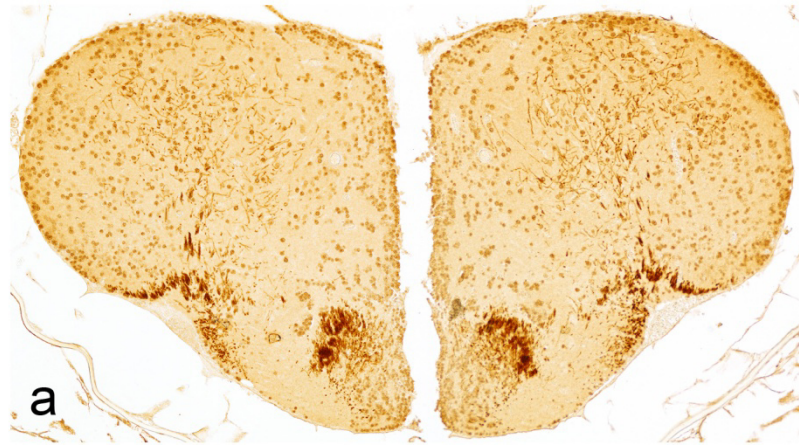
<b>Tabella 8: TrkB</b>			
<i>TELENCEFALO</i>			
Bulbi olfattori	s. delle fibre olfattorie primarie	POF	Fibre
	s. glomerulare	GL	Fibre
	s cellulare esterno	ECL	Neuroni
Telencefalo dorsale	dorso-laterale	DI	Cellule
	dorso-dorsale	Dd	Cellule
	dorso-mediale	Dm	Cellule
	fascio laterale telencefalico	LFB	Fibre
Telencefalo ventrale	ventro-dorsale	Vd	Cellule
<i>DIENCEFALO</i>			
Epitalamo	complesso ependimale	CE	Cellule
Ipotalamo	zona caudale periventricolare	Hc	Fibre
Tratto ottico	tratto ottico ventrolaterale	VOT	Fibre
<i>MESENCEFALO</i>			
Tetto ottico	zona periventricolare grigia	PGZ	Cellule
	zona centrale	CZ	Neuronie fibre
	zona superficiale bianca e grigia	SWGZ	Neuroni e fibre
Tegmento	n. oculomotore	nIII	Fibre
	fascicolo longitudinale mediale	NMLF	Fibre
	fascicolo longitudinale laterale	LLF	Fibre
	commessura ansulata	Cans	Fibre
<i>ROMBOENCEFALO</i>			
Cervelletto	strato molecolare	Sm	Fibre
	strato delle cellule di Purkinje	SCP	Cellule e fibre
	strato granulare	SG	Fibre
Midollo allungato	tratto cerebellare posteriore	PC	Fibre

	fascicolo longitudinale mediale	MLF	Fibre
	fascicolo longitudinale laterale	LLM	Fibre
	commissura ventrale	Cven	Fibre

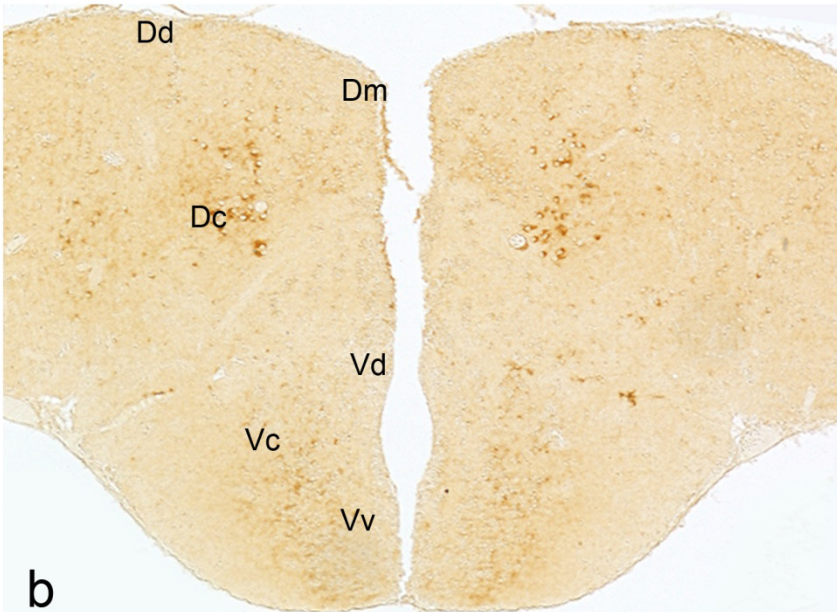
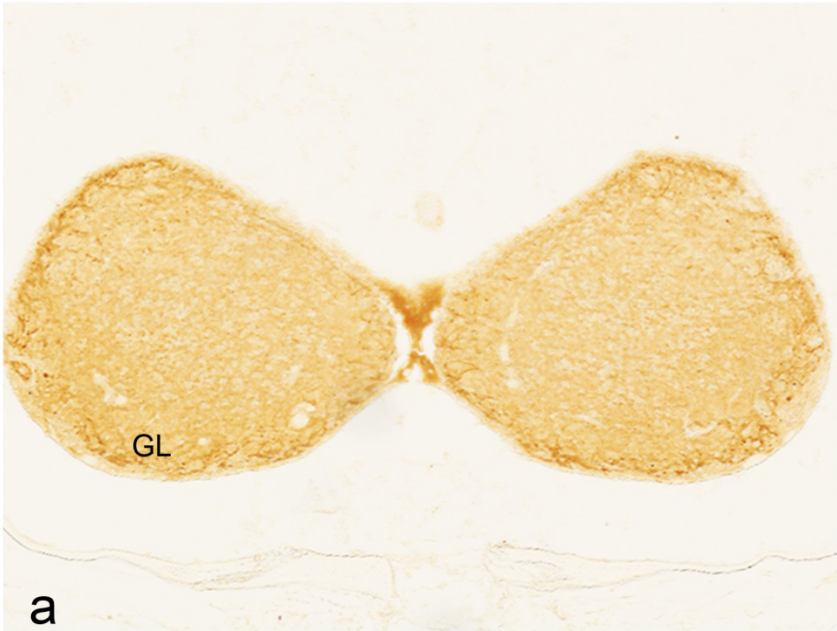
## Tavola 1 Western-Blotting



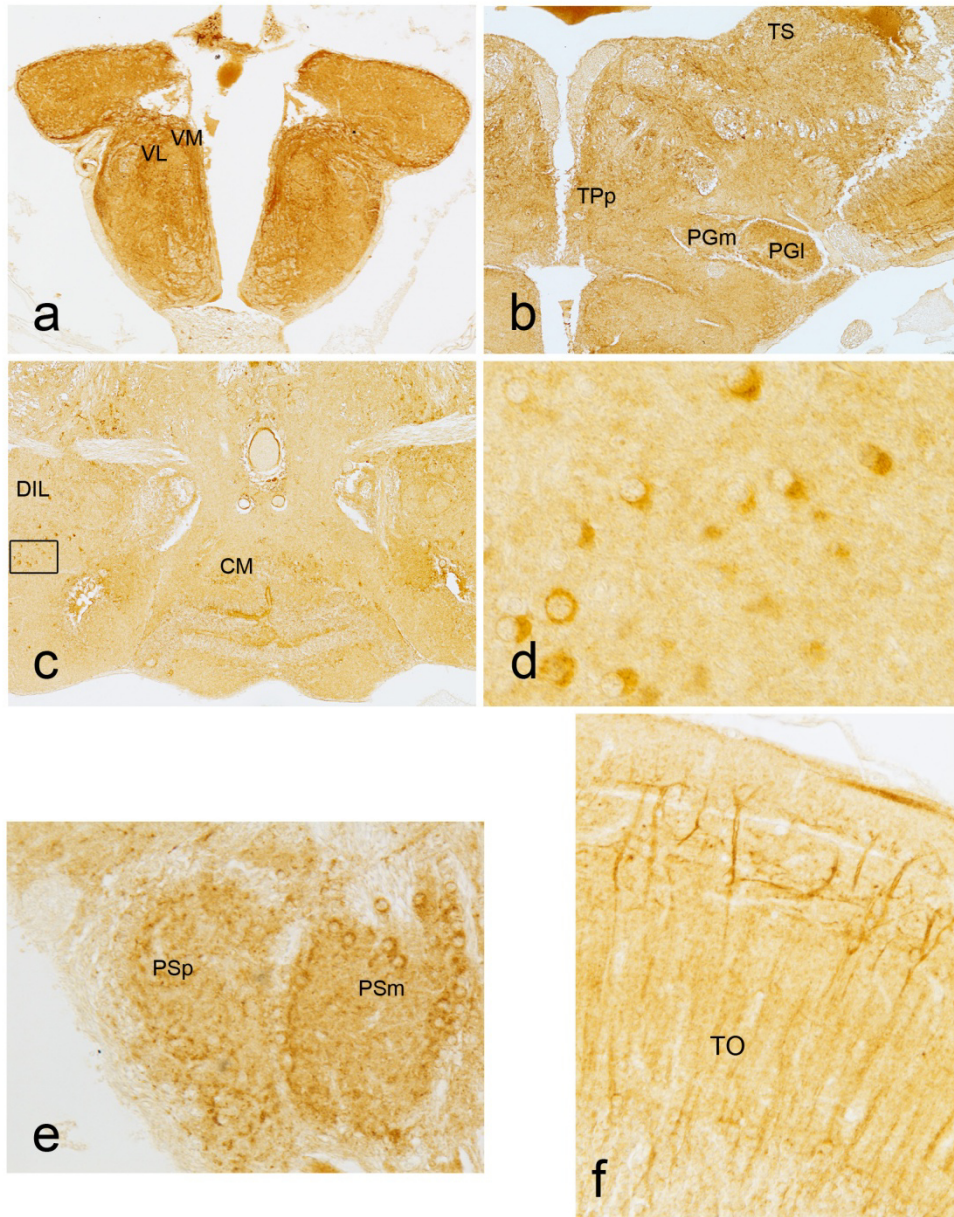
*Tavola 2 PGP 9.5*



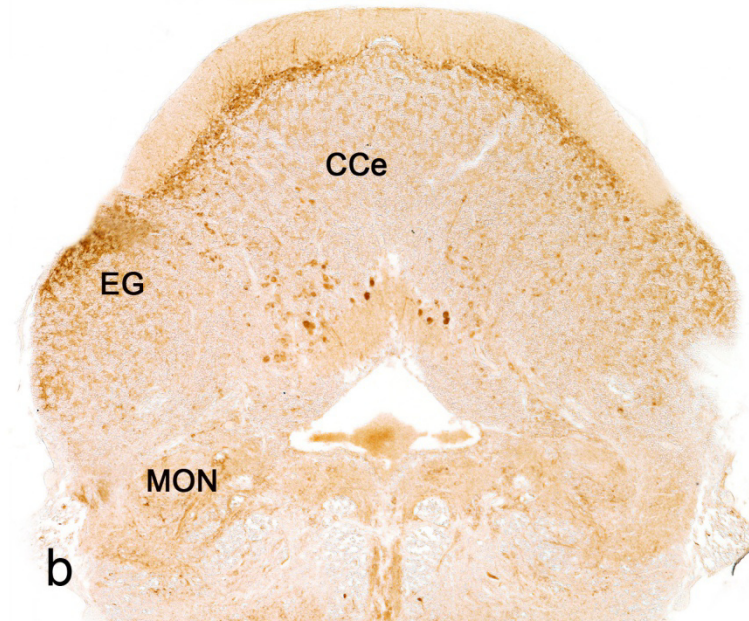
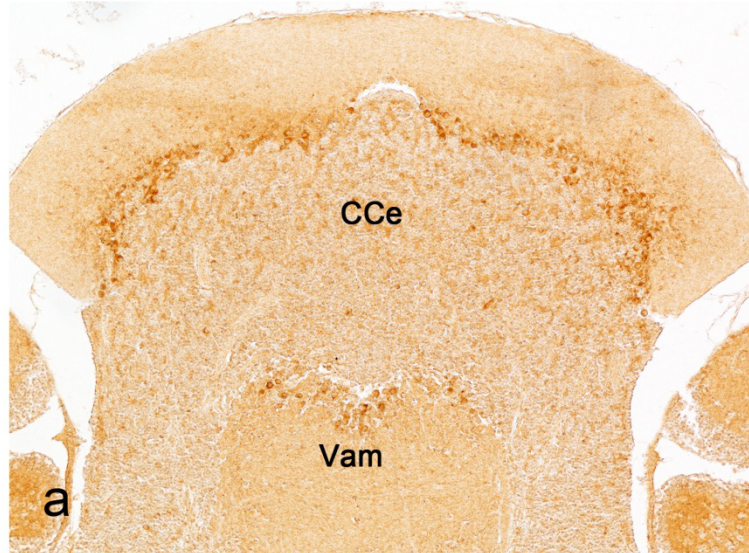
*Tavola 3 NGF*



## Tavola 4 NGF

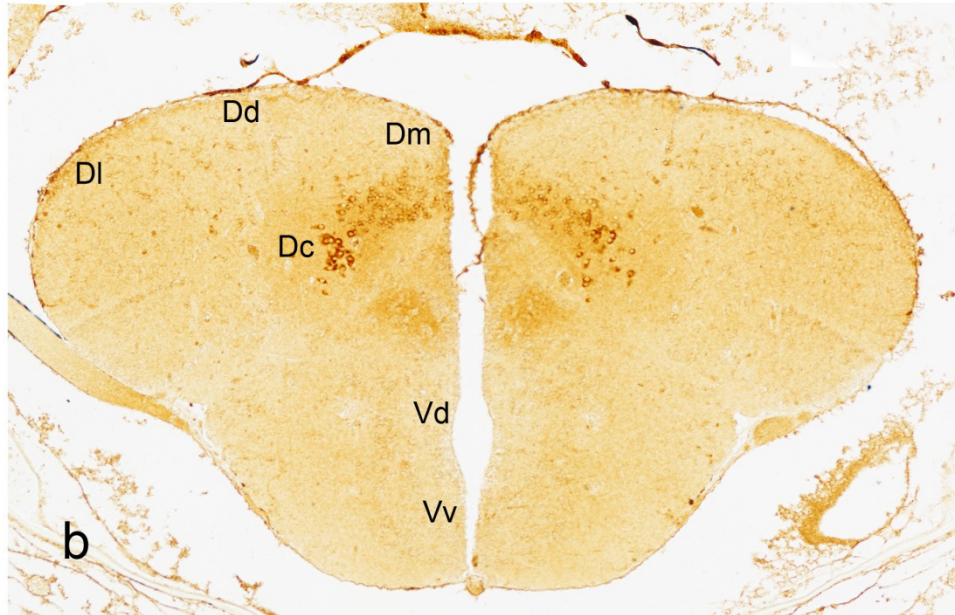
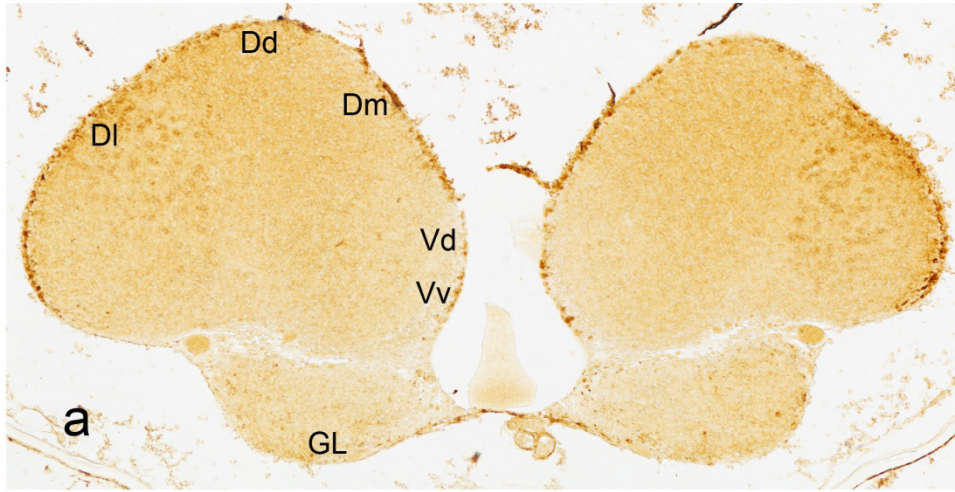


*Tavola 5 NGF*

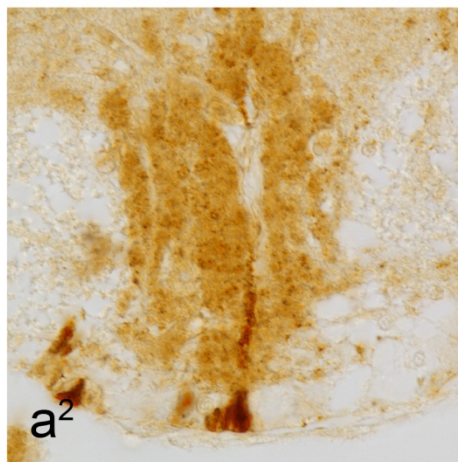
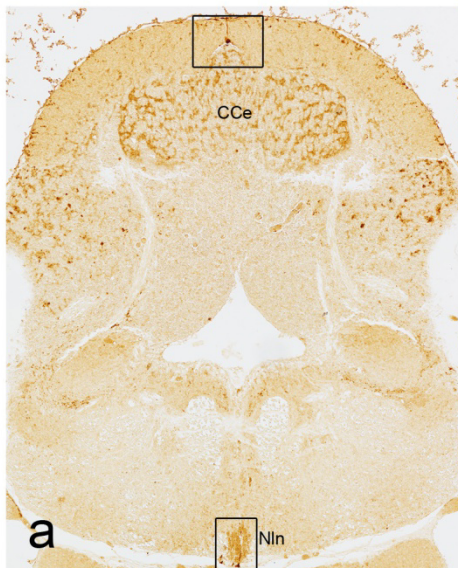
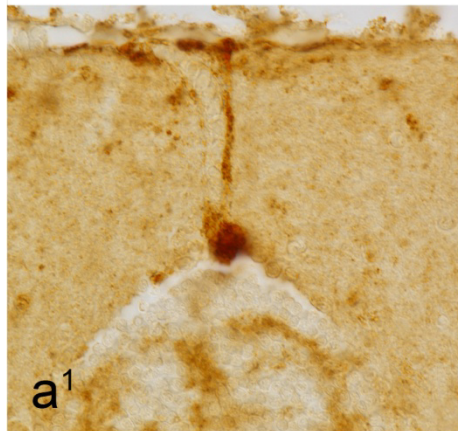




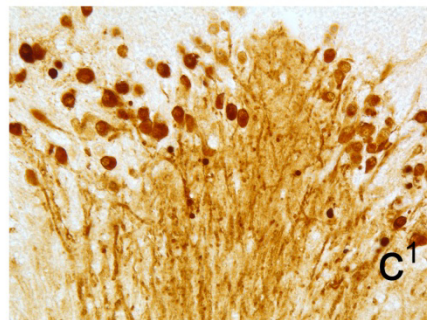
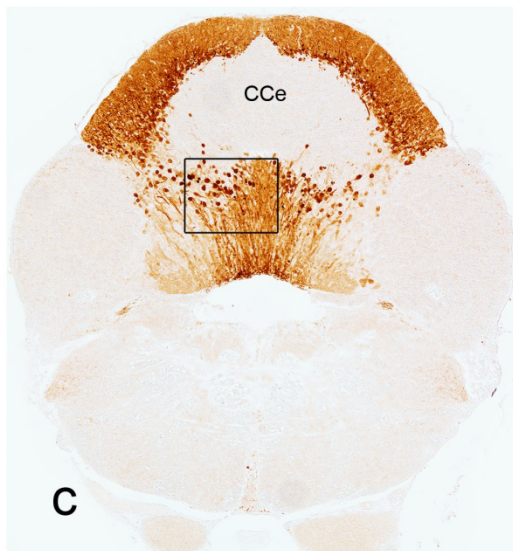
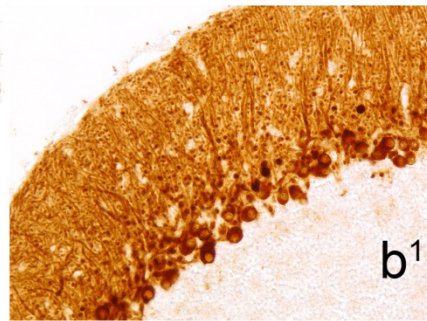
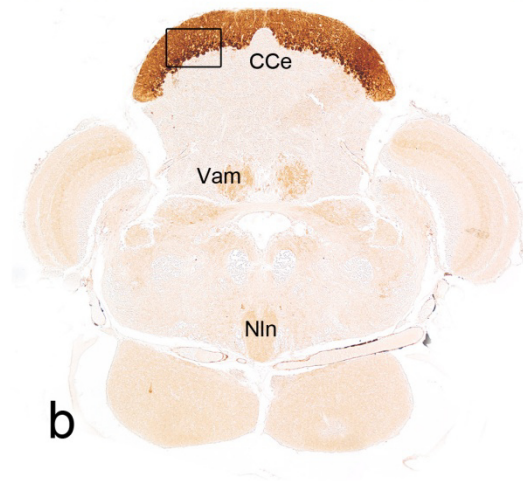
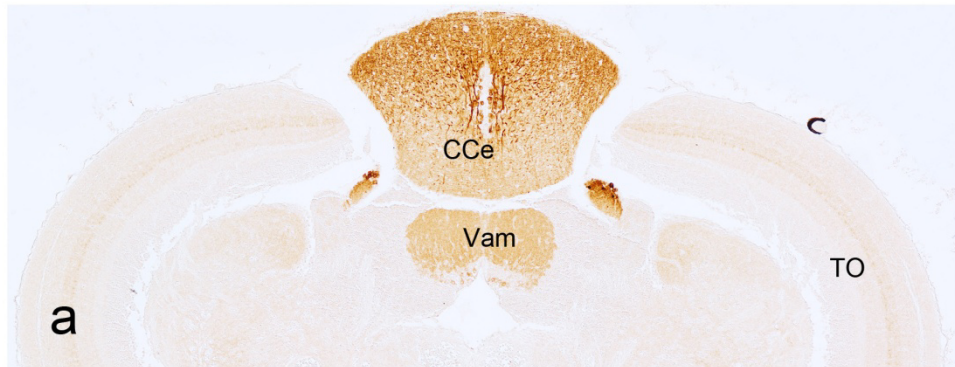
## Tavola 6 TrkA



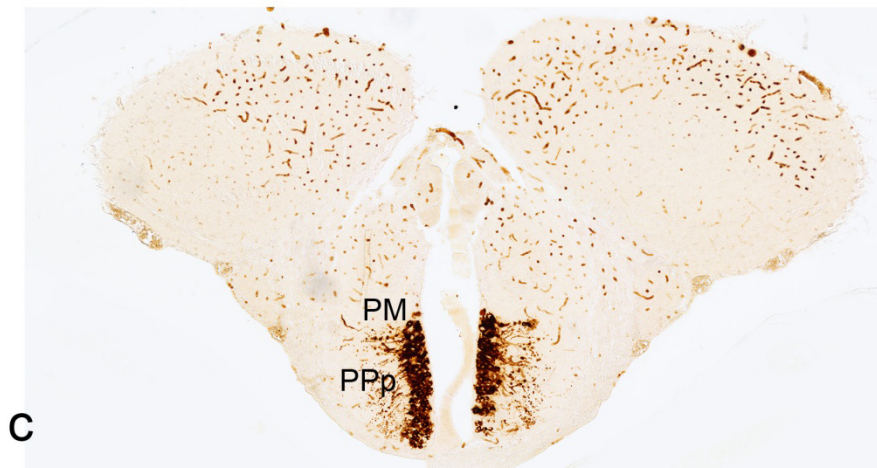
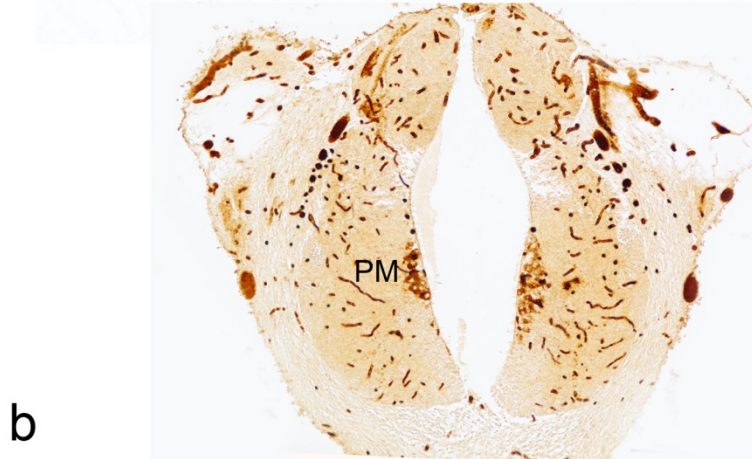
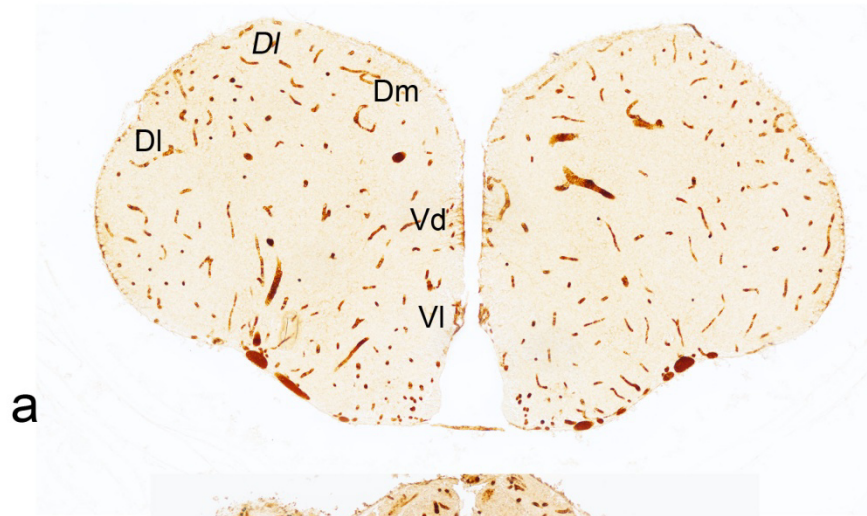
*Tavola 7 TrkA*



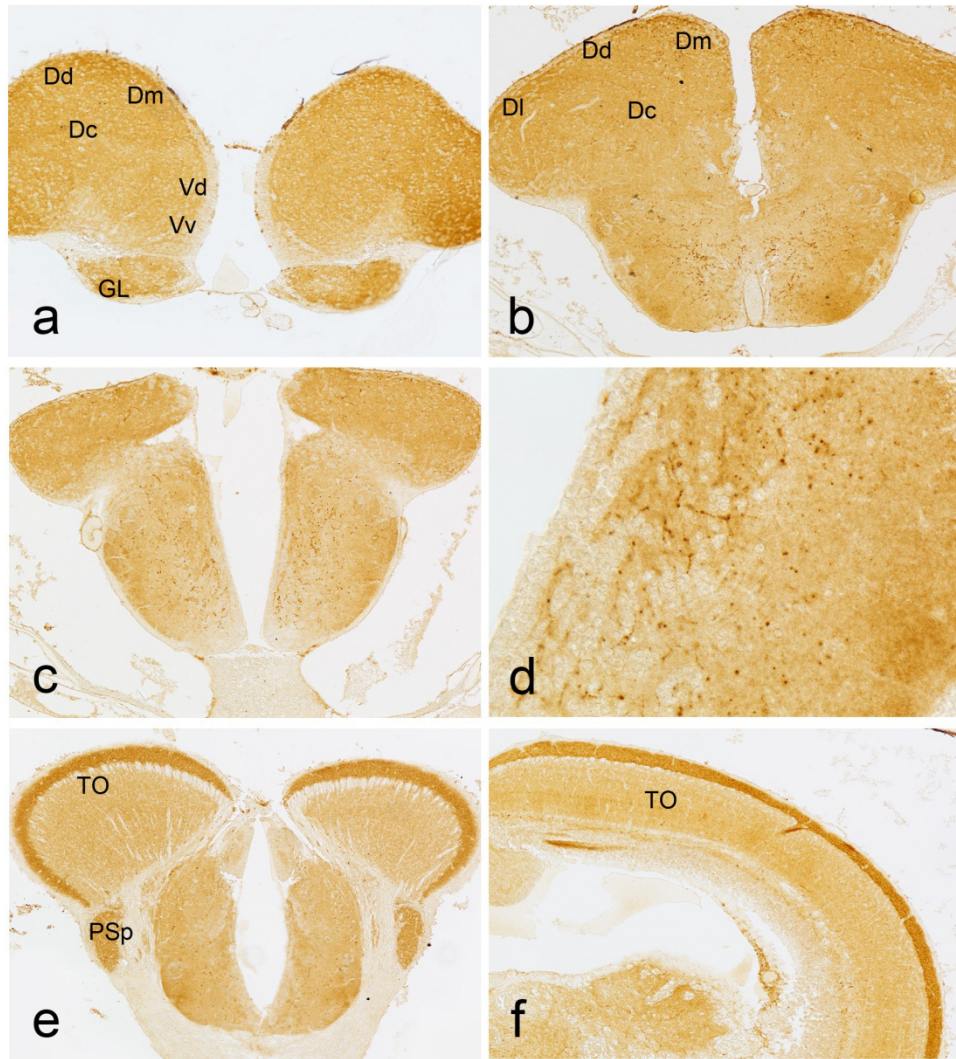
# Tavola 8 NT-3



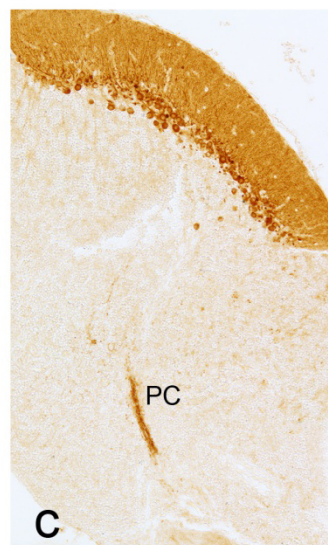
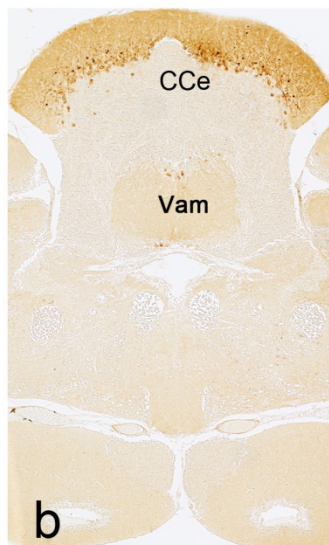
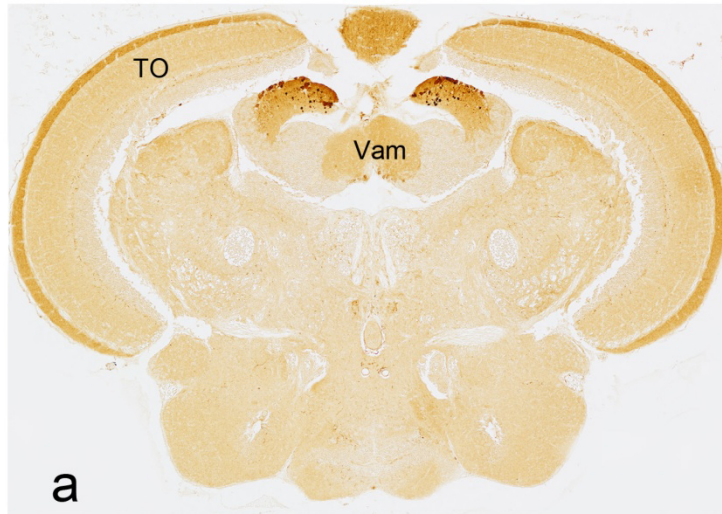
*Tavola 9 TrkC*



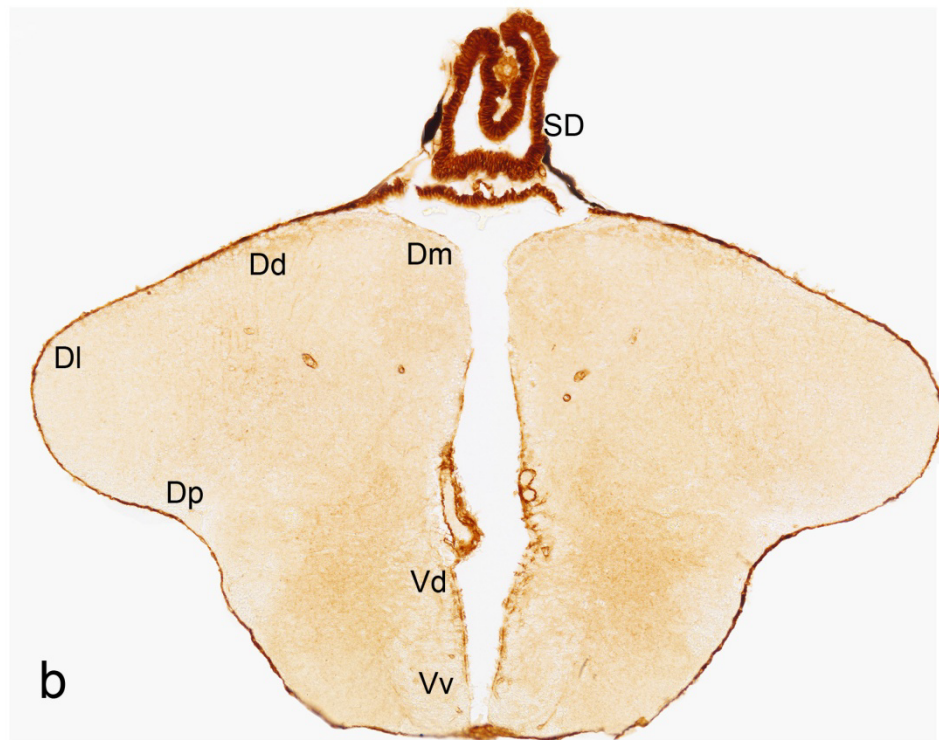
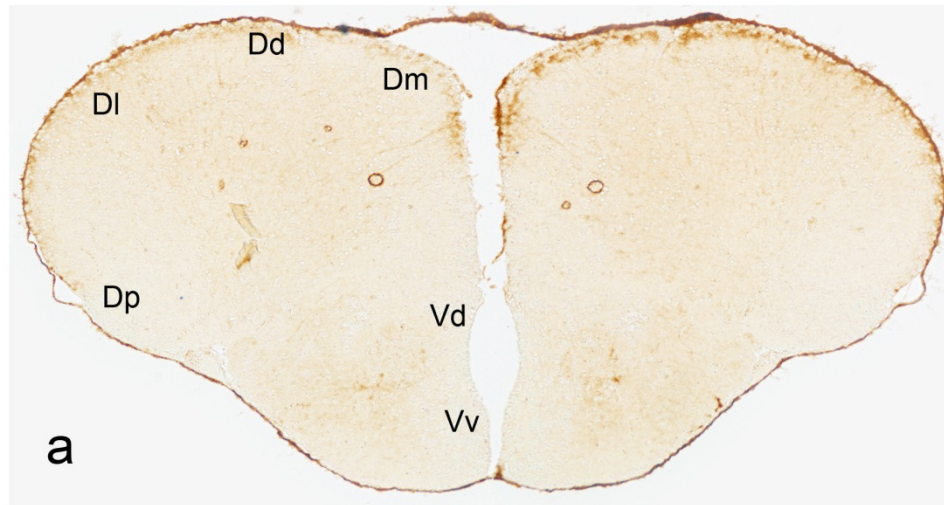
*Tavola 10 NT-4*



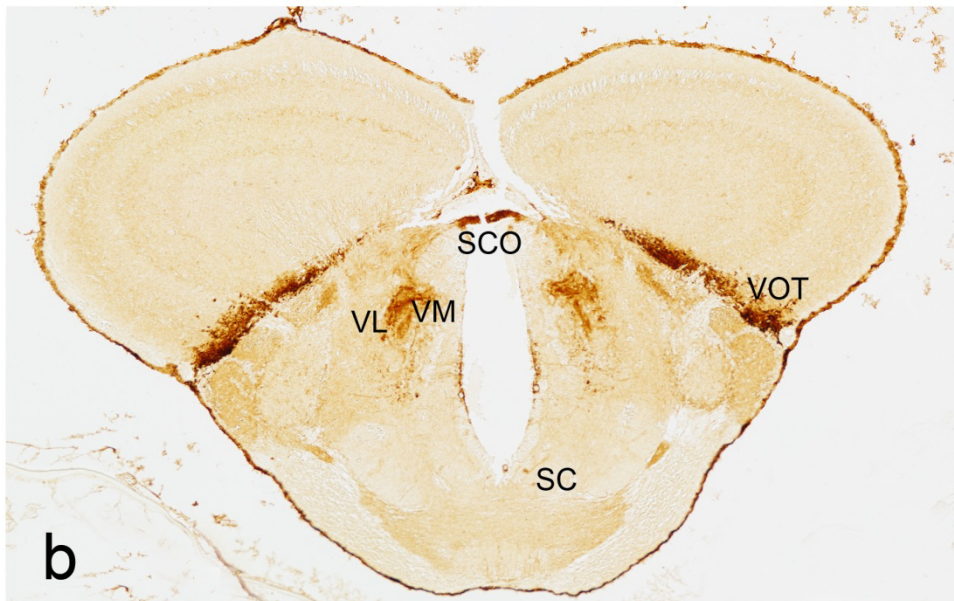
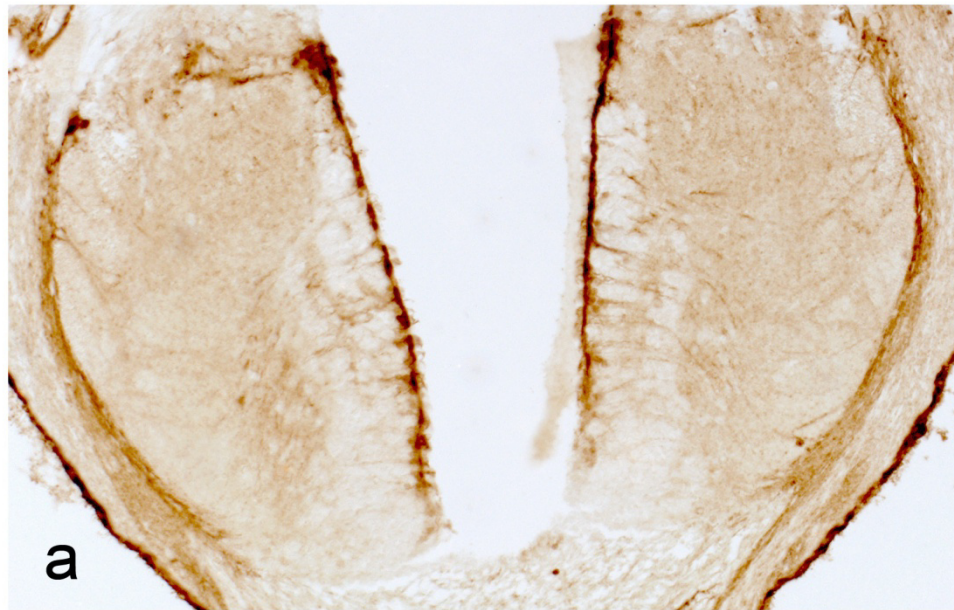
*Tavola 11 NT-4*



*Tavola 12* BDNF

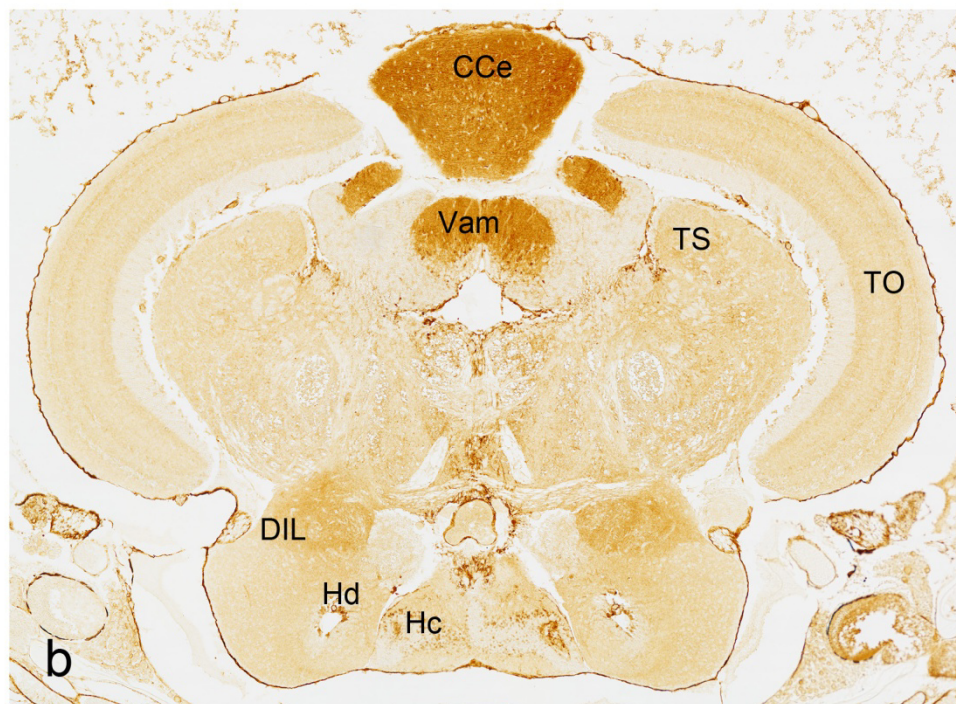
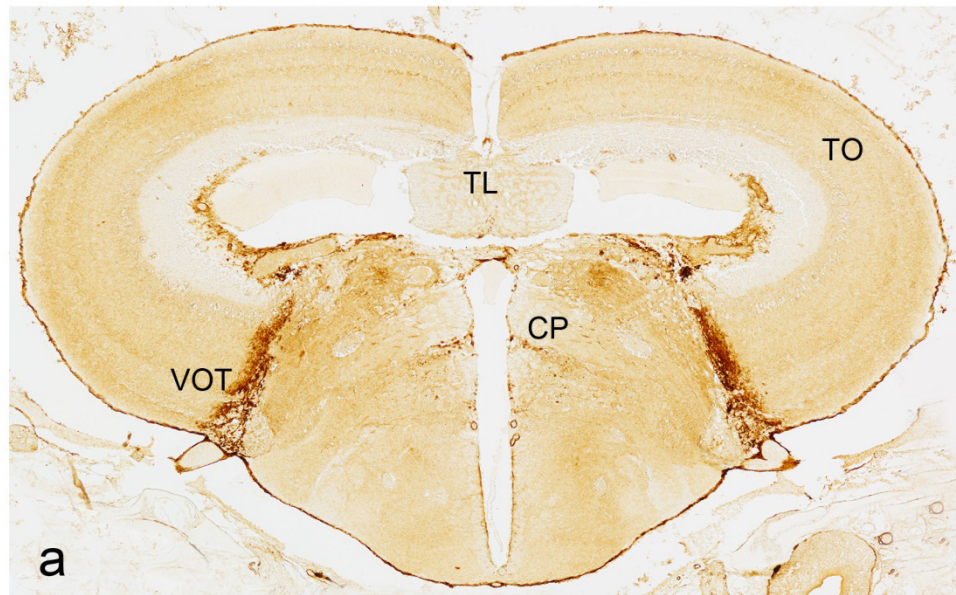


*Tavola 13* BDNF

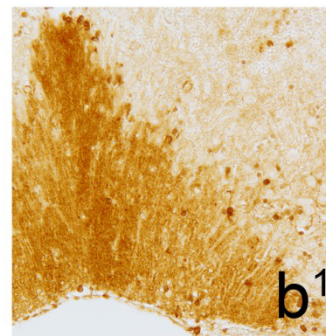
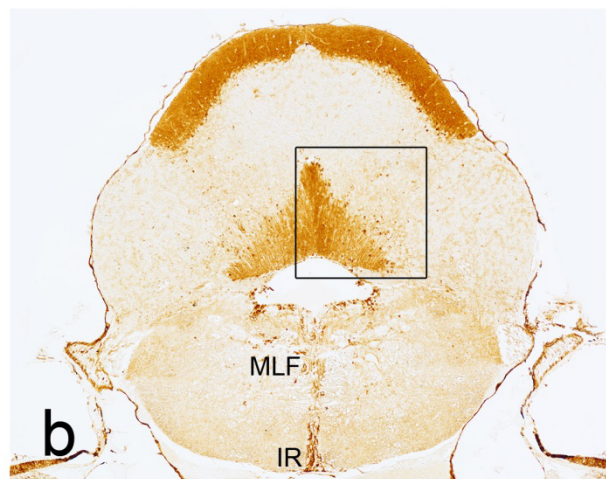
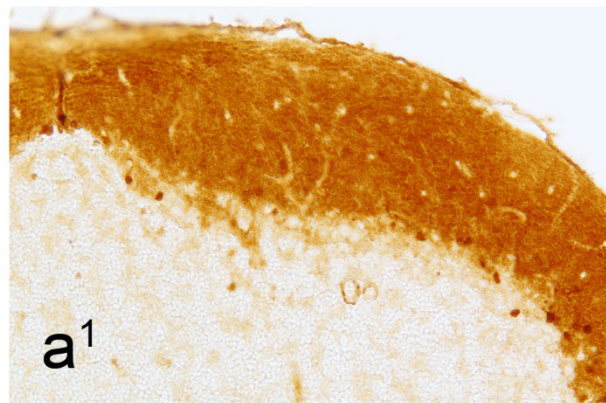
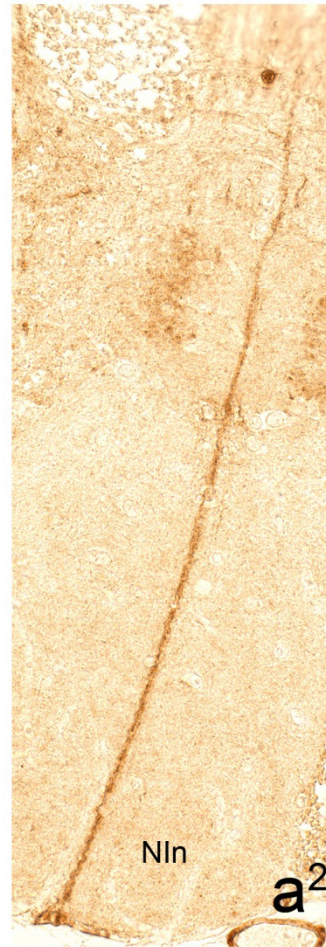
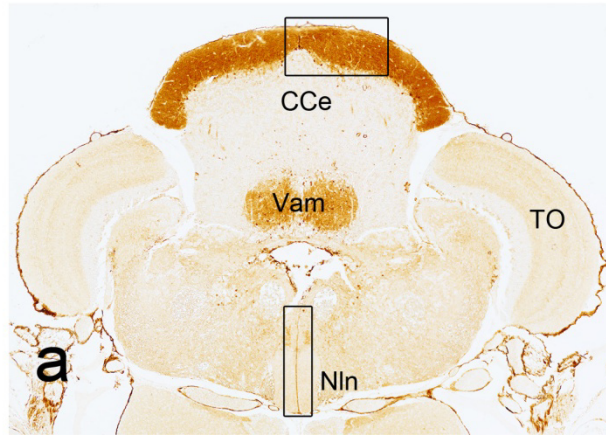




## Tavola 14 BDNF



# Tavola 15 BDNF



# Tavola 16 TrkB

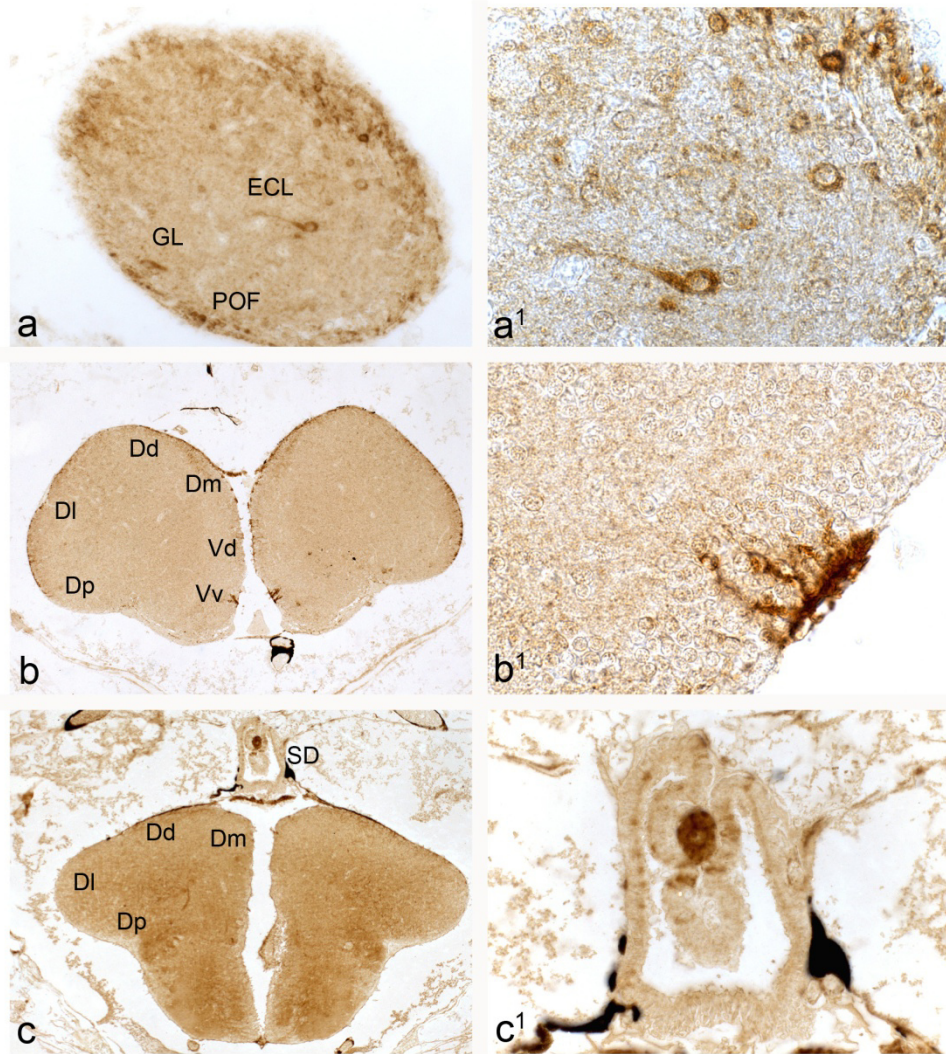
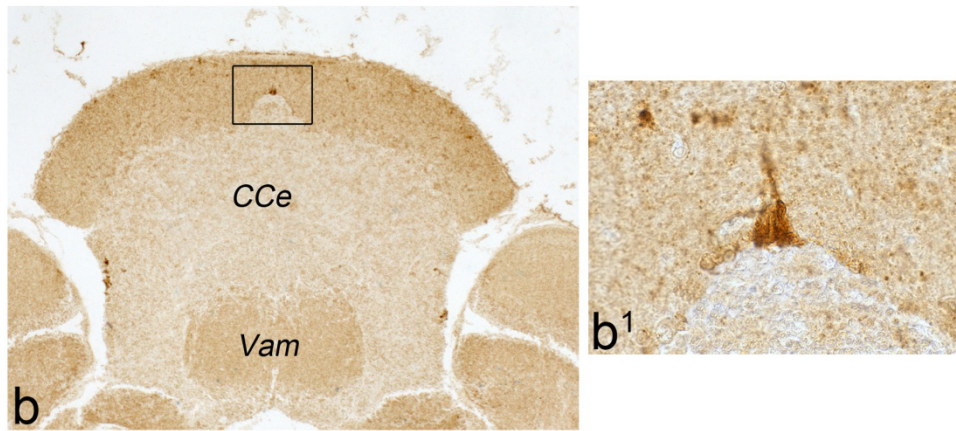
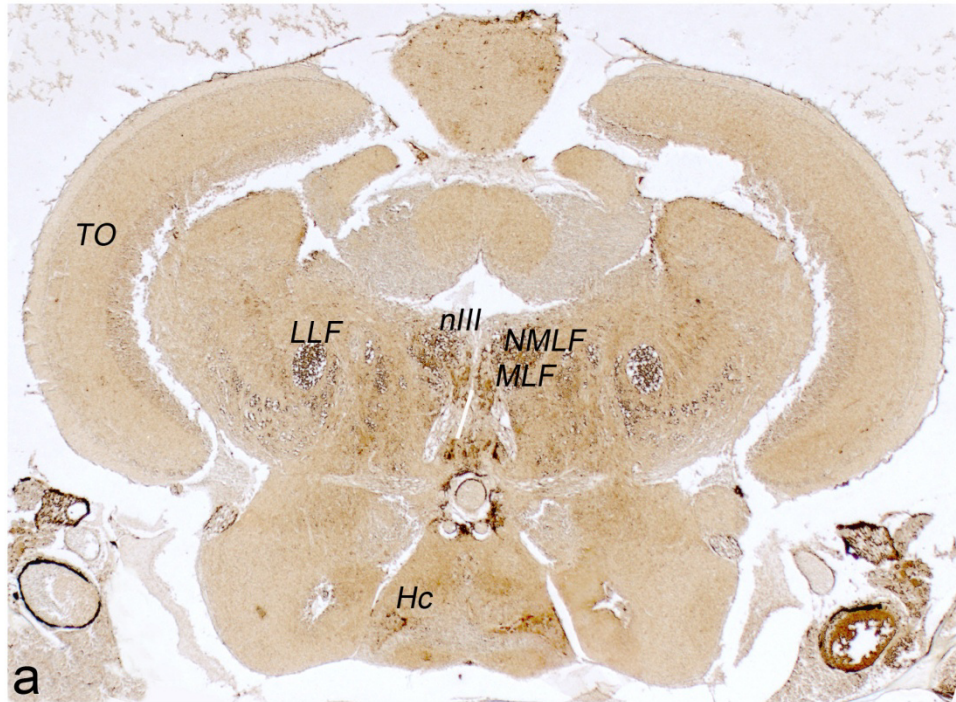
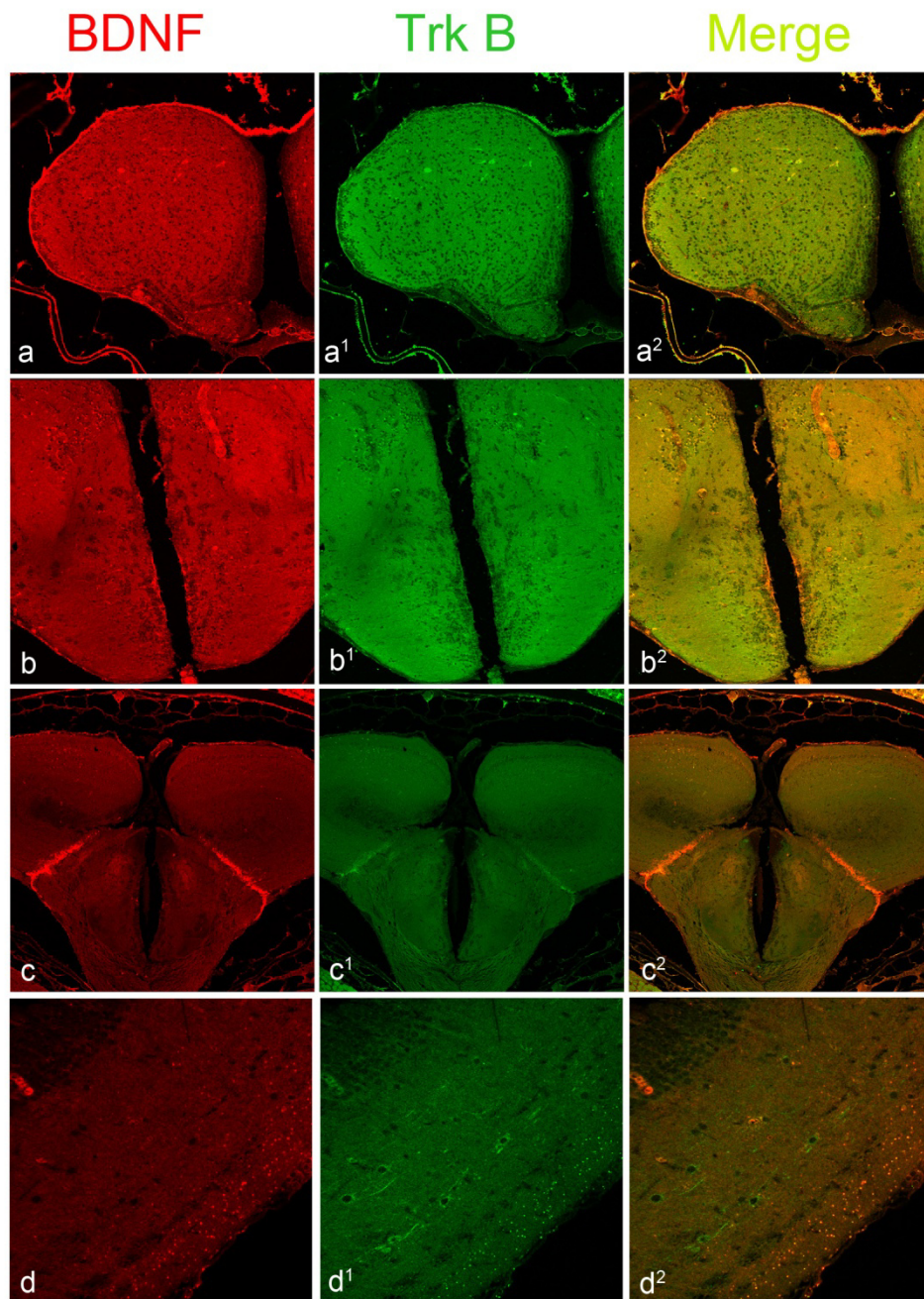


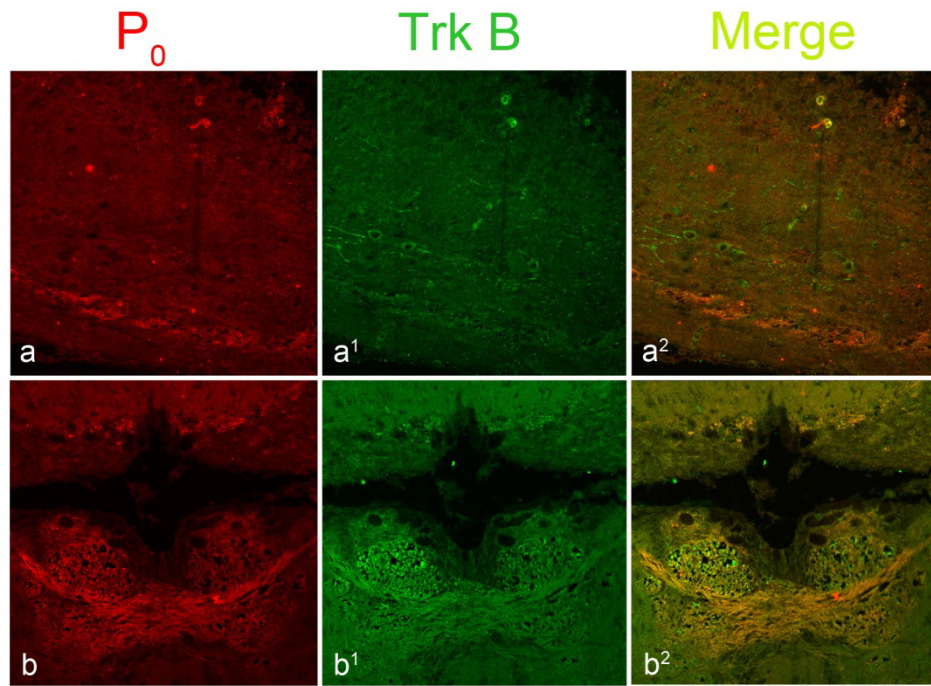
Tavola 17 TrkB



*Tavola 18*



*Tavola 19*

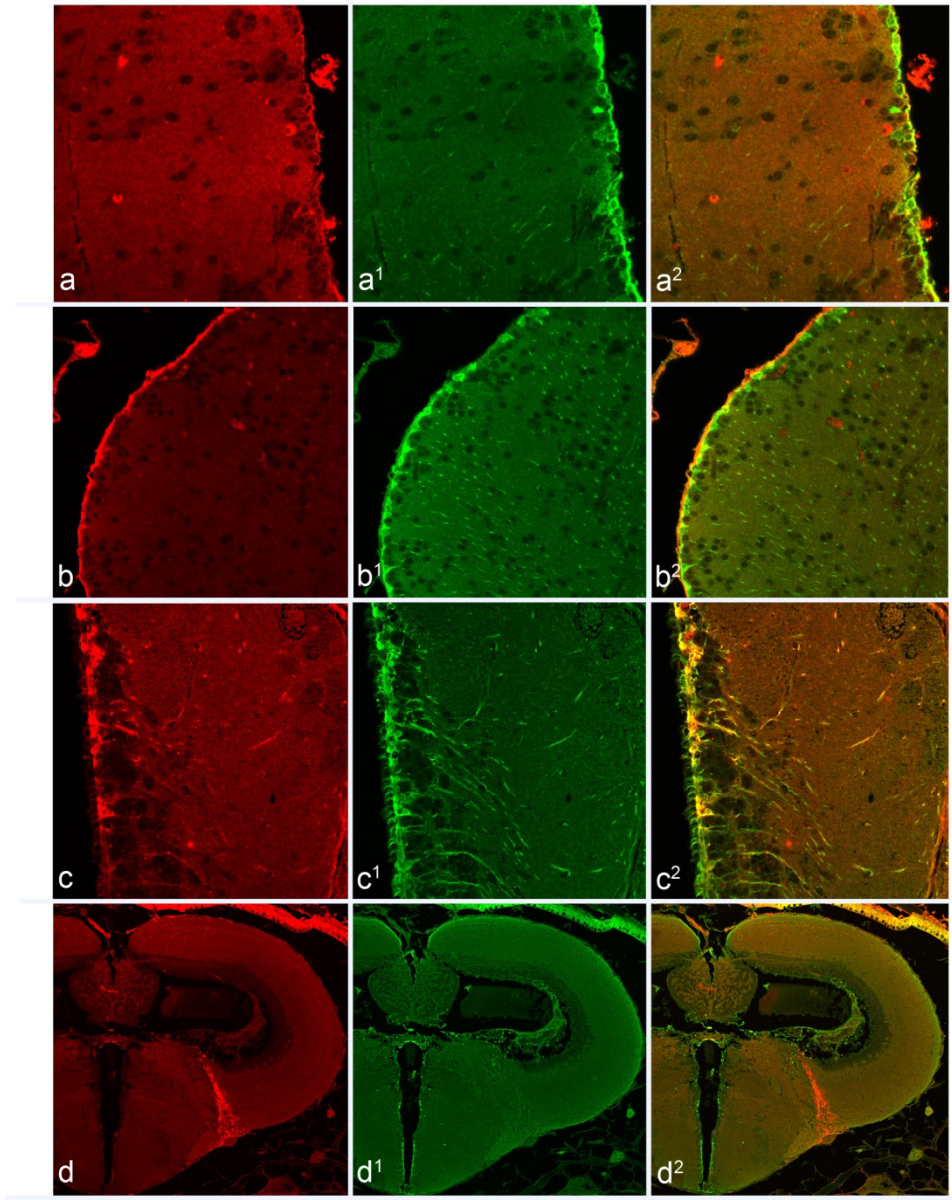


*Tavola 20*

BDNF

S 100 $\beta$

Merge

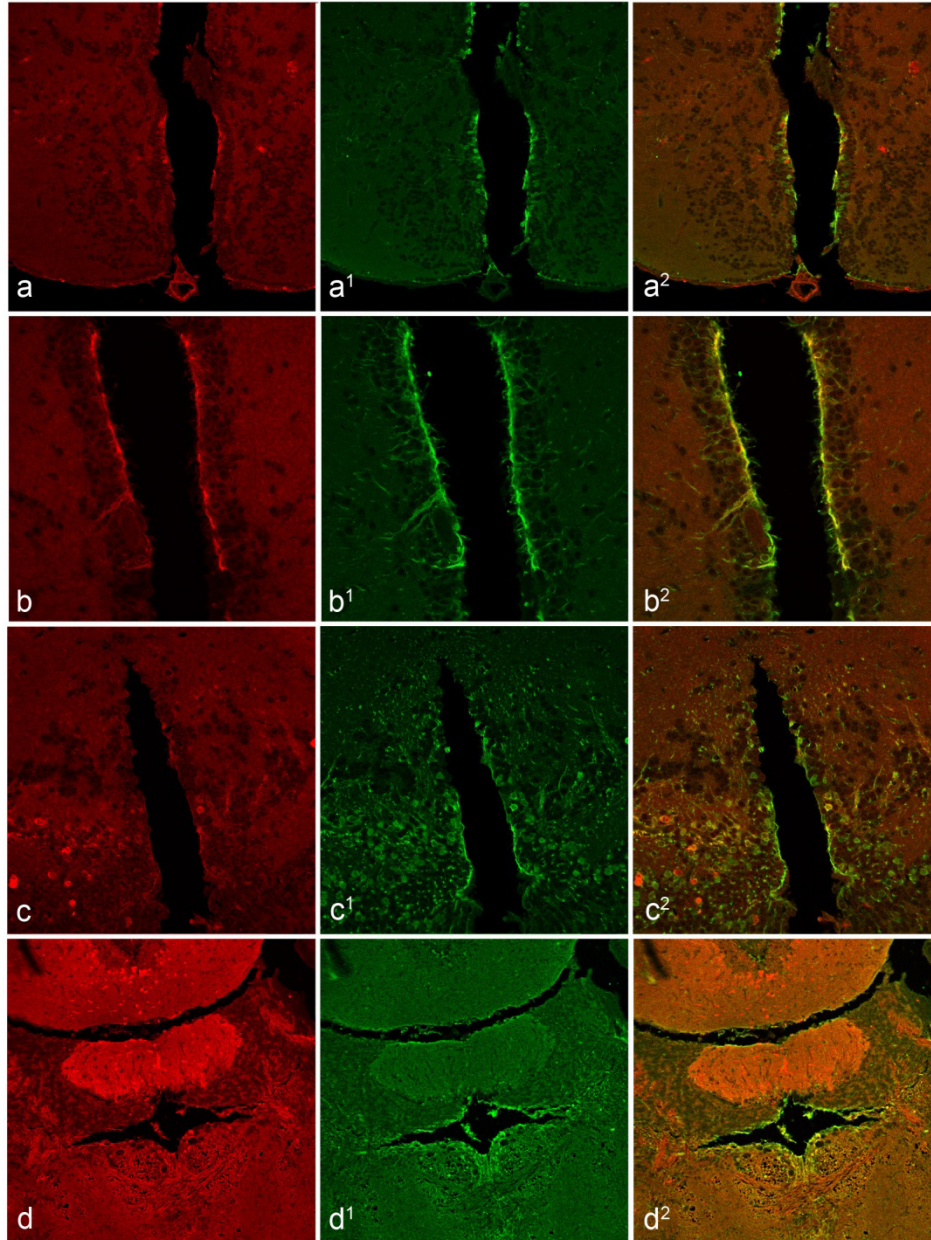


*Tavola 21*

PCNA

S 100 $\beta$

Merge



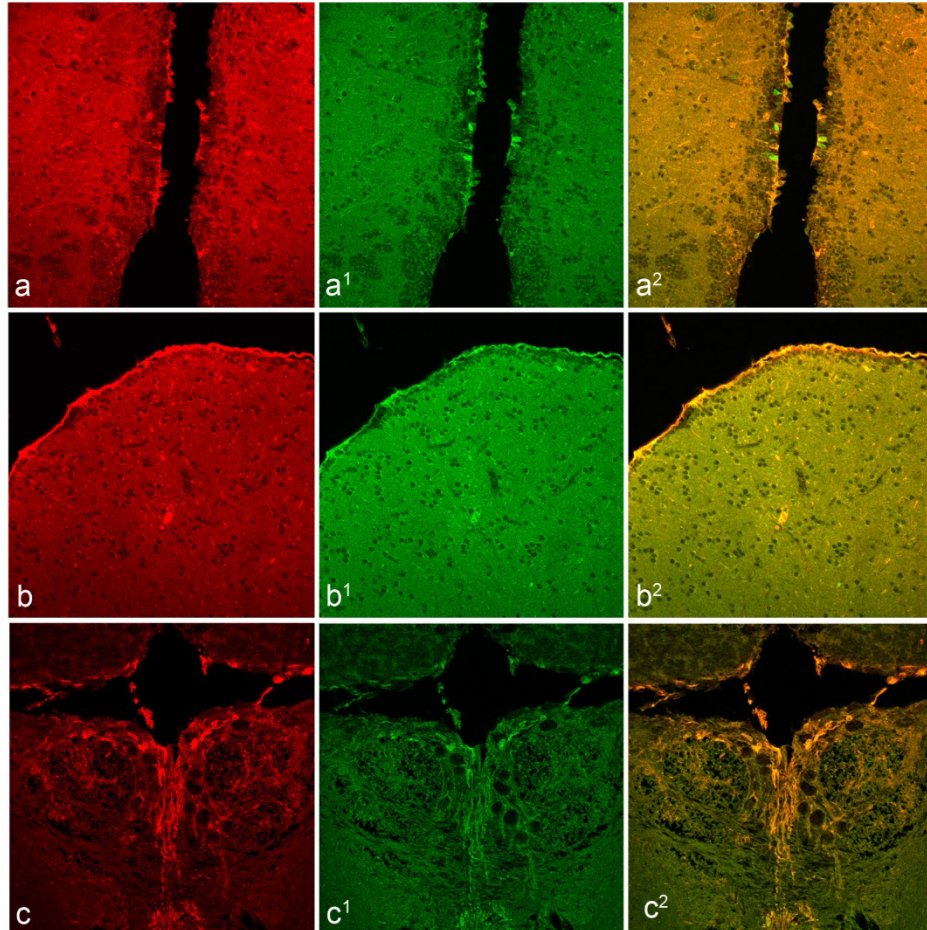


*Tavola 22*

**BDNF**

**PCNA**

*Merge*



## Tavola 23

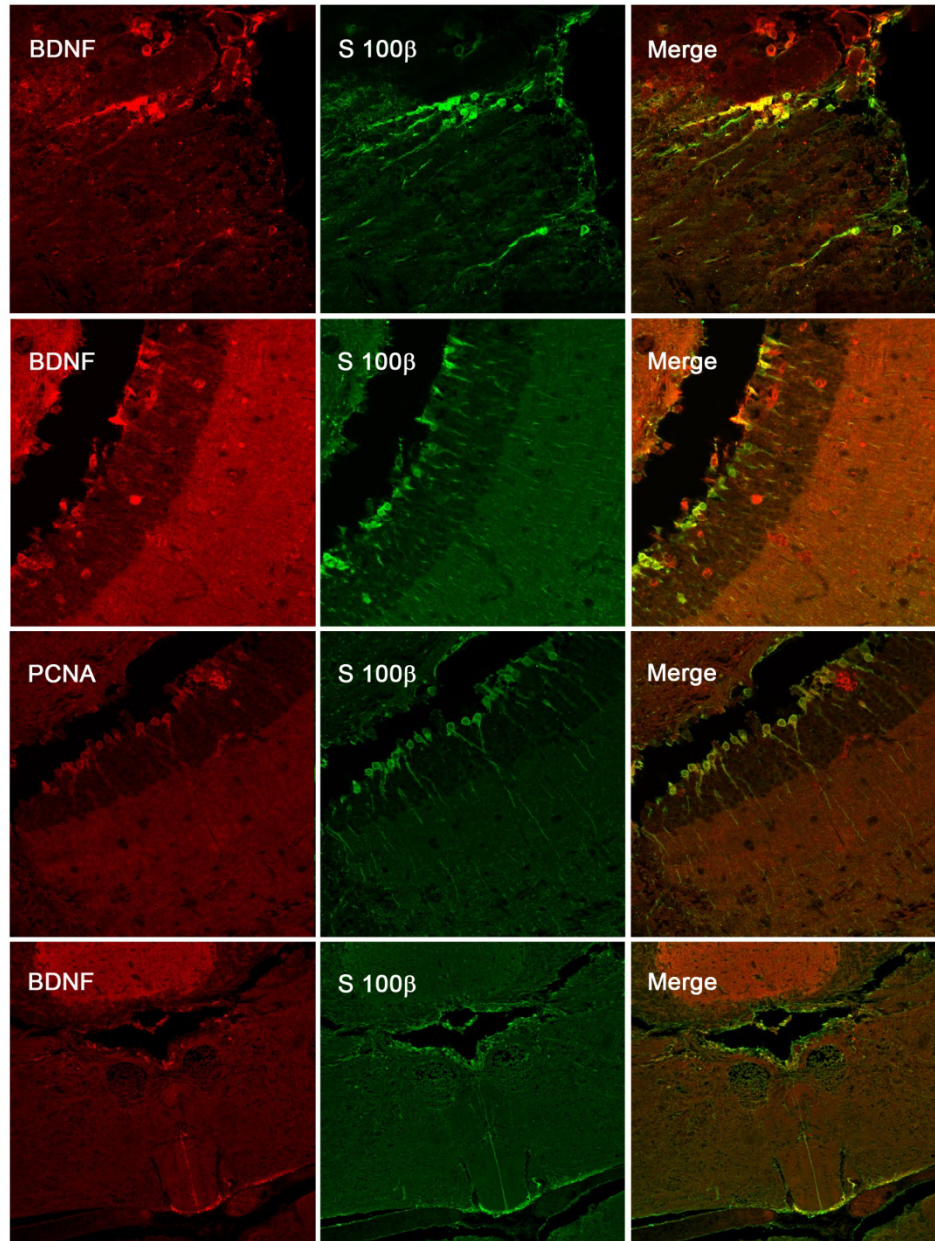


Tavola 24

BDNF + *gfap:gfp*

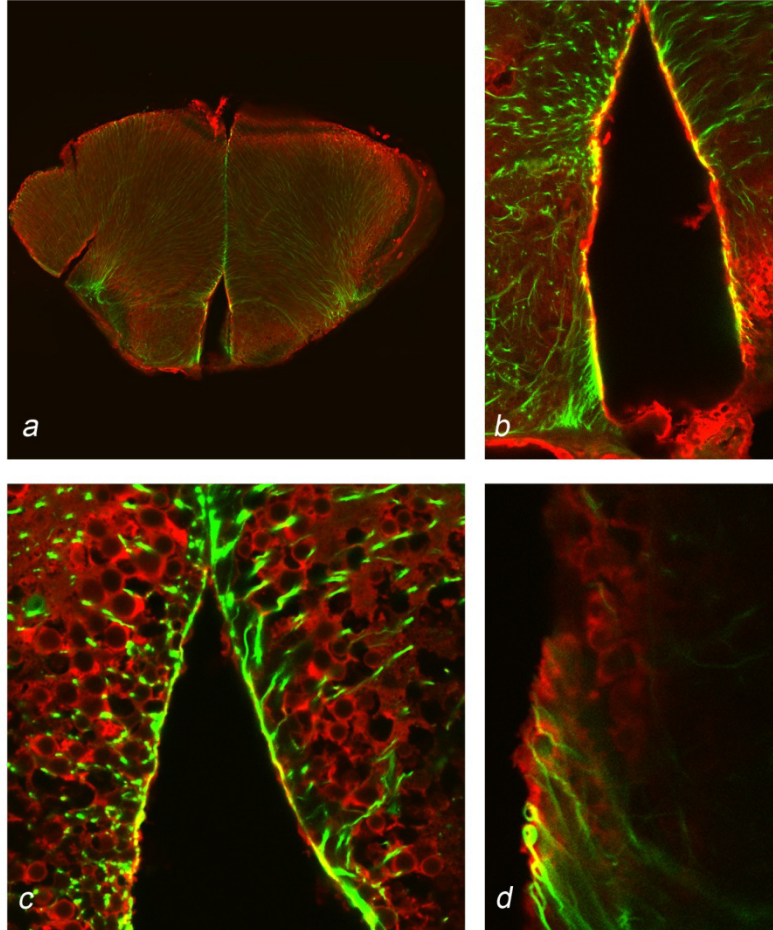


Tavola 25

BDNF + *gfap:gfp*

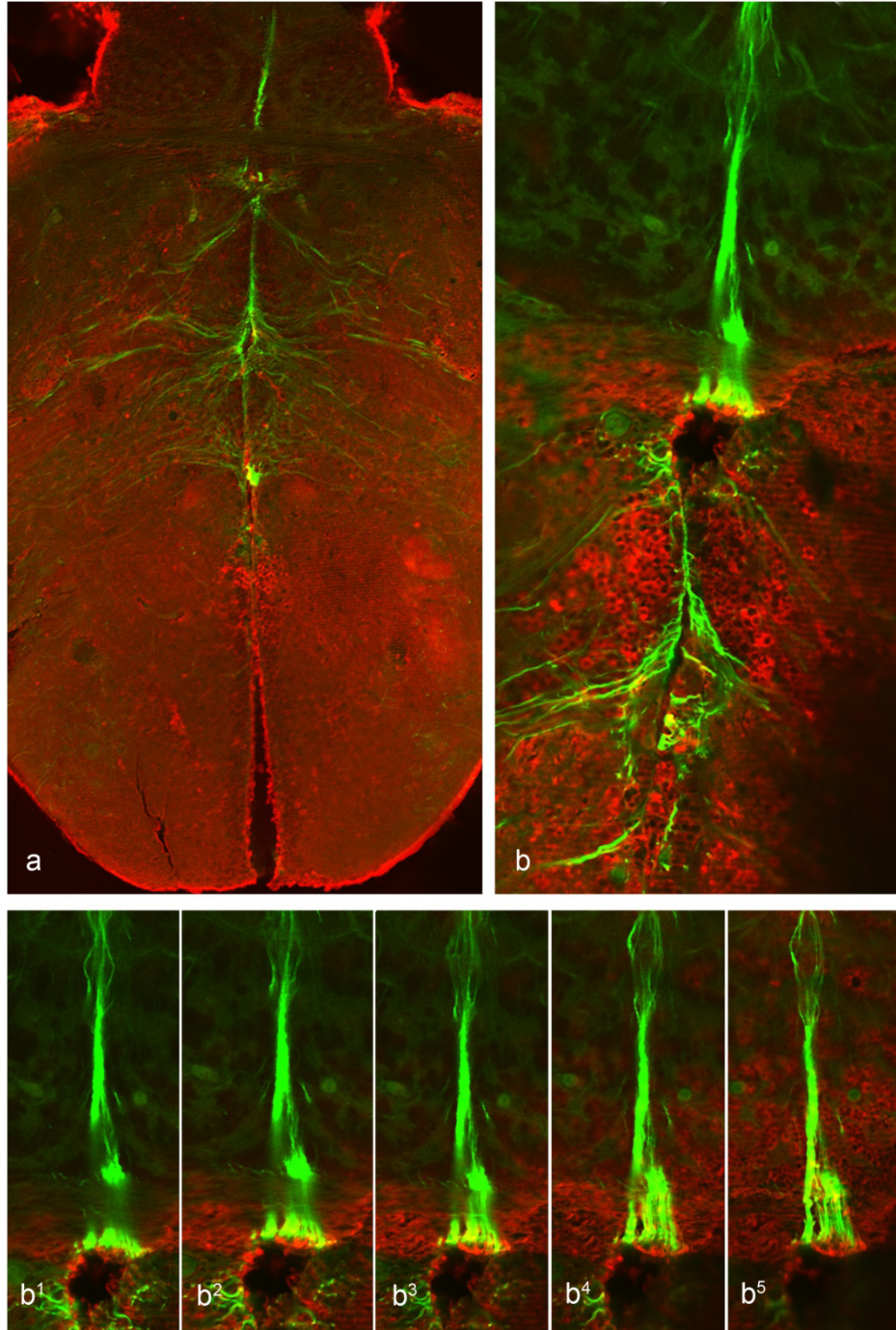


Tavola 26

BDNF + *gfap:gfp*

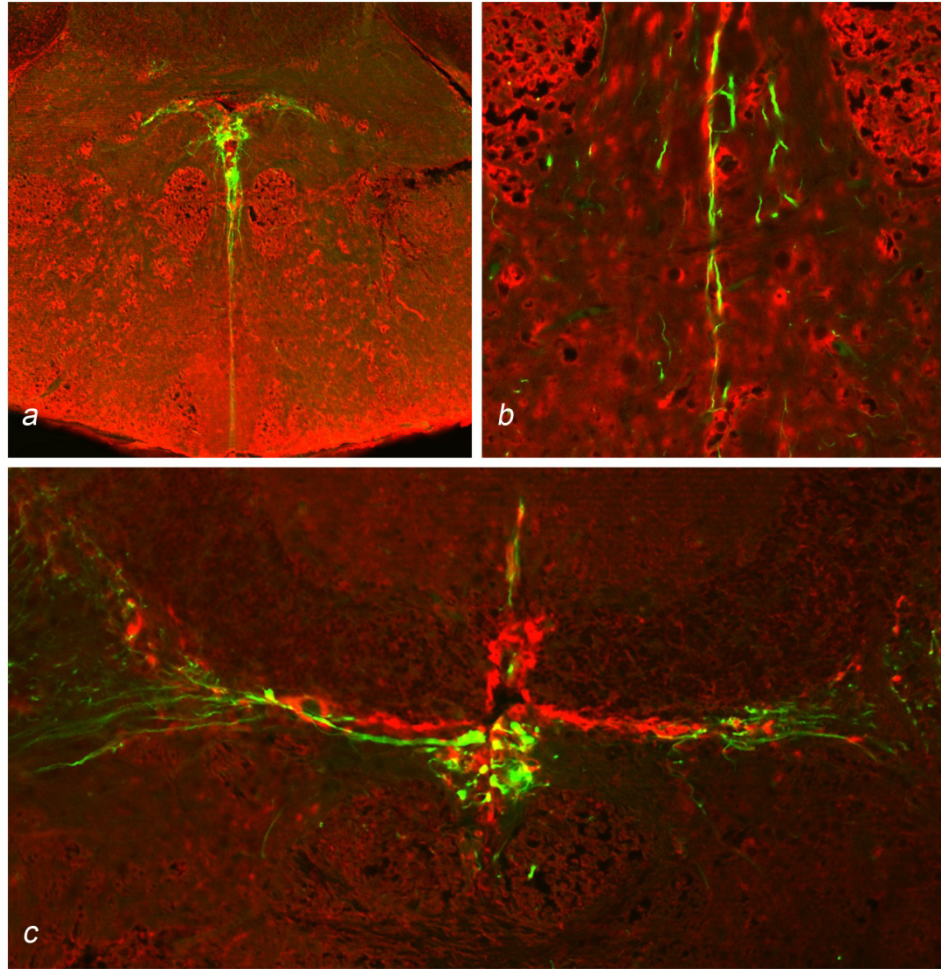
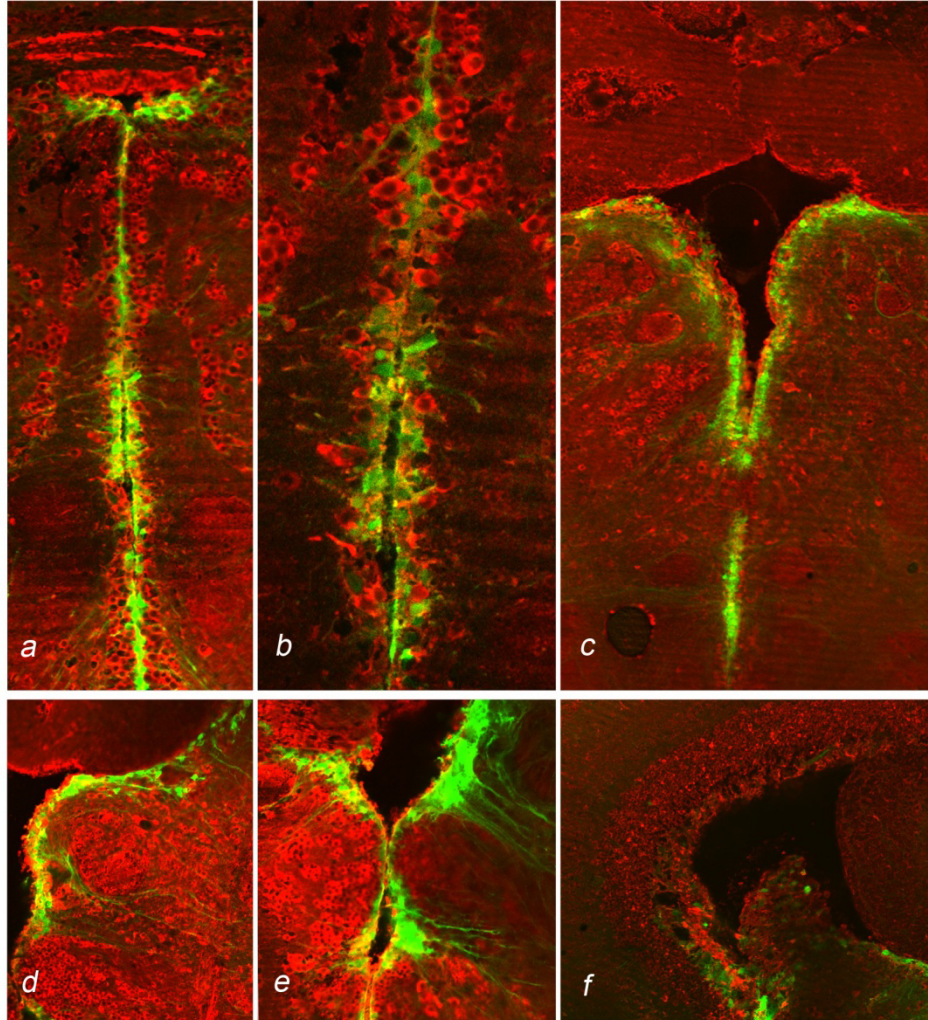


Tavola 27

BDNF + Nestin:gfp



## **Legenda delle tavole:**

**Tavola 1:** Western-blotting delle neurotrofine e dei recettori Trk condotti su omogenati di encefalo di topo (T) e di zebrafish (Zf). M= markers di riferimento.

**Tavola 2:** PGP 9.5

Neuroni e fibre positive in vari distretti encefalici: a) telencefalo; b) diencefalo; c) diencefalo, mesencefalo e romboencefalo.

**Tavola 3:** NGF

a): fibre positive nel GL; b): fibre positive nello strato più superficiale nelle zone, Dd, Dm, neuroni nelle zone Dm e Dc, neuroni e fibre positive nelle zone Vd, Vc e Vv.

**Tavola 4:** NGF

a): fibre nel talamo e lungo i nuclei VM e VL; b): neuroni e fibre positive nel nucleo Tpp e nei nuclei PGI e PGM, fibre nei TS; c): fibre nel CM, neuroni nel DIL; d): particolare dei neuroni del riquadro in (c); e): grandi neuroni al margine del nucleo PSm, piccoli neuroni e fibre nel nucleo PSp; f): fibre positive in tutti gli strati del tetto ottico e grandi neuroni fusiformi con prolungamenti.

**Tavola 5:** NGF

a): positività in cellule di Purkinje nel corpo (CCe) e nella valvola (Vam) del cervelletto; b): positività in cellule di Purkinje e nello strato granulare, in fibre al margine esterno nelle EG, in neuroni e fibre nel MON del midollo allungato.

**Tavola 6:** TrkA

a): fibre positive nel GL, piccoli neuroni positivi addensati nelle zone DI e Dm, sparsi in Dd, cellule intensamente positive al margine di Dm, Dd e DI; b): fibre e neuroni positivi raggruppati nella zona Dc, cellule positive seguite più internamente da una rete lassa di fibre sul margine delle zone Dm, Dd e DI, piccoli neuroni nelle zone Vd e Vv.

**Tavola 7:** TrkA

a): fibre positive nel Nln del tegmento, cellule positive allungate lungo la linea mediana dello strato molecolare del Cce; a<sup>1</sup>): particolare delle cellule positive nel Cce; a<sup>2</sup>): particolare di fibre nel Nln.

**Tavola 8:** NT-3

a-c): cellule di Purkinje, cellule e fibre nello strato molecolare del Cce e della Vam; b<sup>1</sup>): ingrandimento del riquadro in (b); c<sup>1</sup>): particolare dell'ingrandimento del riquadro in (c).

**Tavola 9:** TrkC

Cellule dei vasi intensamente reattive nel cervello di Zebrafish.

a): cellule positive sul margine ventricolare telencefalico; b): neuroni positivi nel PM; c): neuroni positivi nel PM e nel Ppp.

**Tavola 10:** NT-4

a) e b): fibre positive addensate nel GL e nelle zone Dm e Dd, cellule appiattite e uno strato di fibre positive sul margine delle zone Dm e Dd; c): fibre positive nel diencefalo particolarmente addensate nell'area preottica; d): particolare di (c); e): fibre positive nel nucleo PSp, nel TO e nel tegmento; f): fibre e cellule positive nel TO.

**Tavola 11:** NT-4

a): positività in fibre del TO, e in cellule del Purkinje; b) e c): positività in cellule del Purkinje e in fibre dello strato molecolare; c): fibre positive nel PC del midollo allungato.

**Tavola 12:** BDNF

a): neuroni positivi nella zona Dm, a) e b): cellule positive lungo tutto il ventricolo telencefalico; b): neuroni positivi sparsi nelle zone Vd e Vv, cellule positive nel sacco dorsale.

**Tavola 13:** BDNF

a): cellule positive lungo i margini del ventricolo diencefalico con prolungamenti; b): neuroni positivi nel nucleo SC, fibre positive nel VOT, nel nucleo VL, cellule positive nel SCO del sinencefalo.



**Tavola 14:** BDNF

a): neuroni nel nucleo CP, fibre intensamente positive nel VOT, cellule positive nel SCO del sinencefalo, fibre e cellule positive nel TO; b): strato molecolare e cellule del Purkinje positive nel CCe e nella Vam, cellule positive nel nucleo Hd e nel nucleo Hc, fibre nel TO, piccole cellule lungo il bordo del ventricolo mesencefalico (MV).

**Tavola 15:** BDNF

a): positività nello strato molecolare e delle cellule del Purkinje nel CCe e nella Vam, cellule alla base del nucleo Nln con lunghi processi che raggiungono il margine del ventricolo; a<sup>1</sup>, a<sup>2</sup>): particolare del riquadro in (a); b): positività nello strato molecolare e delle cellule del Purkinje e in fibre dell'IR e del MLF; b<sup>1</sup>): particolare del riquadro in (b).

**Tavola 16:** TrkB

a): fibre positive nel GL e nello strato POF, neuroni positivi nell' ECL; a<sup>1</sup>): particolare di (a); b) cellule positive con prolungamenti lungo le zone Dm, Dd, Dl, Dp, Vd e Vv; b<sup>1</sup>): cellule positive, allungate verso il parenchima al margine del ventricolo telencefalico ventrale; c): cellule positive lungo il ventricolo e nel SD; c<sup>1</sup>): particolare del SD.

**Tavola 17:** TrkB

a): fibre sparse nella zona ipotalamica Hc, cellule e neuroni nel TO, fibre positive nei nuclei oculomotore (NIII) e nei fascicoli NMLF e LLF; b): cellule positive in posizione mediale nello strato molecolare del CCe. b<sup>1</sup>): particolare di (b).

**Tavola 18:** BDNF/TrkB

Colocalizzazione in cellule delle zone Dl, Dd e Dm (a-a<sup>2</sup>); nelle zone Vd e Vv (b-b<sup>2</sup>); nelle fibre del VOT (c-c<sup>2</sup>); in cellule del TO (d-d<sup>2</sup>).

**Tavola 19:** TrkB/P<sub>0</sub>

Colocalizzazione in cellule positive del TO (a-a<sup>2</sup>) e nel fascicolo MLF (b-b<sup>2</sup>).

**Tavola 20:** BDNF/S100β

Colocalizzazione in cellule lungo il ventricolo telencefalico nelle zone Vd e Vv (a-a<sup>2</sup>); lungo le zone Dl e Dd (b-b<sup>2</sup>); lungo il ventricolo diencefalico (c-c<sup>2</sup>); nel ventricolo diencefalico e nell'SCO (d-d<sup>2</sup>).

**Tavola 21:** S100 $\beta$ /PCNA

Colocalizzazione in cellule del ventricolo telencefalico (a-a<sup>2</sup>); nel tratto dorsale del ventricolo diencefalico (b-b<sup>2</sup>); nel tratto ventrale del ventricolo diencefalico (c-c<sup>2</sup>); nel ventricolo romboencefalico (d-d<sup>2</sup>).

**Tavola 22:** BDNF/PCNA

Colocalizzazione in cellule delle zone Vd e Vv del telencefalo (a-a<sup>2</sup>); nelle zone DI e Dd (b-b<sup>2</sup>); lungo il ventricolo romboencefalico (c-c<sup>2</sup>).

**Tavola 23**

Colocalizzazione BDNF/S100 $\beta$  in neuroni con prolungamenti nel CP (a-a<sup>2</sup>); in cellule del TO (b-b<sup>5</sup>); colocalizzazione PCNA/S100 $\beta$  in cellule nel TO (c-c<sup>2</sup>); in cellule e fibre BDNF/S100 $\beta$  positive del ventricolo romboencefalico, in cellule con processi del nucleo NIn (d-d<sup>2</sup>), provvisti di prolungamenti.

**Tavola 24:** BDNF/*gfap:gfp*

(a-d): colocalizzazione in cellule sul margine del ventricolo telencefalico a diverso ingrandimento.

**Tavola 25:** BDNF/*gfap:gfp*

a, b): colocalizzazione in cellule e fibre sul margine del ventricolo diencefalico; (b-b<sup>5</sup>): colocalizzazione in cellule raggruppate nell'SCO con prolungamenti in TL; (b<sup>1</sup>-b<sup>5</sup>): ingrandimento di (b) con diversi piani focali della stessa area.

**Tavola 26:** BDNF/*gfap:gfp*

a): colocalizzazione in cellule del ventricolo romboencefalico e in cellule del NIn; b): particolare del prolungamento cellulare in (a); c): colocalizzazione in cellule del ventricolo romboencefalico.

**Tavola 27:** BDNF/*nestin:gfp*

a, b): colocalizzazione in cellule sul margine del ventricolo diencefalico; b): particolare di (a); c-e): colocalizzazione in cellule allineate sul margine del del ventricolo mesencefalico; f): cellule positive a BDNF nel TO.

# CAPITOLO 7

## DISCUSSIONI

Le neurotrofine sono fortemente conservate durante la filogenesi dei Vertebrati, specialmente per quanto riguarda il dominio C-terminale. Anche i loro specifici recettori Trks sono rimasti immutati nella gran parte dei Vertebrati. Tuttavia nei Teleostei si assiste ad una duplicazione dei geni (per una review vedi Benito-Gutierrez et al, 2006), per cui nello zebrafish (Martin et al., 1995) sono stati identificati cinque geni che codificano per i recettori Trk: uno per il recettore di tipo A e due per i recettori di tipo B e C. Probabilmente tale quadro è dovuto al fatto che uno dei geni duplicati per il TrkA si sia perso durante la linea evolutiva dei Teleostei.

Le considerazioni suddette portano a ritenere che gli anticorpi utilizzati nel presente lavoro, e che sono diretti contro le neurotrofine e recettori umani, possano riconoscere egregiamente le corrispettive proteine dello zebrafish, a causa dell'elevata identità molecolare.

### **Caratterizzazione immunochimica degli anticorpi**

Gli esperimenti di western blotting, realizzati impiegando anticorpi diretti contro le neurotrofine e i rispettivi recettori Trks, hanno rivelato l'espressione di tutte le proteine, seppur con gradienti di intensità molto variabili e differenti, nel sistema nervoso centrale di zebrafish. Nello specifico, l'anticorpo per l'NGF riconosce solo una banda corrispondente presumibilmente al proNGF, come è stato osservato in *N. furzeri* (D'Angelo et al., 2014) ma diversamente da quanto rilevato nel rene di goldfish e scorpionfish (Arcamone et al., 2005), in cui le bande avevano un peso stimato di 14 kDa, corrispondente alla forma matura. L'anticorpo per il BDNF riconosce due bande riconducibili alla forma immatura e matura. In particolare per il BDNF, i dati ottenuti sono parzialmente in accordo con i dati nella retina (Germanà et al., 2010) di zebrafish dove è stata ritrovata la sola forma matura e in totale accordo con i dati riportati per il cervello di altri teleostei, *Cichlasoma dimerus* (Vissio et al., 2008) e *Nothobranchius furzeri* (D'Angelo et al., 2014) dove viene riconosciuta solo una banda identificata come forma immatura. Gli anticorpi per l'NT-3 e l'NT-4 hanno entrambi indicato una banda di 30 kDa. Per l'NT-3 il valore corrisponde a quello della sequenza aminoacidica predetta (NCBI XP\_697445.5). In altri teleostei è stata identificata una sola banda di 15kDa nell'orecchio interno di *Salmo salar* (Catania et al., 2007) e 13,5 kDa nel rene di *Goldfish* e scorpionfish (Arcamone et al., 2005). I risultati ottenuti con l'anticorpo per l'NT-4 sono i primi che

vengono descritti in un teleosteo. Al momento non è ancora disponibile la sequenza aminoacidica di Zebrafish.

Per quanto riguarda il TrkA, l'anticorpo ha evidenziato una banda di circa 140 kDa, come riportato anche nei mammiferi (Qi et al., 2010), ed in altri teleostei (Lucini et al 1999; Catania et al., 2007). L'anticorpo per il TrkB ha mostrato una banda da 145 kDa, in accordo con quanto riportato per il cervello di zebrafish (Abbate et al., 2014). Infine, l'anticorpo per il TrkC ha evidenziato una banda con un peso di 145 kDa, analogamente a quanto osservato nel teleosteo *Salmo salar* (Catania et al., 2007).

Gli anticorpi utilizzati riconoscono sequenze comprese nel dominio catalitico di TrkA, TrkB e TrkC e, quindi, le proteine ottenute corrispondono alle isoforme complete di tali proteine.

I risultati dell'analisi del Wester blotting, unitamente a tutta la serie di controlli delle reazioni immunochimiche e immunocitochimiche, rafforzano ulteriormente le considerazioni fatte poc'anzi, ovvero che i risultati ottenuti nel presente studio siano adducibili realmente alla presenza di neurotrofine e recettori Trk nel cervello di zebrafish adulto.

Le reazioni immunocitochimiche su sezioni tramite gli anticorpi diretti contro NGF, BDNF, NT-4, NT-3, TrkA, TrkB e TrkC hanno evidenziato un'ampia e spesso intensa positività estesa in tutte le regioni del cervello di zebrafish. La positività è localizzata a livello neuronale, sia nel soma che nei dendriti/assoni, e anche a livello gliale. Tale localizzazione è stata determinata innanzitutto sulle basi delle caratteristiche morfologiche dei citotipi osservate microscopicamente a forte ingrandimento. Inoltre, quali markers per caratterizzare ulteriormente i diversi citotipi, sono stati utilizzati anticorpi diretti contro il PGP 9.5 e aldolase C rispettivamente per identificare in maniera generica neuroni (soprattutto fibre) e specificamente le cellule di Purkinje; un anticorpo diretto contro S100 $\beta$  per l'identificazione di cellule con caratteristiche gliali e staminali e un anticorpo diretto contro P0 per l'identificazione di oligodendrociti. Infine la natura gliale/staminale di alcune cellule positive al BDNF è stata ulteriormente dimostrata dall'impiego di zebrafish transgenici per il GFAP e la nestina.

### **Localizzazione neuronale della neurotrofina e relativo recettore**

#### NGF/TrkA

L'NGF nel cervello di zebrafish è presente in fibre e soma neuronali diffusi in aree e nuclei appartenenti a tutte le regioni encefaliche. Quest'ampia distribuzione è in accordo con quanto riportato precedentemente nel *Carassius* (Benowitz and Shashoua, 1979) e in *N. furzeri* (D'Angelo

et al., 2012). Specificamente nei mammiferi l'NGF è risultato elevato in estratti di cervello (Hoener et al., 1996), e presente in tutte le regioni (Shelton e Reichardt 1986), anche se i suoi livelli, differenti tra le diverse regioni, risultano con la più alta concentrazione nelle aree corticali (Shelton e Reichardt 1986; Sakamoto et al., 1998). Anche la localizzazione tissutale di mRNA (Shelton e Reichardt, 1986) e della proteina (Nishio et al., 1992) nei ratti è ampiamente distribuita, ma la più alta intensità è riportata nella neocorteccia, nello strato piramidale dell'ippocampo e nello striato (Gall e Isackson, 1989; Rylett e Williams, 1994). I dati ottenuti in zebrafish, analogamente a quanto riportato in *N. furzeri* (D'Angelo et al., 2012), non evidenziano una maggiore concentrazione nelle zone prosencefaliche così come indicato nei mammiferi.

Il TrkA è presente in numerose fibre diffuse in tutto l'encefalo e in soma neuronali localizzati nel prosencefalo, precisamente nel telencefalo dorsale e ventrale e nei nuclei preglomerulare laterale e periventricolare ventrale del diencefalo. La presenza del TrkA è stata riportata in *zebrafish* a pochi giorni dalla nascita (Martin et al., 1995), e nel cervello di *Dicentrarchus labrax* (Hannestad et al., 2000), ma una dettagliata descrizione anatomica è stata fatta solo per la distribuzione del TrkA in *N. furzeri* (D'Angelo et al., 2012), in cui, similmente allo zebrafish, tale proteina appare limitata nei distretti anteriori, ovvero nel telencefalo e nel nucleo corticale del diencefalo.

L'NGF e il TrkA talora appaiono distribuiti in neuroni della stessa zona o nucleo, come per es. in neuroni del telencefalo dorso-mediale e dorso-centrale e nei n. preglomerulari laterale e mediale. Inoltre, nel complesso pineale, la positività all'NGF è stata rilevata soprattutto nelle cellule della parete del sacco dorsale e la positività al TrkA nelle cellule del peduncolo. Tali quadri di distribuzione fanno ipotizzare che l'NGF in alcuni distretti possa agire in maniera locale, paracrina, se non addirittura autocrina.

### NT-3/TrkC

La NT-3 è in generale poco espressa e diffusa nel cervello di zebrafish, ma nel cervelletto è fortemente concentrata nelle cellule di Purkinje e nello strato molecolare. In *N. furzeri* l'mRNA per l'NT-3 risulta completamente assente e anche la proteina è molto poco espressa. Nei roditori l'mRNA per l'NT-3 è presente nel cervello di feti a tutti gli stadi di sviluppo e anche nell'adulto (per una review vedi Chalazonitis, 1996), mentre in cervello di ratti adulti, l'espressione dell'NT-3 è limitata prevalentemente alla formazione dell'ippocampo e al cervelletto (Maisonpierre et al., 1990; Ceccatelli et al., 1991; Friedman et al., 1991; Lauterborn et al., 1994). Al contrario, Zhou et al (1993) hanno riportato la presenza di NT-3 sia in neuroni che nella glia, con la più alta intensità di immunoreattività nella corteccia, ippocampo e cervelletto.

Il TrkC presenta una distribuzione ancora più limitata della NT-3, essendo presente in soma neuronali e fibre dei nuclei preottici parvocellulare posteriore e magnocellulare. Tale localizzazione è in accordo con le osservazioni condotte in *N. furzeri*, nel quale tuttavia il TrkC appare maggiormente distribuito.

#### BDNF, NT-4/TrkB

La neurotrofina BDNF è localizzata in fibre ampiamente diffuse e in soma neuronali osservabili nel prosencefalo: nel telencefalo dorsale e ventrale, nell'area preottica e nel talamo dorsale e ventrale del diencefalo. La NT-4 è diffusa soprattutto in fibre disperse in tutte le regioni encefaliche, ma non in soma neuronali, tranne nel caso delle cellule di Purkinje, che risultano intensamente positive in tutto il cervelletto. Pertanto, BDNF e NT-4 presentano una distribuzione nel cervello di zebrafish dissimile, nonostante la somiglianza molecolare dovuta alla provenienza dallo stesso gene ancestrale, e l'analogia funzionale, dal momento che agiscono attraverso lo stesso recettore TrkB. Nei mammiferi i livelli di NT-4 sembrano piuttosto bassi (Katoh-Semba et al., 2003; Timmusk et al., 1993), nonostante siano stati notati cambiamenti significativi con l'età, diminuendo intorno alla nascita e aumentando con il procedere dello sviluppo postnatale (Katoh-Semba et al., 2003).

Il TrkB è presente in numerose fibre ampiamente distribuite in tutte le regioni encefaliche, mentre non sono stati osservati soma neuronali ad eccezione di quelli dello strato cellulare esterno del bulbo olfattorio e delle zone centrale e superficiale bianca e grigia del tetto ottico.

Nel complesso pineale il BDNF appare altamente concentrato nelle cellule del sacco dorsale e che avvolge il peduncolo con cellule intensamente positive al TrkB. Tale distribuzione è analoga a quella osservata per l'NGF e il TrkA. Quindi, similmente a quanto affermato precedentemente per NGF/TrkA, anche per il BDNF/TrkB si può ipotizzare un'azione paracrina della neurotrofina, contenuta nelle cellule del sacco dorsale, e il recettore corrispettivo presente nelle cellule che compongono il peduncolo.

In altre specie di pesci teleostei l'mRNA per il BDNF è apparso ampiamente espresso e distribuito (Dalton et al., 2009; D'Angelo et al., 2012). I dati riguardanti la proteina BDNF presentano invece notevoli variazioni di specie. In *Cichlasoma dimerus* (Vissio et al., 2008) il BDNF appare limitato all'ipotalamo e al tetto ottico mentre in *N. furzeri* è diffuso in numerosi nuclei di tutte le regioni encefaliche. In zebrafish sono stati evidenziati diversi nuclei contenenti neuroni BDNF positivi ma, anche utilizzando le stesse metodiche e lo stesso anticorpo, in numero minore rispetto ad *N. furzeri*. Per quanto riguarda la presenza del TrkB, i nostri dati sono in accordo con quelli di Abbate et al., (2014), ma nel corso di questo studio sono stati osservati neuroni positivi anche nei bulbi olfattori e nel tetto ottico.

### Neurotrofine/recettori in neuroni: riepilogo

In definitiva, nei neuroni del cervello di zebrafish l'NGF è la neurotrofina più presente, la NT-3 la meno presente. Analogamente, il TrkA, recettore specifico dell'NGF, è quello più diffuso e il TrkC, recettore della NT-3, il meno diffuso. Le neurotrofine BDNF, NT-4 e NT-3 e i loro rispettivi recettori TrkB e TrkC sono quindi localizzati in specifiche aree limitate, ma laddove presenti la loro concentrazione è senz'altro elevata, come si evince dall'intensità di reazione

### **Localizzazione non-neuronale**

Tutte le neurotrofine e i loro i recettori presentano, oltre alla localizzazione neuronale previamente descritta, anche una localizzazione non neuronale.

A livello dei vasi sono presenti la NT-3 e soprattutto il TrkC. Questo tipo di localizzazione è stato riportato anche nei mammiferi: nel ratto il TrkC è fortemente espresso nelle cellule endoteliali dei vasi cerebrali e si è visto che l'NT-3 inibisce la proliferazione delle cellule endoteliali e stimola l'espressione di NO (Takeo et al., 2003). Inoltre, uno studio in vitro, ha documentato, in risposta a situazioni di ipossia un aumento notevole di NT-3 da parte dei periciti, i quali inducono la produzione di NGF dagli astrociti tramite la via TrkC/Erk1/2 (Ishitsuka et al., 2012).

Osservando soprattutto sezioni trasversali dei tratti, come per es i tratti longitudinali mediale e laterale, il TrkB appare localizzato a livello della mielina. Ulteriore conferma di tale localizzazione si è avuta tramite l'impiego di P<sub>0</sub>, un marcatore degli oligodendrociti, che appare co-localizzato con il TrkB. Tali dati confermerebbero anche per lo zebrafish il coinvolgimento del BDNF nel processo di mielinizzazione. Infatti, studi condotti su topi con deplezione totale o parziale del gene per il BDNF (Cellerino et al., 1997; Djalali et al., 2005; VonDran, 2011) e per il TrkB (Wong et al., 2013) hanno evidenziato ipomielinizzazione in molte regioni del CNS. Tali dati ulteriormente dimostrati da studi in vitro (Xiao et al., 2010), confermano l'azione del BDNF, modulata dal recettore TrkB, sulle cellule progenitrici degli oligodendrociti e quindi sui processi di avvolgimento di quest'ultimi. Nella regione mediale dello strato molecolare del corpo del cervelletto si possono distinguere cellule allungate, positive al BDNF, al TrkA e al TrkB, che attraversano l'intero spessore dello strato. Queste cellule sono situate in corrispondenza di una nicchia neurogenica in cui sono presenti cellule progenitrici di cellule granulari e di cellule gliali Bergmann-like (Kaslin et al., 2009) nonché cellule della glia radiale che fungono da impalcatura per la migrazione delle cellule progenitrici (per una review vedi Zupanc e Sîrbulescu, 2011).

Infine la localizzazione non neuronale più comune delle neurotrofine e recettori Trk è quella che si osserva in cellule lungo i ventricoli. E' da notare che cellule diversamente immunoreattive non sono ugualmente distribuite lungo i ventricoli delle diverse regioni encefaliche. Il pattern di distribuzione di queste cellule può essere così riassunto: a) ventricolo telencefalico, cellule positive al: TrkA, NT-3, TrkC, BDNF, NT-4 e TrkB; b) ventricolo diencefalico, cellule positive al: BDNF; c) ventricolo mesencefalico, regione più interna dello strato periventricolare grigio del tetto ottico, cellule positive al: NGF, TrkA, NT-3, BDNF, NT-4, TrkB; d) ventricolo mesencefalico, margine del tegmento, cellule positive al: BDNF; e) ventricolo romboencefalico, cellule positive al: TrkA, BDNF. La distribuzione differenziata dimostra che l'immunoreattività non è dovuta a legami aspecifici tra gli anticorpi impiegati e molecole presenti in queste cellule. Si può pertanto ipotizzare l'influenza di ciascuna neurotrofina come rivolta a specifiche regioni ventricolari, più o meno estese. Tale considerazione è in linea con i più recenti dati riguardo ad una profonda diversificazione di ambienti delle diverse nicchie neurogeniche del telencefalo di zebrafish, identificate sia in base all'espressione di marcatori (Lam et al., 2009; Marz et al., 2010) sia in base a criteri morfologici (Lindsey et al., 2012).

La quasi totalità delle cellule positive presenti lungo il margine dei ventricoli spesso hanno una morfologia ascrivibile a quella della "glia radiale" (v. introduzione) per il loro aspetto di cellula bipolare, il cui corpo cellulare risiede verso la parete ventricolare mentre il lungo processo raggiunge la superficie piaie. Per queste cellule sono state usate anche i termini di taniciti e ependimociti (Cuoghi e Mola, 2009). Solo lungo il margine ventricolare del telencefalo dorsale, alcune cellule positive sottili sono ascrivibili a cellule ependimali, le quali delimitano come è noto la sola parete dorsale del ventricolo telencefalico e il margine dorsale e mediale del telencefalo dorsale, mancando invece nelle altre zone ventricolari (Schmidt et al., 2013).

Tutte le zone periventricolari sono state descritte come zone proliferative e neurogeniche (Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006), e sono caratterizzate da cellule della glia radiale che possono dare luogo sia a neuroni che a cellule gliali e che presentano diverse proprietà a seconda della nicchia di appartenenza (for a review see Grandel e Brand, 2013, Lindsey et al., 2012). Quindi, la presenza delle neurotrofine e dei loro recettori in queste regioni conduce a considerare un loro coinvolgimento nei processi di neurogenesi adulta. Tale ipotesi è largamente supportata da numerose prove sperimentali nei roditori, soprattutto per quanto riguarda il BDNF. Infatti, mentre il ruolo dell'NGF e della NT-3 nella neurogenesi presenta dati discordanti, il BDNF appare chiaramente coinvolto nella sopravvivenza, proliferazione (in questo caso tramite il recettore p75 e le forme troncate di TrkB) e migrazione dei neuroblasti. Infine, il BDNF, secondo un'ipotesi per lo meno entusiasmante, potrebbe regolare la sopravvivenza selettiva dei neuroblasti attraverso



un rilascio dipendente dall'attività dei neuroni di proiezione (per una review vedi Bath e Lee, 2010; Bath et al., 2011).

Le cellule BDNF positive situate lungo i ventricoli sono risultate spesso anche S100 $\beta$  positive. Come è stato visto precedentemente, l'S100 $\beta$  è un marcatore della glia dell'encefalo di zebrafish (Germanà et al., 2008) e di altre specie di teleostei (D'Angelo et al., 2012). E' altresì un marcatore di molte cellule progenitrici dell'encefalo di zebrafish (per una review vedi Schmidt et al., 2013). Quindi, la maggior parte delle cellule BDNF positive può essere ascritta, oltre che sulla base di criteri morfologici, alla popolazione delle cellule della glia radiale per la presenza di S100 $\beta$ .

Tuttavia, in generale, solo una percentuale di cellule S100 $\beta$  positive presenta colocalizzazione con il BDNF. Questo dato fa ritenere che il BDNF sia presente in specifici momenti funzionali delle cellule della glia radiale o, considerando anche le numerose diversificazioni che tali cellule presentano (Adolf et al., 2006; Marz et al., 2010; Lindsey et al., 2012), in una o alcune sottopopolazioni delle cellule S100 $\beta$  positive.

In particolare nel telencefalo, sul margine dell'area dorso-laterale e dorso-dorsale il BDNF appare localizzato soprattutto nelle cellule morfologicamente ascrivibili a cellule ependimali, le quali formano un epitelio pavimentoso al di sotto del quale vi sono cellule S100 $\beta$  positive. In tale area è stata descritta una zona neurogenica con basso tasso di mitosi (Adolf et al., 2006; Marz et al., 2010). Quindi la presenza di BDNF in cellule che delimitano nicchie neurogeniche, ma non nelle cellule progenitrici, porta a ipotizzare un suo coinvolgimento nella modulazione dell'ambiente. Inoltre, sul margine del telencefalo dorso-mediale, ventro-dorsale e ventro-ventrale sono state evidenziate alcune cellule in cui BDNF è colocalizzato con PCNA e pertanto attivamente proliferanti. Inoltre, in tutta quest'area sono state osservate cellule S100 $\beta$ /PCNA positive, confermando la presenza di numerose cellule progenitrici in elevata proliferazione (Adolf et al., 2006; Marz et al., 2010).

Altri marcatori importanti delle cellule gliali e/o progenitrici sono il GFAP e la nestina. Mediante l'uso di zebrafish transgenici per tali sostanze (Lam et al., 2009), l'immunoreattività al BDNF è risultata localizzata lungo i ventricoli in cellule nestina positive e soprattutto GFAP positive. Poiché tali risultati sono stati ottenuti mediante singola immunoreazione su zebrafish transgenici, si esclude totalmente la possibilità di eventuali legami aspecifici tra le due catene di immunoglobuline di una doppia marcatura. Essi pertanto confermano, senza ombra di dubbio, la presenza del BDNF in cellule progenitrici periventricolari del cervello di zebrafish.

## **Conclusioni....e future prospettive**

Dai risultati della presente ricerca si evince un quadro ampio e piuttosto approfondito della presenza e distribuzione delle neurotrofine e dei loro specifici recettori Trk nel cervello di zebrafish adulto. Si è visto che la loro localizzazione è riconducibile a numerosi citotipi dell'encefalo: neuroni, cellule perivasali, oligodendrociti, cellule della glia radiale e cellule progenitrici. Inoltre, la diversa localizzazione cellulare di tali proteine suggerisce anche diverse modalità di azione e trasporto. Le innumerevoli fibre positive indicherebbero un trasporto retrogrado, secondo la teoria classica riguardante le neurotrofine, ma anche un trasporto anterogrado, così come suggerito più recentemente per il proNGF (Guo et al., 2012) e BDNF (Conner et al 1997). Ancora, la distribuzione cellulare delle neurotrofine e dei relativi recettori spesso suggerisce una modalità di azione paracrina e/o autocrina.

Particolarmente per l'NGF e il BDNF, nel cervello di zebrafish adulto sono presenti i precursori di entrambi e la forma matura del solo BDNF. Dalla letteratura si è visto che i precursori e le forme mature, tramite diversi tipi di recettori, possono agire con esiti diversi, di morte o di sopravvivenza. La forma matura di BDNF stimola il TrkB per ottenere un segnale trofico, mentre il proBDNF, tramite il recettore p75, media un segnale apoptotico (per una review vedi Skaper 2008). Il proNGF segnala un'azione trofica attraverso un complesso TrkA-p75 e un segnale di apoptosi tramite il complesso p75-sortilina (per una review vedi Niewiadomska et al 2011). Quindi, supponendo anche nello zebrafish una modalità di segnalazione simile a quella mammiferi, dovremmo ipotizzare che i quadri distributivi di positività all'NGF/TrkA e BDNF/TrkB si riferiscano a segnalazioni trofiche, ma che possano esistere anche segnalazioni apoptotiche non ancora indagate. Infine, gli anticorpi impiegati contro i recettori Trk sono rivolti verso il dominio intracitoplasmatico tirosin chinasi. Studi in vitro indicano che soprattutto le forme troncate dei recettori Trk sono espressi nelle cellule nervose staminali, suggerendo così che il BDNF possa agire sulle cellule staminali soprattutto tramite recettori TrkB troncati (Islam et al 2009). Si potrebbe ipotizzare così che nel cervello di zebrafish adulto, a fianco di una forte espressione di BDNF e di una parziale espressione di TrkB nelle nicchie neurogeniche, vi sia anche una presenza non ancora indagata di recettori TrkB troncati.

Concludendo, le neurotrofine nel cervello di zebrafish adulto sembrano influenzare con diversi meccanismi le diverse fasi della neurogenesi, dai precursori a neuroni e cellule gliali differenziate, nonché l'ambiente delle nicchie neurogeniche. E' quindi un materiale prezioso per ulteriori eccitanti approfondimenti.

## BIBLIOGRAFIA

- Adolf B., Chapouton P., Lam CS., Topp S., Tannhäuser B., Strähle U., Götz M. Bally-Cuif L. (2006). Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev Biol.*; 295(1):278-93.
- Aloyz RS., Bamji SX., Pozniak CD., Toma JG., Atwal J., Kaplan DR., Miller FD. (1998). p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol.*; 143(6):1691-703.
- Altman J., Das GD. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.*; 124(3):319-35.
- Altman J. (1966). Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol.*; 16(3):263-78.
- Altman J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.*; 137(4):433-57.
- Anthony T.E., Klein C., Fishell G., Heintz N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron.*; 41(6):881-90.
- Arcamone N., Lucini C., Borzacchiello G., Castaldo L., Gargiulo G., de Girolamo P. (2005). Distribution of NGF and NT-3-like protein immunoreactivity in the teleost kidney. *Microsc Res Tech.*; 66(1):17-24.
- Balkowiec A., Katz DM. (2000). Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J Neurosci.*; 20(19):7417-23.
- Bandmann O., Burton EA. (2010). Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis.*; 40(1):58-65. Review.

- Barde YA., Edgar D., Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.*; 1(5):549-53.
  
- Barker PA., Shooter EM. (1994). Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron.*; 13(1):203-15.
  
- Barman R.P. (1991) A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio* Hamilton-Buchanan (Pisces, Cyprinidae). *Rec. Zool. Surv. India Occas. Pap.* Vol. 137.
  
- Bath KG., Lee FS. (2010). Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Neurobiol.*; 70(5):339-49. Review.
  
- Bath KG., Mandairon N., Jing D., Rajagopal R., Kapoor R., Chen ZY., Khan T., Proenca CC., Kraemer R., Cleland TA., Hempstead BL., Chao MV., Lee FS. (2011). Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J Neurosci.*; 28(10):2383-93.
  
- Battelli C., Nikopoulos GN., Mitchell JG., Verdi JM. (2006). The RNA-binding protein Musashi-1 regulates neural development through the translational repression of p21WAF-1. *Mol Cell Neurosci.*; 31(1):85-96.
  
- Benito-Gutiérrez E., Garcia-Fernández J., Comella JX. (2006). Origin and evolution of the Trk family of neurotrophic receptors. *Mol Cell Neurosci.*; 31(2):179-92. Review.
  
- Berkemeier LR., Ozçelik T., Francke U., Rosenthal A. (1992). Human chromosome 19 contains the neurotrophin-5 gene locus and three related genes that may encode novel acidic neurotrophins. *Somat Cell Mol Genet.*; 18(3):233-45.
  
- Berkemeier LR., Winslow JW., Kaplan DR., Nikolics K., Goeddel DV., Rosenthal A. (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron.*;7(5):857-66.

- Bonhoeffer T. (1996). Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol.*; 6(1):119-26.
- Braford MR. jr., Northcutt RG. (1983). Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. *In: Davis RE. Northcutt RG (eds): Fish Neurobiology, Vol. 2 Higher and the Ret receptor tyrosine kinase. Nature.*; 387: 721-724.
- Breunig JJ, Macklis JD, Pakic P. (2007). Evolving methods for the labeling and mutation of postnatal neuronal precursor cells: a critical review. *In Adult neurogenesis*, F.H. Gage, G. Kempermann, and S. Hongjun, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 49–80.
- Brown JP., Couillard-Despres S., Cooper-Kuhn C.M., Winkler J., Aigner L., Kuhn H.G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.*; 467(1):1–10.
- Campbell K., Götz M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.*; 25(5):235–8.
- Canossa M., Griesbeck O., Berninger B., Campana G., Kolbeck R., Thoenen H. (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 94(24):13279-86.
- Castrén E., Rantamäki T. (2010). The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol.*; 70(5):289-97.
- Catania S., Germanà A., Cabo R., Ochoa-Erena FJ., Guerrero MC., Hannestad J., Represa J., Vega JA. (2007). Neurotrophin and Trk neurotrophin receptors in the inner ear of *Salmo salar* and *Salmo trutta*. *J Anat.*; 210(1):78-88.
- Ceccarelli S., Ernfors P., Villar MJ., Persson H., Hökfelt T. (1991). Expanded distribution of mRNA for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the rat brain after colchicine treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 88(22):10352-6.

- Cellerino A., Carroll P., Thoenen H., Barde YA. (1997). Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci.* ;9(5-6):397-408.
- Chalazonitis A. (1996). Neurotrophin-3 as an essential signal for the developing nervous system. *Mol Neurobiol.*; 12(1):39-53. Review.
- Chao MV. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.*; 4(4):299-309.
- Chapouton P., Adolf B., Leucht C., Tannhäuser B., Ryu S., Driever W., Bally-Cuif L. (2006). Her5 expression reveals a pool of neural stem cells in the adult zebrafish midbrain. *Development.*; 133 (21):4293–4303.
- Chapouton P., Jagasia R., Bally-Cuif L. (2007). Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *Bioessays.*; 29(8):745-57.
- Chen ZY., Jing D., Bath KG., Ieraci A., Khan T., Siao CJ., Herrera DG., Toth M., Yang C., McEwen BS., Hempstead BL., Lee FS. (2006). Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science.*; 314(5796):140-3.
- Connor B., Dragunow M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev.*; 27(1): 1-39. Review.
- Couillard-Despres S., Winner B., Schaubeck S., Aigner R., Vroemen M., Weidner N., Bogdahn U., Winkler J., Kuhn H.G., Aigner L. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.*; 21(1):1-14.
- Cuoghi B., Mola L. (2009). Macroglial cells of the teleost central nervous system: a survey of the main types. *Cell Tissue Res.*; 338(3):319-32.
- Dalton VS., Borich SM., Murphy P., Roberts BL. (2009). Brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the brain of the teleost fish, *Anguilla anguilla*, the European Eel. *Brain Behav Evol.*; 73(1):43-58.

- D'Angelo L., de Girolamo P., Cellerino A., Tozzini ET., Castaldo L., Lucini C. (2012). Neurotrophin Trk receptors in the brain of a teleost fish, *Nothobranchius furzeri*. *Microsc Res Tech.*; 75(1):81-8.
- D'Angelo L., De Girolamo P., Lucini C., Terzibasi ET., Baumgart M., Castaldo L., Cellerino A. (2014). Brain-derived neurotrophic factor: mRNA expression and protein distribution in the brain of the teleost *Nothobranchius furzeri*. *J Comp Neurol* Apr.; 522(5):1004-30.
- Davies AM. (1994). The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiol.*; 25(11):1334-48.
- Del Bene F., Wehman AM., Link BA., Baier H.(2008): Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell.*; 134(6): 1055–65.
- Djalali S., Hölting M., Grosse G., Rothe T., Stroh T., Grosse J., Deng DR., Hellweg R., Grantyn R., Hörtnagl H., Ahnert-Hilger G. (2005). Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *J Neurochem.*; 92(3):616-27.
- Dobrowsky RT., Jenkins GM., Hannun YA. (1995). Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem.* ; 270(38):22135-42.
- Donato R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EFhand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J Biochem Cell Biol.*; 33(7):637–68.
- Echteler SM. (1984). Connections of the auditory midbrain in a teleost fish, *Cyprin carpio*. *J Comp Neurol.*; 230: 536-551.
- Egan MF., Weinberger DR., Lu B. (2003). Schizophrenia, III: brain-derived neurotrophic factor and genetic risk. *Am J Psychiatry.*; 160(7):1242.

- Eide FF., Lowenstein DH., Reichardt LF. (1993). Neurotrophins and their receptors-current concepts and implications for neurologic disease. *Exp Neurol.*; 121(2):200-14. Review.
- Emlen JM. (1973). Ecology: an evolutionary approach. *Addison-Wesley New York; Reading, Mass.* pp. 493.
- Ernest S., Rauch G.J., Haffter P., Geisler R., Petit C., Nicolson T. (2000). Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness. *Hum. Mol. Genet.*; 9: 2189-2196.
- Frade JM., Barde YA. (1998). Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron.*; 20(1):35-41.
- Friedman WJ., Olson L., Persson H. (1991). Temporal and spatial expression of NGF receptor mRNA during postnatal rat brain development analyzed by in situ hybridization. *Brain Res Dev Brain Res.*; 63(1-2):43-51.
- Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science.*; 287(5457); 1433–8.
- Gall MC., Isackson PJ. (1989). Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science.*; 245(4919):758-61.
- Ganz J., Kaslin J., Hochmann S., Freudenreich D., Brand M. (2010). Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon. *Glia.*; 58 (11):1345–1363.
- Garofalo L., Ribeiro-da-Silva A., Cuello AC. (1992). Nerve growth factor-induced synaptogenesis and hypertrophy of cortical cholinergic terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 89(7):2639-43.
- Germanà A., Sánchez-Ramos C., Guerrera MC., Calavia MG., Navarro M., Zichichi R., García-Suárez O., Pérez-Piñera P., Vega JA. (2010). Expression and cell localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB during zebrafishretinal development. *J Anat.*; 217(3):214-22.



- Gleeson JG., Allen KM., Fox JW., Lamperti ED., Berkovic S., Scheffer I., Cooper EC., Dobyns WB., Minnerath SR., Ross ME., Walsh CA. (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell.*, 92(1):63–72.
- Goldman SA., Nottebohm F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 80(8):2390-4.
- Gotz M., Hartfuss E., Malatesta P. (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res.Bull.*; 57(6): 777–88.
- Götz R., Köster R., Winkler C., Raulf F., Lottspeich F., Scharl M., Thoenen H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.*; 372(6503): 266-9.
- Grandel H., Kaslin J., Ganz J., Wenzel I., Brand M. (2006). Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.*; 295(1): 263–277.
- Grandel H., Brand M. (2013). Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Dev Genes Evol.*; 223(1-2):131-47.
- Griesbeck O., Canossa M., Campana G., Gärtner A., Hoener MC., Nawa H., Kolbeck R., Thoenen H. (1999). Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc Res Tech.*; 45(4-5):262-75.
- Halban PA., Irminger JC. (1994). Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem J.*; 299(Pt 1):1-18.
- Hallböök F. (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol.*; 9 (5):616-21.

- Hallböök F., Ibáñez CF., Persson H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.*; 6(5):845-58.
- Hallböök F., Wilson K., Thorndyke M., Olinski RP. (2006). Formation and evolution of the chordate neurotrophin and Trk receptor genes. *Brain Behav Evol.*; 68(3):133-44. Review.
- Hamanoue M., Middleton G., Wyatt S., Jaffray E., Hay RT., Davies AM. (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci.*; 14(1):28-40.
- Han YG., Spassky N., Romaguera-Ros M., García-Verdugo JM., Aguilar A., Schneider-Maunoury S., Alvarez-Buylla A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci.*; 11 (3):277–84.
- Hannestad J., Marino F., Germanà A., Catania S., Abbate F., Ciriaco E., Vega JA. (2000). Trk neurotrophin receptor-like proteins in the teleost *Dicentrarchus labrax*. *Cell Tissue Res.*; 300(1):1-9.
- Harter C., Reinhard C. (2000). The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell Biochem.*; 34:1-38.
- Hartmann M., Heumann R., Lessmann V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.*; 20(21):5887-97.
- Herrick CJ. (1948). *The brain of the Tiger Salamander Ambystoma tigrinum*. Chicago: University of Chicago Press.
- Hoener MC., Hewitt E., Conner JM., Costello JW., Varon S. (1996). Nerve growth factor (NGF) content in adult rat brain tissues is several-fold higher than generally reported and is largely associated with sedimentable fractions. *Brain Res.*; 728(1):47-56.

- Hohn A., Leibrock J., Bailey K., Barde YA. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature.*; 344(6264):339-41.
- Hökfelt T., Broberger C., Xu ZQ., Sergejev V., Ubink R., Diez M. (2000). Neuropeptides-an overview. *Neuropharmacology.*; 39(8):1337-56.
- Huang EJ., Reichardt LF. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.*; 72:609-42. Review.
- Ibáñez CF. (1995). Neurotrophic factors: from structure-function studies to designing effective therapeutics. *Trends Biotechnol.*; 13(6):217-27.
- Ip NY., Ibáñez CF., Nye SH., McClain J., Jones PF., Gies DR., Belluscio L., Le Beau MM., Espinosa R.3rd, Squinto SP., Persson H., Yancopoulos GD. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 89(7):3060-4.
- Ishitsuka K., Ago T., Arimura K., Nakamura K., Tokami H., Makihara N., Kuroda J., Kamouchi M., Kitazono T. (2012). Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: a role of pericytes for neuroprotection. *Microvasc Res.*; 83(3):352-9.
- Ito Y., Tanaka H., Okamoto H., Ohshima T. (2010). Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Dev Biol.*; 342:26–38.
- Itoh M., Kim CH., Palardy G., Oda T., Jiang YJ., Maust D., Yeo SY., Lorick K., Wright GJ., Ariza-McNaughton L., Weissman AM., Lewis J., Chandrasekharappa SC., Chitnis AB. (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell.*; (1):67–82.
- Jacobi S., Soriano J., Moses E. (2010). BDNF and NT-3 increase velocity of activity front propagation in unidimensional hippocampal cultures. *J Neurophysiol.*; 104(6):2932-9.

- Kaplan MS., Hinds JW. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*; 197(4308):1092-4.
- Kaplan DR., Miller FD. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.*; 10(3):381-91.
- Kaslin J., Ganz J., Geffarth M., Grandel H., Hans S., Brand M. (2009). Stem Cells in the Adult Zebrafish Cerebellum: Initiation and Maintenance of a Novel Stem Cell Niche. *The Journal of Neuroscience.*, 29(19):6142– 6153.
- Katoh-Semba R., Ichisaka S., Hata Y., Tsumoto T., Eguchi K., Miyazaki N., Matsuda M., Takeuchi I.K., Kato K. (2003). NT-4 protein is localized in neuronal cells in the brain stem as well as the dorsal root ganglion of embryonic and adult rats. *J. Neurochem.*; 86(3):660-8.
- Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.*; 32:149-84.
- Kroehne V., Freudenreich D., Hans S., Kaslin J., Brand M. (2011): Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development.*; 138 (22): 4831–4841.
- Kurki P., Vanderlaan M., Dolbeare F., Gray J., Tan EM. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res.*; 166(1):209-19.
- Lai KO., Fu WY., Ip FC., Ip NY. (1998) Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci.*; 11(1-2):64-76.
- Lam CS., Marz M., Strahle U. (2009). *gfap* and *nestin* Reporter Lines Reveal Characteristics of Neural Progenitors in the Adult Zebrafish Brain. *Developmental Dynamics.*; 238:475–486.
- Lanave C., Colangelo AM., Saccone C., Alberighina L. (2007). Molecular evolution of the neurotrophin family members and their Trk receptor. *Gene.*; 394(1-2):1-12.

- Lauterborn JC., Isackson PJ., Gall CM. (1994). Cellular localization of NGF and NT-3 mRNAs in postnatal rat forebrain. *Mol Cell Neurosci.*; 5(1):46-62.
- Lee FS., Kim AH., Khursigara G., Chao MV. (2001). The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol.*; 11(3):281-6.
- Lendahl U., Zimmerman LB., McKay RDG. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.*; 60(4):585-95.
- Levi-Montalcini R., Meyer H., Hamburger V. (1985). In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res.*; 45(1):49-57.
- Levi-Montalcini R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science.*; 237(4819):1154-62.
- Levi-Montalcini R., Skaper SD., Dal Toso R., Petrelli L., Leon A. (1996). Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends neurosc.*; 19(11):514-20. Review.
- Lewin GR., Barde YA. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.*; 19:289-317.
- Lieschke GJ., Currie PD. (2007). Animal model of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.*; 8(5):353-67.
- Lindsay RM. (1996). Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; 351(1338):365-73.
- Lindsey BW., Darabie A., Tropepe V. (2012). The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *J Comp Neurol.* ; 520(10):2275-316.
- Lindvall O., Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Smith ML., Siesjö BK., Persson H. (1992). Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic

- factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 89(2):648-52.
- Lisman JE., Harris KM. (1993). Quantal analysis and synaptic anatomy--integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends Neurosci.*; 16(4):141-7.
  - Lothian C., Lendahl U. (1997). An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur J Neurosci.*; 9(3):452-62.
  - Lucini C., de Girolamo P., Maruccio L., Lamanna C., Castaldo L., Vega JA. (1999). Trk-neurotrophin receptor-like immunoreactivity in the gut of teleost species. *Cell Tissue Res.*; 296(2):323-30.
  - Lyons WE., Mamounas LA., Ricaurte GA., Coppola V., Reid SW., Bora SH., Wihler C., Koliatsos V.E., Tessarollo L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96(26):15239-44.
  - Machold R., Hayashi S., Rutlin M., Muzumdar MD., Nery S., Corbin JG., Gritti-Linde A., Dellovade T., Porter JA., Rubin LL., Dudek H., McMahon AP., Fishell G. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron.*; 39(6):937-50.
  - Maggirwar SB., Sarmiere PD., Dewhurst S., Freeman RS. (1998). Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci.*; 18(24):10356-65.
  - Malatesta P., Hartfuss E., Götz M. (2000). Isolation of radial glial cell by fluorescent-activated cell sorting reveals neuronal lineage. *Development.*; 127(24): 5253-63.
  - Marenholz I., Heizmann CW., Fritz G. (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.*; 322(4):1111-22.

- Martin SC., Marazzi G., Sandell JH., Heinrich G. (1995). Five Trk receptors in the zebrafish. *Dev Biol Jun.*; 169(2):745-58.
- März M., Chapouton P., Diotel N., Vaillant C., Hesl B., Takamiya M., Lam CS., Kah O., Bally-Cuif L., Strähle U. (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia.*; 58(7):870-88.
- Masoinpierre PC., Belluscio L., Squinto S., Ip NY., Furth E., Lindsay RM., Yancopoulos GD. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science.*; 247(4949 Pt 1):1446-51.
- Mazzone IE., Saïd FA., Aloyz R., Miller FD., Kaplan D. (1999). Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci.*; 19(22):9716-27.
- McCormick CA., Hernandez DV. (1996). Connections of octaval and lateral line nuclei of the medulla in the goldfish, including the cytoarchitecture of the secondary octaval population in goldfish and catfish. *Brain Behav Evol.*; 47: 113-37.
- Meek J. (1983). Functional anatomy of the tectum mesencephali of the goldfish. An explorative analysis of the functional implications of the laminar structural organization of the tectum. *Brain Behav Evol.*; 287: 247-297.
- Merighi A. (2002). Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol.*; 66(3):161-90.
- Middeldorp J., Hol EM. (2011). GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.*; 93(3):421-43.
- Ming GL., Song H. (2011). Adult neurogenesis in the Mammalian brain: significant answer and significant question. *Neuron.*;70(4):687-702.

- Morgan TE., Xie Z., Goldsmith S., Yoshida T., Lanzrein AS., Stone D., Rozovsky I., Perry G., Smith MA., Finch CE. (1999). The mosaic of brain glial hyperactivity during normal ageing and its attenuation by food restriction. *Neuroscience.*; 89(3);687–99.
- Morshead CM., Reynolds BA., Craig CG., McBurney MW., Morassutti D., Weiss D., van der Kooy D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron.*; 13(5):1071-82.
- Nadarajah B., Brunstrom JE., Grutzendler J., Wong RO., Pearlman AL. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci.*; 4 (2):143–150.
- Neely MN., Pfeifer JD., Caparon M. (2002). Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun.*; 70(7):3904-14.
- Nieuwenhuys R. (1967). Comparative anatomy of olfactory centres and tracts. *Prog Brain Res.*; 23: 1-6.
- Nieuwenhuys R, Meek J. (1990). The telencephalon of actinopterygian fishes. *In: Jones E.G., Peters A. (eds): Cerebral Cortex, Vol. 8A. New York: Plenum Press, 31-73.*
- Nilsson AS., Fainzilber M., Falck P., Ibáñez CF. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.*; 424(3):285-90.
- Nishio T., Akiguchi I., Furukawa S. (1992). Detailed distribution of nerve growth factor in rat brain determined by a highly sensitive enzyme immunoassay. *Exp Neurol.*; 116(1):76-84.
- Northcutt RG. (1983). Evolution of the optic tectum in ray-finned fishes. *In: Davis RE, Northcutt RG. (eds.): Fish Neurobiology, Vol.2 Higher Brain Areas and Functions. Ann. Arbor: University of Michigan Press, 1-42.*
- Peukert D., Weber S., Lumsden A., Scholpp S. (2011). Lhx2 and Lhx9 determine neuronal differentiation and compartmentation in the caudal forebrain by regulating Wnt signaling. *PLoS Biol.*; 9 (12): e1001218.



- Pierce JP., Lewin G. (1994). An ultrastructural size principle. *Neuroscience.*; 58(3):441-6.
- Prakash N., Cohen-Cory S., Frostig RD. (1996). RAPID and opposite effects of BDNF and NGF on the functional organization of the adult cortex in vivo. *Nature.*; 381(6584):702-6.
- Presley JF., Cole NB., Schroer TA., Hirschberg K., Zaal KJ., Lippincott-Schwartz J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature.*; 389(6646):81-5.
- Purves D. (1988). *Body and Brain, A Trophic Theory of Neural Connections*, Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Ratti A., Fallini C., Cova L., Fantozzi R., Calzarossa C., Zennaro E., Pascale A., Quattrone A., Silani V. (2006). A role for the ELAV RNA-binding proteins in neural stem cells: stabilization of Msi1 mRNA. *J Cell Sci.*; 119(Pt 7):1442-52.
- Reichardt LF. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; 361(1473):1545-64.
- Robinson RC., Radziejewski C., Stuart DI., Jones EY. (1995). Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry.*; 34(13):4139-46.
- Rodriguez-Tebar A., Dechant G., Barde YA. (1991). Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; 331(1261):255-8.
- Ruit KG., Osborne PA., Schmidt RE., Johnson EM. jr., Snider WD. (1990). Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse. *J Neurosci.*; 10(7):2412-9.
- Russo SJ., Mazeu-Robinson MS., Ables JL., Nestler EJ. (2009). Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology*; 56 (Suppl 1): 73-82.
- Rylett RJ., Williams LR. (1994). Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. *Trends Neurosci.*;17(11):486-90.

- Sakakibara S., Okano H. (1997). Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implications of their roles in neuronal and glial cell development. *J. Neurosci.*; 17(21):8300–12.
- Sakakibara S., Nakamura Y., Satoh H., Okano H. (2001). Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J. Neurosci.*; 21(20):8091–107.
- Sakamoto H., Kuzuya H., Tamaru M., Sugimoto S., Shimizu J., Fukushima M., Yazaki T., Yamazaki T., Nagata Y. (1998). Developmental changes in the NGF content in the brain of young, growing, low-birth-weight rats. *Neurochem Res.*; 23(1):115-20.
- Santoriello C., Zon LI. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest.*; 122(7):2337-43. Review.
- Schecterson LC., Bothwell M. (2010). Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Dev Neurobiol.*; 70(5):332-8.
- Schmidt R., Strähle U., Scholpp S. (2013). Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult. *Neural Dev.*; 8:3. Review.
- Schneider R., Schweiger M. (1991). A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene.*; 6(10):1807-11.
- Schnell L., Schneider R., Kolbeck R., Barde YA., Schwab ME. (1994). Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature.*; 367(6459):170-3.
- Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.*; 4(1-2):7–25.

- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chrétien M, Murphy RA. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J*; 314(Pt 3):951-60.
- Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ. (1991). Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88(9):3554-8.
- Shelton DL, Reichardt LF. (1986). Studies on the expression of the beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 83(8):2714-8.
- Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, Lemischka IR, Ivanova NB, Stifani S, Morrisey EE, Temple S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci*; 9(6):743-51.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*; 414(6856): 98-104.
- Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DA, Marekov LN, Wu KC, Jang SI, Goldman RD. (1999). A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J Biol Chem*; 274(14):9881-90.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*; 1(5):515-28.
- Taupin P, Gage FH. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*; 69(6):745-9.

- Taylor MR., Hurley JB., Van Epps HA., Brockerhoff SE. (2004). A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and lethality using a ketogenic diet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; 101: 4584-4589.
- Tettamanti G., Cattaneo AG., Gornati R., de Eguileor M., Bernardini G., Binelli G. (2010). Phylogenesis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in vertebrates. *Gene.*; 450(1-2):85-93.
- Thoenen H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science.*; 270(5236):593-8.
- Timmusk T., Belluardo N., Metsis M., Persson H. (1993). Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Neurosci.*; 5(6):605-13.
- Urfer R., Tsoulfas P., O'Connell L., Hongo JA., Zhao W., Presta LG. (1998). High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem.*; 273(10):5829-40.
- Urfer R., Tsoulfas P., O'Connell L., Shelton DL., Parada L.F., Presta LG. (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J.*; 14(12):2795-805.
- van Kesteren RE., Fainzilber m., Hauser G., van Minnen J., Vreugdenhil E., Smit AB., Ibáñez CF., geraerts WP., Bulloch AG. (1998). Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *EMBO J.*; 17(9):2534-42.
- Villani L., Dipietrangelo L., Pallotti C., Pettazzoni P., Zironi I., Guarnieri T. (1994). Ultrastructural and immunohistochemical study of the telencephalo-habenulo-interpeduncular connections of the goldfish. *Brain Res. Bull.*; 34: 1-5.
- Vissio PG., Cánepa MM., Maggese MC. (2008). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-like immunoreactivity localization in the retina and brain of *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue Cell.*; 40(4):261-70.

- VonDrän MW., Singh H., Honeywell JZ., Dreyfus CF. (2011). Levels of BDNF impact oligodendrocyte lineage cells following a cuprizone lesion. *J Neurosci.* ; 31(40):14182-90.
- Wang N., Gibbons CH., Freeman R. (2011). Novel immunohistochemical techniques using discrete signal amplification systems for human cutaneous peripheral nerve fiber imaging. *J Histochem Cytochem.*, 59(4):382-90.
- Westerfield M. (1999). The zebrafish book, A guide for the laboratory use of zebrafish, Institute of neuroscience University of Oregon; Williman D.III H., Westerfield M., Zon L.I.: *The zebrafish*. Vol. 59.
- White FA., Silos-Santiago I., Molliver DC., Nishimura M., Phillips H., Barbacid M., Snider WD. (1996). Synchronous onset of NGF and TrkA survival dependence in developing dorsal root ganglia. *J Neurosci.*; 16(15):4662-72.
- Whitman MC., Greer CA. (2009). Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol.*; 89(2):162-75.
- Wong AW., Xiao J., Kemper D., Kilpatrick TJ., Murray SS. (2013). Oligodendroglial expression of TrkB independently regulates myelination and progenitor cell proliferation. *J Neurosci.*; 33(11):4947-57.
- Wullmann MF., Northcutt RG. (1988). Connections of the corpus cerebelli in the green sunfish and the common goldfish: a comparison of perciform and cypriniform teleosts. *Brain Behav Evol.*; 32: 293-316.
- Wullmann MF., Northcutt RG. (1989). Afferent connections of the valvula cerebelli in two teleosts, the common goldfish and the green sunfish. *J Comp Neurol.*; 289: 554-567.
- Wullmann MF., Meyer DL., Northcutt RG. (1991). The visually related posterior pretectal nucleus in the non-percomorph teleost *Osteoglossum bicirrhosum* projects to the hypothalamus: a DiI study. *J Comp Neurol.*; 312: 415-435.

- Wullimann M.F., Rupp B., Reichert H. (1996) Neuroanatomy of the zebrafish brain. A topological atlas. Berlin: Birkhäuser Verlag.
- Xiao J., Wong AW., Willingham MM., van den Buuse M., Kilpatrick TJ., Murray SS. (2010). Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes. *Neurosignals.*;18(3):186-202.
- Zafra F., Hengerer B., Leibrock J., Thoenen H., Lindholm D. (1990). Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.*; 9(11):3545-50.
- Zimmer DB., Cornwall EH., Landar A., Song W. (1995). The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull.*; 37(4):417-29.
- Zupanc GK., Corrêa SA. (2005). Reciprocal neural connections between the central posterior/prepacemaker nucleus and nucleus G in the gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Brain Behav Evol.*; 65(1):14-25.
- Zupanc GKH. (2008). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *J Physiol Paris.*; 102: 357-373.
- Zupanc GK., Sîrbulescu RF. (2011). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Eur J Neurosci.*; 34(6):917-29. Review.