



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE**

---

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN  
BIOTECNOLOGIE  
MEDICHE**

***Foxg1* E *Emx2* NELLA REGOLAZIONE DELLA CINETICA  
PROLIFERATIVA DEI PROGENITORI NEURONALI  
CORTICOCEREBRALI**

*Laureanda:*  
**Chiara PIVETTA**

*Relatore:*  
**Chiar.mo Prof. Giampiero LEANZA**

*Correlatori:*  
**Prof. Antonello MALLAMACI  
Dott. Marco BRANCACCIO**

**ANNO ACCADEMICO 2007-2008**

# INDICE

## 1. INTRODUZIONE

- 1.1 **EMX2 E FOXP1 DURANTE LO SVILUPPO EMBRIONALE NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE**
  - 1.1.1 SPECIFICAZIONE DELL'IDENTITA' ROSTRO-CAUDALE (R-C) E DORSO-VENTRALE (D-V): INDUZIONE TELEENCEFALICA
  - 1.1.2 AREALIZZAZIONE
  - 1.1.3 CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE, DESTINO NEURALE E LAMINAZIONE CORTICALE
  - 1.1.4 CABLAGGIO
- 1.2 **EMX2 E FOXP1 NEL SISTEMA NERVOSO DELL'ADULTO**
- 1.3 **SISTEMA DI COLTURA: NEUROSFERE**
- 1.4 **PROMOTORI STATO-SPECIFICI**
- 1.5 **SISTEMA DI ESPRESSIONE GENICA TET-ON**
- 1.6 **VETTORI LENTIVIRALI DI TERZA GENERAZIONE**
  - 1.6.1 *Generazione di vettori lentivirali*
  - 1.6.2 *Titolazione di vettori lentivirali*
  - 1.6.3 *Trasduzione di cellule bersaglio*

## 2. MATERIALI E METODI

- 2.1 **TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE**
  - 2.1.1 *Tecniche di clonaggio*
  - 2.1.2 *Trasformazione di cellule elettrocompetenti*
  - 2.1.3 *Estrazione e purificazione di dna plasmidico da gel di agarosio*
- 2.2 **ANIMALI**
  - 2.2.1 *Preparazione di animali*
  - 2.2.2 *Estrazione del dna genomico da coda*
  - 2.2.3 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*
  - 2.2.4 *Generazione di embrioni*
  - 2.2.5 *Dissezioni*
- 2.3 **COLTURA DI NEUROSFERE**
  - 2.3.1 *Infezione di neuroblasti dissociati*

- 2.3.2 *Propagazione della coltura di neurosfere*
- 2.3.3 *Citofluorimetria e preparazione delle neurosfere per analisi citofluorimetrica*
- 2.3.4 *Immunofluorescenza su neurosfere dissociate*
- 2.3.5 *Colorazione con Annessina V / 7-AAD*

## **2.4 PRODUZIONE E TITOLAZIONE DI VETTORI LENTIVIRALI DI TERZA GENERAZIONE**

- 2.4.1 *Lipofezione Transiente di 293T per la produzione di vettori lentivirali di Terza generazione*
- 2.4.2 *Linee cellulari: Hek293T, Hela tet-off, Hek293T-rtTA responsive*
- 2.4.3 *Condizioni di coltura cellulare*
- 2.4.4 *Titolazione di vettori lentivirali*
  - 2.4.4.1 *Titolazione per fluorescenza*
  - 2.4.4.1 *Titolazioni per real-time PCR su DNA genomico*

## **3. RISULTATI**

- 3.1 **COSTRUZIONE DEI VETTORI DI ESPRESSIONE LENTIVIRALI**
- 3.2 **PRODUZIONE E TITOLAZIONE DEI VETTORI LENTIVIRALI**
- 3.3 **VALUTAZIONE DEL PATTERN DI ESPRESSIONE DEI PROMOTORI STATO SPECIFICI**
- 3.4 **SOVRA-REGOLAZIONE CONDIZIONALE DEI GENI FOXG1 E EMX2 NEL COMPARTIMENTO PROGENITORIALE: ESPERIMENTO DI TIME COURSE**

## **4. DICUSSIONE**

## **5. BIBLIOGRAFIA**

## **6. DATI SUPPLEMENTARI**

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 EMX2 E FOXG1 DURANTE LO SVILUPPO EMBRIONALE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Durante fasi molto precoci dello sviluppo embrionale, la parte più anteriore del tubo neurale (struttura che darà vita al sistema nervoso) dà luogo per crescita differenziale ad una serie caratteristica di espansioni e costrizioni. Il tubo passa così per uno stadio primario a 3 vescicole (proencefalo, mesencefalo e rombencefalo) ed uno secondario a 5 (il proencefalo si risolve in telencefalo e diencefalo, il rombencefalo in metencefalo e mielencefalo). La parete di tali vescicole è costituita di un semplice foglietto pseudostratificato di cellule neuroepiteliali, dalle quali avranno origine tutte le strutture componenti il cervello maturo. In particolare, dal neuroepitelio del telencefalo dorsale si svilupperà la futura corteccia cerebrale.

Il processo che conduce un foglietto primordiale di cellule ad un cervello maturo può essere suddiviso in fasi discrete che sono state studiate in modo estensivo nel topo. La fase iniziale di tale processo comporta l'assegnazione di un'identità rostro-caudale (R-C) al tubo neurale, sulla base di segnali antagonisti tra l'organizzatore (nella definizione di Spemann and Mangold nel 1924, un organizzatore è un gruppo di cellule che induce le cellule vicine a cambiare il loro destino e a riorganizzarsi in un nuovo tessuto) e l'endoderma viscerale anteriore (Beddington R.S. et al. 1998; Rallu, M., et al.2002) e l'assegnazione di un'identità dorso-ventrale (D-V). Una volta che il primordio telencefalico è stato specificato, esso viene suddiviso in differenti territori attraverso l'azione di morfogeni (fattori secreti che possono indurre destini cellulari differenti in un modo concentrazione-dipendente) che a loro volta inducono l'espressione di specifici fattori di trascrizione. A seguito di questi eventi precoci, nel telencefalo embrionale si distingue un dominio palliale, dorsale, antesignano di corteccia olfattiva, neocorteccia ed ippocampo, ed uno subpalliale, ventrale, costituito dalle tre eminenze laterale, mediale e caudale, rispettivamente precorritrici di striato, globo pallido ed amigdala.

Il processo di sviluppo corticale può essere suddiviso dunque, per semplicità d'argomentazione, in processi discreti:

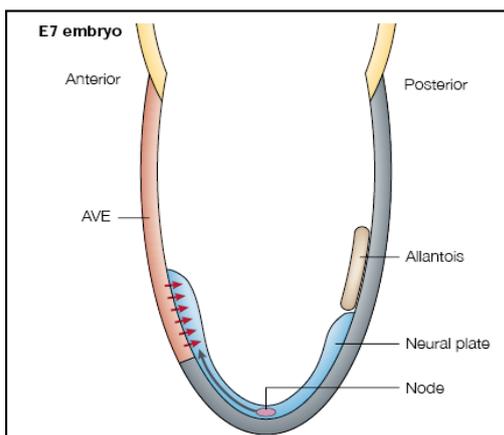
- Impartizione dell'identità territoriale R-C (rostro-caudale) e D-V (dorso-ventrale), ovvero specificazione telencefalica e quindi cortico-cerebrale
- Arealizzazione corticale
- Controllo del ciclo cellulare, destino neurale e laminazione corticale
- Cablaggio

Nei paragrafi seguenti si discuteranno le funzioni giocate dai fattori di trascrizione *Foxg1* (Forkhead-domain transcription factor) ed *Emx2* (Homeodomain transcription factor), nei diversi processi che portano allo sviluppo corticale.

### 1.1.1 SPECIFICAZIONE DELL'IDENTITÀ R-C (ROSTRO-CAUDALE) E D-V (DORSO-VENTRALE): INDUZIONE TELENCEFALICA

La specificazione precoce dei tessuti neurali sia anteriori che posteriori è mediata attraverso segnali che emanano da un “nodo primitivo od organizzatore” (vedi definizione precedente). Si tratta del maggior centro organizzatore nell'embrione, ai primi stadi dello sviluppo, noto anche come “nodo di Hensen” nel pollo o “organizzatore Spemann” nella rana.

Studi sui mammiferi indicano che oltre a tale organizzatore è richiesto l'endoderma viscerale anteriore (AVE) per l'induzione e il mantenimento del carattere neurale anteriore (de Souza F.S., et al. 2000; Thomas P., et al. 1996). L'AVE (Figura 1) è costituito da una popolazione extraembrionale che migra rostralmente dalla punta distale della blastula ed è responsabile dell'induzione della piastra neurale anteriore (Thomas et al., 1998). Nel topo, è un'importante sorgente di segnali anti-caudalizzatori (Kimura et al., 2000; Perea-Gomez et al., 2001).



**Figura1 | Segnali e tessuti coinvolti nell'induzione del carattere neurale anteriore (Rallu M. et al.2002).**

L'endoderma viscerale anteriore assieme al nodo di Hensen precoce, agiscono nell'induzione/mantenimento del carattere neurale anteriore. L'AVE è localizzato sotto la futura piastra neurale ed esprime molecole, come cerberus e dickkopf, che inibiscono fattori altrimenti agenti nel posteriorizzare la piastra neurale anteriore.

La maggior parte dei mutanti di topo nei quali il movimento e i segnali dell'AVE sono distrutti mancano delle strutture del sistema nervoso centrale (Stern C.D., et al., 2001): ciò è potenzialmente dovuto all'esposizione delle cellule anteriori a segnali caudalizzanti.

L'identità dei fattori che caudalizzano la piastra neurale è difficile da risolvere. Questo è in parte dovuto al fatto che le varie vie di segnalazione che modulano la specificazione R-C precoce spesso sono coinvolte in molti eventi così che il loro effetto sulla specificazione R-C può essere sia diretta che indiretta. Fgfs (fibroblast growth factors), Wnts, Acido Retinoico, Nodals e Bmps (Bone morphogenetic proteins) sono tra le molecole di segnalazione proposte come agenti caudalizzanti (Figura 2; Agathon et al., 2003; Munoz-Sanjuan e Brivanlou; 2001), ed è molto probabile che l'attività combinata di molte di queste vie di segnalazione sia richiesta per stabilire la specializzazione R-C precoce.

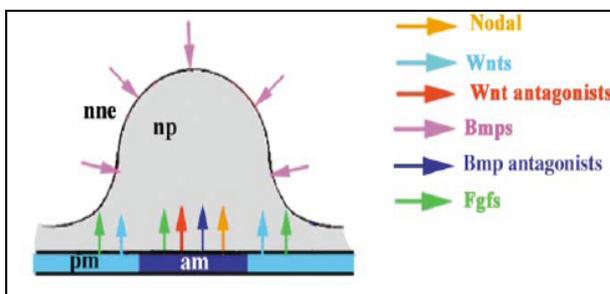


Figura 2 | Segnali caudalizzanti (adattata da Stephen W.W. 2004).

Durante la gastrulazione precoce, segnali caudalizzanti (Wnts, RA, Fgfs) sorgono dall'anello germinale. Antagonisti di alcuni di questi segnali sono prodotti dall'organizzatore e dai suoi derivati (il piatto mesodermico precordiale). Il segnale Bmp dall'ectoderma nonneurale invade la piastra neurale in questa e in fasi più tardive. Abbreviazioni: pm mesoderma parassiale prospettivo; am mesoderma

assiale prospettivo; np piastra neurale; nne ectoderma non neurale.

A stadi precoci è probabile che queste vie di segnalazione agiscano nell'impartire solo un rudimentale asse R-C alla piastra neurale in via di formazione e che altri segnali tardivi agiscano localmente per rifinire all'interno della piastra neurale discrete suddivisioni del sistema nervoso centrale.

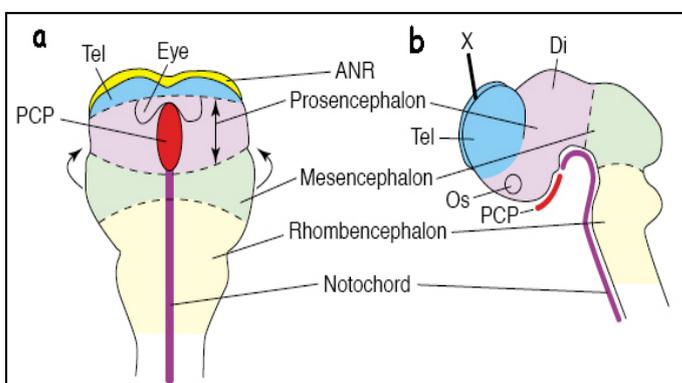
Riassumendo, prima e durante la gastrulazione, la specificazione R-C inizia ad emergere nell'embrione, e contestualmente a questa si verifica l'induzione neurale. Nelle regioni protette dall'influenza di segnali caudalizzanti, il tessuto neurale forma il futuro encefalo anteriore e, nella parte più rostrale di questo, il telencefalo.

Una conseguenza di questa regionalizzazione della piastra neurale è la definizione e la stabilizzazione di speciali popolazioni cellulari, solitamente piazzate al confine fra territori adiacenti, come il "floorplate" (lamina del pavimento, sita presso il piano sagittale mediano, fra le lamine neurali ventrali destra e sinistra) e l'istmo, al bordo

fra mesencefalo e metencefalo, sorgenti locali di segnali all'interno del neuroectoderma.

Questi organizzatori locali modulano e rifiniscono l'iniziale regionalizzazione, attivando e/o inibendo molti nuovi geni specificatori, i quali definiscono in seno alla piastra neurale ed al neurotubo che ne deriva i vari territori presuntivi discreti, da cui deriveranno le numerose strutture e substrutture del futuro sistema nervoso centrale (SNC) maturo.

A seguito dell'induzione neurale anteriore, le cellule al "bordo anteriore della piastra neurale" (ANB, anche chiamato "anterior neural ridge" o ANR) (Figura 3) producono segnali che promuovono l'espressione genica telencefalica all'interno del territorio del prosencefalo (Echevarria et al., 2003; Houart et al., 1998; Shimamura and Rubenstein, 1997; Tian et al., 2002).



**Figura 3 | Sviluppo del telencefalo nel topo (adattata da Zaki P., et al. 2003).**

Formazione della piastra neurale anteriore (a ~E8.5). a) Le regioni che formeranno il prosencefalo sono indicate in blu, il telencefalo (Tel) in rosa, il diencefalo (Di) in verde, il mesencefalo e romboencefalo in giallo. ANR, anterior neural ridge; PCP piastra precordale. Il piatto ripiega in direzione delle frecce. b) Il cervello visto da un lato a metà gestazione (E10.5) dopo la chiusura del tubo neurale. Abbreviazioni: Os placode ottico.

In particolare, approssimativamente attorno a E8.5 o poco dopo, inizia l'espressione del fattore di trascrizione telencefalico *Foxg1* (Tao W., et al. 1992; Shimamura K., et al. 1997), indotta dal morfogeno FGF8 espresso nell'ANR (Figura 3) (Shimamura K., et al. 1997). Cosa importante, *Foxg1* non è un semplice "marker" del territorio telencefalico, ma è implicato fattivamente nella specificazione di questo territorio. Tale ruolo, non evidente in semplici mutanti *Foxg1*<sup>-/-</sup>, emerge quando *Foxg1* è inattivato in un contesto genetico sensibilizzato, difettivo del fattore trascrizionale "zinc finger" telencefalico dorsale *Gli3*. In queste condizioni, infatti, la porzione più rostrale del cervello non è specificata correttamente ed adotta una identità territoriale ibrida, telencefalica e diencefalica (Hanashima C., 2007).

La specificazione D-V del telencefalo ha luogo in parallelo alla specificazione R-C, in risposta alla esposizione sequenziale della piastra neurale anteriore a 4 segnali: Shh, i fattori Wnts, l'acido retinico e l'Fgf8 (Gunhaga L., et al., 2003). Shh,

proveniente da nodo di Hensen e piastra precordale (un derivato mesendodermico assiale del nodo che si trova nella punta rostrale della notocorda (Figura 3) (Kiecker C., 2001), commissiona inizialmente l'intera piastra anteriore al programma morfogenetico pallidale (Gunhaga et al., 2003). Risultati ottenuti dall'analisi di mutanti *Shh*<sup>-/-</sup> (Chiang C., et al. 1996) sostengono il ruolo di SHH nella specificazione del telencefalo ventrale. Esso è richiesto per lo sviluppo del telencefalo ventromediale (MGE-eminenza ganglionica mediale) ma la specificazione del telencefalo ventrolaterale (LGE-eminenza ganglionica laterale) può ancora verificarsi in sua assenza (Rallu M., et al. 2002; Pabst O., et al. 2000). Successivamente, i fattori Wnt, prodotti dalla regione al confine fra pieghe neurali ed ectoderma fiancheggiante, nonché successivamente dalla lamina del tetto o "roof plate", attivano il programma cortico-cerebrale (Gunhaga L., et al., 2003). La lamina del tetto - in verità -esprime anche membri della famiglia delle BMP (bone morphogenetic proteins) (Monuki ES.; 2001; Ragsdale CW.; 2001), ipotizzate anch'esse di partecipare alla specificazione del telencefalo dorsale. Tuttavia, come suggerito dal risultato dell'ablazione del recettore 1a per BMP, il loro ruolo pare ristretto alla specificazione dei territori più dorsali, immediatamente adiacenti alla linea dorsale mediana (Hebert J., et al. 2002). Infine, l'acido retinoico, proveniente dell'ectoderma sovrastante il tubo neurale, distoglie parte del territorio intermedio-ventrale verso il programma intermedio, striatale, e l'*Fgf8*, espresso da ANR e piastra commessurale anteriore, consolida le specificazioni cortico-cerebrale e pallidale. (Figura 4).

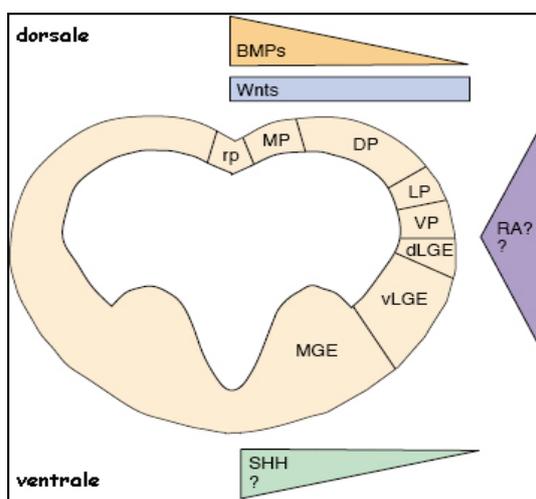


Figura 4 | Il telencefalo murino visto ad E10 raffigurante fattori estrinseci stabilenti diversi domini progenitoriali lungo l'asse D-V (modificata da Campbell K. 2003).

BMPs sono maggiormente espresse nelle porzioni D-M (dorso-mediali) del telencefalo, dove agiscono per lo sviluppo della linea mediana. Wnts sono espressi in tutto il pallio e probabilmente agiscono maggiormente nella specificazione dorsale rispetto alle BMPs. Sebbene SHH sia richiesto nella specificazione ventro- mediale, alcuni aspetti della specificazione ventro- laterale possono verificarsi in sua assenza. La specificazione D-V può verificarsi in assenza sia di *Shh* che di *Gli3*, suggerendo l'esistenza di segnali alternativi o vie di segnalazione nella ventralizzazione del telencefalo. I segnali laterali si suppone partecipino alla specificazione del telencefalo intermedio (RA può essere coinvolto in tale processo). Abbreviazioni:

dLGE LGE dorsale; DP pallio dorsale; LP pallio laterale; MP pallio mediale; rp roof plate; vLGE LGE ventrale; VP pallio ventrale; RA acido retinoico.

Queste molecole segnalano da centri ai bordi o all'interno del telencefalo in via di sviluppo, esercitano la loro azione nella morfogenesi attraverso l'attivazione regionale di fattori di trascrizione nel telencefalo. Nel caso della corteccia cerebrale, fattori trascrizionali chiave implicati nella sua specificazione sono *Emx2* e *Pax6*. Tali due fattori, attivi in risposta al centro di segnalazione dorsale, lavorano in parallelo: almeno un allele funzionale dell'uno o dell'altro è sufficiente per la definizione del campo corticale; in mancanza di alleli funzionali di ambedue i geni, la specificazione corticale abortisce ed il telencefalo dorsale differenzia quale striato (Muzio L., et al.; 2002) (Figura 5).

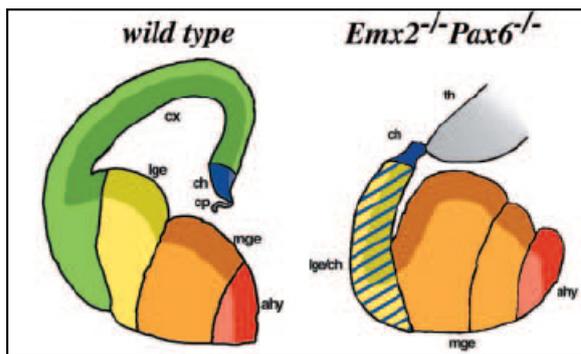


Figura 5 | Anormalità nella specificazione dorso-ventrale nei doppi mutanti (*Emx2<sup>-/-</sup> Pax6<sup>-/-</sup>*) a E14.5 (Muzio L., et al.; 2002).

Nei doppi mutanti, le eminenze gangliari acquisiscono identità di eminenze gangliari mediali, inoltre la corteccia perde ogni specificazione corticale e mostra aspetti ibridi tra quelli dell'eminenza gangliare laterale adiacente e il cortical hem.

### 1.1.2 AREALIZZAZIONE

L'arealizzazione è un processo di sviluppo che porta alla suddivisione del foglietto corticale in aree anatomicamente, funzionalmente e connettivamente distinte.

Prima dell'arrivo delle proiezioni talamocorticali, la regionalizzazione del primordio corticale inizia sulla base di informazioni intrinseche allo stesso primordio. Successivamente, dopo l'arrivo di queste proiezioni (da E13.5 in avanti), l'arealizzazione corticale è rifinita sulla base di informazioni trasportate dalle fibre talamocorticali (TCA). Particolare importanza riveste la finestra temporale da E10.5 a E12.5 quando i neuroblasti corticali sono determinati arealmente, ovvero il loro potenziale areale diventa progressivamente meno reversibile.

Due classi principali di molecole si suppone essere cruciali per la regionalizzazione precoce del primordio corticale: i morfogeni secreti, rilasciati dai bordi del campo corticale e fattori di trascrizione espressi in gradienti all'interno dello strato proliferativo primario.

I centri di specificazione telencefalica direttamente implicati nell'arealizzazione sono (Figura 6):

- a) La piastra commissurale o "Commissural plate" (CoP)
- b) L'orlo corticale o "Cortical hem"
- c) L'anti-orlo o "Antihem"

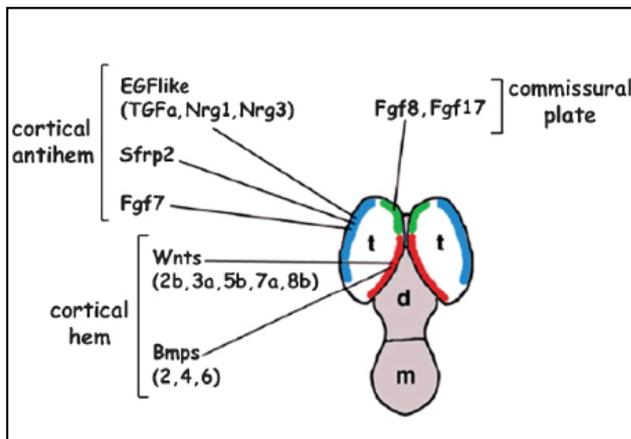


Figura 6 | Schema dell'espressione dei morfogeni e centri di specificazione telencefalica (Mallamaci A & Stoykova A., 2006).

Abbreviazioni: t telencefalo, d diencefalo, m mesencefalo.

Da E10 ad E12.5, la piastra commissurale e le regioni circostanti rilasciano Fgf3, Fgf8, Fgf17, Fgf18 che è stato dimostrato promuovere i programmi rostrali vs quelli caudali (Bachler & Neubuser, 2001).

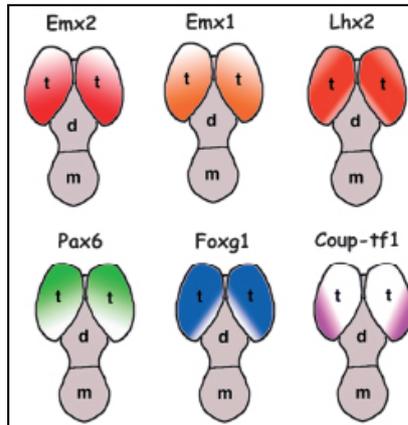
Da E10, l'orlo corticale è sorgente di Wnts (Wnt2b, 3a, 5a, 7b, 8b) e delle BMPs (bone morphogenetic protein; Bmp2, Bmp4, Bmp5, Bmp6, Bmp7), espresse nei domini vicini che si allargano anche nell'adiacente campo corticale dorsomediale (Furuta et al., 1997; Lee et al., 2000).

A partire da E12.5, i progenitori neurali all'interno dell'anti-orlo specificatamente esprimono cinque proteine secrete di segnale: Fgf7, Wnt-secreted inhibitor Sfrp2 e tre ligandi Egf-correlati, Tgf- $\alpha$ , Nrg1, Nrg3 (Assimacopoulos et al., 2003).

Tali morfogeni, secreti dai centri di specificazione ai bordi del campo corticale, stabiliscono nei progenitori corticali l'espressione differenziale di fattori di trascrizione (Figura 7) che determinano l'identità areale esibita dalla loro progenie neuronale.

Figura 7 | Gradienti dei fattori di trascrizione nel primordio corticale precoce (Mallamaci A & Stoykova A., 2006).

Cervelli a E12. Abbreviazioni: t telencefalo, d diencefalo, m mesencefalo.



Fra tali fattori sono *Emx2*, *Emx1*, *Lhx2*, *Pax6*, *Foxg1* e *Coup-tf1*, espressi dai progenitori neurali dello strato proliferativo periventricolare, secondo gradienti specificamente orientati rispetto ai principali assi tangenziali. Nella presente trattazione si discuteranno specificamente i ruoli di *Emx2* e *Foxg1* nella arealizzazione corticale.

L'espressione di *Emx2* è massima nei progenitori che genereranno le aree postero-mediali della neocorteccia, come l'ippocampo e l'area V1 occipitale, ed è minima nei progenitori che generano le aree antero-laterali (Simeone A., *et al.* 1992a, 1992b; Mallamaci *et al.*, 1998). Attraverso analisi di guadagno e perdita di funzione nel topo si è dimostrato che *Emx2* controlla l'arealizzazione impartendo preferenzialmente un'identità postero-mediale. I primi studi, e la prima evidenza del ruolo dei fattori di trascrizione nella specificazione areale, si sono avuti con lavori eseguiti su topi knockout costitutivi per *Emx2* (Bishop K.M. *et al.*, 2000; Mallamaci A. *et al.*, 2000). Manipolazioni genetiche successive, che cambiavano in vario modo i livelli di *Emx2* nei progenitori corticali, hanno dimostrato chiaramente che si verificano modificazioni delle dimensioni delle aree corticali sensoriali e motrici, consistenti con il modello emergente dall'analisi dei mutanti knock-out costitutivi (Hamasaki T., *et al.*, 2004). Questi risultati dimostrano che *Emx2* opera in modo concentrazione dipendente nei progenitori corticali per specificare la dimensione e la posizione differenziale delle aree corticali primarie, e che alti livelli di *Emx2* conferiscono preferenzialmente un'identità postero-mediale, associata alla regione V1. Tale azione sull'arealizzazione sembra però essere indiretta attraverso la repressione di *Fgf8* espresso dalla piastra commissurale (Fukuchi-Shimogori T., e

Grove E.A., 2003). Inoltre sembra, che l'azione dorsalizzante del fattore dorsalizzante *Gli3*, sia mediata da *Emx2*. La perdita di *Emx2* nei mutanti *Gli3* indica che *Emx2* si trova geneticamente a valle di *Gli3* (Theil T., 2002).

L'espressione di *Foxg1*, nel telencefalo precoce, segue un gradiente caudo-mediale basso e rostro-laterale alto. Oltre ad essere indispensabile per stabilire l'identità ventrale del telencefalo, *Foxg1* collabora con FGFs nella suddivisione del telencefalo dorsale in neocorteccia antero-laterale e in territori postero-mediali. Negli embrioni *Foxg1<sup>-/-</sup>*, infatti, in aggiunta alla mancata specificazione del telencefalo ventrale ed alla riduzione della corteccia (associata quest'ultima al precoce differenziamento dei neuroni dello strato 1 di Cajal-Retzius (Xuan S. et al., 1995; Hanashima, C., et al., 2004)), il residuo campo corticale è caudalizzato e specificato come ippocampo (Muzio L., 2005). *Foxg1* ha un ruolo, inoltre, nel confinare lo sviluppo della linea mediana dorsale. Infatti nei mutanti *Foxg1<sup>-/-</sup>* l'area dorso-mediale, identificata mediante l'espressione per esempio della BMP4 (bone morphogenetic protein 4), risulta essere espansa (Dou C.L., 1999; Martynoga B., 2005).

### **1.1.3 CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE, DESTINO NEURALE E LAMINAZIONE CORTICALE**

Durante lo sviluppo, le cellule staminali neurali generano tutti i neuroni del sistema nervoso centrale (SNC) e i due tipi di cellule macrogliali – astrociti e oligodendrociti (Doetsch F., et al. 1999; Alvarez-Buylla A., et al. 2001) secondo l'ordine temporale illustrato in (Figura 8).

Si possono distinguere due grandi classi di neuroni corticali: gli interneuroni, responsabili delle connessioni locali, e i neuroni di proiezione, che estendono i loro assoni verso strutture lontane, intracorticali, subcorticali e subcerebrali.

I neuroni di proiezione, glutammatergici, sono caratterizzati da una morfologia spesso piramidale, con un ampio dendrite diretto verso la superficie piaie, detto "dendrite apicale" ed un ciuffo di dendriti ad orientamento prevalentemente orizzontale, detti "dendriti basali"; l'assone emerge di solito dal lato anti-apicale del soma ed è orientato nel suo primo tratto radialmente. Durante lo sviluppo, essi sono

generati da progenitori localizzati nella parete dorsale laterale del telencefalo (Ware, M. L., et al. 1999; Anderson S. A., 2002).

Gli interneuroni, GABAergici, e quelli di Cajal-Retzius sono invece generati principalmente da progenitori localizzati nel telencefalo ventrale e nell'orlo corticale. Di qui essi migrano per lunghe distanze, fino alle loro destinazioni finali all'interno della neocorteccia (Wonders C. P. 2006) (Figura 8).

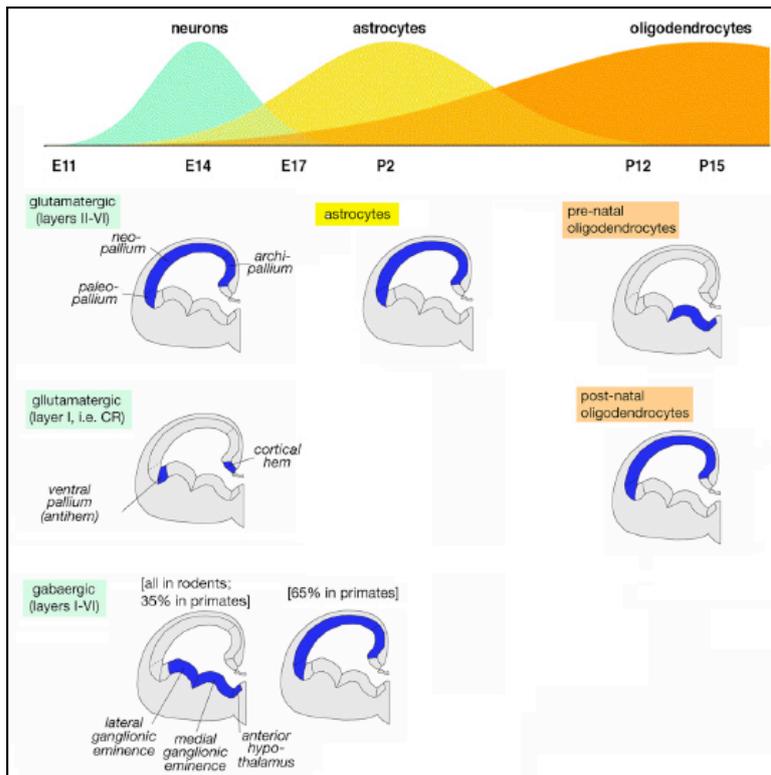
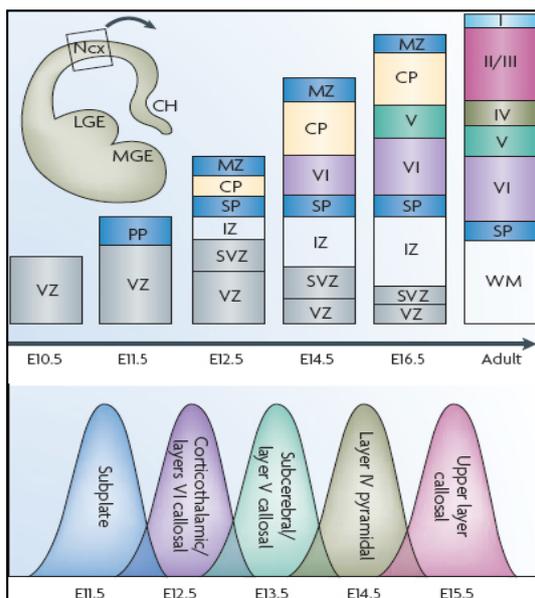


Figura 8 | Istogenesi cortico-cerebrale (A.Mallamaci, unpublished)

Una volta verificatasi l'induzione telencefalica, una vigorosa attività proliferativa in seno al neuroepitelio telencefalico dorsale prelude alla generazione dei neuroni neocorticali di proiezione. Con la generazione dei primi neuroni post-mitotici, ad E11, si possono distinguere nella parete del primordio corticale una porzione abventricolare, dove si accumulano tali neuroni, ed una adventricolare dove persistono gli elementi proliferanti. In particolare, lo strato immediatamente adiacente al ventricolo viene chiamato zona ventricolare (VZ) ed è detectabile sin da E11; da E13.5, uno strato proliferativo addizionale, noto come zona subventricolare, si forma al di sopra della zona ventricolare (The Boulder Committee, 1970; Bayer, S. A. & Altman, J. 1991). I progenitori risiedenti nella zona ventricolare e

subventricolare producono, da E11.5 ad E17.5 nel topo, neuroni di proiezione destinati a tutti gli strati corticali, in un ordine temporale strettamente controllato (Angevine J. B. Jr & Sidman R. L. 1961; Rakic P. 1974; Rakic P., 1972; Britanova, O. 2006; Rakic P. 2003).

I primi neuroni appaiono nel topo intorno ad E11 e formano uno strato noto come pre-piastra (PP). Tale prepiastra viene poi suddivisa, da parte dei neuroni successivamente generati, in una zona più marginale (MZ), antesignana dello strato I, e una zona profonda, la sub-piastra (SP), destinata a regredire e/o ad essere assorbita dalla porzione profonda dello strato VI.



**Figura 9 | Rappresentazione della generazione dei neuroni di proiezione con una modalità interno-esterno da parte dei progenitori della VZ e SVZ (Bradley J. M., 2007).**

I primi neuroni formano la pre-piastra (PP), che viene successivamente suddivisa in una zona più marginale (MZ) e una zona localizzata più profonda, la sub-piastra (SP). La piastra corticale (CP), che dà vita alla neocorteccia multistratificata, si sviluppa tra questi due strati così che i neuroni che nascono successivamente raggiungono la piastra corticale migrando oltre i neuroni nati prima. Differenti classi di neuroni di proiezione nascono secondo ondate sovrapposte. Bisogna tuttavia considerare che la neurogenesi caudo-mediale si verifica dopo quella rostro-laterale (Bayer, S. A. & Altman, J. 1991). Abbreviazioni: CH cortical hem, E giorno embrionale, Ncx neocorteccia, IZ zona intermedia, LGE eminenza gangliare laterale, MGE eminenza gangliare mediana, SVZ zona sotto ventricolare, VZ zona ventricolare, WM sostanza bianca.

Tali neuroni successivamente generati costituiscono la piastra corticale (CP), vale a dire la precorritrice degli strati neocorticali dal VI al II (Bayer, S. A. & Altman, J. 1991): in essa, i neuroni che nascono più tardi oltrepassano i più precoci e si dispongono in superficie a loro, in accordo con la cosiddetta “inside-out rule” (Angevine J. B. Jr & Sidman R. L. 1961; Rakic P. 1974) (Figura 9).

Ci sono quattro tipi di progenitori all’interno della neocorteccia in via di sviluppo (Tabella 1):

- a) Cellule neuroepiteliali o “neuroepithelial cells” (NEs)
- b) Cellule della glia radiale o “radial glia cells” (RGs)
- c) Precursori neuronali corti o “short neuronal precursor” (SNPs)
- d) Progenitori intermedi o “intermediate progenitor cells” (IPCs)

Tabella 1 | Cellule progenitrici neurogeniche nella corteccia cerebrale di topo (modificata da Pontious A., 2008).

<b>NE</b> (neuroepithelial cells)	E9.5-E13.5 IKNM nestin <sup>+</sup>
<b>RG</b> (radial glial cells)	E11.5-P0.5 IKNM nestin <sup>+</sup> , glast <sup>+</sup> , BLBP <sup>+</sup>
<b>SNP</b> (short neuronal precursors)	E12.5-16.5 IKNM, apical Tubulin- $\alpha$ 1 promoter
<b>IPC</b> (intermediate progenitor cells)	E10.5-P0.5 multipolar, basal Tbr2 <sup>+</sup>

Inizialmente, un singolo strato pseudostratificato di cellule neuroepiteliali (NEs) va incontro a divisioni cellulari simmetriche espandendo così l'insieme di progenitori multipotenti, mentre solo una piccola percentuale di queste vanno incontro a divisioni asimmetriche per generare i neuroni più precoci (Götz M., 2005; Smart I.H.1973). Mentre la neurogenesi procede, le cellule neuroepiteliali possono trasformarsi in cellule della glia radiale con le quali condividono larga parte del profilo antigenico (Hartfuss E.,2001; Malatesta P., 2003). Le cellule della glia radiale possiedono un lungo processo che si estende dalla superficie ventricolare fino a quella piaie, esprimono marcatori specifici, quali Blbp ed Hes5, e trascrivono da un promotore minimo coniugato con l'enhancer neurale del gene della nestina. I precursori neuronali corti si distinguono dalle cellule della glia radiale per l'assenza di un processo esteso fino alla superficie piaie e grazie all'abilità di guidare l'espressione a partire dal promotore della tubulina  $\alpha$ 1 (pTa1) (Gal J.S. 2006).

Questi primi tre tipi di progenitori (NEs, RGs, SNPs) danno luogo a migrazione nucleare intercinetica, ovvero hanno il nucleo che cambia livello radiale a seconda della fase del ciclo cellulare in cui si trovano: sintetizzano il DNA quando il loro nucleo è lontano dal ventricolo e si dividono quand'esso è in posizione apicale (ovvero presso la cavità ventricolare). RGs e SNPs possono produrre neuroni o singole cellule progenitrici intermedie mediante divisione asimmetrica con contemporaneo auto-rinnovamento (Haubensak W., 2004; Miyata T., 2004; Noctor S.C., 2004; Gal J.S., 2006; Noctor S.C., 2001; Miyata T., 2001). Infine, completamente diversa la biologia delle IPCs. Prodotte dalle cellule neuroepiteliali, dalle cellule della glia radiale e forse dai precursori neuronali corti (Götz M., 2005;

Götz M., Barde Y.-A., 2005; Malatesta P., 2003), esse si dividono in posizione basale, esprimono il fattore di trascrizione *Tbr2/Eomes*, possiedono una morfologia multipolare ed una limitata capacità di divisione mitotica (2 o 3 cicli cellulari) (Haubensak W., 2004; Miyata T., 2004; Noctor S.C., 2004; Englund C., 2005; Wu S.X., 2005). Sono ristrette ad un destino neurale e producono, attraverso divisioni simmetriche, coppie di IPCs o di neuroni, (Haubensak W., 2004; Miyata T., 2004; Noctor S.C., 2004; Hevner R.F., 2006).

La regolazione del ciclo cellulare è responsabile del controllo del numero di neuroni nella corteccia adulta, come in altre parti del SNC (Oppenheim R. W., 1989). Due parametri del ciclo cellulare sono implicati nel determinare il numero di neuroni: la velocità di ciclo cellulare e l'equilibrio tra rientro od uscita dal ciclo cellulare. Mentre le divisioni proliferative generano due progenitori che rientrano in ciclo cellulare, le divisioni differenziative producono almeno una cellula figlia che esce dal ciclo cellulare per andare incontro ad un processo differenziativo (Figura 11).

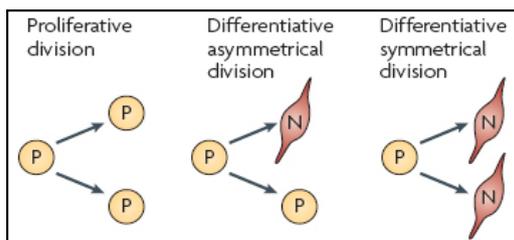


Figura 11| Modalità di divisione cellulare dei progenitori corticali (modificata da Dehay C. e Kennedy H., 2007).

Sebbene i meccanismi molecolari che regolano la frequenza delle divisioni proliferative rispetto a quelle differenziative siano largamente sconosciuti, evidenze convergenti suggeriscono che le modalità di divisione cellulare siano correlate a componenti del ciclo cellulare, in particolare a componenti regolatori della fase G1 (Figura 12).

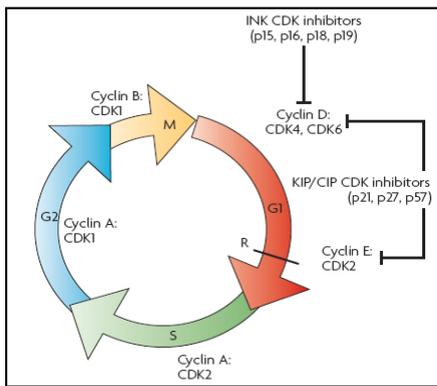


Figura 12| Struttura e regolazione del ciclo cellulare (Dehay C. e Kennedy H., 2007).

Durante la corticogenesi (nel topo), si verifica un progressivo incremento nella produzione del numero di neuroni e nella frequenza delle divisioni differenziative, simultaneamente a una riduzione della velocità di proliferazione dovuta principalmente ad un allungamento della fase G1 (Caviness V.S., 1995). L'allungamento della fase G1 del ciclo cellulare facilita la stimolazione da parte di segnali extracellulari dell'uscita dal ciclo (G0), per intraprendere la strada differenziativa (Zetterberg A., 1995). La durata della fase G1 e la modalità di divisione cellulare sono connesse anche dall'evidenza che marcatori espressi selettivamente in divisioni neurogeniche inibiscono la progressione G1 (per esempio *Tis21*; Iacopetti, P. 1999; Tirone F. 2001). Esperimenti di "birth-dating" nei roditori, assieme a manipolazioni dell'ambiente extracellulare, suggeriscono che il destino neurale è deciso prima della migrazione (Caviness V. S. 1972; Caviness V.S. & Sidman R.L.J. 1973; Jensen K.F. & Killackey H. P. 1994). I progenitori precoci destinati a generare neuroni degli strati profondi sono multipotenti e possono generare i neuroni degli strati superficiali nati più tardivamente, quando trapiantati in nicchie di progenitori tardivi. Nel corso dello sviluppo questi ultimi acquisiscono una competenza differenziativa progressivamente più ristretta, cosicché risultano incapaci di generare neuroni degli strati più profondi, anche se trapiantati in un ambiente più "giovanile". (McConnell S. K. & Kaznowski C. E 1991).

Fattori responsabili della generazione di differenti fenotipi neurali sono stati riconsiderati attraverso studi di "lineage" in progenitori corticali isolati (Shen Q. et al., 2006). Inoltre è stato dimostrato che anche la scelta fra destino neurale e gliale è conservata *in vitro* (Sun Y., 2005). Questi risultati dimostrano che nella determinazione del destino cellulare esiste un programma intrinseco (Shen Q. et al.,

2006) che viene influenzato da fattori estrinseci (McConnell S. K. & Kaznowski C. E 1991; Frantz G.D. & McConnell S.K. 1996; Fishell G. 1995; Qian X., 1997). L'ordine temporale della generazione dei sottotipi neuronali *in vitro* corrisponde a quella osservata *in vivo*: i neuroni di Cajal-Retzius, si formano per primi, seguiti da cellule esprimenti marcatori degli strati bassi VI-V (*Foxp2*, *Tle4*, *ER81*) e successivamente degli strati superficiali IV-II/III (*Cux1*), confermando le prime evidenze su una progressiva restrizione del destino cellulare.

La scoperta che la regolazione del ciclo cellulare e i programmi di sviluppo responsabili della diversità neurale, sono mantenuti *in vitro*, implica la possibilità di un coinvolgimento dei meccanismi di controllo del ciclo cellulare nella determinazione del destino cellulare (Shen Q. et al., 2006; Cremisi F., 2003; Ohnuma S., 2001). Tali meccanismi potrebbero determinare sia il numero che il fenotipo dei neuroni corticali generati in ciascuno strato.

In assenza di *Foxg1*, i progenitori corticali non sono specificati, mentre il numero dei progenitori dell'archicorteccia (che dà vita all'ippocampo) e dell'orlo corticale (una delle principali sorgenti di cellule di Cajal-Retzius) aumenta (Dou C.L., 1999; Muzio L. & Mallamaci A., 2005)(Figura 13). La rimozione di *Foxg1* più tardi ad E13.5 da progenitori che dunque hanno già acquisito l'identità neocorticale risulta nella produzione di cellule con caratteristiche di Cajal-Retzius (Shen Q. et al., 2006; Hanashima, C., 2004), indicando che la persistente espressione di *Foxg1* nel corso della neurogenesi è richiesta per il mantenimento dell'identità corticale.

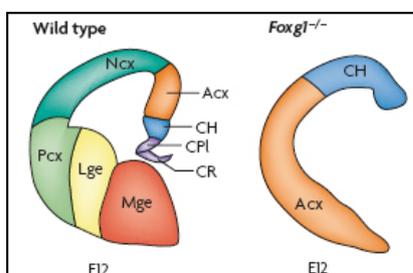


Figura 13| *Foxg1* e la specificazione dei progenitori corticali (modificata da Molyneaux B. J., 2007).

La mancanza del fattore di trascrizione forkhead box G1 causa l'agenesi dei gangli basali, l'eliminazione del dominio progenitoriale neocorticale e l'espansione del CH (cortical hem) e dell'Acx (archicorteccia). Abbreviazioni: CR tetto coroidale, Cx corteccia, Pcx paleocorteccia

Nonostante dunque i progenitori acquisiscano una competenza differenziativa progressivamente più ristretta, trattengono un estremo grado di plasticità.

Evidenze recenti suggeriscono che *Foxg1* contribuisca allo sviluppo del telencefalo mantenendo lo stato progenitoriale ed assicurando che questi progenitori mantengano un'adeguata cinetica proliferativa, in particolare nel telencefalo

rostrale. Quando la neurogenesi inizia, infatti, nei mutanti *Foxg1*<sup>-/-</sup> si verifica una riduzione del tasso di proliferazione, un incremento del tasso di differenziazione, e una riduzione localizzata dei livelli di apoptosi (Martynoga B., 2005). *Foxg1* può regolare questi processi attraverso diversi meccanismi. Esso infatti regola direttamente e indirettamente l'espressione di una serie di morfogeni nel telencefalo in via di sviluppo. I difetti di proliferazione cellulare e di apoptosi, che iniziano nel telencefalo rostrale ad E10.5, possono essere direttamente correlati ad una riduzione dell'espressione di *Fgf8*, potente mitogeno, in questo territorio (Martynoga B., 2005). Evidenze più recenti (Siegenthaler J.A., 2008) ricavate da topi eterozigoti, *Foxg1*<sup>-/cre</sup>, dimostrano una riduzione significativa delle dimensioni della zona subventricolare dovuta ad una produzione ridotta di IPCs, e più tardi nella corticogenesi, ad un incremento della lunghezza del ciclo cellulare nella zona ventricolare. La perdita di IPCs coincide con un incremento dell'espressione di p21, un inibitore delle chinasi ciclina dipendenti (CKI), la trascrizione del quale è direttamente inibita da *Foxg1* con l'effetto di inibire potentemente la progressione nel ciclo cellulare dei progenitori nella zona ventricolare (Seoane J., 2004; Siegenthaler e Miller, 2005). *Foxg1* promuoverebbe dunque la crescita corticale in parte consentendo l'espansione del pool di IPCs nella corteccia in via di sviluppo inibendo l'espressione di p21 (Siegenthaler J.A., 2008).

*Emx2* è espresso nella zona ventricolare e nelle cellule di Cajal-Retzius; almeno nel topo, il suo mRNA è completamente assente negli altri neuroni corticali post-mitotici (Simeone et al., 1992; Gulisano et al., 1996; Mallamaci et al., 1998). Nelle cortecce *Emx2*<sup>-/-</sup> si può notare la perdita delle cellule di Cajal-Retzius nella zona marginale a partire da stadi relativamente tardivi della corticogenesi, fra E13.5 ed E15.5 (Mallamaci et al., 2000a). Tuttavia, la zona marginale (MZ) e la sub-piastra (SP) si formano e i difetti di laminazione corticale sono meno marcati in comparazione con i mutanti *Emx1,2*<sup>-/-</sup>. Le cellule di Cajal-Retzius nascono e occupano inizialmente la zona marginale ma vengono successivamente perdute (Shinozaki K., 2002). Dunque, il profilo d'espressione e il fenotipo mutante suggeriscono che *Emx2* agisca nel mantenere le cellule di Cajal-Retzius nella zona marginale. Inoltre tra E11 ed E13 il primordio occipito-ippocampale dei mutanti *Emx2*<sup>-/-</sup> si espande meno rispetto al normale. Questo sembra dipendere da un selettivo rallentamento della velocità di sintesi del DNA ed ad un'esagerata

neuronogenesi in questa regione. A ciò si associa un incremento dell'espressione di inibitori dei complessi chinasi-ciclina dipendenti *Kip<sup>p27</sup>* e *Kip<sup>p57</sup>*, un rapporto di espressione troppo elevato tra geni pro/antineurali ed una riduzione in quella regione dell'asse Delta-Notch-Hes (Muzio L., et al., 2005). Infine, *Emx2* promuove divisioni proliferative simmetriche. La sovra-espressione forzata di *Emx2* in colture ad alta densità di progenitori corticali aumenta la loro proliferazione, forzandoli a dividere in modo simmetrico; i precursori corticali derivati da topi knockout per *Emx2*, mostrano invece una proliferazione ridotta. Sembra dunque che la riduzione delle dimensioni degli emisferi corticali dei mutanti *Emx2<sup>-/-</sup>* faccia seguito ad una riduzione del numero di divisioni proliferative simmetriche (Heins N., et al. 2001). Tuttavia il ruolo di *Emx2* nel promuovere le divisioni simmetriche delle cellule staminali neurali rimane dibattuto, dal momento che studi successivi di guadagno e perdita di funzione in progenitori coltivati come neurosfere mostrano effetti opposti a quelli sopra riportati. In questi studi la sovraespressione di *Emx2* in cellule staminali neurali ne riduce la loro capacità proliferativa e la clonogenicità, mentre i progenitori derivanti da topi *Emx2<sup>-/-</sup>* sono più clonogenici della loro controparte selvatica (WT) (Galli R., R.M., et al., 2002; Gangemi et al., 2001, 2006).

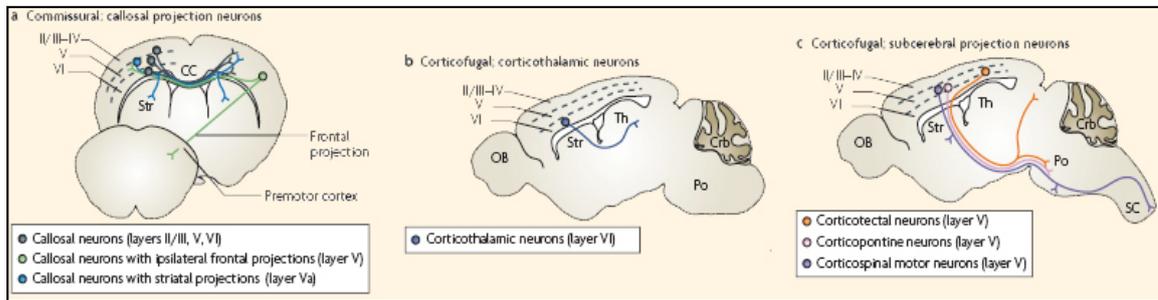
#### **1.1.4 CABLAGGIO**

Ogni area della corteccia è definita sia dalla sua struttura che dall'insieme di connessioni, che insieme determinano le sue funzioni sensoriali, motorie o cognitive. Sulla base delle loro connessioni anatomiche si possono distinguere tre classi di neuroni di proiezione presenti nella neocorteccia (Figura 14):

- a) associativi (che estendono le loro proiezioni assonali all'interno di un singolo emisfero)
- b) commessurali (che estendono le loro proiezioni assonali nella corteccia dell'emisfero opposto tramite il corpo calloso o la commissura anteriore)
- c) corticofugali (che estendono le loro proiezioni assonali a strutture non corticali; inclusi i neuroni subcerebrali e quelli corticotalamici)

Figura 14| Principali sottotipi di neuroni di proiezione all'interno della neocorteccia (Molyneux B. J., 2007).

Abbreviazioni: Crb cervelletto, OB bulbi olfattivi, SC midollo spinale



Esperimenti di trapianto eterotopico mostrano che la citoarchitettura area-specifica e l'eliminazione assonale dai neuroni di proiezione del layer 5 è plastica durante lo sviluppo (Schlaggar B.L., 1991). Trapiantando la corteccia occipitale, che differenzia in corteccia visiva, nella corteccia parietale, S1, quella acquisisce la citoarchitettura ed i marcatori specifici dell'area S1. Altri studi mostrano che lo strato 5 in via di sviluppo trapiantato dalla corteccia visiva a quella motoria, è in grado di mantenere le connessioni spinali, come fa normalmente la corteccia motoria matura, mentre lo stesso strato trapiantato dalla corteccia motoria a quella visiva perde la connessione spinale e mantiene quella collaterale al collicolo superiore, specifica al contrario della corteccia occipitale matura (Stanfield B.B., O'Leary D.D.M., 1985; O'Leary D.D.M., Stanfield B.B.; 1989). Perciò le proiezioni trattenute dai neuroni dello strato 5 trapiantati, sono appropriate all'area corticale nella quale vengono trapiantati e nella quale si sviluppano non all'area nella quale tali neuroni nascono. Anche le connessioni callosali e intracorticali sono plastiche e modificabili da parte di informazioni sensoriali (O'Leary D.D.M., Koester S.E., 1993). Questi esperimenti dimostrano che probabilmente lo sviluppo della distribuzione dei neuroni di proiezione è almeno in parte indipendente da fattori intrinseci.

Ad eccezione dello strato 6 dei neuroni corticotalamici, i neuroni di proiezione corticale inizialmente mostrano una distribuzione areale molto più ampia di quella riscontrata nell'adulto. Contrariamente a questa mancanza di specificità areale nella distribuzione precoce dei neuroni di proiezione, le proiezioni talamocorticali (TCAs) dai principali nuclei talamici sensoriali sono evidenti già nei primi stadi dello sviluppo, prima che i confini citoarchitetturici tra le aree emergano in maniera netta (O'Leary D.D.M., et al., 1994). Progressi sono stati fatti nello stabilire i meccanismi di

formazione delle proiezioni TCA, in particolare quelle subcorticali dal talamo dorsale alla neocorteccia (Polleux F., 2005) ma i meccanismi molecolari della formazione di tali proiezioni rimangono relativamente vaghi. Similmente ai ben definiti meccanismi che controllano lo sviluppo delle proiezioni retiniche nel sistema visivo (McLaughlin T., O'Leary D.D.M., 2005), le proiezioni TCA raggiungono in modo area specifico il loro bersaglio probabilmente grazie a gradienti molecolari intracorticali che guidano tali proiezioni (Dufour A., et al., 2003) e vengono rifinite grazie all'attività neuronale (Catalano S.M., Shatz C.J., 1998). I neuroni della sub-piastra e i loro assoni sono stati implicati nello sviluppo delle connessioni area specifiche delle proiezioni TCA, ma il loro ruolo nonché le basi molecolari rimangono ancora da definire (Allendoerfer K.L., Shatz C.J., 1994; Molnar Z., Blakemore C., 1995).

La corteccia riceve le informazioni sensoriali attraverso le sole proiezioni TCA che definiscono e controllano le caratteristiche funzionali delle aree sensoriali primarie. Inoltre le proiezioni TCA sono responsabili di molti degli aspetti anatomici che distinguono le aree corticali, come la citoarchitettura e la distribuzione dei neuroni di proiezione. Infatti tali proiezioni mostrano specificità di area per tutto il corso dello sviluppo e il differenziamento graduale delle aree all'interno della piastra corticale (CP) va in parallelo con lo sviluppo delle proiezioni TCA in essa (Chenn A., et al., 1997).

Riassumendo, tramite esperimenti di trapianto eterotipico, è stato dimostrato che la CP ha un'enorme plasticità nello sviluppo delle caratteristiche area specifiche, e che le diverse parti della CP hanno simili potenziali nello sviluppare caratteristiche uniche ad una specifica area. Nuovamente, le TCA sono state implicate come principale influenza nel controllo di questa plasticità nell'acquisizione delle caratteristiche area-specifiche (O'Leary D.D.M., et al., 1992; O'Leary D.D.M., et al., 1994).

Il ruolo delle TCA nella formazione dell'architettura non si limita a questi eventi tardivi nella CP differenziante. Esperimenti in vitro usando tessuto di topo, suggeriscono che le TCAs rilasciano un'attività mitogenica diffusibile che promuove la produzione sia di cellule gliali che di neuroni da espianti di VZ corticale (Dehay C., Kennedy H., 2007).

In mutanti *Emx2*<sup>-/-</sup>, si verificano anomalie nello sviluppo delle proiezioni TCA (Mallamaci A., et al., 2000b; Lopez-Bendito G., et al., 2002). *Emx2* è espresso fortemente nell'ipotalamo e in strutture telencefaliche specifiche localizzate lungo la via delle proiezioni TCA dove questi difetti di sviluppo si manifestano. Perciò la perdita di *Emx2* in queste strutture può determinare un loro aberrante differenziamento e di conseguenza portare a questi difetti (Bishop K.M., et al., 2003). I mutanti *Emx1,2*<sup>-/-</sup> mostrano difetti nello sviluppo della maggior parte delle proiezioni assionali. Tutte le maggiori commissure telencefaliche sono ipoplastiche (corpo calloso, commissura ippocampale, commissura anteriore) e la corteccia non manda assoni attraverso la capsula interna, né dallo strato 6 verso il talamo, né dallo strato 5 verso mesencefalo, romboencefalo e midollo spinale (Bishop K.M., et al., 2003).

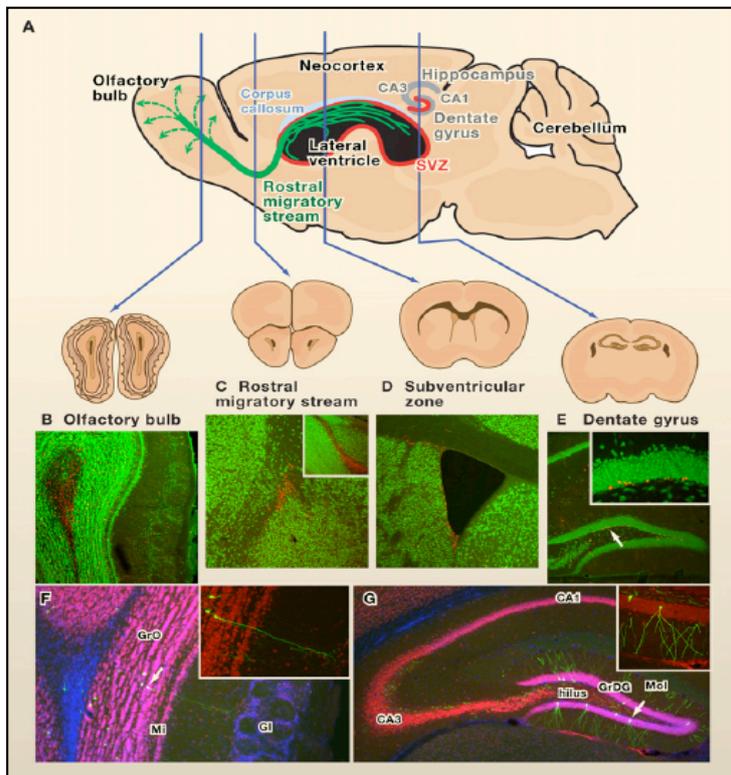
*Foxg1* è implicato nel promuovere le proiezioni controlaterali degli assoni delle cellule gangliari della retina (RGC). *Foxg1* è infatti espresso dalle RGCs nasali e dal presunto chiasma ottico (Hatini V., et al., 1994; Huh S., et al., 1999; Pratt T., et al., 2004).

In embrioni di topo *Foxg1*<sup>-/-</sup>, si verifica un significativo incremento nel numero delle proiezioni ipsilaterali (Pratt T., et al., 2004). *Foxg1* è richiesto dalla retina dorso-nasale affinché gli assoni crescano normalmente verso le cellule del chiasma ottico. Inoltre esso è richiesto dalle cellule del chiasma ottico stesso per sostenere la crescita normale degli assoni retinici (Tian N.M., 2008).

## **1.2 EMX2 E FOXG1 NEL SISTEMA NERVOSO ADULTO**

La neurogenesi nell'adulto si manifesta con tassi differenti nel corso di tutta la vita, ed è stata chiaramente dimostrata avere due localizzazioni precise in condizioni normali: nella zona subventricolare (SVZ) dei ventricoli laterali e nella zona subgranulare (SGZ) del giro dentato dell'ippocampo. I nuovi neuroni nella zona SVZ dell'adulto migrano per lunghe distanze attraverso la "rostral migratory stream" (RMS) e diventano neuroni granulari e periglomerulari nei bulbi olfattivi. I neuroni nati, invece, nella zona SGZ adulta migrano nello strato granulare del giro dentato e

diventano cellule granulari. Studi recenti hanno mostrato che i neuroni nati nel sistema nervoso dell'adulto si integrano nei circuiti esistenti e ricevono input funzionali (Zhao, C. 2007) (Figura 15).



**Figura 15| Neurogenesi nel cervello adulto di roditore (Zhao C., et al. 2008).**

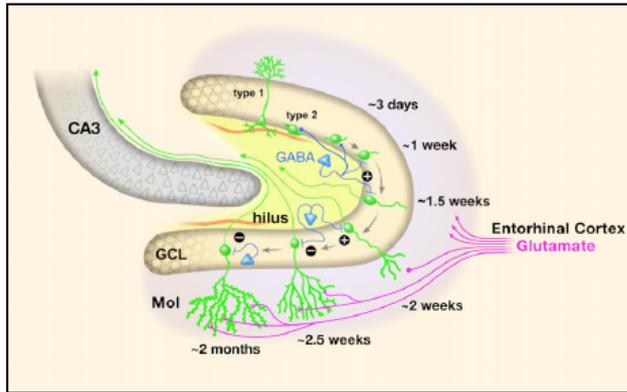
A) Sezioni sagittali e coronali del cervello di topo indicanti le zone dove si verifica la neurogenesi. Le zone in rosso indicano le zone germinali: SGZ e SVZ. I neuroni generati nella SVZ migrano attraverso la "rostral migratory stream" e sono incorporati nei bulbi olfattivi. B-E) Neurogenesi rivelata per incorporazione di BrdU

nei bulbi olfattivi (B), nella rostral migratory stream (C), SVZ (D), e nel giro dentato (E). I colori indicano: rosso, BrdU e verde, NeuN. (F e G) i neuroni nati nel bulbo olfattivo e nel giro dentato sono marcati tramite retrovirus esprimenti GFP. I colori indicano: rosso NeuN, verde GFP, blu DAPI.

La neurogenesi nell'adulto è regolata da attività fisiologiche e patologiche a tutti i livelli, inclusa la proliferazione delle cellule staminali neurali adulte (NSCs) o dei progenitori, il loro differenziamento e la determinazione del destino dei progenitori, ma anche la loro sopravvivenza, maturazione, e l'integrazione dei neuroni neonati. Inoltre queste cellule possono assolvere a funzioni nel cervello adulto coinvolgenti i bulbi olfattivi e l'ippocampo, quest'ultimo importante per alcune forme di apprendimento e di memoria.

Le cellule staminali neurali dell'adulto possono auto-rinnovarsi e differenziare in tutti i tipi di cellule neurali, inclusi i neuroni, astrociti, e oligodendrociti (Gage F.H., 2000).

Nella SGZ sono state identificati due tipi di progenitori neurali in base alla morfologia e all'espressione di set particolari di marcatori molecolari (Figura 16).



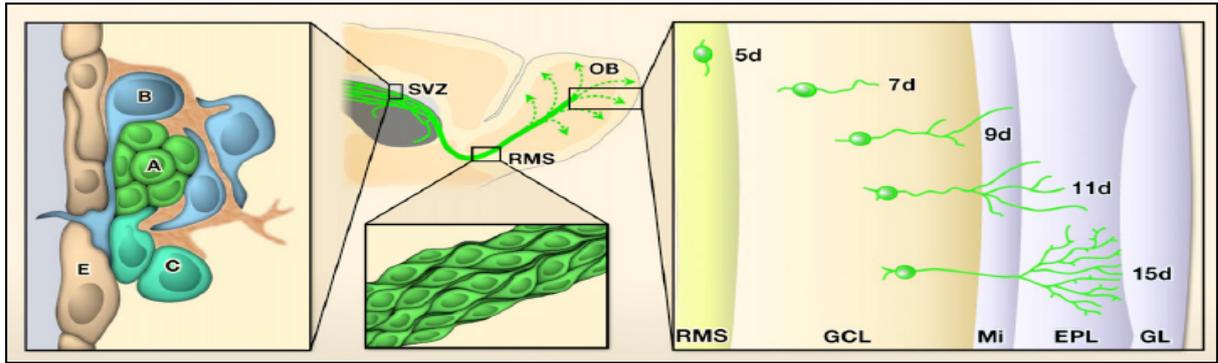
vascolatura in rosso. Abbreviazioni: GCL strato granulare

Figura 16| Neurogenesi nel giro dentato (Zhao C., et al. 2008).

Progenitori di tipo 1 e di tipo 2 nella SGZ possono essere identificati dalla morfologia e dell'espressione di specifici marcatori molecolari. I neuroni neonati nel giro dentato dell'ippocampo vanno incontro a differenti cambiamenti di tipo morfologico e fisiologico. Specificatamente, una transizione da GABA (blu) eccitatori a GABA inibitori e gli input eccitatori ai neuroni neonati si verificano durante la terza settimana dopo la nascita, concomitante alla crescita dell'albero dendritico. Le cellule progenitrici del giro dentato sono influenzate da astrociti locali e dalla

I progenitori ippocampali di tipo 1 hanno processi radiali che si estendono per l'intero strato di cellule granulari e ramificano nello strato molecolare interno. Queste cellule esprimono nestina, proteina fibrillare gliale acida (GFAP) il fattore di trascrizione della famiglia HMG Sry-relato e Sox2 (Fukuda S., et al., 2003; Garcia A.D., et al., 2004; Suh H., et al., 2007). Sebbene queste cellule esprimano un marcatore gliale come GFAP, esse risultano essere morfologicamente e funzionalmente differenti dagli astrociti maturi. I progenitori di tipo 2 ippocampali hanno solo corti processi e non esprimono GFAP. Questi potrebbero originare dai progenitori di tipo 1, ma evidenze dirette che delineano tale relazione mancano ancora. Un recente studio ha mostrato che le cellule di tipo 2 Sox2 positive possono auto-rinnovarsi e che una singola cellula Sox2 positiva può dare un neurone e un astrocita dando la prima evidenza delle proprietà staminali di progenitori neurali ippocampali (Suh H., et al., 2007). Il fattore di trascrizione Sox2 è importante per il mantenimento della staminalità non solo di certi tipi di cellule staminali adulte incluse le NSCs ma anche le cellule staminali embrionali (ES).

La zona subventricolare fiancheggiante l'ependima, è rappresentata da uno strato sottile che circonda i ventricoli laterali del cervello (Figura 15A e 17).



**Figura 17| neurogenesi nella zona subventricolare (Zhao C., et al. 2008).**

Le cellule progenitrici (A-C) nella SVZ sono adiacenti alle cellule ependimali (E) che circondano il ventricolo e interagiscono con la lamina basale della vascolatura locale. I neuroni neonati raggiungono il bulbo olfattivo (OB) attraverso una migrazione a catena e vanno incontro a cambiamenti morfologici e fisiologici prima di integrarsi come neuroni granulari nello strato granulare (GCL) e come neuroni periglomerulari nello strato granulare (GL). Abbreviazioni: Mi, strato mitrale; EPL, strato plessiforme esterno; RMS, rostral migratory stream.

Si è suggerito che le cellule ependimali possano fungere da NSCs responsabili della neurogenesi nella SVZ (Johansson C.B et al., 1999). Studi contrastanti hanno mostrato che le cellule ependimali sono quiescenti e che non hanno proprietà di NSCs *in vitro* (Capela A., Temple S., 2002; Doetsch F., et al., 1999). Recentemente Coskun V., et al. 2008, hanno gettato nuova luce su tale diatriba, dimostrando innanzitutto che il marcatore CD133/prominina1, espresso da cellule staminali in vari tessuti/organi, risulta essere specificatamente espresso anche in una subpopolazione di cellule ependimali e che queste sono nella maggior parte quiescenti ma possono dividersi *in situ* sotto condizioni che normalmente ucciderebbero le cellule adiacenti, attivamente proliferanti, della SVZ. Attraverso colture *in vitro* hanno altresì dimostrato che cellule CD133<sup>+</sup> possiedono le caratteristiche di cellule staminali neurali canoniche.

Ancor prima, era stato provato che cellule all'interno della SVZ contribuiscono in maniera importante alla neurogenesi a lungo termine nei bulbi olfattivi (Consiglio A. et al., 2004). Tre tipi di precursori esistono nella SVZ: cellule di tipo B, positive per la GFAP; cellule di tipo C, "transient amplifying"; cellule di tipo A, neuroblasti migratori (Figura 17). Le cellule di tipo B, GFAP positive, sono meno suscettibili all'azione di sostanze antimitotiche e potrebbero essere relativamente quiescenti (Doetsch F., et al., 1999).

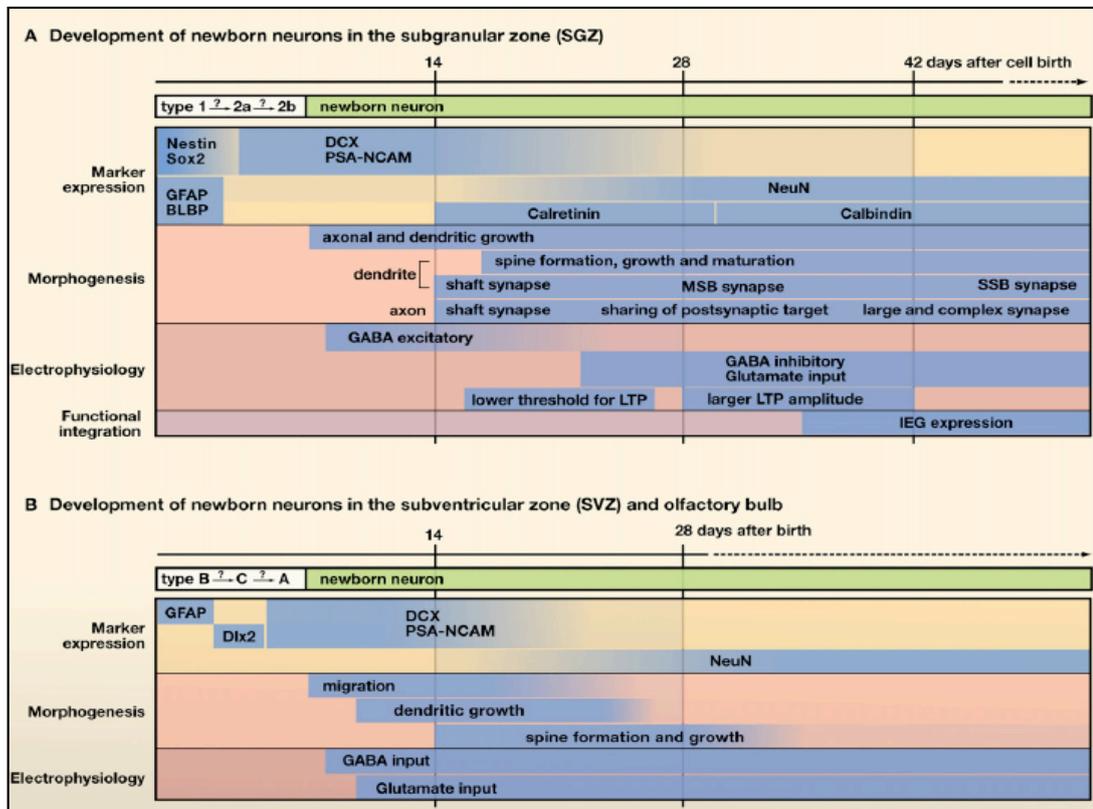


Figura 18| Sviluppo dei neuroni neonati nella SGZ e SVZ (Zhao C., et al. 2008).

Lo sviluppo dei neuroni neonati nella SVZ (A) e nella SVZ-bulbi olfattivi (B) come caratterizzata da specifici marcatori molecolari, dalla morfogenesi, dalla formazione delle sinapsi e da proprietà elettrofisiologiche e dall'integrazione funzionale. Abbreviazioni: MSB bottoni sinaptici multipli, SSB bottoni sinaptici singoli, LTP "long-term potentiation" IEG gene precoce immediato.

L'identificazione di progenitori nella SVZ è stata basata sull'analisi principalmente morfologica, tramite microscopia elettronica; ma le cellule di tipo A e C possono essere identificate anche mediante incorporazione di BrdU e di timidina triziata e grazie a specifici marcatori molecolari, come Dlx2, doublecortin (DCX) e la molecola neurale di adesione polisialilata (PSA-NCAM) (Figura 18).

Il potenziale dei progenitori della SVZ sembra essere limitato, in quanto il destino della loro progenie è determinato da informazioni posizionali stabilite durante lo sviluppo precoce del sistema nervoso centrale (Merkle F.T., et al., 2007). Studi di "lineage" hanno dimostrato, nel cervello di topo adulto, che i neuroni neonati, astrociti e qualche volta oligodendrociti possono derivare da cellule esprimenti un dato marcatore molecolare come Nestina, GLAST e Sox2 (Breunig J.J., et al., 2007). L'origine embrionale delle cellule di tipo B è stata risolta solo recentemente, dimostrando che le cellule staminali subventricolari dell'adulto non sono legate ai precursori della zona subventricolare (progenitori intermedi) ma piuttosto alle cellule della glia radiale ventricolari. L'evidenza diretta deriva da studi di "lineage" in vivo,

dove cellule della glia radiale ventrale venivano marcate a P0 (giorno post natele) attraverso l'iniezione stereotassica di adenovirus esprimenti la Cre-ricombinasi in prossimità della corteccia piriforme. Le cellule marcate si sono trovate attorno al ventricolo come gli ependimociti, nello strato subependimale, nella RMS e nel bulbo olfattivo. Un'analisi accurata a stadi di sviluppo differenti dimostra che le cellule della glia radiale striatale trasformano la loro morfologia ritraendo i loro processi (Merkle F.T., et al., 2004). Evidenze più recenti, dimostrano che anche le cellule della glia radiale dorsali, marcate a P1 o P2, danno vita alle cellule dello strato subependimale (Ventura R.E., et al., 2007). Inoltre le cellule di tipo B condividono con le cellule della glia radiale meccanismi molecolari regolatori come il ruolo neurogenico del fattore di trascrizione Pax6 (Hank et al., 2005). Anche la via di segnalazione di Notch è condivisa dalle due popolazioni cellulari (Chambers C.B., et al., 2001). Queste evidenze dimostrano che nonostante la chiara trasformazione morfologica durante la transizione da cellula della glia radiale a cellula staminale neurale adulta, quest'ultime condividono meccanismi molecolari comuni ai loro antenatori.

*Emx2* e *Foxg1* continuano ad essere espressi anche nel telencefalo di topo durante la vita adulta, in particolare nelle aree neurogeniche (zona subgranulare del giro dentato, SGZ; zona subventricolare, SVZ).

L'espressione di *Emx2* persiste nelle cellule proliferanti della zona subgranulare del giro dentato dell'ippocampo, di roditore (Briata et al., 1996; Mallamaci A., et al., 1998) e di primate (Tonchev A.B., 2006), suggerendone un ruolo di controllo nella proliferazione e nel differenziamento, non solo nel corso dello sviluppo ma anche nel corso della vita adulta. *Emx2* risulta essere espresso nei progenitori ippocampali di roditore sia in condizioni normali (Gangemi et al., 2001; Galli et al., 2002) sia a seguito di ischemia (Nakatomi et al., 2002). Da notare, inoltre, sono i difetti di migrazione dei precursori della SGZ e dei neuroni granulari differenziati (Oldekamp et al., 2004) e la ridotta dimensione del settore CA1 (Savaskan et al., 2002) nei mutanti murini *Emx2*<sup>-/-</sup>. *Emx2* risulta essere espresso anche nella zona subependimale del ventricolo laterale e la sua sovra-espressione in ANSCs (adult neural stem cells) le induce a dividersi asimmetricamente, dando

luogo ad una cellula in grado di auto-rinnovarsi ed ad una che dopo poco va incontro al differenziamento (Gangemi R.M.R., 2001).

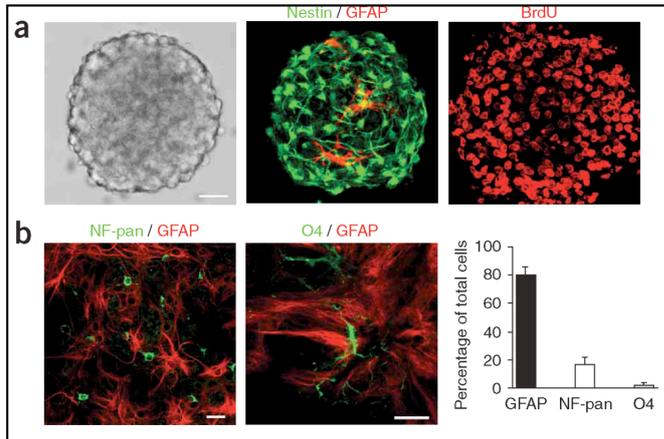
Shen L. et al., 2006, mostrano come l'aploinsufficienza di *Foxg1* risulti in una riduzione marcata delle dimensioni del giro dentato sia in ceppi puri (inbred) che non (outbred). Contrariamente a quest'ultima area, l'altra sede di neurogenesi dell'adulto, la zona subventricolare, non sembra essere interessata e presenta una normale neurogenesi dei bulbi olfattivi. La riduzione del giro dentato dell'ippocampo è associata ad una forte riduzione della neurogenesi postnatale che è quasi completamente esaurita in giovane età. Si dimostra anche contestualmente che topi *Foxg1*<sup>+/-</sup> sono iperambulatori in spazi aperti e rendono molto poco in test per il condizionamento contestuale alla paura, entrambe anomalie da imputarsi a disfunzioni ippocampali.

Alla luce delle innumerevoli funzioni giocate da questi fattori di trascrizione sia durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale, in particolare della corteccia, che in età adulta, nonché al ruolo controverso giocato da uno di essi *Emx2*, il presente lavoro di tesi si prefigge di studiarne gli effetti a seguito di sovraespressione condizionale, nella via neurogenica. Tale lavoro è stato focalizzato allo studio della cinetica proliferativa dei progenitori neurali corticali nel contesto di un progetto più ampio volto all'analisi degli effetti di *Foxg1* ed *Emx2* a partire dal compartimento delle cellule staminali neurali per una eventuale applicazione delle cellule modificate in un approccio di terapia *ex vivo* in cervelli ischemici. A tale scopo, si sono effettuate delle scelte tecniche/tecnologiche che hanno permesso la costruzione di un sistema *in vitro* che consentisse di studiarne nel modo più dettagliato possibile l'effetto.

### **1.3 SISTEMA DI COLTURA: NEUROSFERE**

Le neurosfere sono ammassi sferoidali flottanti di cellule, aventi origine da cellule staminali e/o progenitrici neurali, isolate dal sistema nervoso adulto o da quello fetale (Tropepe V., et al., 2001) e lasciate proliferare e/o aggregare (Figura 19). Le neurosfere sono strutture eterogenee contenenti cellule staminali neurali e differenziate circondate da matrice extracellulare; il loro centro contiene cellule

differenzianti GFAP<sup>+</sup> e  $\beta$ -tubulina<sup>+</sup> circondate da cellule Nestina<sup>+</sup>, epidermal growth factor receptor + (EGFR<sup>+</sup>),  $\beta$ 1-integrina<sup>+</sup> indifferenziate (Campos L.S., et al., 2004).



**Figura 19|** Caratterizzazione di tipiche neurosfere isolate dal telencefalo di topo adulto ed espanse in presenza di bFGF e EGF.

a) Micrografie (microscopio confocale) di sfere secondarie (passate almeno una volta dopo la raccolta). La maggior parte delle neurosfere esprimono marcatori di cellule staminali come Nestina, mentre GFAP è ristretto solo ad alcune cellule. Marcatura cumulativa con BrdU identifica le cellule proliferanti. b) La differenziazione di neurosfere da vita ad astrociti (GFAP<sup>+</sup>), neuroni (NF<sup>+</sup>) e oligodendrociti (O4<sup>+</sup>) nelle proporzioni indicate dall'istogramma. Scala 25 $\mu$ m.

Le neurosfere vengono mantenute e propagate in terreno addizionato con N2 e/o B27 e contenente i fattori di crescita bFGF (basic fibroblast growth factor) e/o EGF (epidermal growth factor) (Reynolds B.A., Weiss S., 1996; Gritti A., et al., 1996; Vescovi A.L., et al., 1993). Questi due fattori di crescita sono critici per la crescita cellulare. Sebbene bFGF sia richiesto per i progenitori neurali precoci e l'EGF per quelli tardivi (Tropepe V., et al., 1999), la presenza di entrambi questi fattori è ottimale per il mantenimento a lungo termine delle neurosfere *in vitro*.

Da tener presente che la progressione di colture di neurosfere è molto sensibile alle precise condizioni colturali prescelte. Variazioni nella densità cellulare alterano il microambiente, che a sua volta può influenzare sia la capacità proliferativa che differenziativa (Tropepe V., et al. 1999). Costituenti differenti o la stessa concentrazione dei fattori di crescita nel mezzo (Arsenijevic Y., et al., 2001; Irvin D. K., et al., 2003), il metodo e la frequenza dei passaggi (Caldwell M.A., et al., 2001), se le sfere vengono dissociate prima del differenziamento (Caldwell M.A., et al., 2001), portano a differenze sia nella composizione cellulare sia nelle proprietà di ciascuna cellula all'interno delle neurosfere.

Numerose evidenze suggeriscono che l'espressione di tipici geni di controllo dello sviluppo sono mantenuti in modo regione specifica in colture di neurosfere anche dopo molti passaggi, e che le cellule coltivate come neurosfere mantengono la

capacità di differenziare in sottotipi neurali caratteristici della regione di origine (Parmar M., et al., 2002; Hitoshi S., et al., 2002; Klein C., et al., 2005; Ostefeld T., et al., 2002; Zappone M.V., et al. 2000).

Due lavori riportano il contrario. Machon O. et al., 2005 hanno mostrato che la presenza dei fattori di crescita bFGF e EGF sarebbe in grado di alterare i programmi genetici nelle cellule. Cellule isolate dal telencefalo dorsale sottoregolano l'espressione di marcatori dorsali (*Emx2/1*, *Pax6*, *Ngn1/2*, *Dach1*) e sovraregolano quella di marcatori ventrali (*Mash1*, *Nkx2.1*, *Shh*, *Oligo1/2*). Una simile sottoregolazione di *Pax6* ed *Emx2* in progenitori corticali coltivati come neurosfere era pure stata riportata in precedenza da Hack M.A. et al. (2004). E' possibile che tali discrepanze possano derivare in parte o del tutto dalla diversa densità alla quale le NSC sono state coltivate nei diversi studi, potendo gli effetti di comunità tipici delle coltivazioni dense favorire la ritenzione dell'identità regionale iniziale, le condizioni di coltivazione clonale favorire la perdita di tale identità.

Nonostante i limiti che l'uso della coltura di neurosfere ha nel saggiare le capacità staminali di una cellula (Singec I., et al., 2006), esse possono, al contrario, risultare utili come modello nello studio della neurogenesi e dello sviluppo neurale. Molti studi sul controllo molecolare e genico della specificazione regionale dei precursori neurali è stato eseguito *in vitro*. Approcci *in vitro* sono utili anche per determinare il grado di specificazione intrinseca presente nei precursori neurali a vari stadi dello sviluppo, come lo studio del pieno potenziale di cellule rimosse da influenze esterne fornite dal loro ambiente naturale. Le neurosfere sono un buon sistema perchè mantenute in ambiente controllato privo di siero dove gli stimoli ambientali vengono tenuti sotto controllo. Inoltre risulta semplice manipolare le influenze esterne a cui le cellule sono esposte. Un altro vantaggio è la facile modificazione genetica tramite trasduzione con vettori retrovirali (Arsenijevic Y., et al., 2001; Falk A., et al., 2002; Heins, N., et al., 2002) e con vettori lentivirali (Capowski E.E., et al., 2007).

Studi comparativi del tessuto cerebrale fetale e di colture di neurosfere hanno mostrato che cellule staminali neurali espanse con tale metodo di cultura hanno comportamenti spaziali e temporali che rassomigliano alla loro controparte *in vivo* (Irvin D. K., et al., 2003; Tropepe V., et al., 1999).

E' necessario inoltre ricordare in tale contesto che è stato dimostrato che progenitori isolati, coltivati *in vitro* come culture clonali aderenti, producono neuroni in un ordine temporale *in vivo* normale (Shen Q., et al., 2006).

Questo sistema di coltura offre indubbi vantaggi per lo studio dell'effetto che la sovraespressione di *Foxg1* ed *Emx2* ha nel compartimento progenitoriale lungo la via neurogenica, consentendo di analizzarne gli effetti anche nel corso del tempo grazie alla possibilità di espandere e mantenere la coltura per un numero elevato di passaggi. La loro struttura eterogenea, contenente tutti gli istotipi generati a partire dalla cellula staminale neurale, ne fa un ottimo modello per studiare eventuali effetti anche sugli altri compartimenti (astro/oligodendrociti e neuroni) oltre che l'effetto diretto sul compartimento di sovraespressione (nel presente studio i progenitori neurali).

#### **1.4 PROMOTORI STATO-SPECIFICI**

Tanto nella terapia genica (Terazaki Y., et al., 2003; Chen P., 2008), quanto in studi volti a marcare e/o modificare una data popolazione cellulare, si pone il problema di far esprimere una data proteina o molecola di RNA in una finestra spazio-temporale ben definita. A tale scopo si sono stati studiati e sviluppati diversi enhancer-promotori (EPs), principali elementi genici agenti *in cis* nella regolazione dell'espressione genica, nello spazio, nel tempo, nello sviluppo e nell'ambiente. Tali EPs possono essere naturali, composti od artificiali.

Sebbene molto allettante, l'impiego di tali EPs richiede alcune particolari cautele. Ad esempio, taluni EPs considerati ubiquitari possono risultare non tali *in vivo* (RSV) (Overbeek P.A., et al., 1986). Ancora, l'EP prescelto controlla sì la trascrizione del transgene desiderato, ma potrebbe anche influenzare l'espressione di geni endogeni qualora fosse stato trasferito mediante un vettore che si integra nel cromosoma dell'ospite (Chen P., 2008; Weber E.L., et al., 2007; Hong S., et al., 2007). L'EP esogeno inserito nel genoma vettore virale potrebbe influenzare l'espressione di altri geni virali diversi dal transgene, aumentando in questo modo l'immunogenicità del vettore virale stesso (Nakai M., et al.; 2007). L'uso di promotori eterologhi multipli nello stesso vettore virale potrebbe portare ad una loro interferenza reciproca (Curtin J.A., et al.; 2008). Infine, prodotti biologicamente attivi come proteine virali, fattori di

trascrizione e citochine espresse dai vettori di trasferimento genico potrebbero influenzare la fisiologia cellulare ed influenzare così la stessa attività dei promotori tessuto specifici, oscurandone la loro specificità (McCart J.A., et al. 2002; Rohmer S., et al.; 2008).

Esistono diversi tipi di EPs utilizzabili per guidare l'espressione del transgene in modo diverso, tra questi: EPs ubiquitari come CMV,RSV o Pgk; EPs tessuto specifici, stadio di sviluppo specifici, stato specifici o regolati dal ciclo cellulare; EPs indotti dall'ipossia; EPs regolati da segnali ambientali; EPs indotti dall'ipertermia; EPs indotti da radiazione o chemioterapia; EPs regolabili epigeneticamente o promotori virali.

Nel nostro caso, abbiamo impiegato la tecnologia dei promotori stato-specifici, per costruire un sistema che consentisse di seguire e/o modificare i compartimenti lungo la via neurogenica *in vitro*. I promotori stato specifici scelti a tale scopo sono stati studiati in precedenti lavori per la loro specificità di dominio, ovvero per la capacità di marcare coorti di popolazioni lungo la via neurogenica.

Pertanto ciascun compartimento, di tale via, è stato marcato mediante l'uso di proteine fluorescenti guidate da opportuni promotori stato-specifici.

I promotori, scelti per i loro profili di espressione, sono i seguenti:

- a) promotore  $T\alpha 1$  per marcare i progenitori neurali (SNP)
- b) promotore E/Nestin:P/hsp68 per marcare le cellule staminali neurali
- c) SCG102S2N per marcare i neuroni postmitotici

$T\alpha 1$ , membro della famiglia multigene della tubulina  $\alpha$ , è localizzata quasi esclusivamente nel sistema nervoso, ed appare specifica per i neuroni (Miller F., et al., 1987; Gloster A., et al., 1994). Sebbene maggiormente abbondante nei neuroni che estendono neuriti, esso è espresso precocemente nell'ontogenesi neuronale, incluso nelle cellule della VZ (Miller F., et al., 1987). La regione di 1.1 kb al 5' del gene  $T\alpha 1$ , contiene quelle sequenze responsabili dell'espressione in neuroni neonati, e della regolazione dell'espressione come funzione della crescita (Gloster A., et al., 1994). Topi transgenici con tale regione fusa ad un reporter LacZ nucleare esprimono il transgene guidato dal promotore  $T\alpha 1$  solo all'interno del sistema nervoso centrale in via di sviluppo e successivamente solo nei neuroni e nella VZ neurale, suggerendo che tale promotore è espresso da cellule mitotiche della VZ e dalla loro progenie precoce. Tale promotore è stato utilizzato per isolare i progenitori

neurali e la loro progenie precoce sia nel telencefalo di pollo che di ratto (Wang S., et al., 1998). Il promotore  $T\alpha 1$  è stato trovato essere attivo in precursori mitotici ristretti ad un destino neurale e non gliale e nella progenie precoce neuronale (Wang S., et al., 1998). Gal J.S., et al., 2006 hanno dimostrato che questo promotore, precedentemente descritto essere espresso dai progenitori neuronali (Gloster A., et al., 1994; Sawamoto K., et al., 2001), è preferenzialmente espresso dai progenitori neurogenici SNPs nella VZ prenatale murina. Le popolazione  $T\alpha 1+$  è rappresentata da cellule attivamente proliferanti e da neuroni neonati uscenti dalla zona germinale. Inoltre in tale lavoro si mette in evidenza che gli SNPs, caratterizzati da un processo apicale che non raggiunge la superficie piaie e da un destino neuronale, rappresentano una popolazione distinta dal punto di vista morfologico e molecolare dalle cellule della glia radiale (Figura 20).

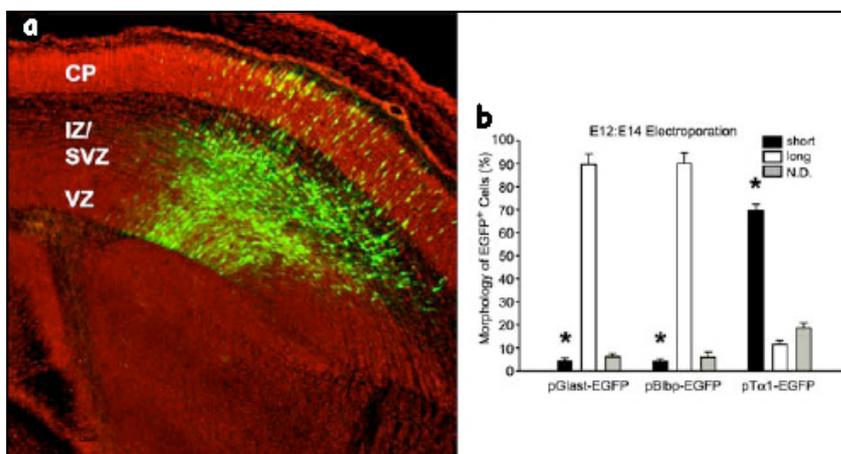


Figura 20| Elettroporazione di promotori cellula specifici per l'identificazione differenziale di precursori lunghi e corti della VZ (Gal J.S., et al., 2006).

a) Il promotore  $T\alpha 1$  marca preferenzialmente le cellule dal prolungamento corto della VZ. 48 ore dopo l'elettroporazione in utero con il costrutto pTα1-hGFP, molti neuroni generati nelle VZ e nella SVZ si trovano migrati attraverso la IZ nella

CP. b) 48 ore dopo l'elettroporazione in utero dei costrutti pGLAST-EGFP, pBlbp-EGFP, pTα1-hGFP. Sul totale delle cellule i primi due costrutti marcano le RGCs mentre il terzo dalle cellule presentanti un prolungamento apicale corto, SNPs.

Il promotore  $T\alpha 1$  è stato visto essere in grado di identificare e dunque portare all'isolamento di progenitori neurali anche nel sistema nervoso adulto (Roy N.S., et al., 2000). Tale promotore identifica progenitori neurali isolati dall'ippocampo adulto. Può dunque essere utilizzato per identificare progenitori neuronali sia dal cervello adulto che fetale (Wang S., et al., 1998; Wang S., et al., 2000).

Nestina, una proteina appartenente ai filamenti intermedi, è espressa nelle cellule staminali neurali del sistema nervoso centrale in via di sviluppo (Reynolds B.A., et al. 1992; Frederiksen K., 1988). L'espressione di nestina nel sistema nervoso centrale in via di sviluppo è spazialmente e temporalmente correlata allo stadio



l'enhancer di 714pb include peraltro un elemento superconservato di 120 pb, essenziale per la sua funzione embrionale (Josephson et al., 1998; Lothian et al., 1999; Yaworsky et al., 1999). La regione di 636 pb (1162-1798) del secondo introne di ratto è invece pienamente sufficiente per ricapitolare l'espressione di nestina nel sistema nervoso centrale in via di sviluppo (Kawaguchi A., 2001). In più essa è attiva nei progenitori neurali dell'ipocampo adulto (Roy N.S., et al., 2000). Pertanto, il promotore utilizzato nel presente lavoro, per guidare l'espressione della proteina fluorescente mCherry (Shaner N.C., et al. 2004) nel compartimento delle cellule staminali neurali, è stato costruito assemblando tale regione di 636 pb (Kawaguchi A., et al., 2001; Sunabori T., et al., 2008) con un promotore minimo non dotato di attività basale, derivato dal gene heat shock protein-68 (hsp68) (Rossant J., et al., 1991) (Figura 22).

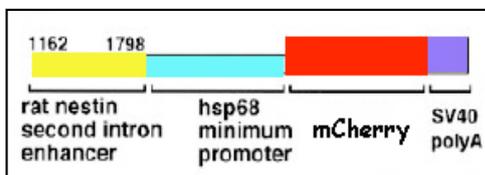


Figura 22| Struttura del promotore E/nestin:P/hsp68 (modificata da Kawaguchi A., et al., 2001).

L'enhancer del secondo introne del gene della nestina di ratto (1162-1798) (Lothian C., et al., 1997) è stato messo a monte del promotore minimo della heat shock protein-68 (hsp68) (Rossant J., et al., 1991).

E' necessario inoltre riportare che tale promotore, E/nestin:P/hsp68, identifica non solo i progenitori neurali durante lo sviluppo ma si è rilevato utile anche nell'isolamento di questi precursori dall'ippocampo adulto (Roy N.S., et al., 2000). La popolazione isolata, in questo caso, sembra essere analoga anche se non identica alla popolazione isolata tramite il promotore  $T\alpha 1$  (Roy N.S., et al., 2000).

Per seguire il compartimento di neuroni post-mitotici, abbiamo preso in considerazione il promotore sintetico SCG102S2N, descritto in Namikawa K., et al. (2006). In tale lavoro gli autori assemblano il promotore neurone-specifico del gene superior cervical ganglion 10 (SCG10, o stathmina) (Mori N., et al., 1992) con più copie del NRSE (Neuronal restrictive silencer element) (Schoender C.J., et al. 1995) in diverse posizioni, fino ad ottenere un promotore nel contempo molto potente ed altamente specifico per i neuroni, ben superiore in tal senso a quelli della neuron-specific enolase (NSE) (Navarro V., et al., 1999) e della Sinapsina 1 (Kugler S., et al., 2001) (Figura 23). Abbiamo pertanto selezionato tale promotore sintetico e lo

abbiamo impiegato per guidare l'espressione della proteina fluorescente mCerulean (Rizzo M.A., et al., 2004) nel compartimento neuronale.

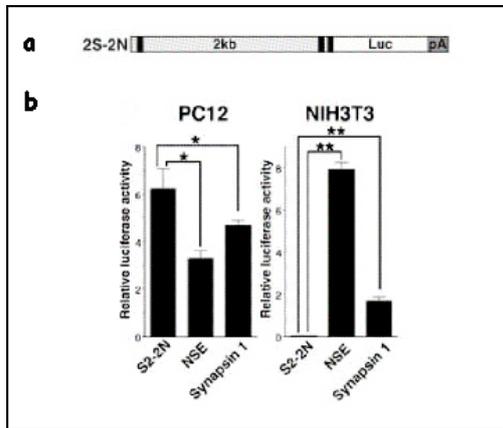


Figura 23| Attività del promotore SCG10 ingegnerizzato con sequenze NRSEs (modificata da Namikawa K., et al., 2006).

a) Rappresentazione schematica del promotore. Le barre nere rappresentano le sequenze NRSEs aggiunte. b) Attività della Luciferasi sotto tre promotori a confronto, SCG102S2N, NSE, Sinapsina 1, in cellule PC12 (linea cellulare neuronale) e in NIH3T3 (linea cellulare non neuronale).

## 1.5 SISTEMA DI ESPRESSIONE GENICA TET-ON

Per guidare l'espressione dei geni *Foxg1* ed *Emx2* nel compartimento degli SNP (pTα1+), si è deciso di utilizzare il sistema inducibile Tet-On (Gossen et al., 1995).

In tale sistema l'espressione è attivata grazie alla somministrazione di doxiciclina (Dox) e i livelli d'espressione possono essere finemente controllati attraverso variazioni nella concentrazione di Dox (Figura 24).

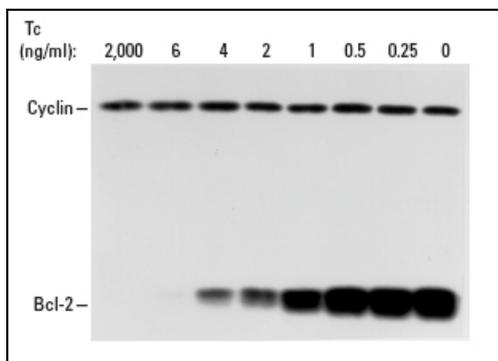


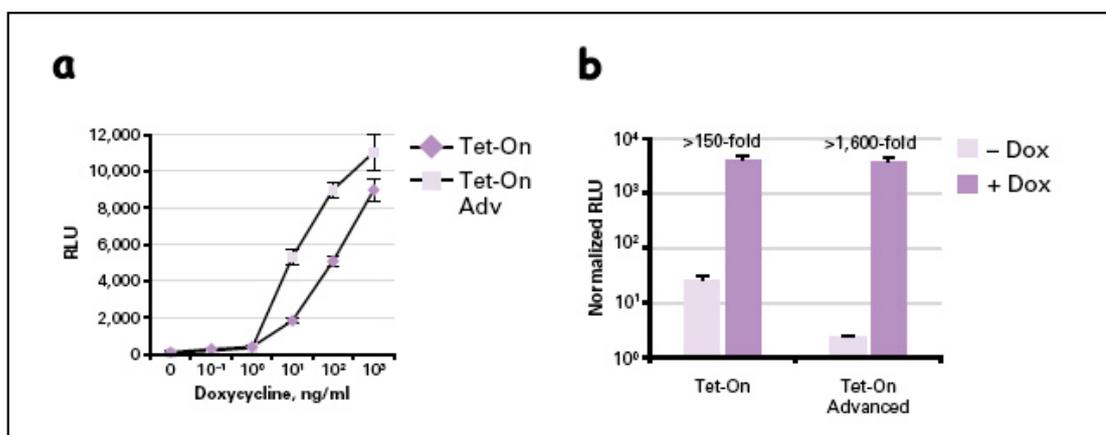
Figura 24| Controllo on/off inducibile nel sistem Tet (da website di Clontech).

Cellule HeLa S3 Tet-Off sono state stabilmente trasfettate con un plasmide contenente il gene Bcl-2 sotto il controllo del promotore TRE e cresciute in presenza della concentrazione indicata di Tc (tetraciclina). Westerblot contenente 100µg di proteina totale per ciascuna condizione è stata rilevata tramite anticorpi monoclonali specifici per l'isoforma umana di Bcl-2 e ciclina B1.

Il sistema Tet-On è caratterizzato dall'aver il repressore Tet inverso (rTetR) che è stato creato dal cambiamento di 4 amminoacidi nel TetR (Hillen W., et al., 1994; Gossen et al., 1995). Questa proteina TetR, di 37-KDa (207aa) è fusa con il dominio d'attivazione C-terminale (127aa) della proteina VP16 del virus Herpes simplex

(Triezenberg et al. , 1988). Il dominio di VP16 converte la proteina TetR da repressore trascrizionale ad attivatore e la risultante proteina prende il nome di transattivatore tetraciclina dipendente (rtTA). La proteina a seguito della mutazione amminoacidica è una tTA inversa (rtTA).

Il sistema Tet-On utilizzato (Tet-On Advanced), tuttavia, possiede modificazioni nella proteina transattivante rtTA che ne aumentano le prestazioni rispetto al sistema Tet-On originale (Figura 25).



**Figura 25| Il sistema Tet-On Advanced è più sensibile alla Dox e presenta livelli basali minori del sistema Tet-On tradizionale (modificato da Clontech website)**

a) Due linee cellulari Hek293 trasformate stabilmente con pTet-On e pTet-On Advanced sono state transientemente trasfettate con pTRE2-Luciferasi. Le cellule sono state esposte alle concentrazioni indicate di Dox prima di essere analizzate per l'attività di luciferasi a 48h. b) Cellule MCF-7 capaci di indurre l'espressione della luciferasi, sono state generate con il sistema Tet-On o Tet-On Advanced. l'espressione dell'aluciferasi è controllata dal promotore TRE2 nel sistema Tet-On e Tre-tight nel sistema Tet-On Advanced. Le cellule sono state trattate con o senza 1µg/ml di Dox prima di saggiare l'attività della luciferasi. Come si può notare i livelli di espressione massima sono simili per entrambi i sistemi cellulari ma la riduzione dei livelli basali fa si che nel sistema Tet-On Advanced ci sia una induzione maggiore.

L'espressione e la stabilità della proteina rtTA-Advanced nelle cellule di mammifero è stata ottimizzata rimpiazzandone i codoni batterici originali con codoni di mammifero e rimuovendo siti di splicing criptici dall'mRNA dell'rtTA Advanced. Il dominio d'attivazione consiste di tre domini "F" d'attivazione della proteina VP16 (Baron U., et al., 1997) consentendo così l'attivazione trascrizionale della forma a lunghezza completa del dominio di attivazione, riducendo la crossreattività e la citotossicità. Questi miglioramenti hanno consentito di aumentare i livelli di espressione nominali della proteina rtTA Advanced.

La seconda componente critica del sistema è il costituito dal vettore codificante il gene di interesse sotto il controllo dell'elemento di risposta alla tetraciclina o TRE. La variante promotrice utilizzata nel presente lavoro è il promotore TRE-tight.

Questo contiene una TRE modificata a monte di un promotore minimo CMV alterato (PminCMVΔ), risultante in una riduzione dell'espressione basale del gene di interesse. pTRE-Tight può minimizzare completamente l'espressione in alcune linee cellulari, e risulta utile nei casi in cui l'espressione basale sia inaccettabile (April 2003 Clontech).

Nel sistema Tet-On Advanced, rtTA si lega al promotore TRE-Tight e attiva la trascrizione in presenza di Dox in modo dose-dipendente (Figura 26).

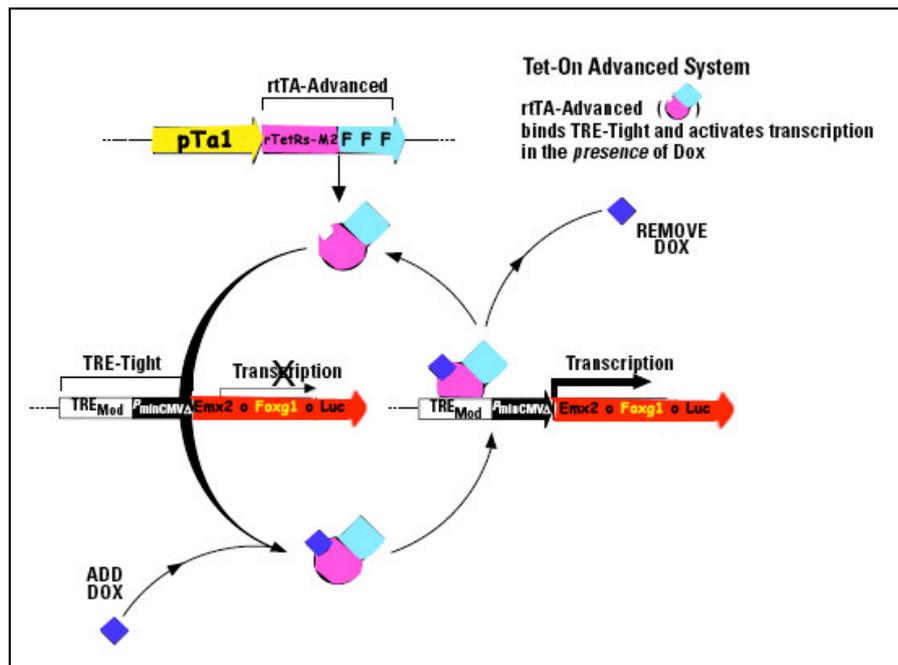


Figura 26| Rappresentazione schematica della regolazione dei geni *Emx2* e *Foxg1* tramite il sistema Tet-On Advanced inducibile (modificata da website Clontech).

Il dominio di repressione Tet inverso (rTetRs-M2) dell'rtTA Advanced contiene 5 cambiamenti amminoacidici che invertono l'originale risposta della proteina alla Dox. Ulteriori cambiamenti amminoacidici hanno reso la proteina più sensibile alla Dox, riducendo il legame basale al TRE ed ottimizzando la sua espressione in cellule di mammifero. rTa Advanced si lega al promotore TRE-Tight e determina l'attivazione trascrizionale per bassi livelli di Dox.

La dox legandosi alla rTA Advanced, sotto il controllo del promotore Tα1, ne consente il legame al promotore TRE-Tight attivando la trascrizione di Foxg1 o di Emx2 (nel caso del controllo Luciferasi, Luc).

I vantaggi nell'uso di questo sistema inducibile sono:

1. Regolazione fine on/off. L'espressione basale risulta essere nulla in assenza dell'induttore (Dox);
2. Nessuna attivazione di altri promotori (effetto pleiotropico assente);
3. Inducibilità elevata e tempi di risposta rapidi. Con questo sistema l'espressione può essere osservata in 30 min, utilizzando livelli non tossici di induttore;
4. Elevati livelli di espressione assoluta. Livelli di espressione massimi superiori a quelli raggiunti con un promotore CMV (citomegalovirus);

5. Induttori ben caratterizzati. Dox non è costosa e porta a risultati ben riproducibili. Nel sistema Tet-On può essere utilizzato solo l'induttore Dox (Gossen & Bujard, 1995), contrariamente al sistema Tet-Off dove è possibile usare anche la tetraciclina (Tc).

6. Attivazione con il sistema Tet-On anziché repressione per il controllo dell'espressione. Per ottenere la repressione sicura nel sistema Tet-Off è necessario utilizzare elevate dosi di Dox o di Tc, questo può determinare una non rapida e non elevata induzione del gene di interesse (Gossen et al., 1993).

Il sistema Tet-On Advanced è stato utilizzato per guidare l'espressione condizionale a partire dal promotore  $T\alpha 1$  dei geni studiati *Foxg1* ed *Emx2* (Figura 26). Tale scelta è stata basata sulla reversibilità dell'induzione e sulla possibilità di controllare i livelli di tali geni in modo dose-dipendente.

## 1.6 VETTORI LENTIVIRALI DI TERZA GENERAZIONE

Il trasferimento genico mediante vettori derivanti da lentivirus, come il virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV-1), risulta essere uno strumento con interessanti applicazioni nel campo della terapia genica di una vasta gamma di patologie. La ragione risiede nell'abilità dei lentivirus di infettare una vasta gamma di cellule indipendentemente dal loro stato proliferativo (Vigna E., et al. 2000), *ex vivo* e *in vivo*.

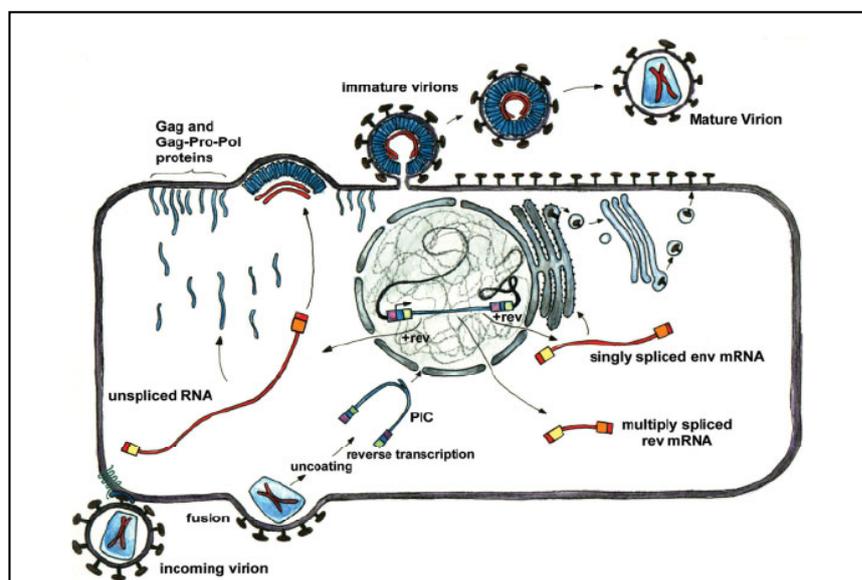


Figura 27 | Ciclo vitale di un lentivirus (*J Gene Med* 2004; **6**: S95–S104).

I vettori lentivirali sono particelle virali difettive di replicazione, assemblate con proteine del core ed enzimi lentivirali e con proteine dell'envelope di un virus differente. Nella maggior parte dei casi si tratta della proteina VSVG del virus della stomatite vescicolare (VSV), in grado di mediare l'infezione di pressochè qualsiasi tipo cellulare, nonché di conferire maggiore stabilità alle particelle virali ricombinanti, consentendo così la generazione di preparazioni a titoli elevati (J.C. Burns *et al.* 1993). I vettori lentivirali possono essere disegnati per l'espressione (costitutiva o condizionale) sia di transgeni sia di shRNA in singole unità o combinazioni multiple (Naldini L. *et al.* 1996)(Tiscornia, G. *et al.* 2003).

I vettori lentivirali hanno un genoma complesso. Oltre ai geni strutturali (gag, pol, env) comuni a tutti i retrovirus, i lentivirus contengono altri due geni regolatori (tat e rev) e molti geni accessori coinvolti nella modulazione dell'espressione genica virale, nell'assemblaggio delle particelle virali, e nell'alterazione strutturale e funzionale delle cellule infettate.

La replicazione lentivirale è in parte mediata da sequenze in cis non codificanti proteine, molte delle quali essenziali per il funzionamento dei lentivirus ed incluse nel costrutto di trasferimento (codificante il gene d'interesse). Le sequenze in trans codificano tre gruppi di proteine: strutturali, regolatorie e accessorie.

I vettori lentivirali, difettivi di replicazione, mantengono la capacità di eseguire solo i primi passaggi della vita di un lentivirus (Figura 27): attacco, ingresso, trascrizione inversa, trasporto nucleare ed integrazione. Essendo i primi passaggi non dipendenti dalla sintesi virale, tutti i geni in trans possono essere esclusi dal vettore di trasferimento che codificherà in questo modo solo il gene d'interesse.

La strategia generale dunque per produrre vettori lentivirali è stata quella di rimuovere tutti i geni non necessari dal genoma di HIV-1 e separare le sequenze cis dai fattori agenti in trans che sono assolutamente richiesti per la produzione, l'infezione e l'integrazione (Delenda C. 2004).

Il sistema per la produzione di vettori lentivirali di terza generazione consiste di 4 plasmidi (Dull, T. *et al.* 1998). Il vettore di trasferimento contiene il transgene o la cassetta di silenziamento, oltre a tutte le sequenze in cis necessarie per la produzione del RNA genomico e per il packaging. Per incrementare il "delivery" del gene e l'espressione nelle cellule trasdotte ne sono state apportate, inoltre, alcune modifiche. Una di queste prevede l'inserzione di un elemento

regolatorio post-trascrizionale dal genoma del virus dell'epatite woodchuck (Marmotta Monax) (Wpre) nell'estremità 3' del vettore di trasferimento. La sequenza Wpre agisce a livello post-trascrizionale, promuovendo l'esportazione nucleare dei trascritti e/o incrementando l'efficienza di poliadenilazione del trascritto stesso (Zufferey, R. *et al.* 1999).

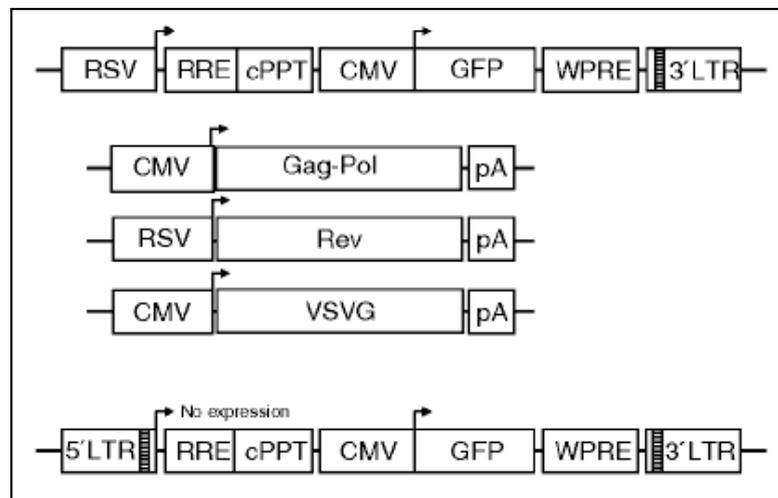


Figura 28| Rappresentazione schematica di vettori lentivirali di terza generazione (Tiscornia G. *et al.* 2006).

Il vettore di trasferimento ha una capacità di ~8 kb che risulta adeguata per la maggior parte delle applicazioni. I plasmidi di packaging (pMDL, pREV, pVSVG) forniscono dei fattori tras richiesti, cioè Gag-Pol, Rev e la proteina dell'envelope VSVG, rispettivamente.

Il plasmide pMDL codifica per la proteina precorritrice Gag-Pol che viene processata in integrasi, trascrittasi inversa, e proteine strutturali. Mentre tali proteine strutturali sono assolutamente richieste per la produzione delle particelle, l'integrasi e la trascrittasi inversa (già presenti nella particella virale) sono coinvolte in eventi successivi all'infezione. Rev interagisce con la sequenza cis (RRE) nel vettore di trasferimento incrementando l'efficienza del trasporto di trascritti genomici non spliced. La presenza della VSVG nell'envelope virale conferisce alla particella virale la capacità di infettare un'ampia varietà di cellule come cellule primarie, cellule staminali e embrioni precoci (Naldini *et al.* 2006)(Pfeifer, A. *et al.* 2002)(Lois, C. *et al.* 2002).

Il box tratteggiato rappresenta la delezione (self-inactivating) nella 3' LTR

La sicurezza del sistema risiede nella fornitura delle funzioni in trans, richieste per il packaging, da parte di tre distinti plasmidi addizionali (pMDL, pREV, pVSVG, vedi Figura 28), nonché dalla delezione nella regione promotrice/enhancer nella 3' LTR (Long terminal repeat) sul vettore di trasferimento. La prima misura riduce drammaticamente il rischio di formazione accidentale, per ricombinazione causale, di genomi virali completi per la replicazione. La seconda misura, essendo la 5' LTR provirale copiata dalla 3'LTR virionica, consente la formazione di una 5' LTR inattiva a monte del provirus integrato, impedendo la trascrizione e/o la mobilizzazione di quest'ultimo (SIN vector: self inactivating vector).

### 1.6.1 Generazione di vettori lentivirali

I costrutti d'espressione utilizzati per la produzione di vettori lentivirali sono mantenuti nella forma di plasmidi batterici e vengono trasfettati nelle cellule di mammifero per produrre stock di vettori difettivi di replicazione. E' necessario ottenere grandi quantità di DNA plasmidico puro (privo di endotossina) per la trasfezione mediante uno dei metodi commercialmente disponibili.

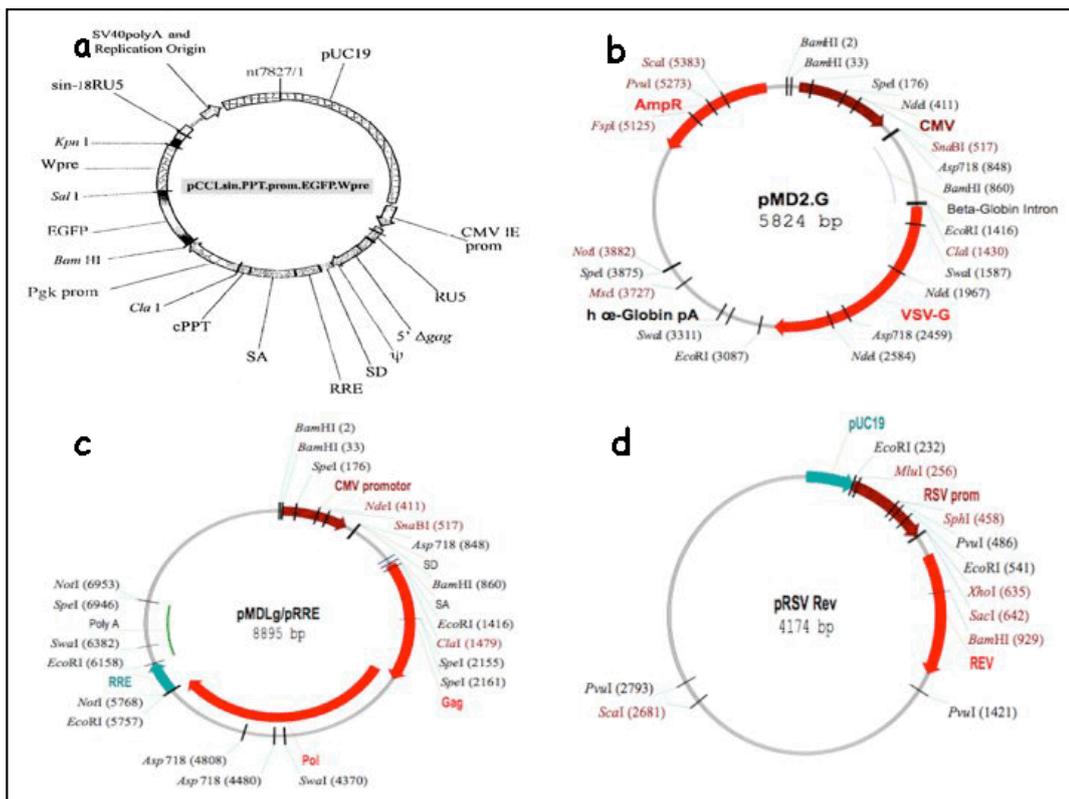
La produzione si ottiene mediante trasfezione transiente di 293T con 4 plasmidi:

*pMDLg/pRRE*, codificante per la proteina precorritrice GAG-POL;

*pRSV.REV*, codificante per la proteina Rev;

*pCCL-SIN18PPT.Prom.EGFPWpre*, il vettore di trasferimento (self-inactivating)(Follenzi, A.,2002);

*pMD2 VSV.G* codificante per la proteina dell'envelope VSVG. Questo plasmide è stato ottenuto clonando il frammento VSVG EcoRI da pMD.G a pMD-2 (Naldini L. et al. 1996; Dull T. et al. 1998; Zufferey R. et al. 1998; Follenzi A. et al. 2000); (Figura29).



**Figura 29| Rappresentazione schematica dei 4 costrutti per la produzione di vettori self-inactivating (SIN).**

a) Il costrutto self-inactivating (SIN) contenente le sequenze cis dell'HIV-1 e la cassetta di espressione per il transgene (EGFP enhanced green fluorescence protein) guidata da un promotore interno. b) Il secondo costrutto codifica per la proteina dell'envelope eterologa per pseudotipizzare il vettore, la proteina G del virus della stomatite vescicolare (VSVG) sotto il controllo del promotore CMV (citomegalovirus). c) Il costrutto di packaging esprime i geni gag e pol guidati da CMV. d) Un costrutto per l'espressione della proteina Rev sotto il promotore RSV. sono rappresentati i siti di restrizione rilevanti.

La produzione di vettori lentivirali si ottiene tradizionalmente trasfettando transientemente una linea cellulare umana embrionale di rene 293T in quanto queste cellule sono buoni recipienti di DNA in procedure di trasfezione e lo scheletro dei costrutti plasmidici contiene l'origine di replicazione dell'SV40. Infatti queste cellule derivano dalle 293 trasformate da DNA dell'adenovirus di sierotipo 5, a loro volta trasfettate con il gene mutante tsA 1609 dell'antigene large t di SV40 e il gene Neo<sup>r</sup> di *E.Coli*.

La trasfezione transiente si può ottenere mediante precipitazione con calcio-fosfato ma buone efficienze si ottengono anche con l'uso di metodi basati sui lipidi. Mancano per il momento linee cellulari stabili per la produzione di vettori lentivirali.

Per la costruzione del vettore di trasferimento esprime il gene di interesse si deve considerare che lo scheletro di SIN-18 è di ~2kb e che l' RNA genomico di HIV-1 è di 9.18 kb perciò la cassetta di espressione non deve superare i 7.5 kb. E' possibile inserire elementi regolatori post-trascrizionali e cassette di espressione bicistrioniche contenenti una IRES (internal ribosome entry site) o due promotori differenti in successione.

### 1.6.2 Titolazione di vettori lentivirali

Le particelle lentivirali pseudotipizzate con la glicoproteina VSVG sono state viste essere abbastanza stabili e resistenti all'ultracentrifugazione, generando in questo modo stock di LV ad alta concentrazione.

La concentrazione relativa dei vettori viene misurata come titolo. Il titolo può essere considerato come il numero di virioni in grado di trasdurre cellule. Le particelle trasducenti rappresentano generalmente solo una piccola percentuale del totale delle particelle che può variare tra diverse preparazioni.

La concentrazione di particelle infettanti può essere stimata tramite titolazione "end-point" trasducendo una linea cellulare standard facilmente infettabile (Hela,

293T, HOS) con diluizioni seriali della preparazione virale. Tale titolazione può essere eseguita nel caso in cui il vettore in questione esprima un gene reporter facilmente rilevabile nella linea cellulare dove viene eseguita la titolazione.

La titolazione in end-point risulta essere fortemente influenzata da:

- a) il tipo di cellule trasdotte
  - b) il promotore nella cassetta di espressione
- 
- a) Alcune linee cellulari vengono trasdotte con minor efficienza rispetto ad altre, perciò portando ad una sottostima del titolo della preparazione lentivirale. Tuttavia, altre linee cellulari sono particolarmente suscettibili alla trasduzione. Queste discrepanze implicano che quando si trasducono cellule relativamente refrattarie all'infezione (come alcune cellule primarie) utilizzando vettori titolati su cellule facilmente trasducibili, si deve empiricamente utilizzare un numero elevato di TU (unità trasducenti) per raggiungere un'espressione misurabile del transgene.
  - b) L'attività trascrizionale del promotore è strettamente dipendente dal tipo cellulare. Questo significa che vettori con promotori deboli, tessuto-specifici o regolabili non possono essere titolati con titolazione in end point o tale titolazione deve essere effettuata in una opportuna linea cellulare. Per superare questi limiti vettori contenenti una seconda cassetta d'espressione indipendente possono essere disegnati, per esempio IRES-gene reporter (internal ribosome entry site).

Tale titolazione è stata adottata nel presente lavoro come titolazione per fluorescenza.

Qualora non sia possibile realizzare una titolazione in "end-point", in quanto i vettori di trasferimento contengono promotori non costitutivi o transgeni che non possono essere direttamente testati, risulta essere cruciale l'uso di tecniche come la Real-time PCR su DNA genomico (valutando il numero di eventi di integrazione) o su RNA virale o l'analisi mediante Southern blot (Riviere I., et al., 1995; Onodera M., et al., 1997; Sastry L., et al., 2002). Queste tecniche, di quantificazione assoluta, provvedono un metodo per normalizzare differenti preparazioni lentivirali, indipendentemente dal tipo di costrutto, per il numero di eventi integrativi per cellula.

### 1.6.3 *Trasduzione di cellule bersaglio*

Le cellule possono essere trasdotte in vitro direttamente nel loro mezzo di coltura aggiungendo la quantità di vettore opportuna. Il polibrene può aiutare la trasduzione ma alcune cellule primarie non ne tollerano le concentrazioni standard. Per effettuare la trasduzione si prende in considerazione il numero di TU per cellula equivalente all'unità di misura MOI (molteplicità di infezione).

Per aumentare l'efficienza di trasduzione, le cellule dovrebbero essere trasdotte ad elevata densità in una piccola quantità di volume, così da aumentare la possibilità di contatto tra il bersaglio ed il vettore, dal momento che solo una frazione di esse verrà effettivamente in contatto con il bersaglio.

Per quanto riguarda la trasduzione di neurosfere è stato riportato che la loro struttura tridimensionale le rende refrattarie al delivery genico mediante vettori (Corti et al. 1999; Buchet et al., 2002; Ostenfeld et al., 2002; Wu et al., 2002). È stato sviluppato dunque un protocollo per la loro infezione come singole cellule dopo dissociazione ed alta densità per favorirne la rapida ri-associazione a neurosfere (Capowski E.E., et al. 2007). Capowski E.E., et al. 2007 dimostra che la dissociazione transiente delle neurosfere e la loro riassociazione in presenza del virus consente l'uso di meno virus e ristabilisce la relazione tra titolo virale, numero di cellule transgeniche ed espressione del transgene. Inoltre dimostra la relazione tra TU per cellula e percentuale di cellule trasdotte, stabilendo che MOI di 9 consente di trasdurre tra il 75-100% delle cellule. Si stabilisce dunque una relazione dove aumentando il numero di particelle trasducenti si aumenta il numero di cellule trasdotte.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

#### 2.1.1 *Tecniche di clonaggio*

Le reazioni enzimatiche di digestione del DNA vengono eseguite secondo le indicazioni dei produttori delle endonucleasi di restrizione (New England Biolabs o Promega).

Il DNA plasmidico, purificato dal ceppo di E.Coli XL1blue mediante il kit di estrazione prodotto da Qiagen, viene digerito alla temperatura indicata come ottimale per l'enzima per circa 2 ore. L'enzima è diluito con una concentrazione di 1U/100 ng DNA nell'opportuno tampone di reazione.

Nel caso in cui sia necessario creare delle estremità a doppio filamento tronche, si usa il frammento *Klenow* della DNA Polimerasi I di E. Coli (Promega) mancante dell'attività esonucleasica 5'→3'. La reazione, condotta in una soluzione contenente desossinucleotidi 0.2 mM ciascuno, l'appropriato tampone di reazione (Tris-HCl pH 7.5 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, DTT 7.5 mM) e 1U di frammento Klenow/μg DNA, viene fatta procedere a 25°C per 10', per essere poi bloccata con un'incubazione di 10' a 75°C.

Il vettore purificato si mescola con l'inserito in un rapporto di 1:3, o in rapporti variabili a seconda della strategia, nel tampone 2x Rapid Ligation Buffer (Promega). Si aggiungono poi 3U di ligasi del fago T4 per 100 ng di vettore, la miscela viene incubata 5 minuti per estremità coesive o 15 minuti per estremità blunt.

Per effettuare una trasformazione mediante cellule elettrocompetenti è necessario rimuovere i sali del buffer di ligazione mediante dialisi su membrana (Millipore).

#### 2.1.2 *Trasformazione di cellule elettrocompetenti*

Tutte le trasformazioni sono state effettuate usando batteri E. coli del ceppo XL1blue resi elettrocompetenti.

Le cellule competenti XL1blue vengono conservate in glicerolo al 10% alla temperatura di -80°C. Dai 30 ai 50 μl di questa sospensione vengono incubati per 1

minuti in ghiaccio con la miscela di ligazione. La sospensione si trasferisce dunque in cuvette per l'elettroporazione, precedentemente sterillizzate per immersione in etanolo, asciugate dall'etanolo e raffreddate in ghiaccio. Segue l'elettroshock (25 $\mu$ F, 2.5 KV, 200 $\Omega$ ). Questo breve e intenso campo elettrico produce aperture transitorie nella membrana cellulare attraverso le quali il DNA plasmidico può entrare. Rapidamente alla miscela si aggiungono 500 $\mu$ l di terreno SOC (tryptone 20g/l, estratto di lievito 5g/l, NaCl 5 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, D-glucosio 2 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM).

L'incubazione procede per due ore alla temperatura di 30°C in agitazione a 650 rpm (Termomixer), in modo da consentire ai batteri trasformati di esprimere il gene per la resistenza all'antibiotico prima che la pressione selettiva venga applicata. In seguito, si piastrano 50-150 $\mu$ l di sospensione batterica su LB Agar contenente l'antibiotico [75 $\mu$ g/ml].

### *2.1.3 Estrazione e purificazione di dna plasmidico da gel di agarosio*

Alcune delle colonie formatesi sulla piastra vengono incubate in 5 ml di terreno LB contenente antibiotico in maniera analoga alle piastre precedentemente utilizzate. Il giorno seguente viene effettuata l'estrazione del DNA plasmidico utilizzando il kit QIAprep Spin Plasmid Minutiprep kit (QIAGEN). Per ottenere quantità più elevate di plasmide, necessarie per la trasfezione di cellule eucariotiche, è stato adoperato il kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN), partendo da 500 ml di brodo-cultura tenuta in agitazione a 30°C per 16 ore, secondo il protocollo consigliato dalla ditta. La procedura di estrazione del DNA prevede la lisi in ambiente alcalino dei batteri, seguita da eluizione su una matrice di silice con un adeguato volume (200-500  $\mu$ l) d'acqua per biologia molecolare. La stima della concentrazione e della purezza della preparazione plasmidica è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica e la sua integrità mediante corsa elettroforetica.

Gel d'agarosio a concentrazioni variabili sono stati impiegati per valutare DNA di diverse dimensioni. Essi sono stati preparati come segue. L'agarosio in polvere viene sciolto in tampone TBE 1X (Tris-borato 0.09 M, EDTA 2mM). Alla miscela viene aggiunto Bromuro di Etidio nella misura di 50 ng/ml, in modo che si intercali alle basi del DNA e lo renda visibile al transilluminatore UV. I campioni di DNA vengono diluiti

in DNA loading buffer 6x (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.03% blu di bromofenolo, 0.03% xilene cianolo FF, 60% glicerolo, 60 mM EDTA). La corsa elettroforetica è stata eseguita a voltaggio costante.

Nel caso si voglia recuperare un particolare frammento di DNA, dopo corsa elettroforetica su gel d'agarosio e individuazione della banda d'interesse, si procede alla sua estrazione ritagliandolo da gel. Il DNA viene quindi separato dall'agarosio e da altre eventuali impurità seguendo il protocollo del kit DNA Gel Extraction prodotto dalla QIAGEN.

## **2.2 ANIMALI**

### *2.2.1 Preparazione di animali*

Topi femmina Nestin-rtTA-IRES-bGEO<sup>+/-</sup> (Mitsubishi T. *et al.* 2001; ceppo FVB/N inbreed) sono stati accoppiati con maschio WT (FVB/N) per generare maschi da accoppiamento Nestin-rtTA-IRES-bGEO<sup>+/-</sup>. I cuccioli sono stati numerati a P10 (giorno post natale) mediante il taglio delle dita; con il prelievo di un frammento di coda terminale è stato loro determinato il genotipo. I maschi risultati positivi per il transgene sono stati valutati successivamente per la trasmissione del medesimo alla progenie. A seguito di questa verifica i suddetti possono considerarsi maschio da accoppiamento.

Tutti gli animali sono stati stabulati presso lo stabulario SISSA, e gli esperimenti sono stati condotti in conformità con i protocolli sperimentali approvati dai Responsabili scientifico e veterinario locali e formalmente comunicati al Ministero della Salute.

### *2.2.2 Estrazione del DNA genomico da coda*

A seguito del prelievo della porzione terminale della coda, questa viene incubata in tampone di lisi (100mM NaCl, 100mM Tris HCl pH=7.5, 100mM EDTA, 1% SDS) contenente proteinasi K alla concentrazione finale di 1mg/mL, per 1 ora a 55°C.

Il campione si centrifuga a 16100 RCF (centrifuga eppendorf 5415 D, ad angolo fisso) per 10 minuti. Si trasferisce dunque il surnatante in eppendorf nuove e si

aggiungo da 2 a 3 volumi di etanolo 100% freddo. Invertendo la provetta si assiste alla precipitazione del flocculo di DNA che viene raccolto con una pasteur di vetro e sciolto in acqua per biologia molecolare. Si lascia dissolvere il flocculo per 15-30 minuti a 37 °C.

### 2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Una volta completata l'estrazione del DNA genomico si procede alla fase di determinazione del genotipo mediante reazioni di PCR standardizzate.

I reagenti utilizzati sono:

- DNA genomico estratto;
- Taq polimerasi 0,5 µl per reazione (GoTaqFlexi Promega);
- MgCl<sub>2</sub> alla concentrazione finale di 1.5mM (Promega);
- buffer GoFlexi color buffer alla concentrazione finale 1x (Promega);
- desossinucleotidi fosfato (dNTPs), utilizzati ad una concentrazione di 0.2 mM finale (Promega);
- primers alla concentrazione di 1µM ciascuno,

Protocollo termico usato:

98°C\_1minuti

95°C\_1minuti

65°C\_1minuti

72°C\_2minuti

→35 cicli

72°C\_10minuti

Sequenze primer utilizzate:

5'-CGCTGTGGGGCATTCTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAG-3' forward

5'-CGTCCCCCAACATGTCCAGATCGAAATCGTC-3' reverse

Amplificanti una regione compresa all'interno della sequenza codificante per rt-TA.

### 2.2.4 Generazione di embrioni

Per la generazione d'embrioni allo stadio embrionale di 11 giorni (E11.5), femmine FVB/N WT vengono messe in accoppiamento con maschio da accoppiamento WT o

Nestin-rtTA-IRES-bGEO<sup>+/-</sup>. La presenza del tappo vaginale, la mattina seguente, dà la conferma dell'avvenuta fecondazione (giorno E0.5). Tutte le femmine risultate positive all'ispezione vaginale vengono stabulate in ambiente insonorizzato per favorirne la prosecuzione della gravidanza.

### 2.2.5 Dissezioni

Topi femmina a gravidanza stadiata (E11.5) da maschio WT vengono sacrificate per dislocazione cervicale. Gli embrioni vengono prelevati e messi in 0,6% glucosio-1X PBS -MgCl<sub>2</sub> -CaCl<sub>2</sub> (Gibco) sterile e freddo. Si prosegue alla dissezione delle cortecce dal resto del cervello in 0,6% glucosio-1X PBS -MgCl<sub>2</sub> -CaCl<sub>2</sub> utilizzando micropinzette e lavorando sotto cappa a flusso orizzontale per mantenere la sterilità. Nel caso in cui si debbano utilizzare embrioni Nestin-rtTA-IRES-bGEO<sup>+/-</sup>, si procede selezionandoli dagli embrioni WT. A questo scopo si incubano i corpi degli embrioni a 37°C nella soluzione di colorazione per la b-galattosidasi.

La soluzione contiene:

H<sub>2</sub>O, 8ml

10X PBS, 1ml

100mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,5 ml

100mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>\*3 H<sub>2</sub>O, 0,5 ml

1M MgCl<sub>2</sub>, 20μl

1% Na desossicolato, 100μl

10% NP40, 20μl

in 10ml finali, alla quale prima dell'uso viene aggiunto il 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-b-D-Galactopiranoside (X-Gal) alla concentrazione finale di 1mg/ml.

Le cortecce degli embrioni risultati positivi alla colorazione vengono collezionate in un piccolo volume di 0,6% glucosio-1X PBS -MgCl<sub>2</sub> -CaCl<sub>2</sub>.

A queste vengono aggiunti 200μl di terreno per neuroblasti.

## COMPOSIZIONE DEL MEZZO PER NEUROBLASTI

	Concentrazione finale
DMEM-F12+GLUTAMAX (Sigma)	
Glucosio 30%	0,6%
N2 100X (Gibco)	1X
BSA10%	0,1%
EPARINA 2mg/ml(Sigma)	2 $\mu$ g/ml
Fungizone (Gibco)	0,0025X
Pen/Strept	0,01X
FGF2 100 $\mu$ g/ml (Invitrogen)	0,02 $\mu$ g/ml
EGF 1000 $\mu$ g/ml (Invitrogen)	0,02 $\mu$ g/ml

Nel caso in cui si usi il sistema inducibile TET-ON per ottenere l'espressione del transgene, il terreno deve essere addizionato con Doxiciiclina (Clontech) alla concentrazione finale di 2 $\mu$ g/ml.

Per la dissociazione del tessuto corticale a singola cellula, si procede come segue. Si pipetta la sospensione con una p200 per 8 volte, si attendono 2 minuti perché i brani di tessuto indissociato vadano a fondo per gravità, si mette da parte il sovrinatante ricco di cellule dissociate e si aggiungono altri 200 microlitri di mezzo al tessuto andato a fondo. La procedura si reitera per 4-5 volte ed i sovrinatanti, corrispondenti a 1 ml o meno, si raccolgono e si uniscono.

### 2.3 COLTURA DI NEUROSFERE

#### 2.3.1 *Infezione di neuroblasti dissociati*

A seguito della dissociazione le cellule vengono contate con l'uso di un emocitometro (camera di Burker).

Vengono piastrate 800 cellule/ $\mu$ l in pozzetti di una piastra da 24 (FALCON), di norma 400  $\mu$ l di sospensione per pozzetto. Per ogni condizione sperimentale si infettano 3 pozzetti.

Si procede dunque all'infezione diluendo il vettore virale in una quantità minima di terreno. La quantità di vettore virale corrisponde al numero d'unità trasducenti (particelle virali) per cellula, ovvero la molteplicità d'infezione (MOI), scelta per la data condizione sperimentale.

Dopo 3 giorni e mezzo si procede al passaggio delle neurosfere formatesi e alla

rimozione dei detriti cellulari e del virus.

### *2.3.2 Propagazione della coltura di neurosfere*

La coltura di neurosfere viene passata due volte la settimana, ad intervalli di 3-4 giorni. Raccolte le sfere, dilavando delicatamente la parete del pozzetto con il mezzo di coltura in esso contenuto, le stesse si centrifugano - a temperatura ambiente - a 100 RCF per 3 ½ minuti (centrifuga eppendorf 5415D, ad angolo fisso). Aspirato il surnatante, si aggiunge tripsina 1X (Sigma), sempre a temperatura ambiente, e si risospende il pellet con una p1000 (Gilson). Passati 2 minuti si aggiunge 1 volume di terreno contenente DNAasi-I (10µg/ml finali) (Roche) e inibitore della tripsina di tipo I- da semi di soia (140µg/ml finali) (Sigma). Si procede con una seconda centrifuga, di 7 minuti a 100 RCF, seguita dalla risospensione del pellet in un adeguato volume. Stimato il numero di cellule, si piastrano 250 cellule/µl in 400µl per pozzetto.

Nel corso della coltura, inoltre, al fine di mantenere costante il livello di fattori trofici (EGF e FGF2) e di doxiciolina, due giorni dopo ogni passaggio, si aggiungono a ciascun pozzetto 100µl di terreno 5X per tali fattori.

### *2.3.3 Citofluorimetria e preparazione delle neurosfere per analisi citofluorimetrica*

Per l'analisi della fluorescenza emessa dalle proteine mCherry, EGFP, mCerulean è stato utilizzato un citofluorimetro Dako (Dakocytomation).

I parametri indicanti aspetti morfologici, quali la rugosità mediante l'entità della riflessione (SSC), la grandezza, grazie a misure di diffrazione (FSC) sono stati utilizzati per selezionare la popolazione vitale sulla quale analizzare la fluorescenza.

I Fotomoltiplicatori usati sono stati: FL1 per la EGFP, FL3 per mCherry (laser 488 nm), FL6 per mCerulean (laser 405nm).

Per poterne valutare la fluorescenza, le cellule devono essere dissociate. Durante il passaggio delle neurosfere, secondo protocollo, dopo aver distolto un'aliquota di cellule sufficiente alla propagazione della coltura (100.000 cellule in 400 µl X 3 pozzetti di una piastra da 24 per ciascuna condizione sperimentale), si centrifuga la sospensione cellulare per 10 minuti a 100 RCF (centrifuga eppendorf 5804D, ad angolo fisso). La risospensione del pellet avviene in PBS1X -MgCl<sub>2</sub> -CaCl<sub>2</sub> (Gibco).

I campioni vengono mantenuti in ghiaccio fino al momento dell'analisi.

### 2.3.4 Immunofluorescenza su neurosfere dissociate

Dissociate le sfere, secondo protocollo, si stima il numero di cellule a disposizione considerando un minimo di 100.000 cellule per vetrino (Superfrost plus - Thermo scientific). A vetrini trattati con poli-lisina (poli-d-lisina alla concentrazione finale di 20 µg/ml in H<sub>2</sub>O sterile per 40 minuti in camera umida), si aggiunge la sospensione cellulare. Lasciati i vetrini 1 ora in camera umida si procede alla fissazione delle cellule con paraformaldeide (PFA) 4% per 20 minuti. Dopo 3 lavaggi in PBS 1X da 5 minuti si aggiunge la soluzione di bloccaggio per 40 minuti.

#### SOLUZIONE DI BLOCCAGGIO

	CONCENTRAZIONE FINALE
PBS10X	1X
BSA 10 mg/ml	1mg/ml
Triton X-100	0,1%
FBS	10%
H <sub>2</sub> O	A volume

Gli anticorpi primari diluiti in soluzione di bloccaggio utilizzati sono:

ANTICORPO I	CONCENTRAZIONE D'USO	CASA PRODUTTRICE	ANTIGENE RILEVALTO
Topo/monoclonale-anti Tuj1	1:1000	Covance	β-Tubulina
Coniglio/policlonale-anti Tbr2	1:500	Abcam	Tbr2
Pollo/policlonale-anti GFP	1:1000	Invitrogen	EGFP/Cerulean

L'incubazione procede a 4°C O/N. Lavaggi in PBS1X-Triton 0,1% per 3 volte da 5 minuti.

Il rilevamento dell'anticorpo I è stato realizzato con i seguenti anticorpi secondari incubati a temperatura ambiente per 2ore:

ANTICORPO II	CONCENTRAZIONE D'USO	CASA PRODUTTRICE
Anti topo-biotinilato	1:100	Invitrogen
Anti coniglio-Alexa 594	1:600	Invitrogen
Anti pollo-Alexa 488	1:600	Invitrogen

L'anticorpo biotinilato è stato rilevato con avidina coniugata all'Alexa 633 per 1 ora a temperatura ambiente.

In tutti gli esperimenti i nuclei sono stati controcolorati con Hoechst 33258 (1:1000 in PBS1X 10 minuti al buio), a seguire il montaggio con soluzione di montaggio Vectashield (Vector). Per l'analisi di fluorescenza si è utilizzato un microscopio confocale (Leica DM2 IRES).

### *2.3.5 Colorazione con Annessina V / 7-AAD*

La colorazione con Annessina V si basa sulla trasposizione della fosfatidilserina (PS) dal foglietto interno a quello esterno della membrana plasmatica, tipica delle cellule apoptotiche precoci. L'esposizione di questo fosfolipide le rende riconoscibili rispetto alle cellule vitali. L'Annessina V è una proteina  $Ca^{2+}$ -dipendente in grado di legarsi ai fosfolipidi, in particolare alla PS con elevata affinità.

La 7-amino-actinomicina D (7-AAD), invece, è un tracciante fluorescente che penetra esclusivamente la membrana plasmatica "forata" di cellule morenti, per apoptosi o altro processo, e va a legarsi al loro DNA, rendendole distinguibili da quelle vitali.

Le neurosfere vengono dissociate secondo protocollo. Si distoglie un'aliquota contenente  $3 \cdot 10^5$  cellule che vengono centrifugate a 100 RCF (centrifuga eppendorf 5415D, ad angolo fisso) e risospese in 100 $\mu$ l di buffer (annexin-binding buffer, Invitrogen). Si aggiungono 0,2 $\mu$ l di Annessina V coniugata con allofocianina (APC) a 100 $\mu$ l di sospensione cellulare, aggiungendo anche 1 $\mu$ l dell'indicatore di morte 7-AAD. Dopo un periodo di incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente si aggiungono ulteriori 400 $\mu$ l di buffer, si mescola gentilmente e si lascia in ghiaccio fino alla lettura citofluorimetrica.

## **2.4 PRODUZIONE E TITOLAZIONE DI VETTORI LENTIVIRALI DI TERZA GENERAZIONE**

### *2.4.1 Lipofezione transiente di Hek293T per la produzione di vettori lentivirali di Terza generazione*

Si piastrano dalle 16/24 ore prima la trasfezione,  $7.0 \times 10^6$  di Hek293T in piastre da 10 cm (Nunc) in 7 ml di mezzo (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM-GLUTAMAX Gibco, 10% siero FCS, Sigma). Si utilizzano cellule a basso numero di passaggi (P12-P13).

#### PLASMIDI ACESSORI

Plasmide ENV (VSV-G)	3 $\mu$ g X piastra
Plasmide di packaging (pMDLg/p RRE)	5 $\mu$ g X piastra
Plasmide Rev (pRSV-REV)	2,5 $\mu$ g X piastra

+ 16-18  $\mu$ g per piastra del plasmide SIN (self inactivating) contenente la cassetta di espressione del transgene.

Si diluisce la miscela dei plasmidi in 1,5 ml di mezzo per piastra e la lipofectamina (Lipofectamina 2000- Invitrogen) 60 $\mu$ l in altri 1,5 ml di mezzo. Dopo 5 minuti a temperatura ambiente si mescola la miscela di lipofectamina con la miscela di DNA e si attendono ulteriori 20 minuti. Si aggiunge dunque questa soluzione alla piastra.

Dopo 5 ore si procede con la rimozione del mezzo e l'aggiunta di mezzo fresco. Da questo momento in avanti è necessario lavorare adottando procedure di sicurezza Bio-safety level 2 plus (BSL-2+) in quanto inizia la produzione di vettori lentivirali attivi.

Dopo 14-16 ore si rimuove il mezzo e si aggiungono 5 ml di mezzo per piastra per iniziare la raccolta dei vettori lentivirali. Il surnatante cellulare, raccolto dopo 24 ore, viene filtrato con un filtro da 0.45 $\mu$ m (Corning) allo scopo di rimuovere i detriti cellulari formati e sostituito con 5 ml di mezzo per piastra. Si conserva a 4°C.

La medesima operazione si ripete a 48 ore. I surnatanti delle 24 ore e delle 48 ore vengono uniti e trasferiti in bottiglie da centrifuga in poliallometere (Beckman 357003). Si centrifuga a 50000 RCF 2ore 30 minuti a 20°C (20500 rpm in un rotore JA 25.50 – centrifuga Beckman Avanti J).

Il pellet si risospende in PBS1X –MgCl<sub>2</sub> –CaCl<sub>2</sub> (Gibco), dopo aver accuratamente rimosso il surnatante residuo. La sospensione viene aliquotata in eppendorf e conservata a -80°C.

#### *2.4.2 Linee cellulari: Hek293T, HELA tet-off, Hek293T-rtTa responsive*

La linea cellulare utilizzata per la produzione di vettori lentivirali di terza generazione in trasfezione transiente e per la titolazione dei medesimi è Hek293T (ATCC # CRL-11268). Questa linea cellulare deriva dalle Hek293 (human embryonic kidney) a loro volta generate dalla trasformazione di cellule renali umane normali con l'Adenovirus di serotipo 5. La linea Hek293T ne è una variante contenente l'antigene "Large T" di SV40. Questo consente la replicazione episomale di plasmidi trasfettati contenenti l'origine di replicazione SV40, ovvero la loro amplificazione e un'estesa espressione temporale del prodotto genico codificato.

Per la titolazione fluorescente dei vettori lentivirali di terza generazione recanti EGFP sotto il controllo del promotore TRE, si utilizza la linea cellulare HELA TeT-Off (HELA Tet-Off cell line-Clontech). Si tratta di una linea cellulare di carcinoma umano dell'epitelio cervicale che esprime stabilmente il transattivatore tetraciclina dipendente, tTA. Questa linea è resistente al G418 (contiene la resistenza alla neomicina), addizionato per mantenerne la stabilità durante la propagazione. La linea cellulare è stata disegnata per essere usata nel sistema "Tet-Off Inducible Gene Expression System,, e può essere transientemente o stabilmente trasfettata con un vettore contenente un gene d'interesse sotto il controllo di un promotore Tet-responsivo (pTRE-Tight per esempio). Il gene clonato verrà espresso ai massimi livelli in assenza di induttore (doxiciclina).

La preparazione policlonare cellulare, utilizzata per la titolazione di vettori lentivirali di terza generazione esprimenti il transattivatore rtTA, è stata ottenuta a partire dalla linea cellulare Hek293T. Per ottenere una preparazione di cellule esprimenti un gene reporter (EGFP) in modo rtTA dipendente, si sono infettate Hek293T con un LV pTRE-Tight-EGFP ad MOI 30.

#### *2.4.3 Condizioni di coltura cellulare*

Entrambe le linee cellulari Hek293T e Hek293T rt-TA responsive sono state mantenute in terreno Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (1X) addizionato con il 10% siero FCS (Sigma). La linea cellulare HELA Tet-Off (Clontech) viene mantenuta in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) addizionato con il 10% Tet System Approved FBS, Glutamax 200Mm, 100µg/ml di G418. Le cellule vengono cresciute 37°C in ambiente umidificato e al 5% di CO<sub>2</sub>. Tutte le

manipolazioni delle colture vengono eseguite sotto cappa a flusso laminare utilizzando materiale sterile usa e getta. Al raggiungimento della confluenza desiderata il terreno viene eliminato e le cellule vengono staccate mediante una soluzione di Tripsina (1X per 293T e 2X per HELA) (Invitrogen) Quando le cellule si sono staccate, la Tripsina viene neutralizzata con un egual volume di terreno con siero e la sospensione cellulare si centrifuga a 190 RCF (centrifuga eppendorf 5804, ad angolo variabile). Una volta risospeso il pellet in un adeguato volume e stimato il numero di cellule, usando un emocitometro (camera di Burker), si procede piastrando le cellule in piastre Nunc.

#### *2.4.4 Titolazione di vettori lentivirali*

##### *2.4.4.1 Titolazione per fluorescenza*

A seconda del tipo di vettore lentivirale, la titolazione verrà eseguita su cellule HELA Tet-Off, Hek293T o Hek293T-rtTA responsive. Per tutte le linee indicate si segue il medesimo protocollo di infezione.

Il principio su cui si basa la titolazione per fluorescenza è la stima del numero di integrazioni produttive di un vettore lentivirale contenente un tracciante fluorescente rilevabile per microscopio e la cui espressione sia guidata da un promotore attivo in una delle linee cellulari sopra elencate. Tale sistema risulta essere dunque fortemente dipendente sia dal tipo di cellule trasdotte che dal tipo di promotore nella cassetta di espressione.

Il titolo, come TU/ $\mu$ l (“Transducing unit”-unità trasducenti per unità di volume), si ottiene stimando il numero di cellule trasdotte sul totale, nella diluizione seriale in cui risultano positive dall’1% al 15% delle cellule.

Il protocollo di titolazione procede secondo la seguente scaletta:

(A) Al giorno 0 si piastrano  $1 \cdot 10^6$  cellule per pozzetto di una piastra multi-pozzetto da 6 (Nunc), preparando tanti pozzetti quante sono le diluizioni lentivirali prese in considerazione, più uno supplementare.

(B) Al giorno 1 si effettua l’infezione. Si procede alla stima del numero di cellule mediamente presenti in ogni pozzetto al momento dell’infezione, staccandole con tripsina dal pozzetto supplementare, e contandole con l’uso di un emocitometro (camera di burker). Si utilizzano quindi le cellule degli altri pozzetti per l’infezione vera e propria. Si rimuove il mezzo e lo si sostituisce con 500 $\mu$ l di mezzo fresco

filtrato addizionato con bromuro di esadimetrine o “Polybrene” (Sigma) alla concentrazione finale di 9µg/ml, per massimizzare la trasduzione. Il vettore lentivirale, opportunamente diluito in 500µl di mezzo, viene quindi aggiunto a ciascun pozzetto.

(C) Al giorno 3 si procede alla dissociazione delle cellule da ogni singolo pozzetto e le si trasferisce in piastre da 6 cm (Nunc). La piastra in cui circa il 10% delle cellule risultano positive alla fluorescenza viene scelta per la stima del titolo. Lo stesso campo viene fotografato in campo chiaro e in fluorescenza. Si procede dunque alla conta delle cellule utilizzando il programma Adobe Photoshop Ac. La stima del titolo procede secondo la formula seguente:

$$TU/\mu l = (((N^{\circ} \text{positive} / N^{\circ} \text{totale}) * N^{\circ} \text{al gg 1}) / \mu l \text{ aggiunti}) * DF$$

N°positive = numero di cellule positive alla fluorescenza al giorno 3

N°totale = numero di cellule totale al giorno 3

N°al gg 1= numero di cellule al momento dell'infezione

DF = fattore di diluizione

µl aggiunti = µl di diluizione aggiunti

I calcoli, così effettuati per ogni campo, vengono mediati e ne viene calcolata la deviazione standard per ottenere una stima precisa del titolo.

#### *2.4.4.2 Titolazione per real-time PCR su DNA genomico*

La titolazione per fluorescenza dipende sia dall'infettività sia dall'attività di trasduzione del vettore nelle cellule trasdotte. L'analisi del DNA delle cellule trasdotte, al contrario, rivela direttamente la capacità integrativa del vettore nel genoma delle cellule bersaglio, indipendentemente dall'espressione del transgene.

La Real-time PCR si rileva dunque essenziale qualora il vettore contenga promotori non costitutivi o attivi in una data linea cellulare adibita alla titolazione o l'attività del transgene espresso non possa essere validata direttamente (Riviere I., et al., 1995; Onodera M., et al., 1997; Sastry L., et al., 2002).

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

al giorno 0 si piastrano  $1 \cdot 10^6$  cellule in 2 ml di mezzo ( HELA in DMEM-10% siero, 293T in IMDM-10% siero, in Nunc).

Al giorno 1 si lavano i pozzetti 1 volta con PBS1X (Gibco) e si aggiungono 500µl di mezzo filtrato con 9µg/ml di polybrene (Sigma). Uno dei pozzetti è usato per stimare il numero di cellule al momento dell'infezione. Si diluiscono dunque 2µl di vettore lentivirale in 500µl di mezzo e si aggiungono ai pozzetti.

Il DNA genomico di un pozzetto equitrattato, nel quale non sia stata aggiunta la sospensione lentivirale, è utilizzato come mock per la successiva reazione di PCR.

Al 3 giorno si lavano i pozzetti con 2ml di PBS1X per 2 volte e si procede all'estrazione del DNA genomico seguendo le istruzioni del kit FlexiGene DNA (QIAGEN). I detriti cellulari vengono rimossi a seguito di centrifugazione (13000 rpm per 5 minuti-centrifuga eppendorf 5415D) ed il surnatante prelevato viene lasciato a 37°C per 15 minuti. La concentrazione, stimata allo spettrofotometro, deve essere compresa tra 100-300ng/µl.

Gli standard (std) utilizzati nella reazione di real time PCR sono:

Std 0 : 40 ng/µl di plasmide pCCL-SIN18PPT.Prom.EGFPWpre linearizzato (  $5 \cdot 10^9$  molecole);

Std 1 a 7 : diluizioni 1:10 dello std 0 in modo da avere 8 standards da  $5 \cdot 10^9$  a 500 molecole;

Il protocollo di termico utilizzato è :

95 °C\_ 4 minuti

( 94°C\_10 sec + 60°C\_15 sec+ 72°C\_20 sec+ plate read 72°C+ 78°C\_1sec plate read\_) →39 cicli

Curva di melting 58 a 98 °C letta ogni 0.5°C (1sec)

La piastra viene preparata con la seguente miscela per pozzetto (10µl) :

Miscela #261 (ogni campione in triplicato)

5µl syber green (BIO RAD)

0.5µl oligo forward #261 10µM

0.5µl oligo reverse #261 10µM

0.5 µl dna\_campione (incluso il mock)

3.5µl H<sub>2</sub>O

Miscela #261 Std

5µl syber green (BIO RAD)

0.5µl oligo forward #261 10µM

0.5µl oligo reverse #261 10µM

0.5 µl dna\_mock

1 µl std

2.5 µl H<sub>2</sub>O

Sequenze primer utilizzate:

#261/F2

5' GGC AAG CAG GGA GCT AGA ACG ATT CGC AG 3'

#261/R2

5' CTT CTG ATC CTG TCT GAA GGG ATG GTT GTA GCT GTC C 3'

Tali oligo consentono l'amplificazione della regione  $\psi$  (segnale di packaging) nel genoma del vettore lentivirale.

Per il calcolo del titolo si procede come segue.

Si valuta il numero di ampliconi lentivirali presenti nelle cellule infettate (N° vir), rappresentativo del numero di pro-virioni integrati nel loro DNA genomico, tramite la curva standard.

Si calcola il numero di molecole di DNA genomico delle cellule substrato in ciascun pozzetto:

$(\text{massa di DNA genomico}) / (\text{massa molare DNA genomico}) = \text{N}^\circ \text{ moli di DNA}$ ,

dove  $1.8 \cdot 10^{12}$  gr è la massa molare del DNA genomico

Si procede poi alla stima del rapporto (N° vir) / (N° moli di DNA), correlato linearmente con il titolo della preparazione virale caricata su tali cellule.

Si confronta infine il rapporto (N° vir) / (N° moli di DNA) del virus in esame con quello di un altro precedentemente titolato per fluorescenza e, per interpolazione lineare, noto il titolo del secondo, si risale a quello del primo.

### 3.RISULTATI

#### 3.1 COSTRUZIONE DEI VETTORI DI ESPRESSIONE LENTIVIRALI

Per la costruzione del vettore d'espressione lentivirale LTV-ENestin:P/hsp68-mCherry, si è partiti assemblando il promotore ENestin:P/hsp68 nel plasmide pHPS.sis (Choi et al., 1991).

Il frammento corrispondente all'enhancer II dell'introne del gene della nestina di ratto di 636 pb prelevato dal plasmide pENestin:EGFP (Kawaguchi A., 2001) mediante i siti di restrizione *Ascl* e *NdeI* modificato a terminazione netta (blunt), è stato subclonato nel plasmide pHPS.sis a sua volta digerito per *Ascl* e *SmaI*. Il promotore ENestin:P/hsp68 così generato è stato trasferito mediante i siti *Ascl* e *XbaI* reso blunt nel costrutto LTV-pTa1-mCherry digerito per *MluI* e *BamHI* reso blunt, per rimuovere il promotore Ta1. Il vettore finale presenta dunque il promotore ENestin:P/hsp68 a monte della proteina fluorescente mCherry (Figura 30a).

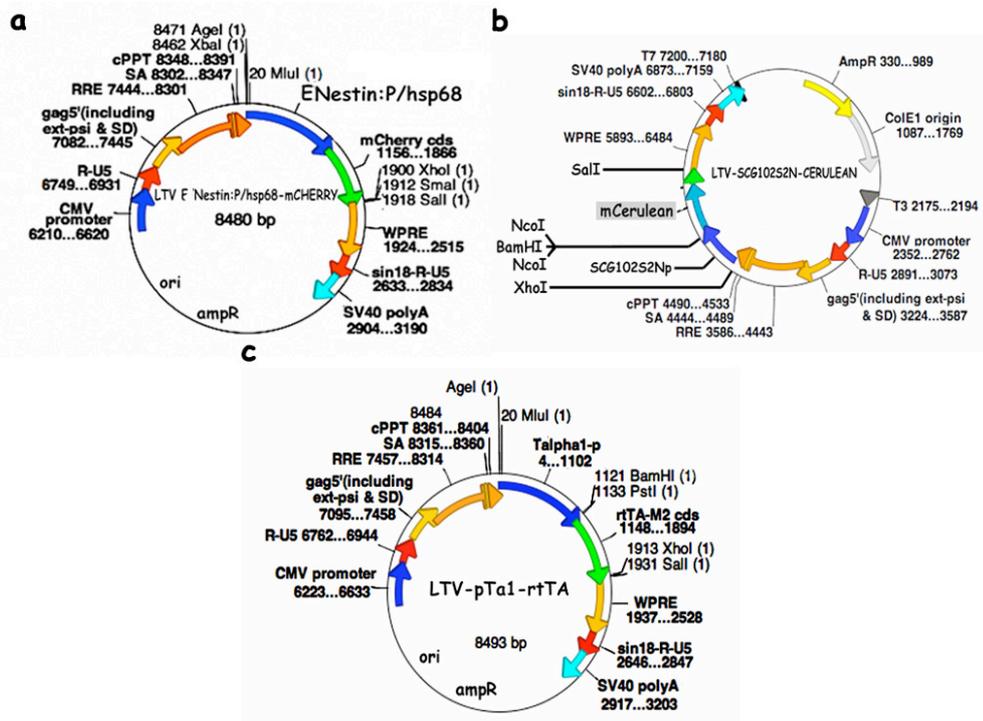


Figura30| Vettori lentivirali costruiti

a) Vettore lentivirale ENestin:P/hsp68-mCherry. b) Vettore lentivirale SCG102S2N-Cerulean. c) Vettore lentivirale pTa1-rtTA

Per realizzare il vettore LTV-SCG102S2N-mCerulean si è assemblata la mCerulean con la sequenza codone di stop-Wpre nel plasmide Cerulean (Adgene 15214). La sequenza, contenente il codone di stop a monte della sequenza Wpre, è stata prelevata dal plasmide pCCL-SIN18PPT.Prom.EGFPWpre (Follenzi, A.,2002) mediante i siti BrsGI ed KpnI e trasferita mediante i medesimi nel plasmide Cerulean (clontech 15214). L'mCerulean così assemblata è stata trasferita mediante i siti AgeI ed KpnI nel plasmide pCCL-SIN18PPT.Prom.EGFPWpre sostituendone la EGFP-Wpre. A monte della mCerulean si è clonato il promotore SCG102S2N prelevato mediante i siti di restrizione XhoI e NcoI reso blunt dal plasmide S2NP-Luciferase-PGL3 (Namikawa K., et al., 2006). Il vettore d'arrivo contenete la mCerulean a sua volta è stato digerito con XhoI e BamHI reso blunt, sostituendone in questo modo il promotore pgk1 ed ottenendo il plasmide LTV-SCG102S2N-mCerulean (figura 30b).La costruzione di questo vettore è stata eseguita in collaborazione col dott.Marco Brancaccio.

La costruzione del vettore lentivirale LTV-pTa1-rtTA ha richiesto l'adattamento dell'rtTA del plasmide di pTet-On Advanced (clontech 630930) per i siti di restrizione BamHI ed XhoI. L'rtTA Advanced (rtTA<sup>s</sup>-M2) è stata subclonata con i siti EcoRI e BamHI reso blunt in EcoRI ed Sal I del sito di clonaggio multiplo di pBluescript II SK (+/-). Si è reso possibile dunque trasferire l'rtTA, da pBluescript, mediante i siti BamHI ed XhoI direttamente nel plasmide LTV-pTa1-mCherry (costruito dal dott. Brancaccio) mediante i medesimi siti, sostituendone l'mCherry (Figura 30c).

I vettori lentivirali LTV-TRE-Tight-Luciferasi-IRES-EGFP, LTV-TRE-Tight-Foxg1-IRES-EGFP, LTV-TRE-Tight-Emx2-IRES-EGFP, erano già disponibili e costruiti nello stesso laboratorio dal dott. Brancaccio.

### **3.2 PRODUZIONE E TITOLAZIONE DEI VETTORI LENTIVIRALI**

La produzione e la titolazione dei vettori lentivirali di terza generazione per fluorescenza è stata realizzata mediante il protocollo messo appunto dal dott. Brancaccio mentre per la titolazione per Real-Time PCR con il protocollo messo appunto dal dott. Maiorano.

I vettori lentivirali, utilizzati nel presente lavoro, sono stati titolati secondo due metodi la titolazione per fluorescenza, che stima il numero di copie integrate

funzionali (gold standard) e la titolazione per Real-Time PCR, che stima del numero totale di copie di vettore virale integrate (quantificazione assoluta).

I vettori di seguito riportati sono stati titolati per fluorescenza (Figura 30):

LTV-TRE-Tight-Luciferasi-IRES-EGFP,

LTV-TRE-Tight-Foxg1-IRES-EGFP,

LTV-TRE-Tight-Emx2-IRES-EGFP,

LTV-ENestin:P/hsp68-mCherry,

LTV-pTa1-rtTA.

In base al promotore responsabile dell'espressione del marcatore fluorescente, si è resa necessaria la scelta di una linea cellulare opportuna nella quale tale promotore potesse essere attivo. A tale scopo per i vettori LTV-TRE-Tight-Luciferasi-IRES-EGFP, LTV-TRE-Tight-Foxg1-IRES-EGFP, LTV-TRE-Tight-Emx2-IRES-EGFP è stata usata la linea cellulare Hela Tet-Off (clontech) che esprime il transattivatore tTA ad elevati livelli in assenza di doxiciclina. Le cellule positive per la trasduzione risulteranno essere dunque EGFP positive (Figura 31b).

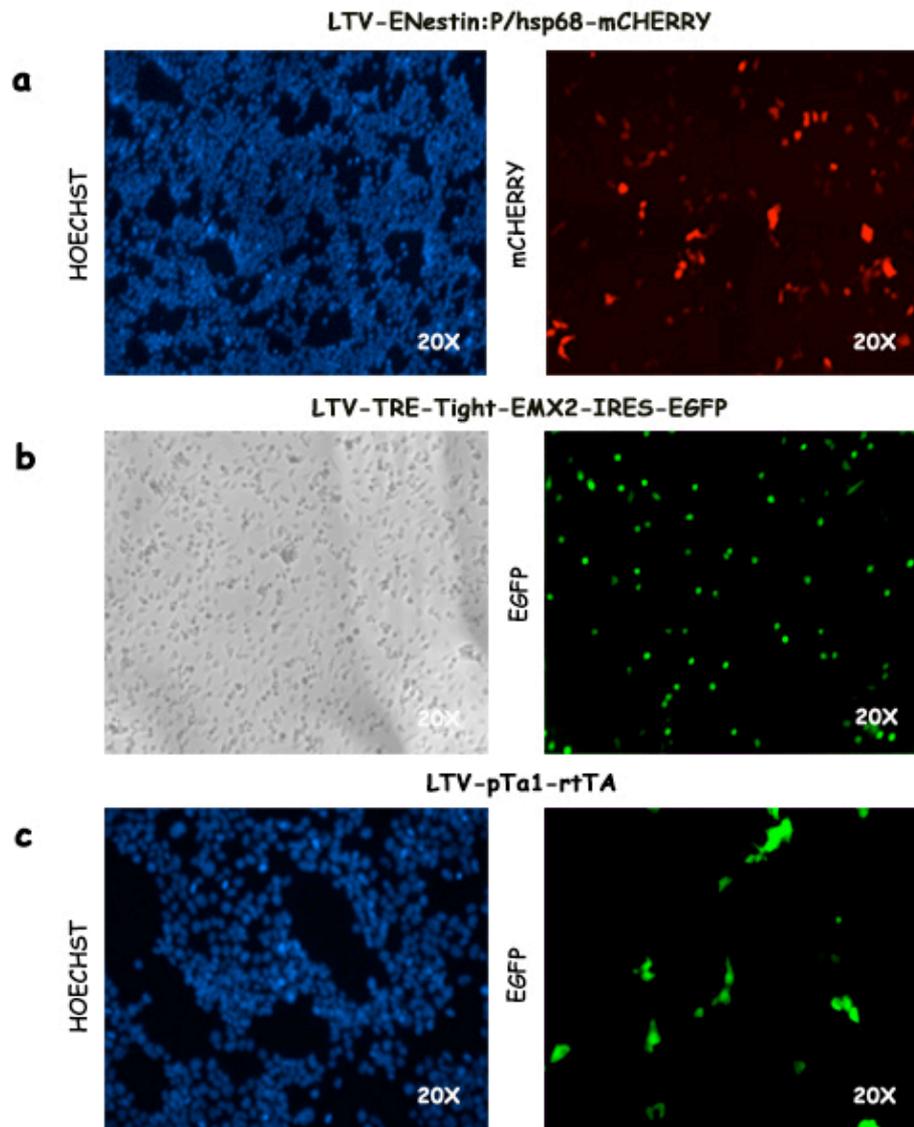
Per il vettore LTV-ENestin:P/hsp68-mCherry si è potuta utilizzare la linea cellulare Hek293T. A seguito di infezione per effettuare la titolazione per Real-time PCR si era potuta constatare l'attività promotore ENestin:P/hsp68 in questa linea cellulare. Le cellule positive alla trasduzione risulteranno mCherry positive (Figura 31a).

Infine per il vettore LTV-pTa1-rtTA, è stata generata una linea cellulare esprimente l'EGFP sotto il controllo del promotore TRE-Tight. Questa linea cellulare è stata generata mediante la trasduzione di Hek293T con MOI 30 di LTV pTRE-Tight-EGFP, rendendo possibile la titolazione di LTV-pTa1-rtTA per fluorescenza (Figura 31c).

Il vettore LTV-SCG102S2N-mCerulean è stato titolato mediante amplificazione della regione  $\psi$  per PCR Real-Time (Figura 32). Il protocollo di titolazione prevede che a seguito di infezione e estrazione del DNA genomico da Hek293T, si esegua una PCR Real-Time utilizzando come standard un numero noto di molecole di plasmide pCCL-SIN18PPT.Prom.EGFPWpre (Follenzi, A.,2002) linearizzato.

Questo consente di costruire una curva di calibrazione in base alla quale stimare il numero di copie integrate nel campione esaminato, ed in base alla formula riportata in materiali e metodi (paragrafo 2.4.4.2) arrivare alla stima del titolo (Figura 33).

Tuttavia per ottenere un titolo equivalente a quello per fluorescenza, usato come gold standard, si cotitola nella stessa sessione sperimentale un vettore virale il cui titolo sia stato ottenuto precedentemente per fluorescenza. Questo consente di ottenere un titolo per fluorescenza equivalente che verrà considerato come titolo reale ai fini sperimentali.



**Figura 31|Esempi di titolazione per fluorescenza dei vettori lentivirali LTV-ENestin:P/hsp68-mCherry, LTV-TRE-Tight-Emx2-IRES-EGFP, LTV-pTa1-rtTA.**

a) Titolazione del vettore lentivirale LTV-ENestin:P/hsp68-mCherry su cellule 293T 4 gg dopo l'infezione (diluizione 1:100, infezione con 2,5  $\mu$ l di tale diluizione). In blu i nuclei visualizzati con hoechst ed in rosso cellule positive all'integrazione virale. b) Titolazione del vettore lentivirale LTV-TRE-Tight-EMX2-IRES-EGFP su cellule HELA Tet-Off 4gg dopo l'infezione (diluizione 1:10, infezione con 5  $\mu$ l di tale diluizione). In campo chiaro visualizzazione delle cellule totali in verde cellule positive all'integrazione virale. c) Titolazione del vettore lentivirale LTV-pTa1-rtTA su cellule 293T-rtTA responsive dopo 4 gg dall'infezione (diluizione 1:100, infezione con 10  $\mu$ l di tale diluizione). In blu sono visualizzati i nuclei con hoechst ed in verde le cellule positive per l'integrazione virale.

Figura32| Rappresentazione schematica dei vettori lentivirali integrati e regione  $\psi$  amplificata per Real-Time PCR.

In rosso è evidenziata la regione  $\psi$  amplificata tramite primer (#261/F"appaiati in tale regione.

$\psi$  sequenza di packaging;  $\Delta$ gag porzione del gene gaga con forma tronca della cornice di lettura aperta; RRE elemento di risposta a Rev; SA sito di splicing accettore;SD sito di splicing donatore; cPPT tratto centrale di polipurine.



Figura 33| Curve di amplificazione e curva di calibrazione.

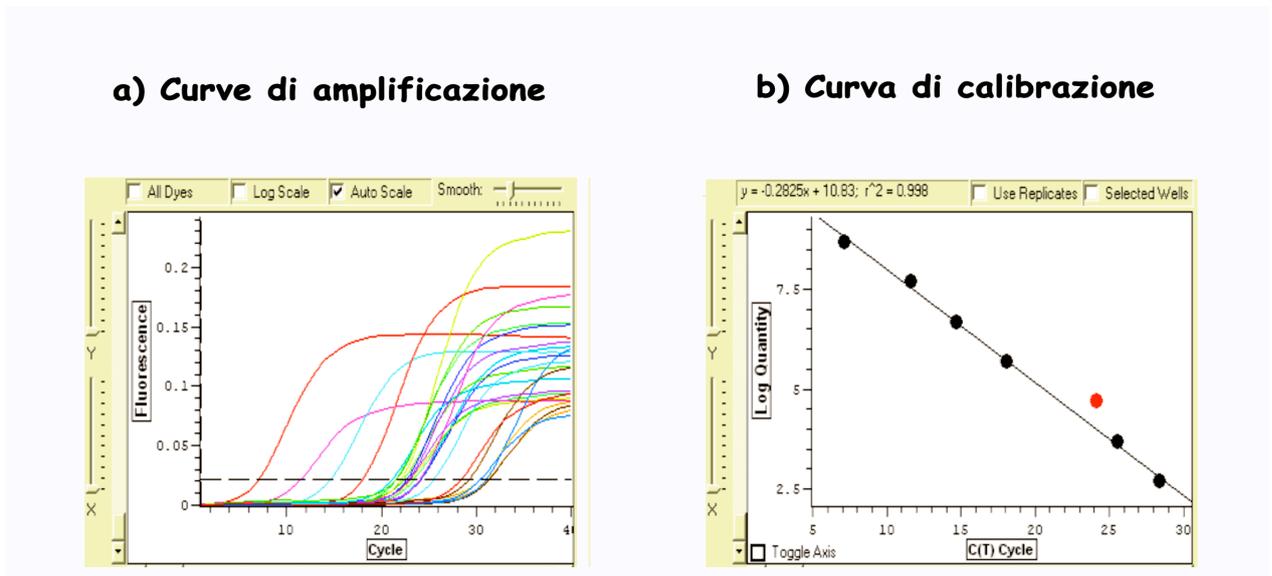
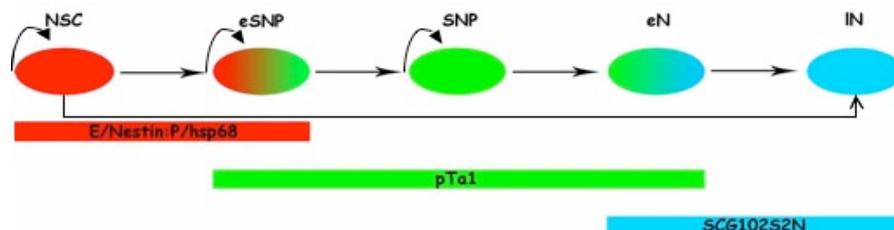


Figura 34|Rappresentazione schematica delle transizioni analizzate e dei domini di espressione dei promotori stato specifici usati.

In rosso sono rappresentate le cellule staminali neurali marcate tramite il promotore ENestin:P/hsp68, in verde e rosso gli SNP precoci che iniziano ad attivare l'espressione anche a partire dal promotore pTa1; in verde gli SNP; in blu i neuroni precoci che coesprimoo pT $\alpha$ 1 ed mCerulean guidata dal promotore SCG102S2N ed infine i neuroni tardivi in blu esprimenti l'mCerulean sotto SCG102S2N



### 3.3 VALUTAZIONE DEL PATTERN DI ESPRESSIONE DEI PROMOTORI STATO SPECIFICI

Nel sistema sperimentale messo appunto, ciascun compartimento lungo la via neurogenica, cellule staminali neurali (NSC), progenitori neuronali corti (SNP) e neuroni (Figura 34), viene monitorato mediante l'uso di proteine fluorescenti guidate da promotori stato specifici, scelti sulla base di lavori precedenti (vedi introduzione paragrafo 2.2).

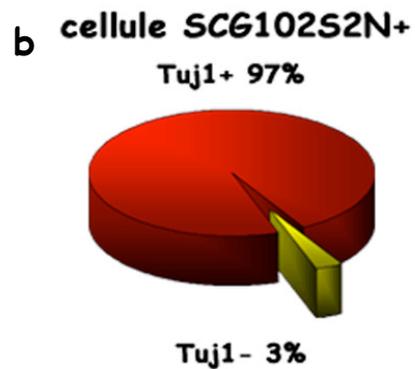
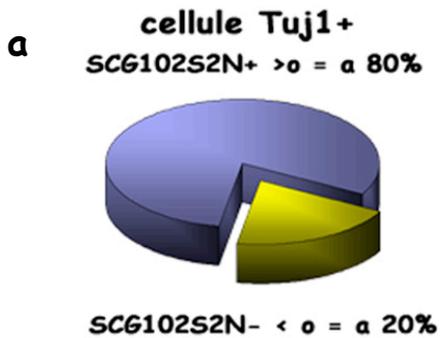
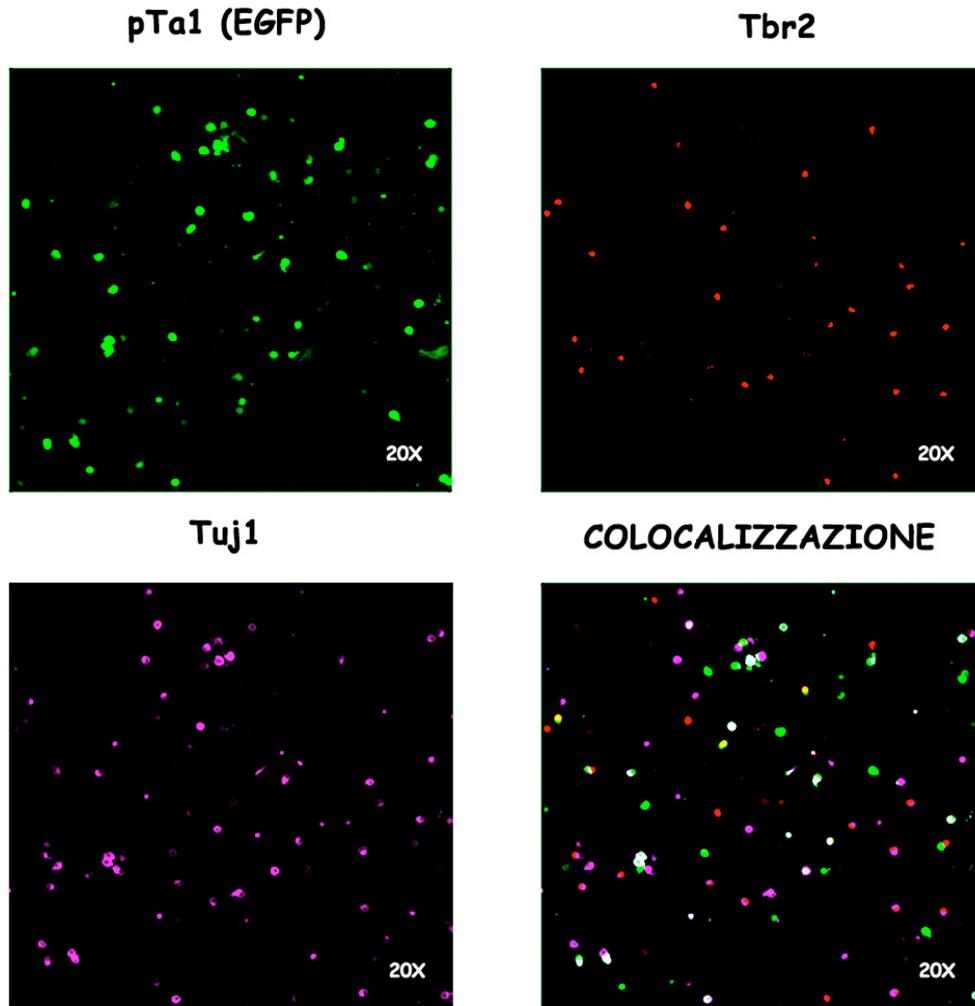
Si sono eseguite alcune prove che hanno consentito di accertare la specificità dei promotori SCG102S2N,  $T\alpha 1$ , E/Nestin:P/hsp68 nel sistema *in vitro* utilizzato, le neurosfere, prima di procedere alla sovraespressione condizionale dei geni *Foxg1*, *Emx2* ed Luciferasi nel compartimento dei progenitori neuronali corti (SNP).

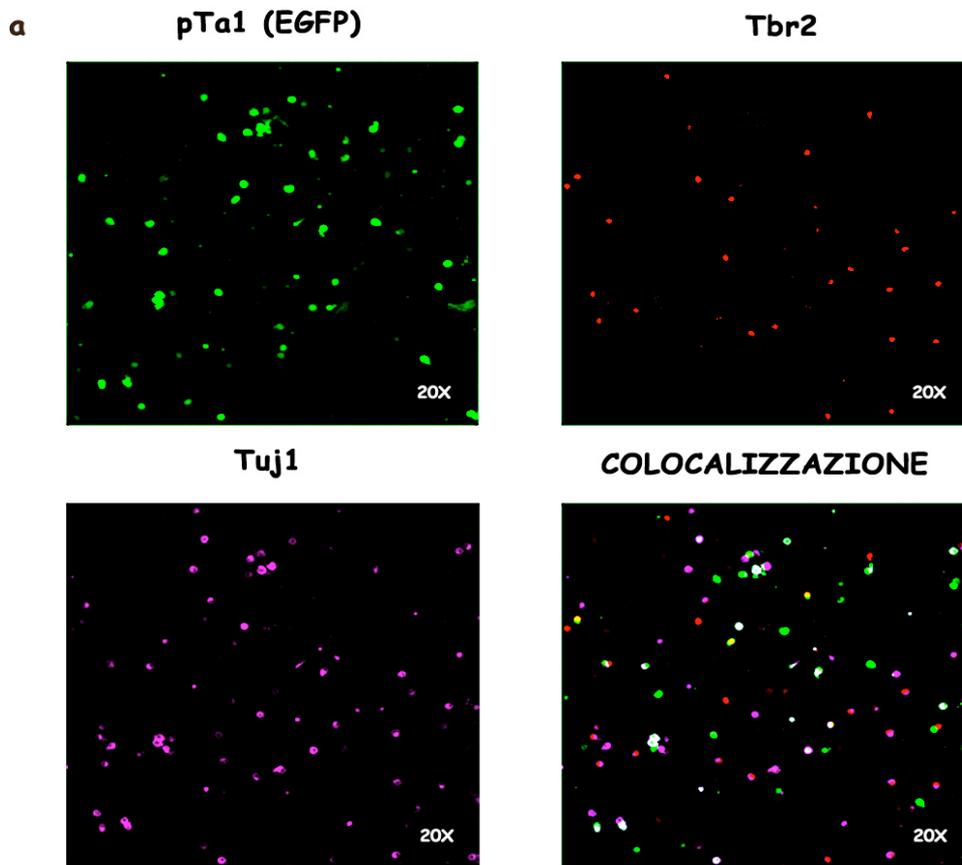
La specificità del promotore SCG102S2N è stata valutata mediante immunofluorescenza su progenitori corticali dissociati (prelevati ad E11.5), a 3 giorni e mezzo dall'infezione con il vettore LTV-SCG102S2N-mCerulean (MOI16), per Tuj1 (neuroni precoci) e mCerulean (anti GFP) (Figura 35).

Le cellule sono state contate per la singola positività a Tuj1 o mCerulean o per la loro doppia positività. Si è stimato che le cellule Tuj1 positive sono per più dell'80% anche positive per SCG102S2N (mCerulean) mentre meno del 20% non lo sono (Figura 35a). Le cellule positive per SCG102S2N (mCerulean) sono al contrario per il 97% positive per Tuj1 mentre solo il 3% non lo risulta essere (Figura 35b). Da ciò si evince che l'espressione di Tuj1 è più precoce rispetto all'attivazione di SCG102S2N. Namikawa K., et al., 2006, stimano infatti la colocalizzazione di questo promotore con NeuN al 98% in sezioni di cervello di ratto. NeuN è noto essere un marcatore più tardivo rispetto a Tuj1.

**Figura 35|Validazione del promotore SCG102S2N come marcatore neuronale nel sistema di coltura di neurosfere.**

Immunofluorescenza su neuroblasti dissociati (prelevati ad E11.5) dopo 3 giorni e mezzo dall'infezione con LTV-SCG102S2N-mCERULEAN; rilevazione dell'espressione di Tuj1 in rosso, e di mCerulean con anticorpo anti GFP in verde, in blu visualizzazione dei nuclei con hoechst. a) Grafico illustrante la percentuale di cellule SCG102S2N+ nella popolazione di neuroni postmitotici immaturi Tuj1+, tale percentuale ammonta a più dell'80%. b) Grafico illustrante la percentuale di cellule SCG102S2N+ che esprimono il marcatore neuronale precoce Tuj1. Tale percentuale ammonta al 97%.





**b**

Anticorpo			% cellule positive
pTa1	Tbr2	Tuj1	
+	+	+	4,2%
-	+	+	6,3%
+	-	+	13,5%
+	+	-	1,8%
-	+	-	3,4%
+	-	-	23,1%
-	-	+	6,8%
-	-	-	41%

**c**

	pTa1	Tbr2	Tuj1	
SNP	+	-	-	23,1%
IPC	+/-	+	-	5,2%
NEURONI	+/-	+/-	+	31%

**d**

SNP/ all pTa1+	53%
(pTa1+ Tbr2+)/SNP	7%
(pTa1+ Tbr2+)/IPC	35%

**Figura 36|Valutazione della struttura compositiva del compartimento progenitoriale.**

a) Immunofluorescenza su neuroblasti (prelevati ad E11.5) dissociati dopo 3 giorni e mezzo dall'infezione con il vettore LTV-pTa1-rtTa, il vettore responsivo LTV-TRE-Tight-Luciferasi-IRES-EGFP. Le cellule sono state marcate per EGFP (in verde) (cellule positive per pTa1), per Tuj1 in viola, per Tbr2 in rosso e i nuclei in blu con hoechst. b) Nella tabella sono rappresentate le percentuali delle cellule positive per i marcatori citati. Sotto sono riportate le percentuali degli SNP 23,1% (pTa1+), IPC 3,4% (Tbr2+), neuroni 31% (Tuj1+). c) Nel riquadro sono riportate le percentuali di SNP, IPC, neuroni così come sono state calcolate. d) Viene inoltre riportata la percentuale di cellule positive per Tuj1 nella popolazione pTa1 positiva; la frazione di progenitori pTa1+ / Tbr2+ sia sulla popolazione degli SNP (7%), sia sulla popolazione degli IPC (Tbr2+) (35%).

L'analisi del promotore  $T\alpha 1$  si è basata sul confronto con i marcatori Tuj1 (neuroni precoci) e Tbr2 (progenitori intermedi), non essendo presente un marcatore alternativo per la popolazione dei progenitori neuronali corti (SNP).

Si è effettuata un'immunofluorescenza su progenitori corticali dissociati (prelevati ad E11.5), a 3 giorni e mezzo dall'infezione con il vettore LTV-pTa1-rtTA ed LTV-TRE-Tight-Luciferasi-IRES-EGFP. Le cellule sono state contate considerando tutte le possibili combinazioni tra  $T\alpha 1$  (EGFP), Tbr2, Tuj1 (Figura 36a). Da questa prima analisi risultano 8 possibili combinazioni le cui percentuali sono riportate in Figura 36b.

Da un'analisi interpretativa di tali percentuali:

1. La popolazione degli SNP è stata identificata *in vivo* mediante l'uso del promotore stato specifico  $T\alpha 1$ , in base ad informazioni posizionali (la presenza in zona ventricolare) ed aspetti morfologici (la presenza di un prolungamento piaie corto) (Gal J.S., et al., 2006). Nel sistema *in vitro* da noi usato, le neurosfere, mancano informazioni che derivino dalla posizione anatomica e dalla morfologia, così è stato necessario basare l'identificazione e l'analisi di tale popolazione sull'esclusione con i marcatori Tuj1, Tbr2. L'omologo *in vitro* della popolazione degli SNP, sarebbe dunque la frazione di cellule  $pT\alpha 1+$  (Tuj1-, Tbr2-) che ammonta al 23,1% delle cellule totali ad uno stadio equivalente ad E14.5 (Figura 36c).

L'espressione di Tbr2 si manifesta in cellule che sono in zona subventricolare e sono considerate progenitori intermedi. Si è quindi considerata la frazione di cellule Tbr2+ (Tuj1-,  $pT\alpha 1+/-$ ) come l'omologo *in vitro* dei progenitori intermedi. Tale percentuale ammonta nel sistema *in vitro* al 5,2% delle cellule totali (Figura 36c).

Infine la percentuale di neuroni ad uno stadio equivalente ad E14.5 ammonta al 31% delle cellule totali (Figura 36c).

2. Successivamente si è preso in considerazione il rapporto tra SNP ( $pT\alpha 1+$ ) e tutte le cellule che sono  $pT\alpha 1+$ . Tale rapporto ci consente di valutare quanti sono gli SNP sul totale di cellule che esprimono il marcatore  $pT\alpha 1+$ , informazione utile per stimare la frazione di cellule  $pT\alpha 1+$  che sono progenitori neurali corti "reali" (53%) (Figura 36d). Ciò risulta ancora più importante considerato che il promotore dell' $\alpha$  tubulina ha una coda di espressione nel compartimento dei neuroni precoci.

Inoltre, valutando la percentuale di cellule  $pT\alpha 1+, Tbr2+$  sulla popolazione dei progenitori neurali corti (SNP) o sulla popolazione dei progenitori intermedi (IPC), si

nota che nel primo caso la percentuale è del 7% mentre nel secondo del 35%. Questo significa che una piccola coorte di cellule pT $\alpha$ 1+ sono anche Tbr2+ mentre un coorte non trascurabile di cellule Tbr2+ sono anche pT $\alpha$ 1+. Ciò suggerisce fortemente che le cellule Tbr2 possano derivare, in larga parte, dai progenitori neuronali corti (SNP).

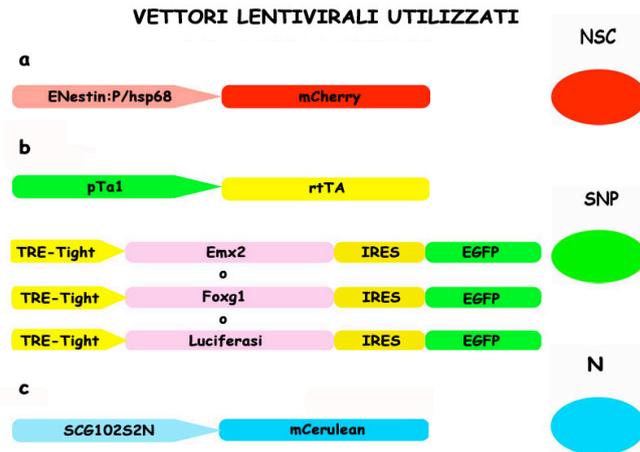
Infine da notare che la frazione di cellule pT $\alpha$ 1+ *in vitro* è circa 4 volte maggiore della frazione di cellule Tbr2+. Considerando i fini sperimentali di questo lavoro, ciò significa che il compartimento di iperespressione dei geni studiati rappresenta una frazione maggioritaria dei progenitori totali. Questi esperimenti sono stati eseguiti in collaborazione col dott. Marco Brancaccio.

Il promotore E/Nestin:P/hsp68 è stato confrontato con il promotore della nestina, Nestin II intron enhancer (1852pb)-HSV TK presente nella linea di topi transgenici utilizzata, Nestin-rtTA-IRES-bGEO<sup>+/-</sup> (Mitsubishi T. *et al.* 2001). Progenitori corticali (prelevati ad E11.5) Nestin-rtTA-IRES-bGEO<sup>+/-</sup> sono stati analizzati a 7 giorni dall'infezione con LTV-E/Nestin:P/hsp68-mCherry ed LTV-TRE-Tight-Luciferasi-IRES-EGFP, mediante acquisizione citofluorimetrica rivelando una percentuale di colocalizzazione consistente tra mCherry e EGFP sotto il controllo del promotore Nestin II intron enhancer (1852pb)-HSV TK (dati non presentati).

### **3.4 SOVRA-REGOLAZIONE CONDIZIONALE DEI GENI *Foxg1* E *Emx2* NEL COMPARTIMENTO PROGENITORIALE: ESPERIMENTO DI TIME COURSE**

Il sistema messo a punto è indirizzato allo studio dell'effetto che l'iperespressione condizionale dei geni *Foxg1* ed *Emx2* determina nel compartimento dei progenitori neuronali, a completamento di uno studio che prende in considerazione l'effetto svolto dagli stessi nel compartimento delle cellule staminali neurali (NSC).

Il nostro sistema di analisi si basa sull'impiego di promotori stato-specifici (pTa1, SCG102S2N, E/Nestin:P/hsp68) che controllano l'espressione di tre diverse proteine fluorescenti, consentendo di monitorare l'evoluzione del sistema nel tempo. Grazie alla stabilità delle proteine fluorescenti utilizzate e alla parziale sovrapposizione dei pattern d'espressione dei promotori utilizzati (pT $\alpha$ 1 è espresso anche nei neuroni neonati), si possono trarre informazioni anche sulle transizioni tra i compartimenti presi in considerazione (Figura 34).



**Figura37|Rappresentazione schematica dei vettori lentivirali utilizzati.**

a) Per seguire l'andamento temporale del compartimento delle cellule staminali neurali (NSC), viene utilizzato il vettore lentivirale LTV-ENestin:P/hsp68-mCherry. b) La sovraespressione inducibile dei geni *Emx2* e *Foxg1* (come controllo Luciferasi) nel compartimento degli SNP si verifica mediante la coinfezione del vettore lentivirale LTV-pTa1-rtTA con LTV-TRE-Tight-*Foxg1*-IRES-EGFP o LTV-TRE-Tight-*Emx2*-IRES-EGFP o LTV-TRE-Tight-Luciferasi-IRES-EGFP. c) Il compartimento dei neuroni viene seguito mediante il vettore lentivirale LTV-SCG102S2N-mCerulean.

I vettori lentivirali utilizzati a tale scopo sono rappresentati in Figura 37. Il promotore  $T\alpha 1$  guida l'espressione dell'*rtTA*, che a sua volta attiva l'espressione del promotore TRE-Tight responsabile dell'espressione di *Foxg1* ed *Emx2*. Il trascritto di questi geni include un modulo IRES2-EGFP, che consente la marcatura del compartimento  $pT\alpha 1+$ .

Nell'esperimento di time course, abbiamo allestito colture di neurosfere a partire da progenitori corticali embrionali, isolati a E11.5 ed infettati immediatamente con i vettori lentivirali riportati in Figura 37.

Abbiamo monitorato quindi per microscopia confocale l'evoluzione del sistema (Figura 38) ed osservato differenze significative fra i progenitori di diverso genotipo. In particolare, a 28 giorni dall'infezione (28 dpi; days post infection)::

(a) a seguito dell'iperespressione di *Foxg1* si evidenzia un incremento delle cellule  $pT\alpha 1$  positive rispetto al controllo;

(b) nel caso di *Emx2* le stesse si riducono, a fronte di un concomitante incremento delle cellule SCG102S2N+.

Inoltre, come previsto, si possono apprezzare cellule che coesprimono diversi marcatori, ad esempio ENestin:P/hsp68+ e  $pT\alpha 1+$  (Figura 39), con valore di elementi transizionali.

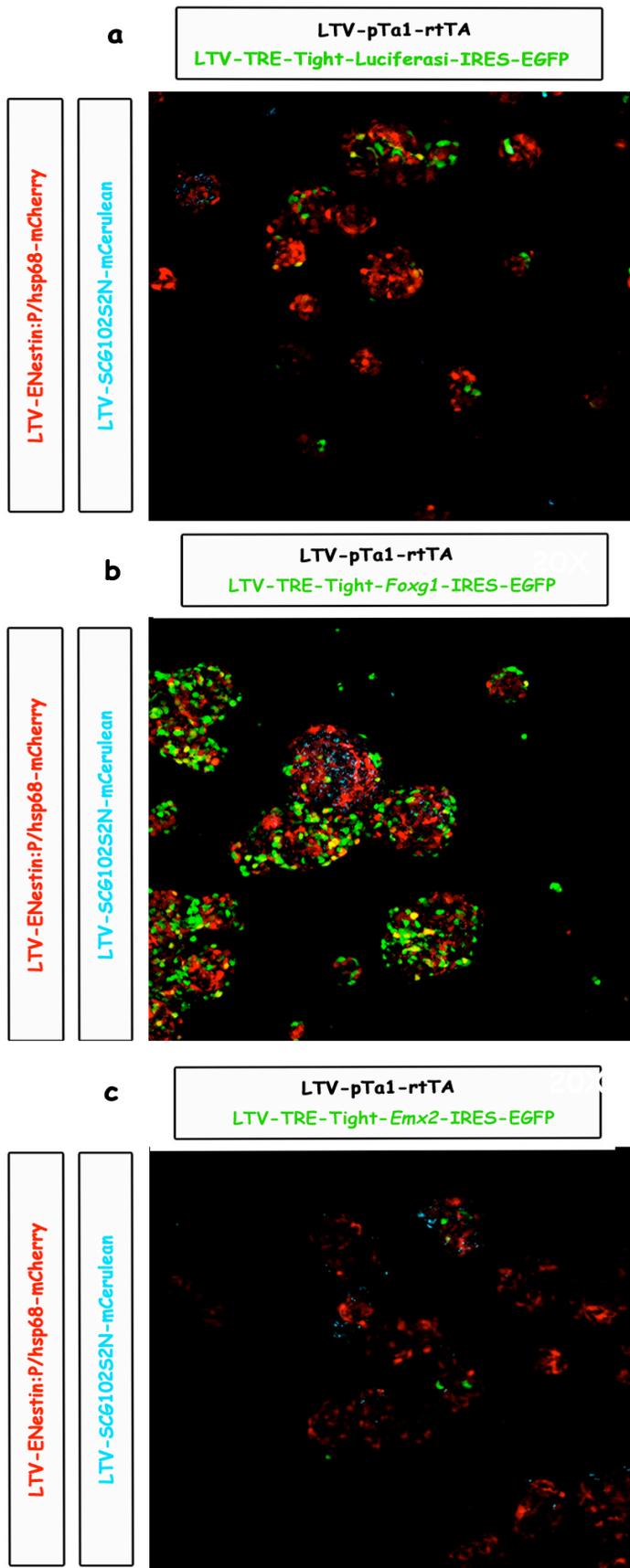


Figura 38| Neurosfere a 28 dpi (days post infection).

a) Neurosfere infette con LTV-TRE-Tight-Luciferasi-IRES-EGFP. b) Neurosfere infette con LTV-TRE-Tight-FOXG1-IRES-EGFP, è evidente un incremento di cellule pTα1 positive (EGFP+) rispetto al controllo Luciferasi. c) Neurosfere infette con LTV-TRE-Tight-EMX2-IRES-EGFP, è evidente una riduzione drastica delle cellule pTα1 positive (EGFP+) ed un aumento concomitante di cellule SCG102S2N positive (mCerulean+). Colori: cellule pTα1 positive sono EGFP+, cellule ENestin:P/hsp68 positive sono mCherry+, cellule SCG102S2N positive sono mCerulean +. Foto al confocale (Leica DM2 IRES).

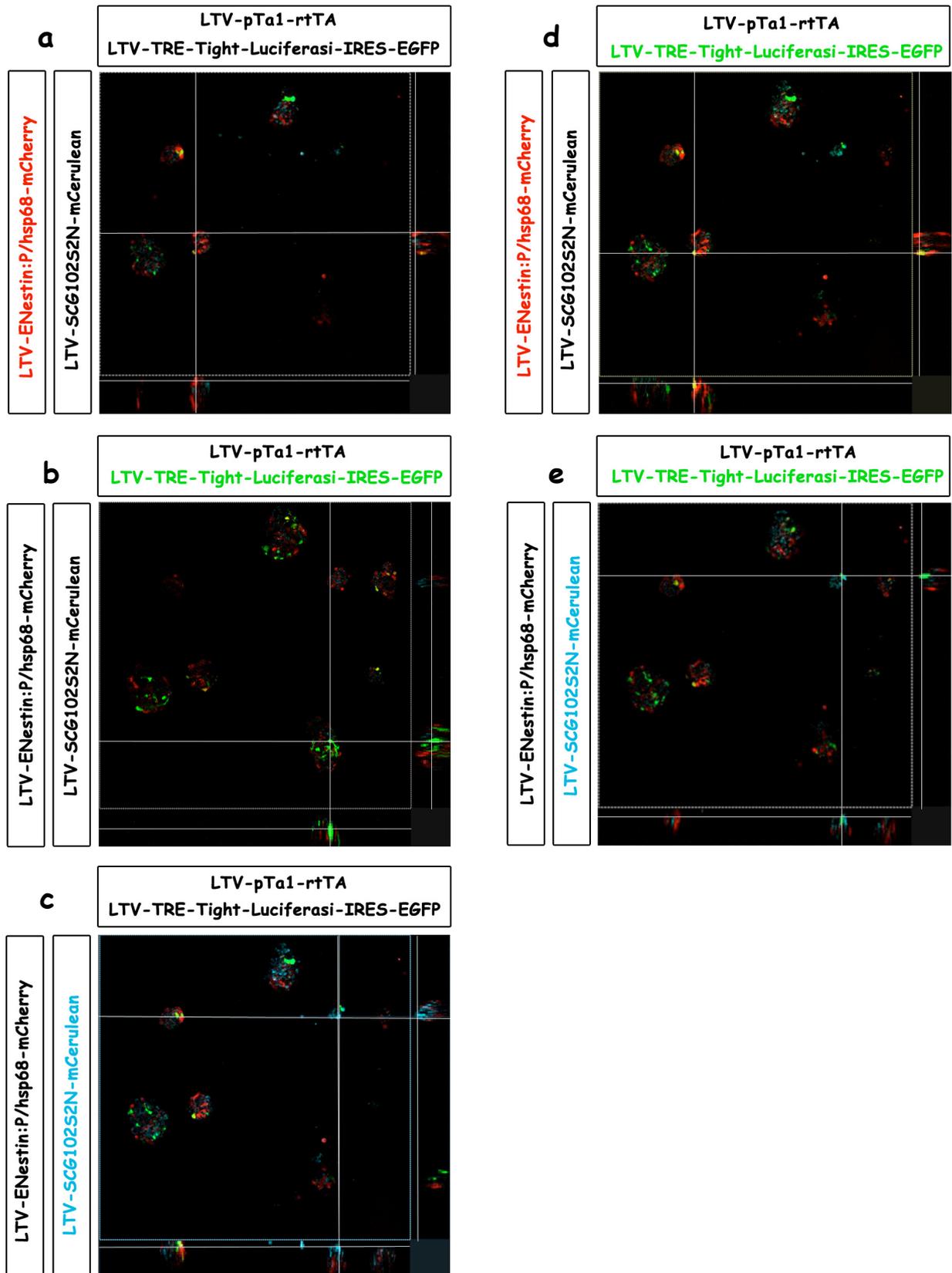
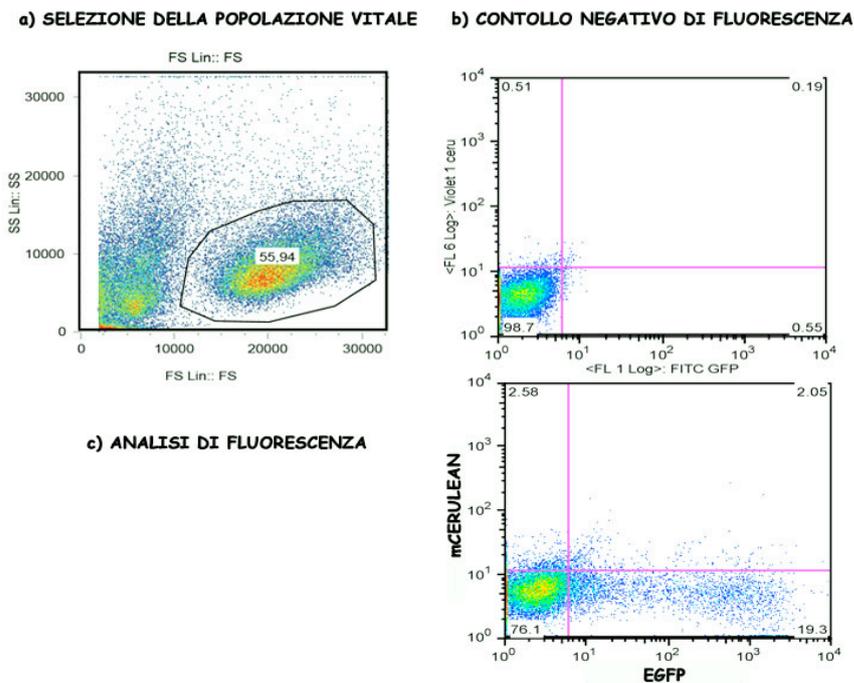


Figura 39| Colocalizzazioni in neurosfere a 28 dpi (days post infection).

a) Cellula singolo positiva per LTV-ENestin:P/hsp68-mCherry. b) Cellula singolo positiva per LTV-pTa1-EGFP. c) Cellula singolo positiva per LTV-SCG102S2N-mCerulean. d) Cellula coesprimente LTV-pTa1-rtTA e LTV-ENestin:P/hsp68-mCherry. e) Cellula coesprimente LTV-pTa1-rtTA e LTV-SCG102S2N-mCerulean. Foto al confocale Leica DM2 IRES.

Successivamente, ai fini di una migliore valutazione dell'ampiezza e della significatività statistica dei quanto osservato in microscopia confocale, abbiamo rianalizzato il sistema per citofluorimetria. L'analisi citofluorimetrica prevede la pre-selezione delle cellule vitali sulla base di parametri citofluorimetrici, quali SSC ed FSC, rappresentativi di tratti morfologici cellulari notevoli ovvero rugosità (SSC) e volume (FSC). Su queste cellule si analizza quindi la fluorescenza (60000 cellule circa analizzate a seguito di selezione SS/FC). Il controllo negativo per stabilire le soglie di positività è rappresentato da cellule non infettate equistadiate e coprocessate (Figura 40).



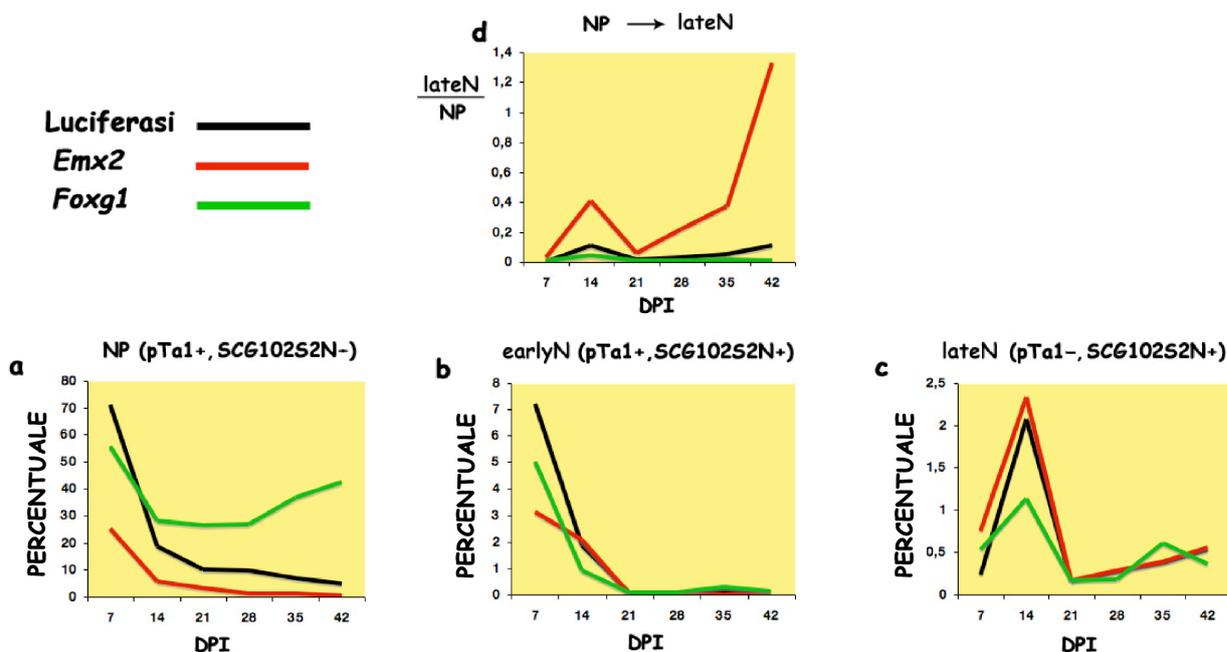
**Figura40| Schema d'analisi citofluorimetrica.**

a) L'analisi di fluorescenza viene condotta sulla popolazione cellulare vitale selezionata tramite i parametri morfologici di SS ed FS. b) In base al controllo negativo per fluorescenza si stabiliscono le soglie di positività. c) Si procede dunque alla valutazione delle fluorescenze.

In un primo esperimento esplorativo sono stati studiati gli effetti della sovraespressione dei geni in analisi nel compartimento  $pT\alpha1+$  sulle dimensioni di tale compartimento, nonché di quello neuronale a valle, positivo per il promotore SCG102S2N. In tale esperimento, della durata di 6 settimane (42 DPI, days post infection), si sono utilizzati LTV- $pTa1$ -rtTA (MOI 10), LTV-TRE-Tight-Luciferasi-IRES-EGFP o LTV-TRE-Tight-Foxg1-IRES-EGFP o LTV-TRE-Tight-Emx2-IRES-EGFP (MOI 15), LTV-SCG102S2N-mCerulean (MOI 8). I dati ottenuti sono stati analizzati come rappresentato in figura 41. Abbiamo prestato attenzione alle tre popolazioni,  $pT\alpha1+$ /SCG102S2N- (NP, progenitori neuronali),  $pT\alpha1+$ /SCG102S2N+ (earlyN, neuroni precoci), e  $pT\alpha1$ -/SCG102S2N+ (lateN, neuroni tardivi), valutandone l'ampiezza nel tempo a seguito delle diverse manipolazioni genetiche effettuate.

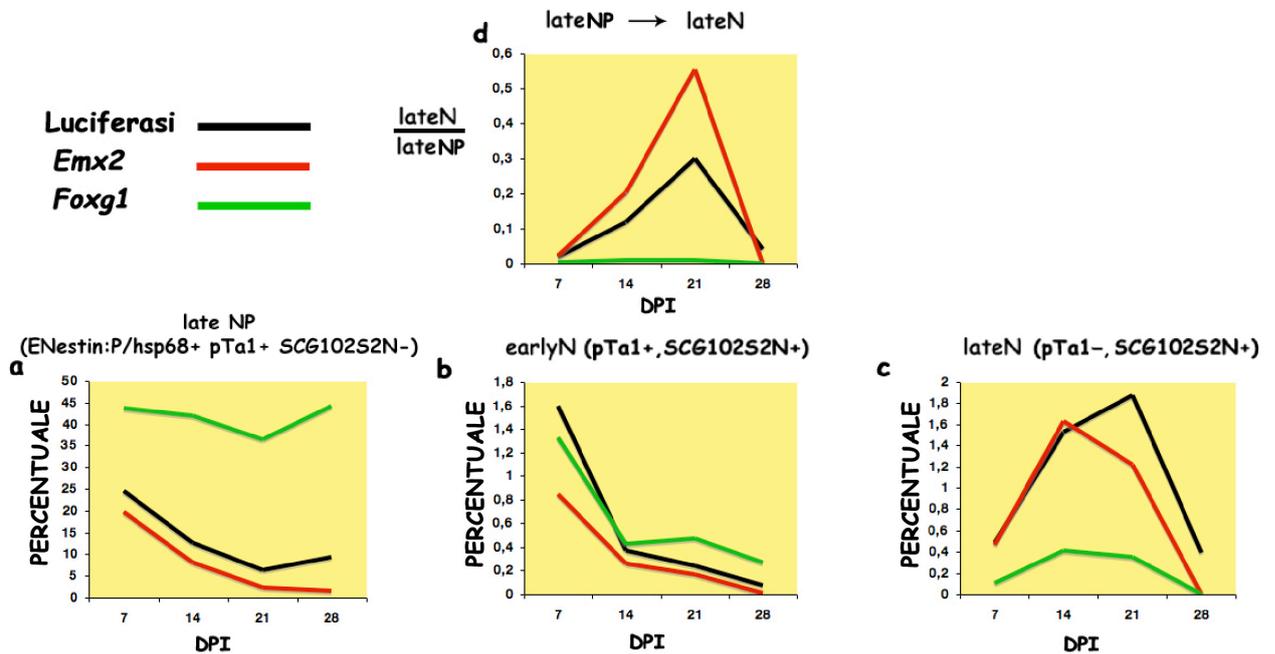
Figura 41| Esperimento di time course (durata 42 giorni) configurazione a doppia marcatura per pTα1 (EGFP) ed SCG102S2N (mCerulean).

Cellule singole positive per il promotore Ta1 vengono considerate come progenitori neuronali (NP), cellule positive per SCG102S2N come neuroni tardivi (lateN), cellule positive per entrambi come neuroni precoci (earlyN). Viene mostrata in a,b,c la progressione nel tempo (days post infection, DPI) delle ampiezze (in percentuale) dei diversi compartimenti sopra citati per i tre genotipi (Luciferasi, *Emx2*, *Foxg1*). In d viene riportata la velocità di transizione tra il compartimento dei progenitori neuronali (NP) e quello dei neuroni tardivi (lateN) (n=1, eventi SS/FC circa 60000) (nero, Luciferasi; rosso, *Emx2*; verde, *Foxg1*). Vedi testo per i dettagli.



Il compartimento NP è dilatato a seguito di iperespressione di *Foxg1* e ridotto nel caso di *Emx2*. La popolazione dei neuroni precoci (earlyN) non presenta alterazioni significative rispetto a Luciferasi sia per *Emx2* che per *Foxg1*. I neuroni tardivi (lateN) aumentano sotto *Emx2* e diminuiscono sotto *Foxg1*, specialmente nel corso delle prime settimane (Figura 41). Tali effetti sono qualitativamente consistenti con i risultati dell'analisi confocale riportata sopra (Figura 38). Ora, è ragionevole assumere il rapporto tra l'ampiezza del comparto a valle e l'ampiezza di quello a monte quale indice della frequenza con la quale gli elementi del primo transitano nel secondo. Alla luce di tale assunzione, l'andamento del rapporto lateN/NP suggerisce una accelerazione della transizione NP→lateN indotta da *Emx2* ed un suo rallentamento promosso da *Foxg1*.

Figura 42| Esperimento di time course (durata 28 giorni) configurazione a tripla marcatura per pTα1(EGFP) e SCG102S2N (mCerulean), ENestin:P/hsp68 (mCherry). Cellule singole positive per il promotore Ta1 vengono considerate come progenitori neuronali tardivi (lateNP), cellule positive per SCG102S2N come neuroni tardivi (lateN), cellule positive per entrambi come neuroni precoci (earlyN). Viene mostrata in a,b,c la progressione nel tempo (days post infection, DPI) delle ampiezze (in percentuale) dei diversi compartimenti sopra citati per i tre genotipi (Luciferasi, *Emx2*, *Foxg1*). In d viene riportata la velocità di transizione tra il compartimento dei progenitori neuronali tardivi (lateNP) e quello dei neuroni tardivi (lateN) (n=1) (nero, Luciferasi; rosso, *Emx2*; verde, *Foxg1*). Vedi testo per dettagli.

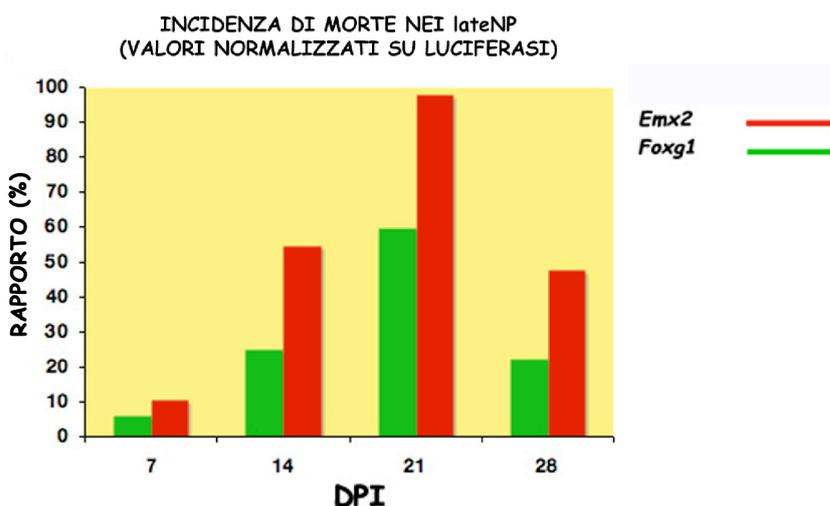


Abbiamo ripetuto quindi l'esperimento, aggiungendo ai vettori lentivirali di cui sopra il lentivirus LTV-ENestin:P/hsp68-mCherry, attivo nel compartimento neurale staminale (NSC), nonché capace di provvedere un residuo di fluorescenza rossa ai progenitori neuronali precoci (earlyNP) (Figura 42). Ciò al fine di confermare i dati sperimentali precedenti e di raccogliere informazioni sugli effetti della sovraespressione di *Emx2* o *Foxg1* sulla maturazione precoce dei neuroprogenitori. Da notare che l'MOI è stato abbassato in tal caso ad 8 per tutti i vettori virali usati, allo scopo di mantenere il carico metabolico complessivo omogeneo al primo esperimento ed evitare tossicità troppo elevate. Con questo nuovo assetto sperimentale, i progenitori neuronali sono stati distinti in un comparto precoce, ENestin:P/hsp68+ e pTα1+, ed uno tardivo, ENestin:P/hsp68- e pTα1+. I risultati di tale secondo esperimento, tabulati dettagliatamente nei dati supplementari, concordano con quelli del primo. Apparentemente, *Foxg1* inibisce la transizione tra

progenitori neuronali tardivi (lateNP) e neuroni tardivi (lateN), *Emx2* aumenta la velocità di tale transizione (Figura 42d).

Fra i meccanismi alla base della dilatazione del comparto NP indotto da *Foxg1*, dobbiamo anche contemplare una possibile attività protettiva sui progenitori neuronali, giocata da tale gene. Per verificare questa ipotesi, si è effettuato un saggio di vitalità cellulare compartimento specifico con 7AAD. Essendo l'incidenza della morte cellulare alquanto contenuta (ad esempio, fra i lateNP sovraespressanti luciferasi, 0,210, 0,024, 0,013 e 0,016, a 7, 14, 21 e 28 dpi rispettivamente; gli altri valori sono tabulati in dati supplementari), non è stato possibile quantificare affidabilmente tale fenomeno nei compartimenti di minori dimensioni. Tale valutazione è stata possibile solo in seno ai lateNP, costituenti il compartimento di maggiore ampiezza della coltura (Figura 43).

**Figura 43| Incidenza di morte cellulare nel compartimento dei progenitori neuronali tardivi (lateNP).** Frazione di lateNP positiva per 7AAD normalizzata sul controllo biologico, Luciferasi (rapporto (%)). Si noti come la percentuale di cellule morte sia ridotta per entrambi i genotipi, in modo più marcato per *Foxg1* nelle prime settimane (n=1) (rosso, *Emx2*; verde, *Foxg1*). DPI (days post infection).



Dal grafico riportato in Figura 43 si osserva per entrambi i genotipi una riduzione della percentuale di progenitori neuronali tardivi morenti. Tale fenomeno è assai più pronunciato precocemente che tardivamente e più evidente nel caso di *Foxg1* che di *Emx2*.

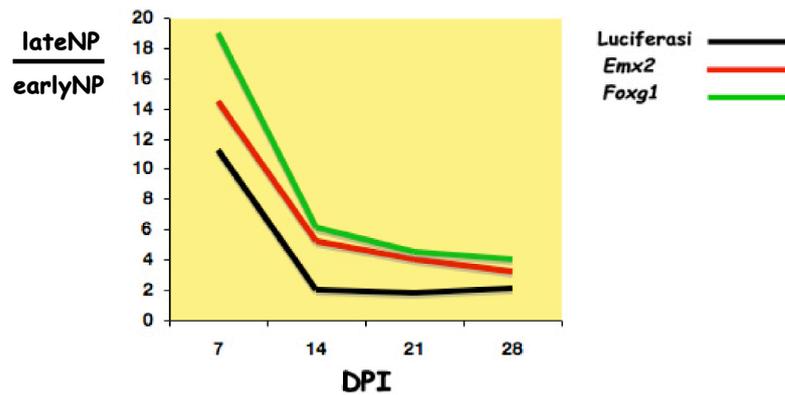


Figura 44| Transizione tra progenitori neuronali precoci (earlyNP) e progenitori neuronali tardivi (lateNP). Progenitori neuronali precoci (earlyNP) sono positivi sia per pT $\alpha$ 1, ENestin:P/hsp68, i progenitori neuronali tardivi (lateNP) sono positivi solo per pT $\alpha$ 1. DPI (days post infection)

Circa la progressione da earlyNP a lateNP, sia *Foxg1* che *Emx2* incrementano il rapporto fra i lateNP e gli earlyNP (Figura 44). Nel caso di *Emx2*, ciò lascia ipotizzare che la accelerazione della progressione istogenetica indotta a tale gene abbia probabilmente inizio non appena i neuroprecursori lasciano lo stato staminale. Nel caso di *Foxg1*, invece, è possibile che l'incremento di tale rapporto rifletta l'accumulazione selettiva di neuroprogenitori tardivi, susseguente l'inibizione della uscita di questi ultimi dal ciclo cellulare.

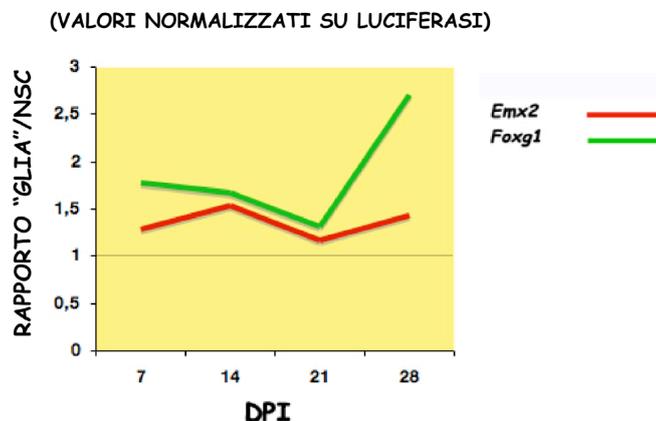


Figura 45| Transizione tra cellule staminali neurali (NSC) e glia presunta (GLIA). Si considerano NSC cellule singole positive per ENestin:P/hsp68 mentre il compartimento nero viene considerato come compartimento non marcato, con valore presuntivo di glia. Valori normalizzati sul controllo biologico Luciferasi (valore 1). DPI (days post infection).

Infine, essendo la nostra manipolazione genica ristretta agli NP, compartimento a valle delle NSC, era ragionevole aspettarsi che il rapporto fra le cellule non fluorescenti (aventi valore presuntivo di glia) e le NSC non cambiasse al cambiare di tale manipolazione. Tale rapporto risulta invece incrementato sotto *Foxg1* (Figura 44). Il significato rimane tuttavia da chiarire.

## 5.DISCUSSIONE

Scopo di tale progetto era studiare gli effetti dell'iperpressione condizionale dei geni *Foxg1* ed *Emx2* nel compartimento dei progenitori neuronali. Tale studio è stato condotto a come integrazione di uno studio parallelo sugli effetti dell'iperpressione degli stessi geni nel compartimento delle cellule staminali neurali (condotto dal dott. Marco Brancaccio), in vista dell'eventuale impiego di precursori neurali così ingegnerizzati in un approccio di terapia cellulare *ex vivo* in modelli di ischemia/ipossia cerebrale.

Per la conduzione dello studio abbiamo scelto un modello, le neurosfere, che meglio rappresentasse *in vitro* la complessa eterogeneità degli istotipi generati a partire dalla cellula staminale neurale e al contempo consentisse di monitorare l'evoluzione del sistema stesso con comodità e per un periodo sufficientemente lungo. Il trasferimento genico a mezzo di vettori lentivirali ci ha dato la possibilità di trasdurre ad elevata efficienza ed in modo permanente i progenitori corticali prelevati ad uno stadio, E11.5, in cui il tessuto neuroepiteliale è in larga parte costituito cellule staminali neurali. Lo stesso ci ha permesso altresì una straordinaria flessibilità nella definizione del disegno sperimentale e nella sua realizzazione pratica. L'approccio innovativo tuttavia riguarda l'uso integrato e sistematico di promotori stato specifici. Questi ci hanno consentito di monitorare specificamente - tramite tre diverse fluoroproteine - ciascun comparto della via neuronogenica (cellule staminali neurali, progenitori neuronali e neuroni), perturbarne specificamente uno, il progenitoriale, e disseccare così "chirurgicamente" le attività giocate dai due geni in esso.

Prima di procedere all'analisi cinetica, i promotori stadio-specifici (pT $\alpha$ 1, E/Nestin:P/hsp 68, SCG102S2N), scelti sulla base di lavori precedenti, sono stati validati nel sistema *in vitro* da noi prescelto, le neurosfere, per robustezza e specificità. In particolare, nel caso del promotore pT $\alpha$ 1, mancando un corrispettivo marcatore per i progenitori neuronali corti (SNP), la sua validazione nel sistema è stata basata sullo studio della sua relazione con i marcatori Tuj1 (neuroni precoci) ed Tbr2 (IPCs). Da quest'analisi è risultato che ad "E11.5 + 3 giorni *in vitro*", circa la metà delle cellule pTa1+ costituiscono uno specifico sottogruppo di progenitori neuronali, con identità presuntiva di SNPs, ben distinti dalle IPCs, nonché dai neuroni postmitotici immaturi. Inoltre, l'esistenza di un comparto transizionale

pTa1+/Tbr2+, di dimensioni pari a circa 1/3 del comparto IPC pTa1-/Tbr2+, ci ha indotto ad ipotizzare che una frazione sostanziale delle IPCs basali sia normalmente generata dalle SNPs. Ebbene, giusto durante la redazione di questa tesi, tale predizione è stata sostanzialmente confermata *in vivo*, dal gruppo di T. Miyata (Ochiai W., et al., 2009).

Validati i promotori, si è passati all'iperespressione condizionale dei geni *Foxg1* ed *Emx2* nel compartimento pT $\alpha$ 1+ dei progenitori neuronali. In principio, monitorando il sistema mediante microscopia confocale, è stato subito possibile notare differenze significative tra i diversi genotipi, ovvero un aumento delle cellule pT $\alpha$ 1+ nelle colture *Foxg1-GOF* (guadagno di funzione per *Foxg1*) ed una riduzione delle medesime nonché un aumento dei neuroni nelle *Emx2-GOF* (guadagno di funzione per *Emx2*). Tuttavia, sebbene utile per una prima caratterizzazione del sistema, la microscopia confocale non è particolarmente adatta ad una misura rapida e statisticamente affidabile degli elementi cellulari meno frequenti, comunque essenziali per la ricostruzione delle dinamiche complessive del sistema stesso. Per tali motivi, si è rapidamente passati all'analisi citofluorimetrica.

Tale approccio è stato condotto su due batterie di colture parallele, guadagno di funzione per *Luciferasi*, *Emx2* e *Foxg1*, in due distinte tornate sperimentali, ognuna della durata di almeno 28 giorni, con misure a cadenza settimanale, campionando per ogni misura un gran numero di cellule (tipicamente fra le 50.000 e le 100.000 per genotipo). I risultati di tale analisi si possono sintetizzare come segue.

Nel caso di *Foxg1*, la sovrespressione del gene induce una dilatazione selettiva del compartimento pT $\alpha$ 1+ rispetto a quello neuronale (nonché rispetto a quello staminale). Ciò suggerisce un rallentamento della transizione tra il primo compartimento ed il secondo, con conseguente accumulazione di cellule nel primo. Possono tuttavia contribuire a tale fenotipo un'accelerazione del ciclo mitotico e/o una migliore protezione dalla morte cellulare, indotte specificamente da *Foxg1* in seno al comparto neurono-progenitoriale. In verità, una correlazione positiva fra espressione di *Foxg1* ed avanzamento nel ciclo cellulare è stata già ben documentata *in vivo* da Martynoga et al (2005). Quanto alla morte cellulare, invece, i dati in letteratura sono apparentemente contrastanti, essendo riportata una rilevante diminuzione di quest'ultima in telencefali embrionali *Foxg1*<sup>-/-</sup> (Martynoga et al., 2005), come pure in neurosfere *Foxg1-GOF* costitutive (Fasano C.A., et al., 2009).

Per fare chiarezza sulla questione, abbiamo misurato nella seconda tornata sperimentale l'incidenza della morte cellulare per 7AAD ed abbiamo trovato che, nel comparto pTa1+ della coltura *Foxg1-GOF*, essa è specificamente ridotta. In sintesi, quindi, i progenitori neuronali divengono più numerosi, perché ciclano probabilmente più rapidi, sopravvivono meglio e differenziano più di rado a neuroni.

Quanto ad *Emx2*, esso induce invece una contrazione selettiva del compartimento pTa1+ rispetto a quello neuronale (nonché rispetto a quello staminale). Ciò suggerisce un'accelerazione della transizione tra il primo compartimento ed il secondo, con conseguente deplezione del primo [un'accelerazione ha apparentemente luogo anche nella transizione da progenitore neuronale precoce (E/Nestin:P/hsp 68+ / pTa1+) a tardivo (E/Nestin:P/hsp 68- / pTa1+), indicando che, non appena il precursore neurale lascia lo stato staminale e transita a quello neurone-progenitoriale, *Emx2* ne possa stimolare l'ulteriore progressione istogenetica]. Teoricamente, potrebbero contribuire alla contrazione del compartimento dei progenitori neuronali anche un rallentamento del ciclo mitotico, come pure una maggiore predisposizione alla morte cellulare, evocati specificamente da *Emx2*. Ambedue queste spiegazioni, tuttavia, sono in palese disaccordo con i dati sperimentali. La letteratura precedente riporta chiaramente che l'espressione di *Emx2* o non influenza l'avanzamento del ciclo cellulare (Mallamaci A., et al., 2000) o, semmai, la accelera (Muzio L., et al., 2005). Il nostro profiling comparativo del comparto pTa1+ per 7AAD indica che la sovraespressione di *Emx2* protegge piuttosto i progenitori neuronali dalla morte, anziché predisporli ad essa. Quindi, il ruolo di *Emx2* nei progenitori è puramente pro-differenziativo.

Cosa inaspettata, infine, a seguito di sovraespressione di ciascuno dei geni, il compartimento staminale si restringe rispetto a quello "nero", non fluorescente, presuntivamente comprendente gli elementi del lineage gliale. Non conosciamo i meccanismi alla base di ciò, ma possiamo fare due ipotesi. E' noto che segnali Delta forniti dai progenitori neuronali stimolano fisiologicamente i recettori Notch alla superficie delle neurali staminali (Yoon K.-J., et al., 2008), promuovendo la ritenzione a parte di queste ultime del loro stato (Gaiano N., et al., 2000). Si può ipotizzare allora che la contrazione relativa del comparto staminale peculiare delle colture *Emx2-GOF* faccia seguito alla contrazione del comparto neurone-progenitoriale ed alla susseguente riduzione del segnale Delta complessivo, pro-staminale, che ne

emana. E' noto altresì che l'attivazione dell'asse Notch-RBPJk-Hes1 inibisce l'attivazione dei geni proneurali e della famiglia Delta-Serrate-Jagged. La sovraespressione nei progenitori di *Foxg1*, noto cofattore di Hes1 nella repressione di proneurali e Delta (Yao J., et al., 2001), potrebbe rendere allora tali progenitori, pur numerosi, incapaci di dispensare il normale segnale Delta, inducendo così per altra via la contrazione del comparto staminale. Tali interpretazioni, sebbene suggestive, attendono però ancora piena verifica sperimentale.

In conclusione, l'effetto di *Foxg1* sulla popolazione di progenitori neuronali risulta essere interessante, in vista di potenziali approcci di terapia cellulare *ex vivo*. La dilatazione, infatti, di entrambi i compartimenti in cui è stato iperespresso, cellule staminali (dati ottenuti dal dott. Marco Brancaccio) e progenitori neuronali (questo lavoro), suggerisce che la sovraespressione continua di tale gene, dallo stato staminale a quello di progenitore neuronale, potrebbe essere sfruttata, in futuro, in approcci di terapia riparativa a seguito di ischemia cerebrale, per potenziare il gettito di neuroni fornito dalle cellule neurali staminali trapiantate. Tuttavia rimane da chiarire se tali precursori iperesprimenti *Foxg1*, una volta spento il gene, siano capaci di differenziare correttamente a neuroni provvisti di tratti strutturali e funzionali normali. Nelle prossime settimane verranno terminati ulteriori replicati degli esperimenti di time course descritti sopra, che ci consentiranno di consolidare statisticamente i risultati riportati in questa tesi. Proprio su queste stesse colture, forzate ad esprimere *Foxg1* ed *Emx2* per lunghi periodi, sarà infine saggiata la capacità da parte dei precursori ingegnerizzati, una volta spenti i transgeni per rimozione dell'induttore doxyciclina, di produrre neuroni funzionali.

## 5.BIBLIOGRAFIA

- Adesina A.M., Nguyen Y., Mehta V., Takei H., Stangeby P., Crabtree S., Chintagumpala M., Gumerlock M.K.; *J. Neurooncol.* 85:111–122 (2007)
- Agathon A., Thisse C., and Thisse B., *Nature* 424 448–452 (2003)
- Allendoerfer K.L., Shatz C.J.; *Annu. Rev. Neurosci.* 17 185-218 (1994)
- Anderson S. A., Kaznowski C. E., Horn C., Rubenstein J. L. & McConnell S. K.; *Cereb. Cortex* 12 702–709 (2002)
- Angevine J. B. Jr & Sidman R. L.; *Nature* 192 766–768 (1961)
- Arsenijevic Y., Weiss S., Schneider B., Aebischer P.; *J.Neurosci.* 21, 7194–202 (2001)
- Assimacopoulos S., Grove E.A. & Ragsdale C.W.; *J. Neurosci.* 23 6399–6303 (2003)
- Bachler M. & Neubuser A.; *Mech. Dev.* 100 313–316 (2001)
- Baron U., Gossen M., Bujard H.; *Nucleic Acids Res.* 25 2723–2729 (1997).
- Bayer, S. A. & Altman, J.; in *Neocortical Development* 255 (1991)
- Beddington, R. S. & Robertson, E. J. *Trends Genet.* 14 277–284 (1998)
- Bishop K.M., Garel S., Nakagawa Y., Rubenstein J.L.R., O’Leary D.D.M.; *J. Compative Neurol.* 457 345-360 (2003)
- Bishop K.M., Goudreau G., e O’Leary D.D.M.; *Science* 288 344-349 (2000)
- Breunig, J.J., Macklis, J.D., and Pakic, P. In *Adult neurogenesis*, F.H. Gage, G. Kempermann, and S. Hongjun, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 49–80 (2007)
- Briata P., DiBlas E., Gulisano M., Mallamaci A., Iannone R., Boncinelli E., Corte G.; *Mech. Dev.* 57 169–180 (1996)
- Britanova, O. et al.; *Dev. Biol.* 298 299–311 (2006)

Buchet D., Serguera C., Zennou V., Charneau P., Mallet J. *Mol. Cell Neurosci.* 19, 386-401 (2002)

Burns J.C., Friedmann T., Drivier W., Burrascano M., and Yee J.K., *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 90, 8033 (1993)

Caldwell M.A., He X., Wilkie N., et al.; *Nat. Biotechnol.* 19 475–479 (2001)

Campbell K.; *Current Opinion in Neurobiology* 13 50–56 (2003)

Campos L.S., Leone D.P., Relvas J.B., Brakebusch C., Fassler R., Suter U., French-Constant C.; *Development* 131 3433-3444 (2004)

Capela A., Temple S.; *Neuron* 35 865–875 (2002)

Capowski E.E., Schneider B.L., Erber A.D., Seehus C.R., Szulc J., Zufferey R., Aebischer P., Svendsen CN., *J. Neurosci Methods* 163 338-349 (2007)

Catalano S.M., Shatz C.J.; *Science* 281 559-562 (1998)

Caviness V. S.; *Dev. Brain Res.* 4 293–302 (1982)

Caviness V.S. & Sidman R.L.J.; *Comp. Neurol.* 148 141–152 (1973)

Caviness V.S., Takahashi T. & Nowakowski R. S.; *Trends Neurosci.* 18 379–383 (1995)

Chambers C.B., Peng Y., Nguyen H., Gaiano N., Fishell G., Nye J.S.; *Development* 128 689–702 (2001)

Chen, P. et al.; *J. Gene Med.* 10, 123–131(2008)

Chenn A., Braisted J., McConnell S., O’Leary D.D.M.; *Molecular and Cellular Approches to Neural Development* 440-447 (1997)

Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA.; *Nature* 383 407-413 (1996)

Choi et al., *MCB* 1991 (pHPS.sis) trovare

*Clontechniques XVIII*(2) 10–11 (2003)

Consiglio A., Gritti A., Dolcetta D., Follenzi A., Bordignon C., Gage F.H., Vescovi A.L., Naldini L.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 14835–14840 (2004)

Corti O., Sabate O., Horellou P., Colin P., Dumas S., Buchet D., et al. Nat. Biotechnol. 17 349-54 (1999)

Coskun V., Wu H., Bianchi B., Tsao S., Kim K., Zhao J., Juan Carlos Biancotti, Hutnick L., Krueger R.C., Jr., Fan G., de Vellis J., Sun Y.E.; Proc Natl Acad Sci USA 105 1026-1031 (2008)

Cremisi F., Philpott A. & Ohnuma S.; Curr. Opin. Neurobiol. 13 26–33 (2003)

Curtin J.A., et al.; Gene Ther. 15 384–390 (2008)

Dahlstrand J., Lardelli M., Lendahl U.; Brain Res. dev. Brain Res. 84 109-129 (1995)

de Souza F.S. & Niehrs C., Cell Tissue Res. 300 207-217 (2000)

Dehay C. e Kennedy H. Nature Reviews Neurosci. 8 438-450 (2007)

Dehay C., Kennedy H.; Nat. Rev. Neurosci. 8 438-450 (2007)

Delenda, C. J. Gene Med. 6, S125-S138 (2004)

Ding, J., Yang, L., Yan, Y.T., Chen, A., Desai, N., Wynshaw-Boris, A., and Shen, M.M. Nature 395, 241, 229–237 (1998)

Doetsch F., Caille, I., Lim D.A., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.; Cell 97, 703–716 (1999)

Doetsch F., Garcia-Verdugo J. M. & Alvarez-Buylla A.; Proc. Natl Acad. Sci. USA 96 11619–11624 (1999)

Dou C.L., Li S. & Lai E. Cereb. Cortex 9 543–550 (1999)

Dou C.-L., Li S. & Lai, E.; Cereb. Cortex 9 543–550 (1999)

Dufour A., Seibt J., Passante L., Depaepe V., Ciossek T., Frisen J., Kullander K., Flanagan J.G., Polleux F., Vanderhaeghen P.; Neuron 39 453-465 (2003)

Dull T., et al. J. Virol. 72, 8463-8471 (1998)

Echevarria D., Vieira C., Gimeno L., and Martinez S.; *Brain Res. Rev.* 43 179–191 (2003)

Englund C., Fink A., Lau C., Pham D., Daza R.A.M., Bulfone A., Kowalczyk T., Hevner R.F.; *J Neurosci* 25 247–251(2005)

Falk A., Holmstrom N., Carlen M., Cassidy R., Lundberg C., Frisen J.; *Exp. Cell Res.* 279 34–39 (2002)

Fasano C.A., Phoenix T.N., Kokovay E., Lowry N., Elkabetz Y., Dimos J.T., Lemischka I.R., Studer L., Temple S.; *Genes Dev.* 23 561-547 (2009)

Fishell G.; *Development* 121 803–812 (1995)

Follenzi, A., Ailles E.L., Bakovic S., Geuna M., and Naldini L., *Nat. Genet.* 25, 217 (2000)

Follenzi, A., and Naldini, L. *Methods Enzymol* 346, 454-465 (2002)

Frantz G.D. & McConnell S.K.; *Neuron* 17 55–61 (1996)

Frederiksen K., MacRay R.; *J. Neurosci.* 8 1144-1151 (1988)

Frederiksen K., McKay R.D.; *J. Neurosci.* 8 1144–1151(1988)

Fukuchi-Shimogori T., e Grove E.A.; *Nat.Neurosci.* 6 825-831 (2003)

Fukuda S., Kato F., Tozuka Y., Yamaguchi M., Miyamoto Y., Hisatsune T.; *J. Neurosci.* 23 9357–9366 (2003)

Furuta Y., Piston D.W. & Hogan B.L.M.; *Development* 124 2203–2212 (1997)

Gage, F.H.; *Science* 287, 1433–1438 (2000)

Gaiano N., Nye J.S., Fishell G.; *Neuron* 26 395-404 (2000)

Gal J.S., Morozov Y.M., Ayoub A.E., Chatterjee M., Rakic P., Haydar TF.; *J Neurosci* 26 1045–1056 (2006)

Galli R., Fiocco R., De Filippis L., Muzio L., Gritti A., Mercurio S., Broccoli V., Pellegrini M., Mallamaci A., Vescovi A.L., *Development* 129 1633–1644 (2002)

Gangemi R.M., Daga A., Marubbi D., Rosatto N., Capra M.C., Corte G.; *Mech. Dev.* 109 323–329 (2001)

Gangemi R.M., Daga A., Muzio L., Marubbi D., Coccozza S., Perera M., Verardo S., Bordo D., Griffero F., Capra M.C., Mallamaci A., Corte G.; *Eur J Neurosci* 23 325–334 (2006)

Garcia A.D., Doan N.B., Imura T., Bush T.G., Sofroniew M.V.; *Nat. Neurosci.* 7 1233–1241 (2004)

Gloster A., Wu W., Spleeman A., Weiss S., Causing C., Poznias C., et al.; *J. Neurosci.* 14 7319-7330 (1994)

Gossen M., Bujard H. 89 213–215(1995)

Gossen M., Bujard H.; *Nucleic Acids Res.* 21 4411–4412 (1993)

Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Muller G., Hillen W., Bujard H.; *Science* 268 1766– 1769 (1995)

Götz M., Barde Y.-A.; *Neuron* 46 369–372(2005)

Götz M., Huttner W.B.; *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 777–788 (2005)

Gritti A., Parati E. A., Cova L., et al.; *J. Neurosci.* 16 1091–1100 (1996)

Gulisano M., Broccoli V., Pardini C. e Boncinelli E.; *Eur. J. Neurosci.* 8 1037-1050 (1996)

Gunhaga L., Marklund M., Siodal M., Hsieh J-C, Jessell T.M., Edlund T.; *Nature Neuroscience* 6 701-707 (2003)

Hack M.A., Saghatelian A., de Chevigny A., Pfeifer A., Ashery-Padan R., Lledo P.M., Gotz M.; *Nat Neurosci* 8 865–872 (2005)

Hack M.A., Sugimori M., Lundberg C., Nakafuku M., Gotz M.; *Mol. Cell Neurosci.* 25664– 678 (2004)

Hamasaki T., Leigartner A., Ringstedt T., e O’Leary D.D.M.; *Neuron* 43 359-372

(2004)

Hanashima C., Fernandes M., Hébert J. M. & Fishell G. J. *Neurosci.* 27 11103–

11111 (2007)

Hanashima, C., Li, S. C., Shen, L., Lai, E. & Fishell, G.; *Science* 303 56–59 (2004)

Hartfuss E., Galli R., Heins N. & Gotz M.; *Dev. Biol.* 229 15–30 (2001)

Hatini V., Tao W., Lai E.; *J. Neurobiol.* 25 1293–1309 (1994)

Haubensak W., Attardo A., Denk W., Huttner W.B.; *Proc Natl Acad Sci USA* 101

3196– 3201(2004)

Hebert J, Mishina Y, McConnell S.; *Neuron* 35 1029 (2002)

Heins N., et al.; *Mol. Cell Neurosci.* 18 485–502 (2001)

Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., et al.; *Nat. Neurosci.* 5 308–315 (2002)

Hevner R.F.; *Mol Neurobiol* 33 33–50 (2006)

Hillen W., Berens C.; *Annual. Rev. Microbiol.* 48 345–369(1994)

Hitoshi S., Tropepe V., Ekker M., Van der Kooy, D.; *Development* 129 233–244

(2002)

Hockfield S., MacRay R.; *J. Neurosci.* 5 3310–3328 (1985)

Hong S., et al.; *Mol. Ther.* 15 1630–1639 (2007)

Houart C., Westerfield M., e Wilson S.W.; *Nature* 391 788–792 (1998)

Huh S., Hatini V., Marcus R.C., Li S.C., Lai E.; *Dev. Biol* 211(1) 53–63 (1999)

Hui C.-C. & Joyner A. L.; *Nature Genet.* 3 241–246 (1993)

Iacopetti P. et al.; *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96 4639–4644 (1999)

Irvin D. K., Dhaka A., Hicks C., Weinmaster G., Kornblum H.I.; *Dev. Neurosci.* 25,

162–172 (2003)

Jensen K.F. & Killackey H. P.; *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81 964–968 (1984)

Johansson C.B., Svensson M., Wallstedt L., Janson A.M., Frisen J.; *Exp. Cell Res.* 253 733–736 (1999)

Johe K.K., Hazel T.G., Muller T., Dugich-Djordjevic M., MacRay R.D.G; *Genes Dev.* 10 3129-3140 (1996)

Josephson R., Muller T., Pickel J., Okabe S., Reynolds K., Turner P.A., Zimmer A., MacRay R.D.G.; *Development* 125 3087-3100 (1998)

Kawaguchi A., Miyata T., Sawamoto K., Takashita N., Murayama A., Akamatsu W., Ogawa M., Okabe M., Tano Y., Goldman S.A., Okano H.; *Molecular and Cellular Neurosci.* 17 259-273 (2001)

Kiecker C., Niehrs C.; *Curr Opin Neurobiol* 11 27-33 (2001)

Kimura, C., Yoshinaga, K., Tian, E., Suzuki, M., Aizawa, S., and Matsuo, I. *Dev. Biol.* 225 304–321 (2000)

Klein C., Butt S.J., Machold R.P., Johnson J.E., Fishell G.; *Development* 132, 4497–4508 (2005)

Kugler S., Meyn L., Holzmüller H., Gerhardt E.; Isenmann S., Schulz J.B., et al.; *Mol. Cell Neurosci.* 17 78-96 (2001)

Lazar L.M., Blum M.; *J. Neurosci* 12 1688-1697 (1992)

Lee K.J., Jessell T.M.; *Annu. Rev. Neurosci.* 22 261-294 (1999)

Lee S.M., Tole S., Grove E. & McMahon A.P.; *Development* 127 457–467 (2000)

Lendhal u., Zimmerman L.B., MacRay R.D.G.; *Cell* 60 585-595 (1990)

Liguori G.L., Echevarria D., Improta R., Signore M., Adamson E., Martinez S., e Persico, M.G. *Dev. Biol.* 264 537–549 (2003)

Logan A.C., Haas D.L., Kafri T. & Kohn D.B.; *J. Virol.* 78 8421-8436 (2004)

Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J. & Baltimore, D. *Science* 295, 868-872 (2002)

Lopez-Bendito G., Chan C.H., Mallamaci A., Parnavelas J., Molnar Z.; *J Comp Neurol.* 451 153-169 (2002)

Lothian C., Prakash N., Lendahl U., Wahlstrom G.; *Exp. Cell Res.* 248 509-519 (1999)

Lothian C.; Lendahl U.; *Eur. J. Neurosci* 9 452-462 (1997)

Machon O., Backman M., Krauss S., Kozmik Z.; *Mol cell Neurosci.* 30 388-397 (2005)

Malatesta P., Hack M.A., Hartfuss E., Kettenmann H., Klinkert W., Kirchhoff F., Götz M.; *Neuron* 37 751-764 (2003)

Mallamaci A & Stoykova A.; *European Journal of Neuroscience* 23 847-856 (2006)

Mallamaci A., Iannone R., Briata P., Pintonello L., Mercurio S., Boncinelli E. e Corte G. *Mech. Dev.* 77 165-172 (1998)

Mallamaci A., Mercurio S., Muzio L., Cecchi C., Pardini C.L., Gruss P., Boncinelli E.; *J. Neurosci.* 20 1109-1118 (2000)

Mallamaci A., Muzio L., Chan C.H., Parnavelas J., Boncinelli E.; *Neurosci.* 3 679-686 (2000b)

Mallamaci A., Muzio L., Chan C.H., Parnavelas J., e Boncinelli E.; *Nat. Neurosci.* 3 679- 686 (2000)

Martynoga B., Morrison H., Price D.J., e Masona J.O.; *Dev Biol.* 283(1) 113-127 (2005)

McCart J.A., et al.; *Mol. Ther.* 6 471-480 (2002).

McConnell S. K. & Kaznowski C. E.; *Science* 254 282-285 (1991)

McLaughlin T., O'Leary D.D.M.; *Annu. Rev. Neurosci.* 28 327-356 (2005)

Merkle F.T., Mirzadeh Z., Alvarez-Buylla A.; *Science* 317 381-384 (2007)

Merkle F.T., Tramontin A.D., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.; *Proc Natl Acad Sci USA* 101 17528-17532 (2004)

Miller F., Naus C., Durand M., Bloom F., Milner R.; *J. Cell Biol.* 105 3065-3073 (1987)

Mitsuhashi T., Aoki Y., Eksioglu Y., Takahashi T., Bhide G.P., reeves A.S., and Caviness V.S., *PNSA* 98 6435-6440 (2001)

Miyata T., Kawaguchi A., Okano H., Ogawa M.; *Neuron* 31 727-741(2001)

Miyata T., Kawaguchi A., Saito K., Kawano M., Muto T., Ogawa M.; *Development* 131 3133-3145 (2004)

Molnar Z., Blakemore C.; *Trends Neurosci.* 18 389-397 (1995)

Molyneaux B. J., Arlotta P., Menezes J. R. L. e Macklis J. D.; *Nature Reviews* 8 427 (2007)

Monuki ES, Walsh CA.; *Nat Neurosci* 4(Suppl) 1199-1206 (2001)

Mori N., Schoenherr C., Vanderbergh D.J., Anderson D.J.; *Neuron* 9 45-54 (1992)

Morshead C.M., Reynolds B.A., craig C.G., McBurney M.W., Staines W.A., Morassuti D., Weiss S., van der Kooy D.; *Neuron* 13 1071-1082 (1994)

Munoz-Sanjuan I., and Brivanlou A.H., *Dev. Biol.* 237 1-17 (2001)

Muzio L. & Mallamaci A.; *J. Neurosci.* 25 4435-4441 (2005)

Muzio L., Soria J.M., Pannese M., Piccolo S., Mallamaci A.; *Cereb. Cortex* 15 2021-2028 (2005)

Muzio L., DiBenedetto B., Stoykova A., Boncinelli E., Gruss P., Mallamaci A.; *Nat. Neurosci.* 5 737-745 (2002)

Nakai M., et al.; *Hum. Gene Ther.* 18 925-936 (2007)

Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N., Tamura A., Kirino T., Nakafuku M.; *Cell* 110 429-441 (2002).

Nakimawa K., Murakami K., Okamoto T., Okado H., Kiyama H.; *Gene Therapy* 1244-1250 (2006)

Naldini, L. et al. *Science* 272, 263-267 (1996)

Navarro V., Millicamps S., Geoffroy M.C., Robert J.J., Valin A., Mallet J., et al.;  
*Gene Therapy* 6 1884-1892 (1999)

Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A., Dammerman R.S., Kriegstein A.R.; *Nature*  
 409 714–720 (2001)

Noctor S.C., Martínez-Cerdeño V., Ivic L., Kriegstein A.R.; *Nat Neurosci* 7 136–144  
 (2004)

O’Leary D.D.M., Koester B.B.; *Neuron* 10 991-1006 (1993)

O’Leary D.D.M., Schlaggar B.L., Stanfield B.B.; *Exp. Neurol.* 115 121-126 (1992)

O’Leary D.D.M., Schlaggar B.L., Tuttle R.; *Annu. Rev. Neurosci.* 17 419-439 (1994)

O’Leary D.D.M., Stanfield B.B.; *J. Neurosci.* 9 2230-2246 (1989)

Ochiaia W., Nakatania S., Takaharaa T., Kainumaa M., Masaoka M., Minobeaa S.,  
 Namihirab M., Nakashimab K., Sakakibara A., Ogawac M., Miyata T.;  
*Molecular and Cellular Neuroscience* 40 225–233 (2009)

Ohnuma S., Philpott A. & Harris W.A.; *Curr. Opin. Neurobiol.* 11 66–73 (2001)

Oldekamp J., Kraemer N., Alvarez-Bolado G., Skutella, T.; *Cereb. Cortex* 14, 1045–  
 1058 (2004)

Onodera M., et al.; *Hum. Gene Ther* 8 1189-1194 (1997)

Oppenheim R. W., Cole T. & Prevet D.; *Dev. Biol.* 133 468–474 (1989)

Ostenfeld T., Joly E., Tai Y.T., et al.; *Brain Res. Dev. Brain Res.* 134 43–55 (2002)

Ostenfeld T., Tai YT, Martin P, Deglon N., Aebischer P., Svendsen CN., *J. Neurosci.*  
*Res.* 69 955-65 (2002)

Overbeek, P.A. et al.; *Science* 231 1574–1577 (1986).

Pabst O, Herbrand H, Takuma N, Arnold HH.; *Dev Genes E.* 210 47-50 (2000)

Parmar M., Skogh C., Bjorklund A., Campbell K.; *Mol. Cell Neurosci.* 21 645–656  
 (2002)

Perea-Gomez, A., Rhinn, M., and Ang, S.L. *Int. J. Dev. Biol.* 45 311–320 (2001)

Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. & Verma, I.M. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 99, 2140-2145 (2002)

Polleux F.; *Neuron* 46 395-400 (2005)

Pontious A., Kowalczyk T., Englund C., Hevner R.F.; *Dev Neurosci* 30 24–32 (2008)

Pratt T., Tian N.M., Simpson T.I., Price D.J., Mason J.O.; *Development* 131 3773-3784 (2004)

Qian X., Davis A.A., Goderie S.K. & Temple S.; *Neuron* 18 81–93 (1997)

Ragsdale CW, Grove EA.; *Curr Opin Neurobiol* 11 50-58 (2001).

Rakic P. ; *J. Comp. Neurol.* 145 61–83 (1972)

Rakic P. ; *Science* 183 425–427 (1974)

Rakic P.; *Cereb. Cortex* 13 541–549 (2003)

Rallu M., Corbin J.G. & Fishell G.; *Nature Rev. Neurosci.* 3 5031–5040 (2002)

Rallu M., Corbin J.G., Fishell G.; *Nat Rev Neurosci* 3 943-951 (2002)

Rallu M., Machold R.P., Gaiano N., Corbin J.G., McMahon A.P., Fishell G.; *Development* 129 4963-4974 (2002)

Reid C.B. & Walsh C.A.; *J. Neurosci.* 22 4002–4014 (2002)

Reynolds B.A., Weiss S.; *Dev. Biol.* 175 1–13 (1996)

Reynolds B.A., Weiss S.; *Science* 255 1707–1710(1992)

Riviere I., Brose K., Mulligan R.C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 6733-6737 (1995)

Rizzo M.A., Springer G.H., Granada B., Piston D.W.; 22 445-449 (2004)

Rohmer S., et al.; *J. Gene Med.* 10 340–354 (2008)

Rossant J., Zirngibl R., Cado D., Shago M., Giguere V.; *Genes Dev.* 5 1333–1344 (1991)

Roy N.S., Wang S., Jiang L., Kang J., Benraiss A., Harrison-Restelli C., Fraser R.A.R., Couldwell W.T., Kawaguchi A., Okano H., Nedergaard M., Goldman A.S.; *Nature Medicine* 6 271-277 (2000)

Sanai N. et al.; *Nature* 427, 740–744 (2004).

Sastry L., Johnson T., Hobson M.J., Smucker B., Cornetta K.; *Gene Therapy* 9 1155-1162 (2002)

Savaskan N.E., Alvarez-Bolado G., Glumm R., Nitsch R., Skutella T., Heimrich B.; *J. Neurochem.* 83 1196–1207 (2002)

Sawamoto K., Yamamoto A., Kawaguchi A., Yamaguchi M., Mori K., Goldman S.A., Okano H.; *J. Neurosci. Res.* 65 220–227 (2001)

Schier, A.F. *Annu. Cell Dev. Biol.* 19 589–621 (2003)

Schlaggar B.L., O’Leary D.D.M.; *Science* 252 1556-1560 (1991)

Schoender C.J., Anderson D.J.; *Opin. Neurobiol.* 5 566-571 (1995)

Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J.; *Cell* 117 211–223 (2004)

Shaner N.C. et al.; *Nat. Biotechnol.* 22 1567-1572 (2004)

Shen L., Nam H-S, Song P., Moore H., Anderson S.A.; *HIPPOCAMPUS* 16 875–890 (2006)

Shen Q. et al.; *Nature Neurosci.* 9 743–751 (2006)

Shimamura K., e Rubenstein J.L.; *Development* 124 2709–2718 (1997)

Shimogori T., Banuchi V., Ng H.Y., Strauss J.B., Grove E.A.; *Development* 131(22) 5639– 5647 (2004)

Shinozaki K., Miyagi T., Yoshida M., Miyata T., Ogawa M., Aizawa S., e Suda Y.; *Development* 129 3479-3492 (2002)

Siegenthaler J.A., Miller M.W.; *J Neurosci.* 25 8627– 8636 (2005)

Siegenthaler J.A., Tremper-Wells B.A. e Miller M.W.; *Cerebral Cortex* 18 1865–1875 (2008)

Simeone A., Gulisano M., Acampora D., Stornaiuolo A., Rambaldi M. Boncinelli E.; *EMBO J.* 11 2541-2550 (1992)

Simeone A., Gulisano M., Acampora D., Stornaiuolo A., e Boncinelli E.; *Nature* 358 687- 690 (1999a)

Singec I., Knoth R., Meyer R.P., Maciaczyk J., Volk B., Nikkhah G., Frotscher M., Snyder E.Y.; *Nature Methods* 10 801-806 (2006)

Smart I.H.; *J. Anat.* 116 67–91 (1973)

Stanfield B.B., O’Leary D.D.M.; *Nature* 313 135-137 (1985)

Stephen W.W. e Corinne H.; *Developmental Cell* 6 167–181 (2004)

Stern C.D.; *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 447–451 (2002)

Suh H., Consiglio A., Ray J., Sawai T., D’Amour K.A., Gage F.H.; *Cell Stem Cell* 1 515– 528 (2007)

Sunabori T., Tokunaga A., Nagai T., Sawamoto K., Okabe M., Miyawaki A., Matsuzaki Y., Miyata T., Okano H.; *J. Cell Science* 121 1204-1212 ( 2008)

Tan S. S. et al.; *Neuron* 21 295–304 (1998)

Tao W., & Lai E., *Neuron* 8 957–966 (1992)

Terazaki, Y. et al.; *Hepatology* 37 155–163 (2003)

The Boulder Committee.; *Anat. Rec.* 166 257–261 (1970).

Theil T., Aydin S., Koch S., Grotewold L. & Ruther U.; *Development* 129 3045–3054 (2002)

Thomas P. & Beddington, R. *Curr. Biol.* 6 1487-1496 (1996)

Thomas P.Q., Brown A., e Beddington R.S.; *Development* 125 85–94 (1998)

Tian E., Kimura C., Takeda N., Aizawa S., e Matsuo I.; *Dev. Biol.* 242 204–223 (2002)

Tian N.M., Pratt T., Price D.; *Development* 135 4081-4089 (2008)

Tirone F.; *J. Cell Physiol.* 187 155–165 (2001)

Tiscornia G., Singer O. & Verma I.M.; *Nature Protocols* 1 241-245 (2006)

Tiscornia G., Singer O., Ikawa M. & Verma I.M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 1844- 1848 (2003)

Tonchev A.B., Yamashima T.; *Experimental Neurology* 198 101–113 (2006)

Toresson H., Mata de Urquiza A., Fagerstrom C., Perlmann T., Campbell K.; *Development* 126 1317-1326 (1999)

Triezenberg S.J., Kingsbury R.C., McKnight, S. L.; *Genes Devel.* 2 718–729 (1988)

Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C., Mak T. W., Rossant J., Van der Kooy D.; *Neuron* 30 65– 78 (2001)

Tropepe V., Sibilina M., Ciruna B.G., Rossant J., Wagner E.F., Van der Kooy D.; *Dev. Biol.* 208 166–188 (1999)

Ventura R.E., Goldman J.E.; *J Neurosci* 27 4297–4302 (2007)

Vescovi A.L., Reynolds B.A., Fraser D.D., Weiss, S.; *Neuron* 11 951–966 (1993)

Wang S., Roy N., Benraiss A., Harrison-Restelli C., Goldman S.; *Dev. Neurosci.* 22, 167– 176 (2000)

Wang S., Wu H., Jiang J., Delohery M.T., Isdell F., Goldman S.; *Nature Biotechnology* 16 196-201 (1998)

Ware M. L., Tavazoie S. F., Reid C. B. & Walsh C.A.; *Cereb. Cortex* 9 636–645 (1999)

Weber E.L., Cannon P.M.; *Hum. Gene Ther.* 18 849–860 (2007)

Williams P.B., Price J.; *Neuron* 14 1-20 (1995)

Wonders C.P. & Anderson S.A.; *Nature Rev. Neurosci.* 7 687–696 (2006)

Wu P., Ye Y., Svendsen C.N.; *Gene Ther.* 9 245-55 (2002)

Wu S.X., Goebbels S., Nakamura K., Nakamura K., Kometani K., Minato N., Kaneko T., Nave K.A., Tamamaki N.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 17172–17177 (2005)

Xuan S. et al.; Neuron 14 1141–1152 (1995)

Yao J., Lai E., Stifani S.; Mol Cell Biol 21 1962–1972 (2001)

Yaworsky P.J., Kappen C.; Dev. Biol. 205 309–321 (1999)

Yoon K.-J., Koo B.-K., Im S.-K., Jeong H.-W., Ghim J., Kwon M.-c., Moon J.-S., Miyata T., Kong Y.-Y.; Neuron 58 519–513 (2008)

Zappone M.V., Galli R., Catena R., et al.; Development 127 2367–2382 (2000)

Zetterberg A., Larsson O. & Wiman K.G.; Curr. Opin. Cell Biol. 7 835–842 (1995)

Zhao C., Deng W., e Gage F.H.; Cell 132 645–660 (2008)

Zhao, C. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 101–117 (2007)

Zimmerman L., Lendahl U., Cunningham M., Macray R.D.G., Parr B., Gavin B., Mann J., Vassileva G., MacMahon A.P.; Neuron 12 11–24 (1994)

Zufferey R., Donello J.E., Trono D., and Hope T.J.; J. Virol. 73 2886 (1999)

Zufferey R., Dull T., R.J. mandel, Bukovsky A., Quiroz D., Naldini L., e Trono D.; J. Virol. 72 9873 (1998)

## 6. DATI SUPPLEMENTARI

legend	
FITC-GFP	pTa1-EGFP
PE-TEX	pENestin:P/hsp68-mCherry
violet	SCG102S2N-mCerulean
PE-Cy5	7-AAD

TABELLA 1 | Percentuali dei compartimenti nell'esperimento a tripla marcatura (n=1).

### 7 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,210103	2,181462	0,377842	5,412158
foxg1	0,017736	2,307346	0,039117	2,340883
emx2	0,050487	1,371682	0,19397	4,70603

	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1,597356	24,562644	0,489147	65,169288
foxg1	1,326606	43,783394	0,107658	50,07726
emx2	0,844836	19,795164	0,460692	72,577139

### 14 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,357203	6,202797	0,249391	13,278892
foxg1	0,099002	6,770998	0,000002	5,507254
emx2	0,148925	1,531075	0,097887	10,368152

	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,368692	12,711308	1,525967	65,30575
foxg1	0,422731	41,847269	0,40961	44,943134
emx2	0,25961	8,041246	1,626095	77,92701

### 21 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,219336	3,361026	0,295502	13,314498
foxg1	0,200864	8,079136	0,077505	6,553272
emx2	0,098057	0,552012	0,241012	12,878988

	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,241574	6,240757	1,877877	74,44943
foxg1	0,477388	36,298917	0,35043	47,962488
emx2	0,166289	2,193458	1,213998	82,656186

## 28 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,062337	4,447664	0,064364	8,814748
foxg1	0,037164	5,202836	0,001321	2,059705
emx2	0,000937	0,203196	0,09008	7,31006

	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,057309	9,333648	0,387229	76,832701
foxg1	0,251836	44,082615	0,000002	48,364521
emx2	0,000002	1,368328	0,000002	91,027395

TABELLA 2|Frazione di cellule morenti (7AAD+) nei diversi compartimenti (esperimento a tripla marcatura, n=1)

## 7 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	4,75957E-06	0,057935458	0,09268689	0,025639126
foxg1	5,63825E-05	0,005578704	0,211212516	0,03750935
emx2	1,98071E-05	0,009725286	0,134067124	0,020171992

	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,469578478	0,21115235	0,018812341	0,031077752
foxg1	0,4265087	0,012829636	9,28867E-06	0,041533642
emx2	0,02191668	0,021792595	0,024799649	0,022513949

## 14 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,087538459	0,046282185	4,00977E-06	0,055590933
foxg1	0,104240318	0,0406909	0,5	0,041447879
emx2	0,160987074	0,054063322	1,02159E-05	0,030818125

	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,065127532	0,024684635	6,55322E-07	0,024571711
foxg1	0,040243086	0,006212305	2,44135E-06	0,024431474
emx2	0,065945071	0,013482736	6,1497E-07	0,017125692

## 21 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,017762702	0,017232833	0,015857761	0,02786947
foxg1	0,0181018	0,025539365	1,29024E-05	0,038143846
emx2	0,078852096	0,029374361	0,016393375	0,050478345

	<i>cherry(-) egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-) egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-) egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-) egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	4,13952E-06	0,012783385	0,005533909	0,015268888
foxg1	0,030415511	0,007619731	0,011386011	0,051295087
emx2	0,051368401	0,012509927	0,011041204	0,041258836

## 28 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1,60418E-05	0,029694914	0,222236033	0,173991134
foxg1	0,057044452	0,011409162	0,999242998	0,195945536
emx2	0,998932764	0,027520227	0,041296625	0,126187747

	<i>cherry(-) egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-) egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-) egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-) egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	0,033397896	0,015995032	2,58245E-06	0,024974861
foxg1	0,017674201	0,003533933	0,5	0,01394791
emx2	0,5	0,007653136	0,5	0,017908169

TABELLA 2| Frazione di cellule morenti (7AAD+) nei diversi compartimenti (valori normalizzati sul controllo biologico, Luciferasi) (esperimento a tripla marcatura, n=1)

## 7 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1	1	1	1
foxg1	11,84613216	0,096291702	2,278774438	1,462973049
emx2	4,16152673	0,167864146	1,446451848	0,786765985

	<i>cherry(-) egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-) egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-) egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-) egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1	1	1	1
foxg1	0,908279913	0,06076009	0,000493754	1,336442919
emx2	0,046673092	0,103207923	1,318264944	0,724439419

## 14 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1	1	1	1
foxg1	1,190794539	0,879191408	124695,5	0,745587041
emx2	1,839043967	1,168123787	2,547743827	0,554373218

	<i>cherry(-) egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-) egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-) egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-) egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1	1	1	1
foxg1	0,617912039	0,251666877	3,725414419	0,994292747
emx2	1,012552902	0,546199541	0,938424262	0,696967848

## 21 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1	1	1	1
foxg1	1,019090466	1,482017757	0,000813633	1,368660637
emx2	4,439194912	1,704557881	1,033776138	1,81124167

	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1	1	1	1
foxg1	7347,596672	0,596065237	2,057498948	3,359451421
emx2	12409,27005	0,978608339	1,995190888	2,702150676

## 28 DPI

	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(+)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1	1	1	1
foxg1	3555,979981	0,384212671	4,496314059	1,126181153
emx2	62270,47172	0,926765667	0,185823265	0,72525389

	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(+)</i> <i>violet(-)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(+)</i>	<i>cherry(-)</i> <i>egfp(-)</i> <i>violet(-)</i>
luc	1	1	1	1
foxg1	0,529201027	0,220939401	193614,5	0,558478003
emx2	14,97100313	0,478469547	193614,5	0,717047817

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio i miei genitori, Daniela e Danilo, per aver sempre creduto in me e avermi permesso di iniziare il percorso che qui si conclude; mia sorella Laura e Marco per la loro amicizia incondizionata e l'appoggio morale che non mi hanno mai negato.

Ringrazio inoltre tutti i membri del laboratorio Mallamaci:

Assunta Diodato, per la sua precisione e meticolosità; Giulia Spigoni, per la capacità di farmi ridere anche nei momenti più difficili; Elisa Puzzolo, per le sue risorse illimitate; Nicola Maiorano, perchè mi ha insegnato ad essere più forte. Infine un ringraziamento davvero speciale a Marco Brancaccio, senza il quale questo lavoro non si sarebbe potuto realizzare e che con pazienza e sopportazione mi ha insegnato e guidato sempre.

Un ultimo ringraziamento ad una persona che, nonostante la lontananza e le difficoltà, mi ha sempre rispettata, amata e soprattutto mi ha sempre sopportata.