

UNIVERSITÀ DI PISA



Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

CdL in Scienze Biologiche Molecolari

**Neurogenesi nell'Adulto e Modulazione della Gliosi
in Funzione dell'Invecchiamento:
Studio nel Pesce Annuale *Nothobranchius furzeri***

Candidata:
Giorgia Battistoni

Relatori:
Dott. Alessandro Cellerino
Prof. Massimiliano Andreazzoli

A.A. 2010/2011

I. Indice

I. Indice.....	pg. i
II. Abstract.....	pg. iii
1. Introduzione.....	pg. 1
1.1. Neurogenesi nell'adulto.....	pg. 1
1.1.1. Storia.....	pg. 1
1.1.2. Definizioni.....	pg. 2
1.2. Neurogenesi nel vertebrato adulto.....	pg. 3
1.2.1. Uccelli.....	pg. 4
1.2.2. Rettili.....	pg. 5
1.2.3 Mammiferi.....	pg. 5
1.2.3.1. Sub-Ventricular Zone, SVZ.....	pg. 6
1.2.3.2 Sub-Granular Zone, SGZ.....	pg. 6
1.2.4. Pesci-Teleostei.....	pg. 8
1.3. Glia radiale come fonte di progenitori neurali.....	pg. 9
1.3.1. La Glia Radiale nel SNC dell'embrione.....	pg. 10
1.3.2. La Glia Radiale nel SNC dell'adulto.....	pg. 12
1.4. Marcatori proteici della neurogenesi.....	pg. 13
1.4.1. Glial Fibrillary Acid Protein, GFAP.....	pg. 13
1.4.2. S100 β	pg. 15
1.4.3. Musashi1, Msh1.....	pg. 17
1.4.4. Double-cortin, Dcx.....	pg. 18
1.5. Invecchiamento.....	pg. 19
1.5.1. Definizione e Teorie.....	pg. 19
1.5.2. Effetto dell'invecchiamento sul cervello del mammifero.....	pg. 21
1.6. <i>N. furzeri</i> come modello animale dell'invecchiamento.....	pg. 21
2. Scopo dello studio.....	pg. 26
3. Materiali e Metodi.....	pg. 27
3.1. Animali: linee, condizioni di crescita e riproduzione.....	pg. 27
3.2. Istologia.....	pg. 29

3.3. Immunoistochimica.....	pg. 30
3.4. Saggio EdU.....	pg. 30
3.4.1. Iniezione di EdU.....	pg. 33
3.4.2. Rivelazione di EdU.....	pg. 33
3.5. Microscopia.....	pg. 33
3.6. Anali dell'immagine e quantificazione.....	pg. 34
3.7. Allineamento di sequenze e costruzione di alberi filogenetici.....	pg. 35
4. Risultati.....	pg. 37
4.1 Neurogenesi.....	pg. 37
4.1.1 Neurogenesi nel Telencefalo.....	pg. 37
4.1.2. Neurogenesi nel Tetto Ottico.....	pg. 40
4.2. Gliosi associata all'invecchiamento nel Tetto Ottico.....	pg. 41
4.2.1. Quantificazione della Gliosi.....	pg. 42
4.3. Persistenza dei progenitori neurali nell'invecchiamento.....	pg. 43
4.4. Riduzione della neurogenesi nell'invecchiamento.....	pg. 45
4.5. Ridotta divergenza della sequenza proteica dei marker.....	pg. 46
4.5.1 GFAP.....	pg. 47
4.5.2. S100 β	pg. 48
4.5.3. Msi1.....	pg. 49
4.5.4. Dcx.....	pg. 50
5. Discussione.....	pg. 52
5.1. Neurogenesi nell'adulto di <i>N. furzeri</i>	pg. 52
5.2. Gliosi associata all'invecchiamento: possibili pathway molecolari e implicazioni funzionali.....	pg. 52
5.3. I principali marcatori proteici sono evolutivamente conservati	pg. 55
III. Bibliografia.....	pg. v
IV. Appendici.....	pg. xii
A. Sox2.....	pg. xii
B. Abbreviazioni.....	pg. xiii
V. Ringraziamenti.....	pg. xv

II. Abstract

Per quasi un secolo, l'idea che il Sistema Nervoso Centrale [SNC] esaurisse il proprio potenziale neurogenico nelle fasi precoci dello sviluppo post-embrionale è stato considerato dalla comunità scientifica come un assioma della neurobiologia. Negli ultimi venti anni la dimostrazione della Neurogenesi nell'adulto di mammifero ha definitivamente demolito questo dogma. Durante lo sviluppo embrionale, è ormai ampiamente dimostrato che le cellule della glia radiale, unica forma di glia esistente nell'embrione, sono fonte di progenitori neuronali che nel corso della neurogenesi si differenziano in neuroni e cellule gliali, secondo un ben preciso pattern spazio-temporale. La neurogenicità della glia si mantiene nell'adulto. Le aNSCs [adult Neural Stem Cell], infatti, si originano da cellule con caratteristiche gliali derivanti dalla persistenza di glia radiale nell'adulto. Nel mammifero esistono solo due nicchie neurogeniche nel SNC dell'adulto mentre nel cervello dei teleostei la proliferazione cellulare avviene lungo tutto l'asse rostro-caudale: questo è conseguenza della presenza di 16 aree discrete di neurogenesi poste nel parenchima cerebrale ma soprattutto lungo le pareti ventricolari. Il teleosteo *Nothobranchius furzeri* è un modello animale particolarmente utile per lo studio dell'invecchiamento. Questa specie ha un'aspettativa di vita molto limitata (~50 settimane) e permette perciò di seguire con facilità l'evoluzione di specifici fenomeni biologici legati all'invecchiamento.

Oggetto di studio della mia esperienza di tirocinio è stata l'analisi immunohistochimica della presenza di specifici marcatori di cellule gliali [Glial Fibrillary Acid Protein(GFAP), S100B], precursori neuronali [Musashi1 (Msh1)] e neuroni neo-differenziati [Double-cortin (Dcx)] nel cervello di *N.furzeri* in animali a 5wks (10% del life-span) e 25wks(50% del life-span) al fine di valutarne un eventuale cambiamento del pattern di espressione in funzione dell'invecchiamento. La mia attenzione si è focalizzata sulla regione del Tetto Ottico (Mesencefalo), perché nell'adulto è presente una zona germinale, e sul Telencefalo, dove risiedono zone analoghe alle nicchie neurogeniche del mammifero.

Il telencefalo di *N. furzeri* riproduce fedelmente i dati di attività proliferativa di alcune regioni specifiche del telencefalo di *Danio rerio* [März et al, 2010]. Il dato più

significativo emerso è una marcata risposta gliotica nel Tetto Ottico: questa si attua con l'invecchiamento ed è evidenziata dall'ingente aumento di fibre GFAP⁺. Si è valutata quindi l'espressione di GFAP in associazione con i marcatori S100 β e Msh1. Il pattern di espressione di S100 β non mostra nessun cambiamento sostanziale con l'invecchiamento ma, diversamente dall'animale giovane, le fibre GFAP⁺ nell'animale più anziano co-localizzano perfettamente con tutte e sole le fibre S100 β ⁺. L'invecchiamento modula invece l'espressione di Msh1: nell'animale a 5wks le zone Msh1⁺ si dispongono lungo il margine ventricolare mentre nell'animale più anziano si trova un secondo fronte di espressione si trova in posizione più superficiale. Le cellule Msh1⁺ rimangono comunque distinte rispetto a quelle GFAP⁺ sebbene siano ad esse strettamente associate. L'espressione di Dcx, marcatore dei neuroni neo-differenziati, invece, cala bruscamente con l'invecchiamento. Da ciò si deduce che la riduzione della neurogenesi associata all'invecchiamento è riconducibile ad una riduzione dell'attività neurogenica delle aNSCs piuttosto che ad una loro riduzione in numero.

La gliosi associata all'invecchiamento si potrebbe quindi considerare come risultante dal raggiungimento di uno stato di "differenziamento transiente" da parte delle aNSCs le quali però mantengono il proprio potenziale neurogenico e quindi la capacità di de-differenziare, tornare a proliferare e comportarsi da progenitori neurali, similmente a quanto già dimostrato avvenire per la glia di Müller nella rigenerazione retinica indotta dal danno nei teleostei

1. Introduzione

1.1. Neurogenesi nell'adulto

1.1.1. Storia

“Once the development was ended, the founts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended, and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree”

(Ramon y Cajal, 1913)⁽¹⁾.

Per quasi un secolo, l'idea che il Sistema Nervoso Centrale [SNC] esaurisse il proprio potenziale neurogenico nelle fasi precoci dello sviluppo post-embriale è stata considerata dalla comunità scientifica come un assioma della neurobiologia. Negli ultimi venti anni la dimostrazione che nel cervello del mammifero adulto avviene Neurogenesi ha definitivamente demolito questo dogma.

Gli studi pionieristici di Altman e Das (1965, 1967) con H³-timidina fornirono le prime evidenze anatomiche della presenza di neuroni di nuova genesi nel cervello di ratto adulto: tali neuroni di neo-formazione furono rinvenuti nel giro dentato dell'ippocampo⁽²⁾, nella neocorteccia⁽³⁾ e nel bulbo olfattivo⁽⁴⁾. Nel 1970 l'articolo di Kaplan⁽⁵⁾ riconfermò la presenza, già documentata da Altman, di proliferazione cellulare nel bulbo olfattivo e nel giro dentato di ratto adulto (3 mesi d'età) fornendo però anche la dimostrazione, con immagini di microscopia elettronica, che tali cellule erano, almeno morfologicamente, neuroni. Fu però solo dagli anni '90 che la comunità scientifica riconobbe come scientificamente valida la tesi della *Neurogenesi nell'adulto*, ovvero della continua genesi di nuovi neuroni in fasi successive allo sviluppo embrionale e peri-natale in tutte le specie di vertebrato. Il rinnovato interesse per la Neurogenesi nell'adulto derivò da due diversi input:

1. Nel 1983 Nottebohm dimostrò che nel nucleo del canto del canarino esiste un fenomeno di neurogenesi stagione-dipendente⁽⁶⁾. Egli riuscì in seguito a caratterizzare tale fenomeno anche dal punto di vista funzionale: osservò, infatti, una corrispondenza temporale tra l'estensione del repertorio melodico

degli uccelli e il picco della neurogenesi. Questo fu il primo di una serie di studi volti all'indagine, *in vivo*, della presenza e del grado di attività di eventuali aree neurogeniche nel cervello di mammifero.

2. Negli anni '90 furono introdotti metodi innovativi per condurre saggi di proliferazione (uso di retrovirus, marcatura con BrdU): ciò permise di isolare cellule con caratteristiche di staminalità dal cervello adulto e di caratterizzarle *in vitro*, come cellule in grado di proliferare e differenziare in neuroni, astrociti e oligodendrociti ⁽⁷⁾

1.1.2. Definizioni

Con Neurogenesi nell'Adulto si fa riferimento alla continua genesi di nuovi neuroni nel SNC per tutto l'arco della vita ricapitolando il set di eventi proprio della neurogenesi nello sviluppo embrionale. La neurogenesi comprende, ma non si esaurisce, nello step proliferativo: essa è un processo che ha inizio con la divisione asimmetrica del precursore e termina solo una volta che il nuovo neurone si è completamente differenziato, integrato ed è in grado di sopravvivere e svolgere le proprie funzioni.

Secondo la definizione classica, le Cellule Staminali Neurali [Neural Stem Cells, NSCs] sono cellule dotate di tre caratteristiche principali ⁽⁸⁾:

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

Le cellule staminali con un self-renewal limitato e un destino differenziativo ristretto a un solo lineage cellulare si definiscono *progenitori*; il termine *precursore* viene invece generalmente usato per riferirsi sia alle cellule staminali *de iure* sia ai progenitori.

Le Cellule Staminali Neurali Adulte [aNSCs] sono NSC che si trovano nel tessuto nervoso già differenziato dell'individuo adulto, in microambienti detti "*nicchie neurogeniche*". Riprendendo il concetto più generale di *nicchia ecologica* [l'insieme delle condizioni sotto cui una specie perpetua se stessa⁽⁹⁾], Shofield propose il

concetto di “*nicchia di cellule staminali*”: questa si definisce come una regione di tessuto somatico (cellule e matrice extracellulare) che ospita una o più cellule staminali ed è in grado di regolarne il pattern intrinseco di maturazione agendo, con segnali estrinseci, sul delicato equilibrio tra il mantenimento di uno stato di quiescenza e la produzione di progenie cellulare differenziata ⁽¹⁰⁾. Le nicchie di cellule staminali hanno una struttura tipica⁽¹¹⁾ (Fig.1). Un monostrato di cellule di origine endoteliale (in verde) secerne una membrana basale sul lato rivolto verso le cellule staminali (in rosso): questa membrana regola il flusso di segnali pro/anti-differenziativi diretto alle cellule staminali, sequestrando o attivando fattori solubili presenti nella MEC [Matrice Extra Cellulare] ed inoltre, essendo un substrato di ancoraggio cellulare, può causare una diversa esposizione a determinanti di differenziazione nelle due cellule figlie prodotte dalla divisione orientata della cellula staminale. L’attivazione e la differenziazione delle cellule staminali non sono però regolate unicamente da segnali solubili ma anche da interazioni dirette cellula/cellula: in particolare si è dimostrata che l’intima associazione tra cellule staminali e cellule endoteliali è essenziale per il corretto funzionamento della nicchia.

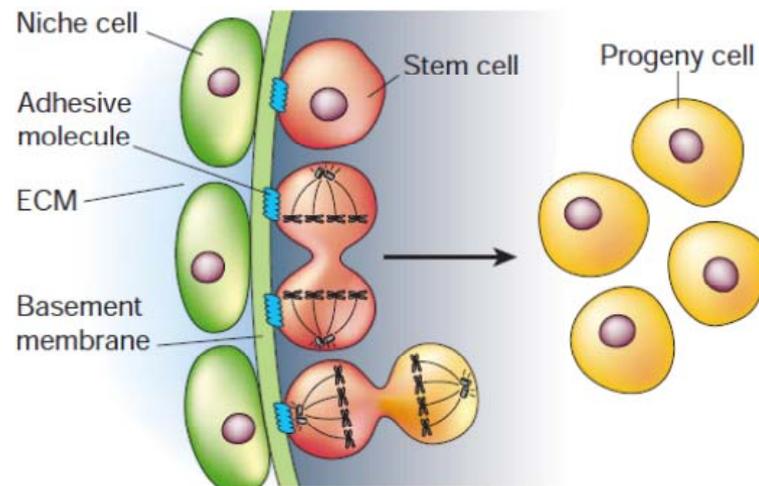


Fig.1 Struttura caratteristica di una nicchia di cellule staminali ⁽¹¹⁾.

1.2. Neurogenesi nel vertebrato adulto

Nonostante la neurogenesi nell’adulto sia ormai dimostrata, a partire dagli uccelli, in tutti i taxa dei vertebrati, studi comparati evidenziano una marcata riduzione del potenziale neurogenico nell’Adulto nel corso dell’evoluzione dai vertebrati inferiori

(rettili, anfibi, pesci, uccelli) a quelli superiori (mammiferi)⁽¹²⁾. I vertebrati non mammiferi rappresentano comunque straordinari modelli per lo studio della neurogenesi dell'adulto, permettendo l'analisi dettagliata delle zone di neurogenesi, dei segnali d'induzione e del microambiente nelle nicchie che regolano il differenziamento/indifferenziamento delle aNSCs, della sopravvivenza e dell'integrazione dei neuroni di nuova genesi⁽¹³⁾.

I principali modelli animali in cui è stata studiata la neurogenesi nell'adulto sono il canarino (uccelli), la lucertola (rettili), i teleostei (pesci) ed il topo (mammifero) (Fig.2): in tutti questi modelli, la neurogenesi ha luogo in subdomini ventricolari posti in varie e differenti aree cerebrali o, più raramente, nel parenchima.

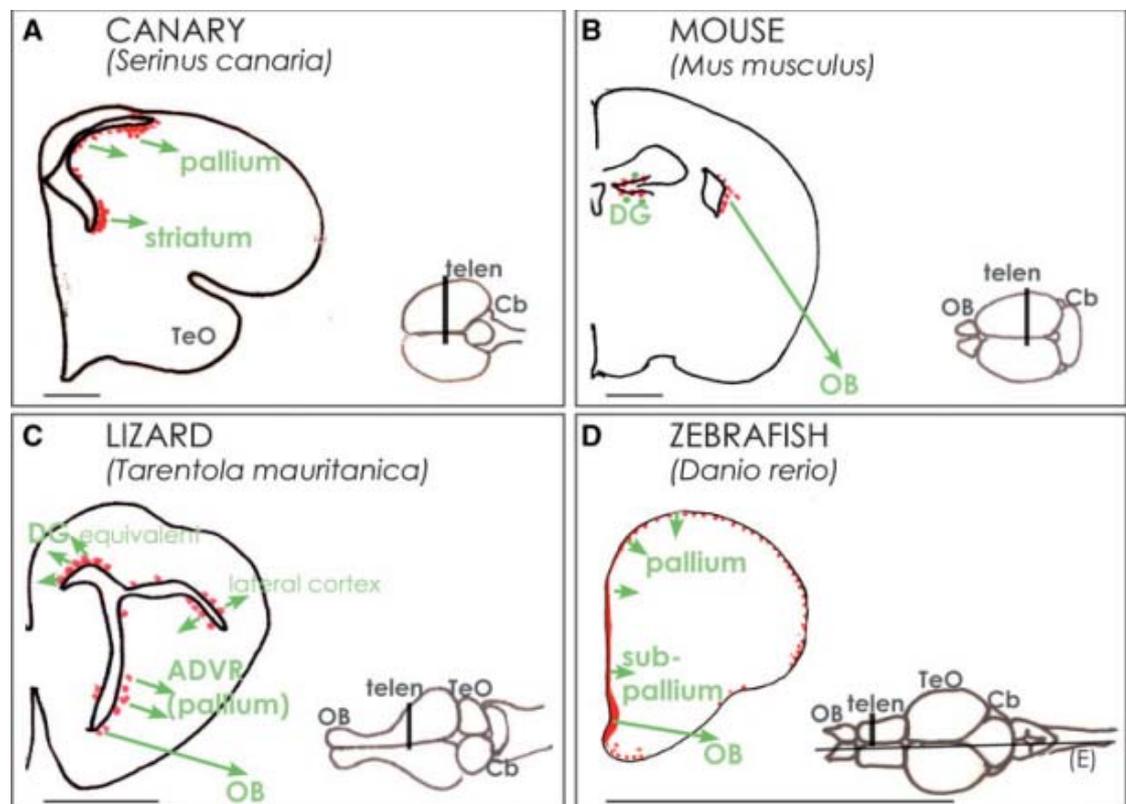


Fig. 2 Pannello comparativo delle aree mitoticamente attive nel telencefalo (in sezioni coronali) dei principali modelli di vertebrato⁽¹³⁾

1.2.1 Uccelli

Gli uccelli furono il primo taxon di vertebrati in cui fu dimostrata la neurogenesi nell'individuo adulto. Il cervello degli uccelli, per complessità, è molto simile a

quello dei mammiferi e perciò questi animali rappresentano un ottimo modello soprattutto per gli studi funzionali.

I primi studi si focalizzarono sulla neurogenesi nel canarino (*Serinus canaria*). In queste specie la neurogenesi è funzionalmente associata all'apprendimento: la proliferazione neurogenica segue un pattern temporale stagionale-dipendente in cui il raggiungimento del picco della neurogenesi coincide con il periodo di apprendimento di nuove melodie⁽¹⁴⁾. I neuroni neo-generati (interneuroni e neuroni di proiezione) nella regione medio-dorsale e rostrale del ventricolo migrano e si integrano nell'ippocampo, nell'HCV (High Vocal Center) del nido pallido e nell'area X dello striato: le ultime due regioni sono specificamente coinvolte nel controllo motorio della produzione canora.

Recentemente si è riusciti a indurre artificialmente la neurogenesi in un modello emergente, lo zebrafinch (*Taeniopygia guttata*)⁽¹⁵⁾. In questa specie la genesi di nuovi neuroni nell'HVC non è controllata dal ritmo stagionale ma può essere artificialmente indotta in seguito a danno.

1.2.2 Rettili

I rettili sono noti per la loro straordinaria capacità di rigenerare praticamente ogni tessuto. Nelle lucertole, esiste una zona di neurogenesi post-natale sia costitutiva sia indotta dal danno la quale sembra essere analoga al giro dentato dell'ippocampo dei mammiferi⁽¹⁶⁾. Le cellule proliferanti si trovano nello spessore delle cellule ependimali che si affacciano sul ventricolo: i neuroni neo-formati vanno al bulbo olfattivo o rimangono nel telencefalo.

1.2.3 Mammiferi

Sebbene gli studi pionieristici di Altman avessero evidenziato la presenza di aree proliferative nel cervello di mammiferi adulti, il potenziale neurogenico di queste cellule mitoticamente attive fu provato solo nel 1992 quando si dimostrò la differenziazione in vitro di tali precursori in neuroni e cellule della neuroglia⁽¹⁷⁾.

Nel mammifero esistono solo due nicchie neurogeniche nel SNC dell'adulto (Fig. 3): la Sub-Granular Zone (SGZ) del giro dentato (DG) dell'ippocampo e la Sub-Ventricular Zone (SVZ) del ventricolo laterale⁽¹⁸⁾.

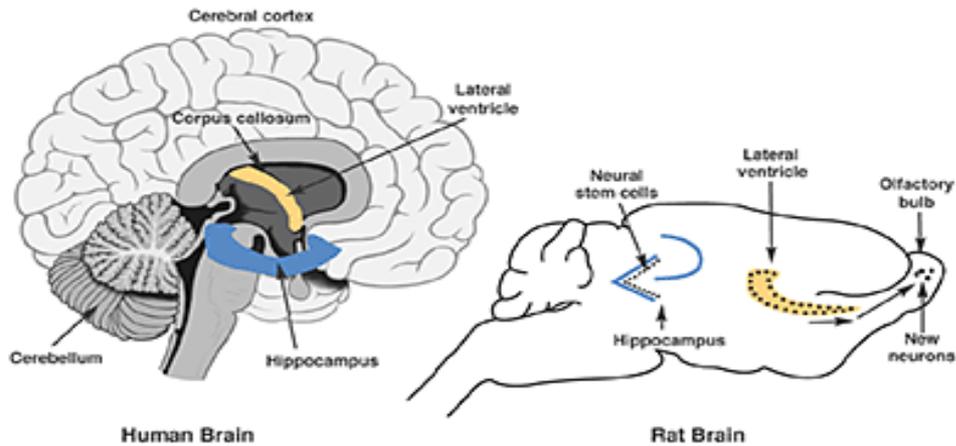


Fig. 3 Aree di neurogenesi nel cervello di mammifero adulto messe in evidenza in sezioni trasversali di uomo e topo⁽¹⁹⁾

1.2.3.1. Sub-Ventricular Zone, SVZ

La SVZ si trova nel ventricolo laterale del telencefalo ed è la principale fonte di neurogenesi nell'adulto (Fig. 4). In questa nicchia si trovano cellule proliferanti simili alla glia radiale (RG-like) [B cells] dalle quali si originano i Precursori Trans-Amplificanti (TAPs) [C cells]. I TAPs vanno incontro a un burst proliferativo e la loro progenie differenzia in neuroblasti [A cells]. I neuroblasti, quindi, migrano ordinatamente lungo il Rostral Migratory Stream (RMS) verso lo strato glomerulare del bulbo olfattivo (OB), dove differenziano terminalmente in interneuroni⁽²⁰⁾, principalmente neuroni glomerulari GABAergici.

1.2.3.1. Sub-Granular Zone, SGZ

Una seconda area, contenente precursori proliferanti, si trova nello strato sottogranulare più interno del Giro Dentato (DG) dell'ippocampo⁽²²⁾ (Fig. 5). Qui precursori con morfologia RG-like (Tipe1 cells) generano progenitori intermedi (Tipe2 cells) dai quali, poi, origineranno neuroblasti (Tipe3 cells). Diversamente da quanto avviene nella SVZ, nella SGZ i neuroblasti non devono migrare per lunghe distanze poiché si integrano come interneuroni glomerulari GABAergici nello strato granulare del DG: coerentemente con la maggiore prossimità del target d'integrazione i neuroblasti iniziano a maturare precocemente e i pochi che sopravvivono alle prime due settimane si dimostrano completamente integrati e funzionali.

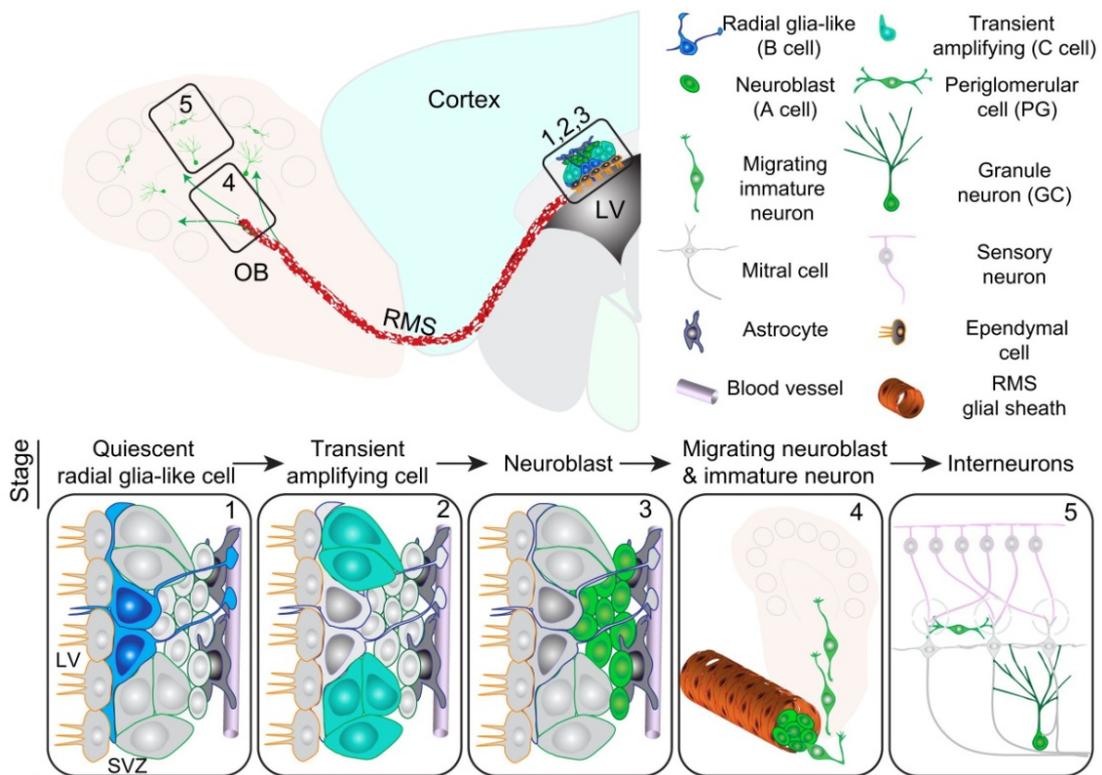


Fig. 4. Neurogenesi associata alla Sub-Ventricular Zone in cervello adulto di topo⁽¹⁸⁾

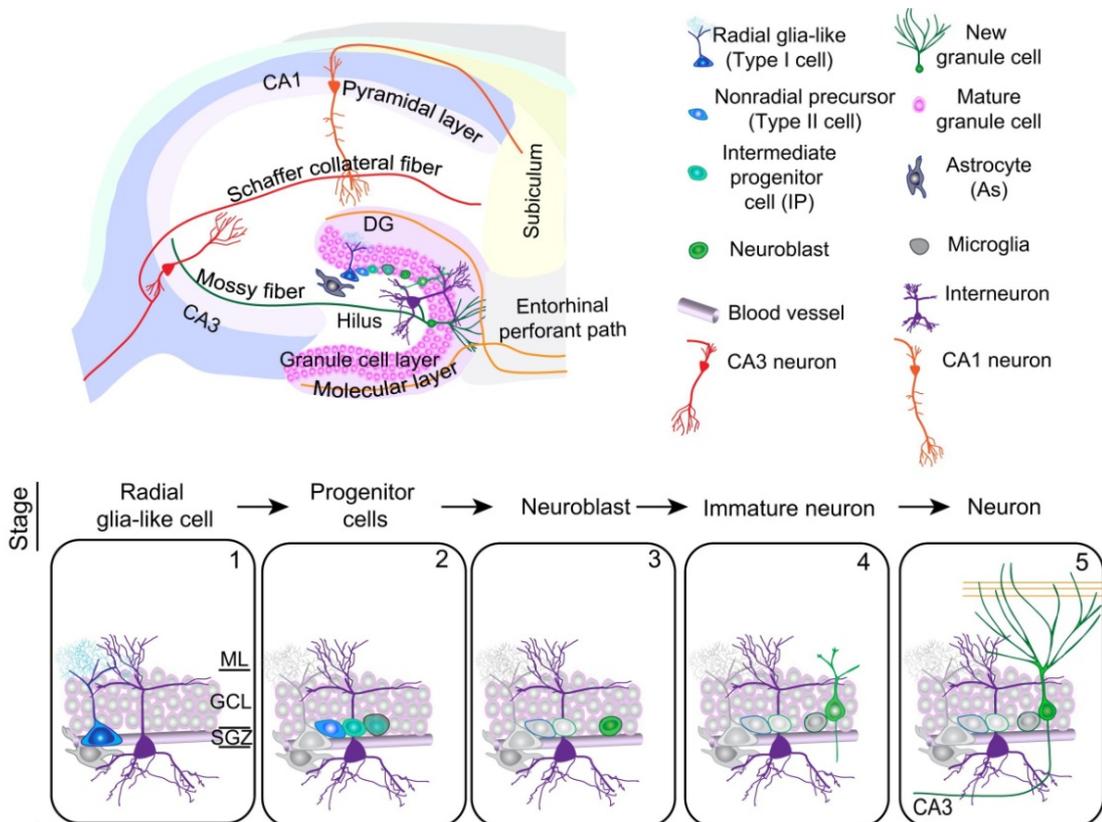


Fig. 5. Neurogenesi associata alla Sub-Granular Zone nel cervello adulto di topo⁽¹⁸⁾

1.2.4. Pesci-Teleostei

I telostei, di cui zebrafish (*Danio rerio*) è la specie più studiata, differiscono dagli uccelli e dai mammiferi perché caratterizzati da due tipi di neurogenesi adulta:

- la *neurogenesi costitutiva* (diffusa) è responsabile della crescita continua delle strutture del sistema nervoso per tutto l'arco di vita dell'animale. La fonte di neurogenesi è rappresentata dalla persistenza, nel parenchima cerebrale, di cellule neuro-epiteliali non differenziate;
- la *neurogenesi nell'adulto* è funzionalmente implicata nella rigenerazione di tessuto in seguito a danno o nel turnover cellulare del tessuto nervoso. Il potenziale neurogenico è dovuto alla presenza di precursori neurali che soddisfano i criteri di definizione delle aNSCs descritti in §1.1.2.

Sebbene si osservi un potenziale proliferativo diffuso, è possibile individuare delle nicchie di neurogenesi spazialmente ristrette nel cervello di teleosteo adulto, le quali sono molto simili a quelle già caratterizzate negli altri taxa di vertebrati. Lungo l'asse rostro-caudale sono presenti 16 aree distinte di neurogenesi⁽²²⁾ distribuite principalmente nelle superfici ventricolari ma anche in alcune aree del parenchima (Fig.6). Il pattern spaziale di queste aree è identico nel pesce a 6 mesi (15% life-span) e a 30 mesi(75% life-span) e perciò si conserva durante la crescita.

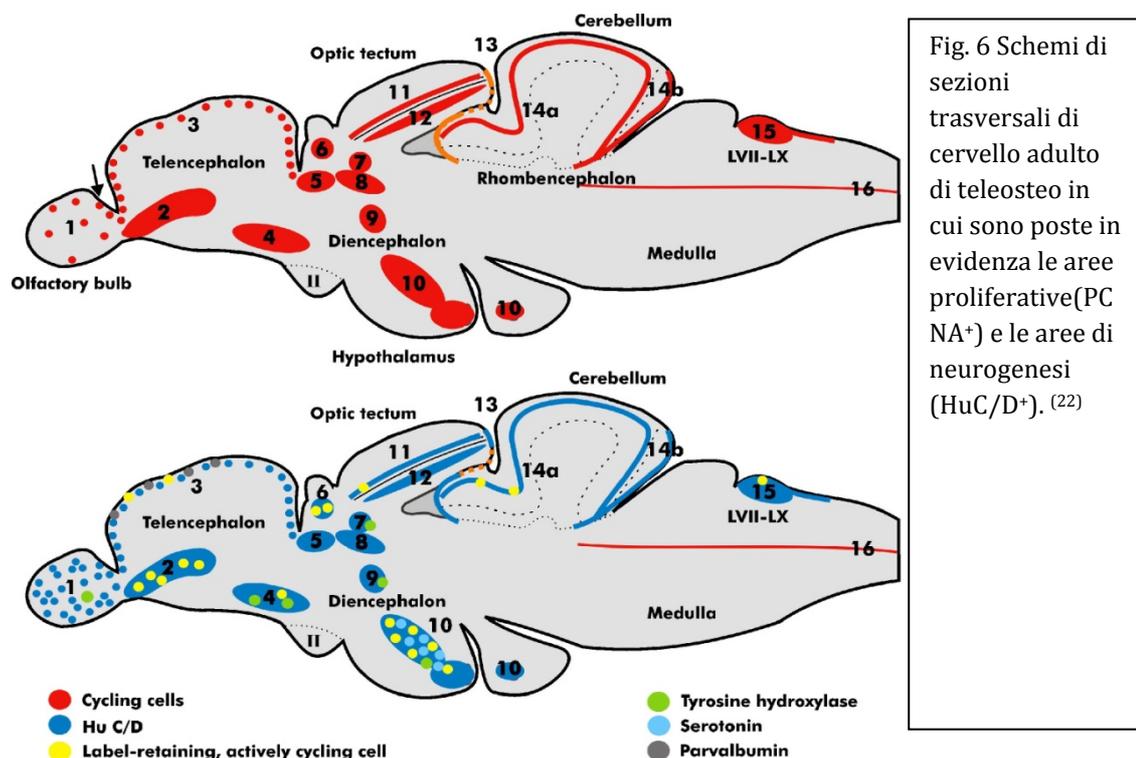


Fig. 6 Schemi di sezioni trasversali di cervello adulto di teleosteo in cui sono poste in evidenza le aree proliferative (PC NA⁺) e le aree di neurogenesi (HuC/D⁺).⁽²²⁾

Il telencefalo dei teleostei si differenzia da quello dei mammiferi per la sua diversa morfogenesi⁽²³⁾ (Fig.7). Nei teleostei questo si origina dal tubo neurale per everzione mentre nei mammiferi questo avviene per evaginazione: durante l'everzione parte della parete ventricolare viene esposta nella regione latero-posteriore del telencefalo e perciò, nell'individuo adulto si trova lungo la superficie piaie e non quella ventricolare come avviene invece nel mammifero.

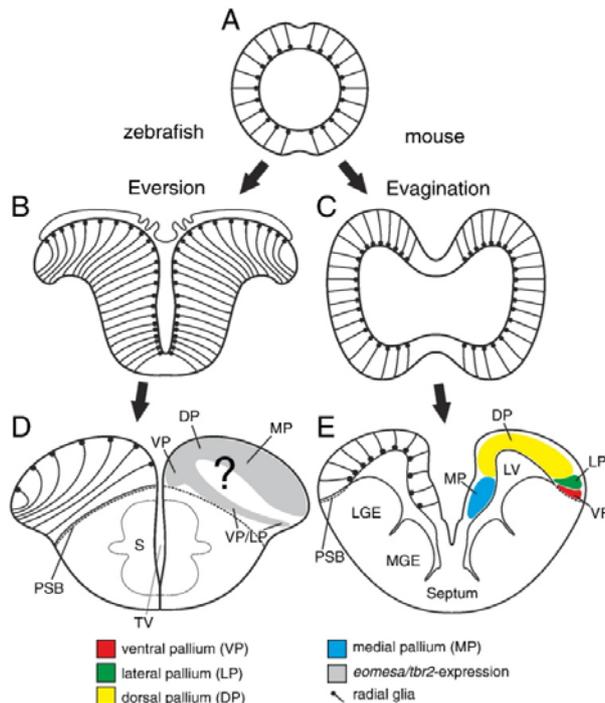


Fig. 7. Sviluppo del telencefalo a paragone tra teleostei e mammiferi⁽²³⁾

1.3 Glia radiale come fonte di progenitori neurali

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

La denominazione "Glia Radiale" riassume al contempo la morfologia radiale e la natura gliale di queste cellule. Di seguito sono riportate le principali caratteristiche della RG:

1. Morfologia bipolare. Il corpo cellulare risiede nella parete ventricolare mentre un lungo processo raggiunge la superficie piaie;

2. Mitoticamente attive. Nel corso del ciclo cellulare vanno incontro a migrazione nucleare intercinetica⁽²⁴⁾: il soma si sposta lungo l'asse cellulare raggiungendo la posizione più ventricolare in fase S e quella più apicale in fase M;
3. Presenza di granuli di glicogeno;
4. Origine neuroepiteliale, come tutte le cellule presenti nel SNC dei vertebrati. Il Neuroepitelio (NE) si trasforma in RG nel momento in cui inizia la neurogenesi embrionale;
5. Espressione di marcatori astrocitari⁽²⁵⁾ come GFAP [Glial Fibrillary Acid Protein], GLAST [Astrocyte-Specific Glutammate Transporter], Nestin, BLBP [Brain Lipid-Binding Protein], GS [Glutamine Synthetase], S100 β . L'espressione di questi marker inizia con la differenziazione della RG dal NE.

1.3.1. La Glia radiale nel SNC dell'embrione

Per tutto il secolo scorso fu ritenuto valido il modello proposto nel 1889 da His⁽²⁶⁾ per cui esisterebbero due distinti pool di precursori nel SNC in sviluppo: gli *spongioblasti* (cellule allungate con processi radiali corrispondenti alla RG) formerebbero il lineage gliale mentre i *neuroblasti* (morfologicamente sferici e privi di processi) sarebbero responsabili della genesi di neuroni. Tuttavia, recentemente, esperimenti *in vitro*⁽²⁷⁾ e *in vivo*⁽²⁸⁾ dimostrano chiaramente l'origine comune delle cellule gliali e neuronali da precursori della Glia Radiale. Con un esperimento di fate-mapping⁽²⁹⁾ in cui l'espressione della ricombinasi Cre è stata posta sotto il controllo del promotore della BLBP (proteina espressa nella RG in tutto il SNC in sviluppo), si è infatti documentato *in vivo* che neuroni di proiezione, interneuroni e cellule gliali derivano tutti da cellule della RG. La RG perciò rappresenta il pool unico di progenitori neurali e gliali nel SNC nel corso di tutto lo sviluppo, sebbene ancora non sia stato chiarito se esista un'eterogeneità intrinseca alla RG.

Sia nella retina sia nella corteccia il destino differenziativo delle NSCs si è dimostrato strettamente collegato al pattern spazio-temporale secondo cui avviene il differenziamento⁽³⁰⁾. Nel corso della neurogenesi, una singola NSC, dividendosi asimmetricamente, genera delle nIPCs (neural Intermediate Progenitor Cells) le quali poi evolvono a neuroblasti (Fig. 8): le nIPCs acquisiscono un destino differenziativo specifico integrando i segnali intrinseci, derivanti da programma di

trascrizione differenziale dipendente dal tempo (misurato in numero di divisioni cellulari pregresse) ed i segnali estrinseci, come Notch-Delta e SonicHedgehog(Shh). La via di segnalazione Notch, attivata dal contatto tra RG e nIPCs, agisce favorendo la quiescenza della RG e bloccandone l'espressione dei geni proneurali *hes1* e *hes5*⁽³¹⁾.

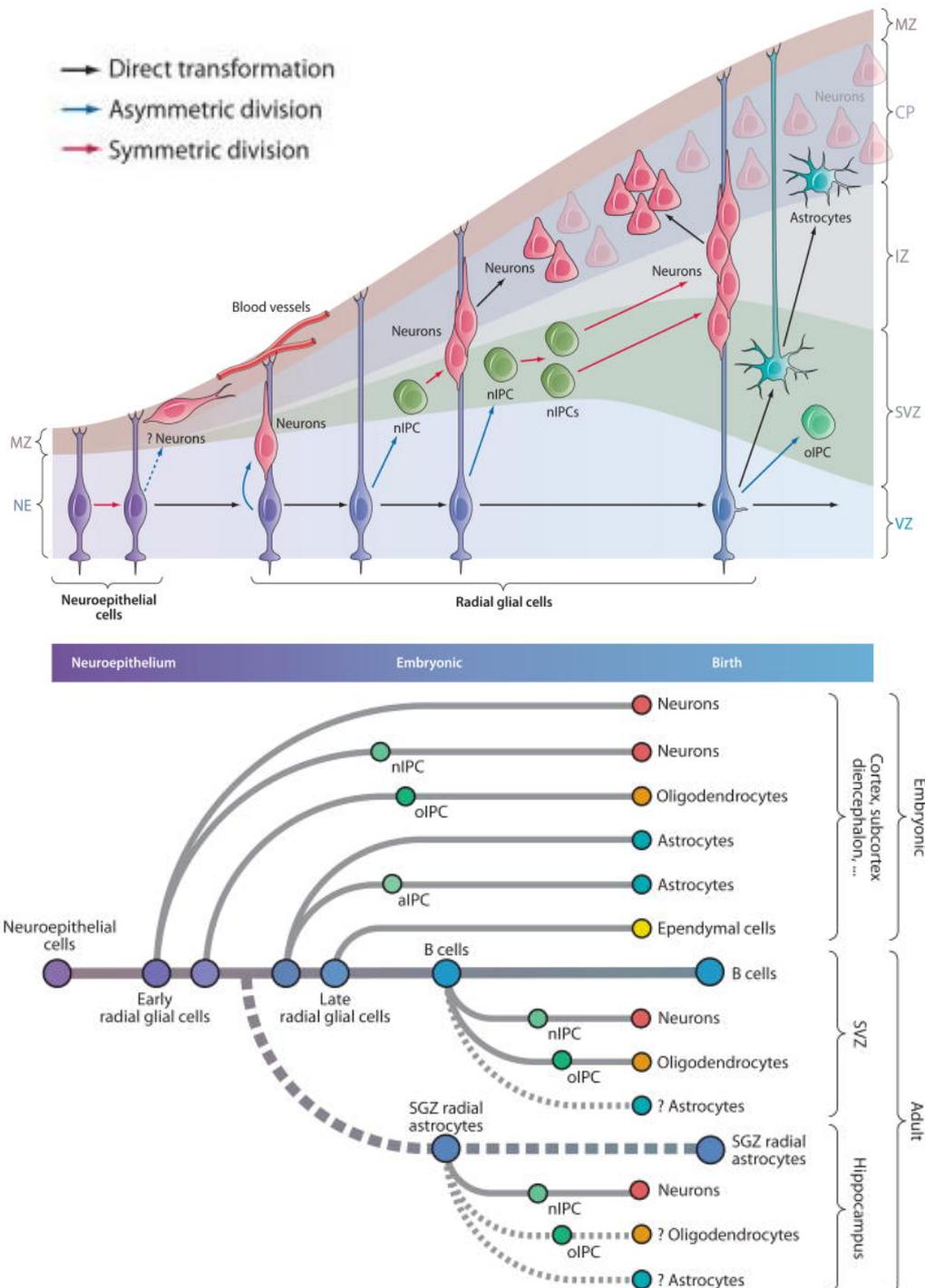


Fig. 8 Modello di neurogenesi illustrante il ruolo della RG nei vari lineages differenziativi⁽²⁹⁾

1.3.2 La Glia Radiale nel SNC dell'adulto

Nei teleostei la GR persiste anche nel SNC dell'adulto, nel quale mancano però astrociti e cellule endoteliali; la GR nei teleostei, infatti, viene anche detta endotelimoglia. Nei mammiferi, invece, la glia radiale scompare in seguito al raggiungimento del pieno sviluppo del SNC, a meno di eccezioni come la Glia di Bergmann nel cervelletto e la Glia di Müller nella retina. I precursori neurali nelle due principali nicchie neurogeniche del mammifero sono tuttavia estremamente simili alla GR poiché, in aggiunta ai requisiti di staminalità, possiedono tutti i tratti distintivi sopra descritti per la GR.

La neurogenicità della glia perciò si mantiene nell'adulto: le aNSCs, infatti, sono cellule con caratteristiche gliali che derivano dalle divisioni asimmetriche della RG nel corso della neurogenesi embrionale, non differenziano ma mantengono il loro potenziale proliferativo e neurogenico per una considerevole parte del life-span dell'animale.

I principali fattori responsabili del mantenimento dello stato indifferenziato delle aNSCs sono fattori intrinseci, tra cui Sox2, ed estrinseci, in particolare Notch-Delta [già discusso in 1.3.1] e SonicHedgehog. Sox2 (SRY-related homeobox 2) è un fattore di trascrizione (TF) già noto per il suo ruolo chiave nel mantenimento dello stato indifferenziato nelle cellule staminali embrionali (ESCs) e come componente del cocktail per l'induzione di iPSCs (Induced Pluripotent Stem Cells). Questo TF è specificamente espresso nella RG embrionale, nelle aNSCs sia nella SVZ (cellule B)⁽³²⁾ che nella SGZ (cellule di tipo 1)⁽³³⁾ lasciando supporre un ruolo centrale nel controllo dello stato differenziativo delle aNSCs, partecipando all'equilibrio tra segnali pro/anti-differenziativi. La presenza di Shh, di cui è già ampiamente nota la funzione di morfogeno e fattore di crescita, è un elemento indispensabile per la genesi e il mantenimento dei pools di aNSCs⁽³⁴⁾. Numerose evidenze indicano che una struttura cellulare peculiare comune alla RG embrionale e alle aNSCs, il *ciglio primario*, sia il sito di segnalazione per Shh e altri morfogeni⁽³⁵⁾. Questi organelli sono presenti in singola copia specificamente nei tipi cellulari indicati e, raccogliendosi in fasci di cilia appartenenti a più cellule, si protrudono nel lume ventricolare al centro di una girandola (pinwheel) formata da cellule endoteliali;

impedendo la formazione di tali strutture è stata dimostrata una drastica riduzione della neurogenesi in entrambe le nicchie del SNC adulto.

1.4 Marcatori proteici della neurogenesi

Sebbene ancora non si disponga di una batteria di marcatori in grado di identificare univocamente le aNSCs, il prossimo completamento della decodificazione del trascrittoma e proteoma di tali cellule permetterà di raggiungere tale obiettivo. Nel frattempo, negli studi sulla neurogenesi è pratica comune l'uso alcuni dei marcatori antigenici sotto riportati (Fig. 9).

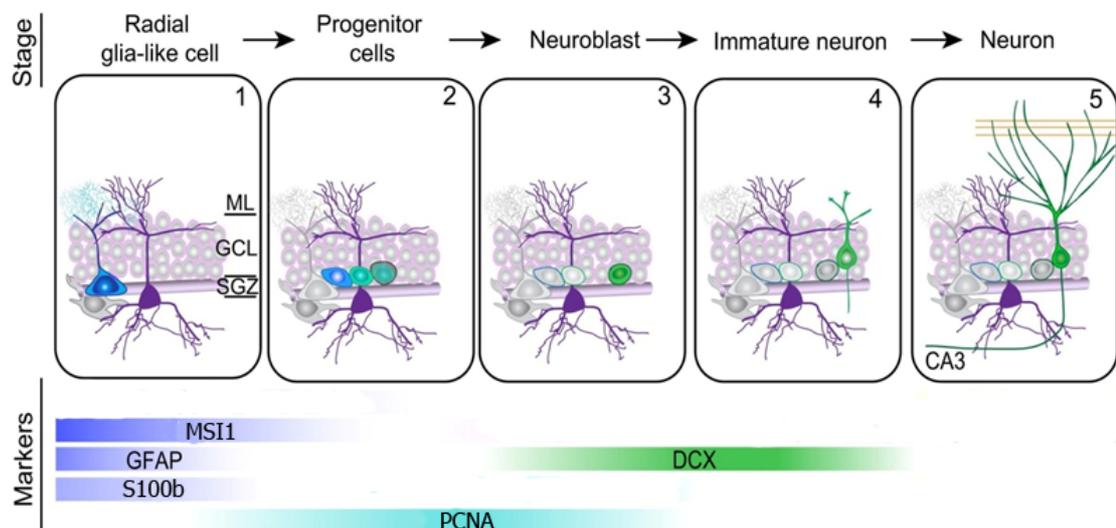


Fig.9 Pattern temporale di alcuni marcatori molecolari della Neurogenesi⁽¹⁸⁾

1.4.1. Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP

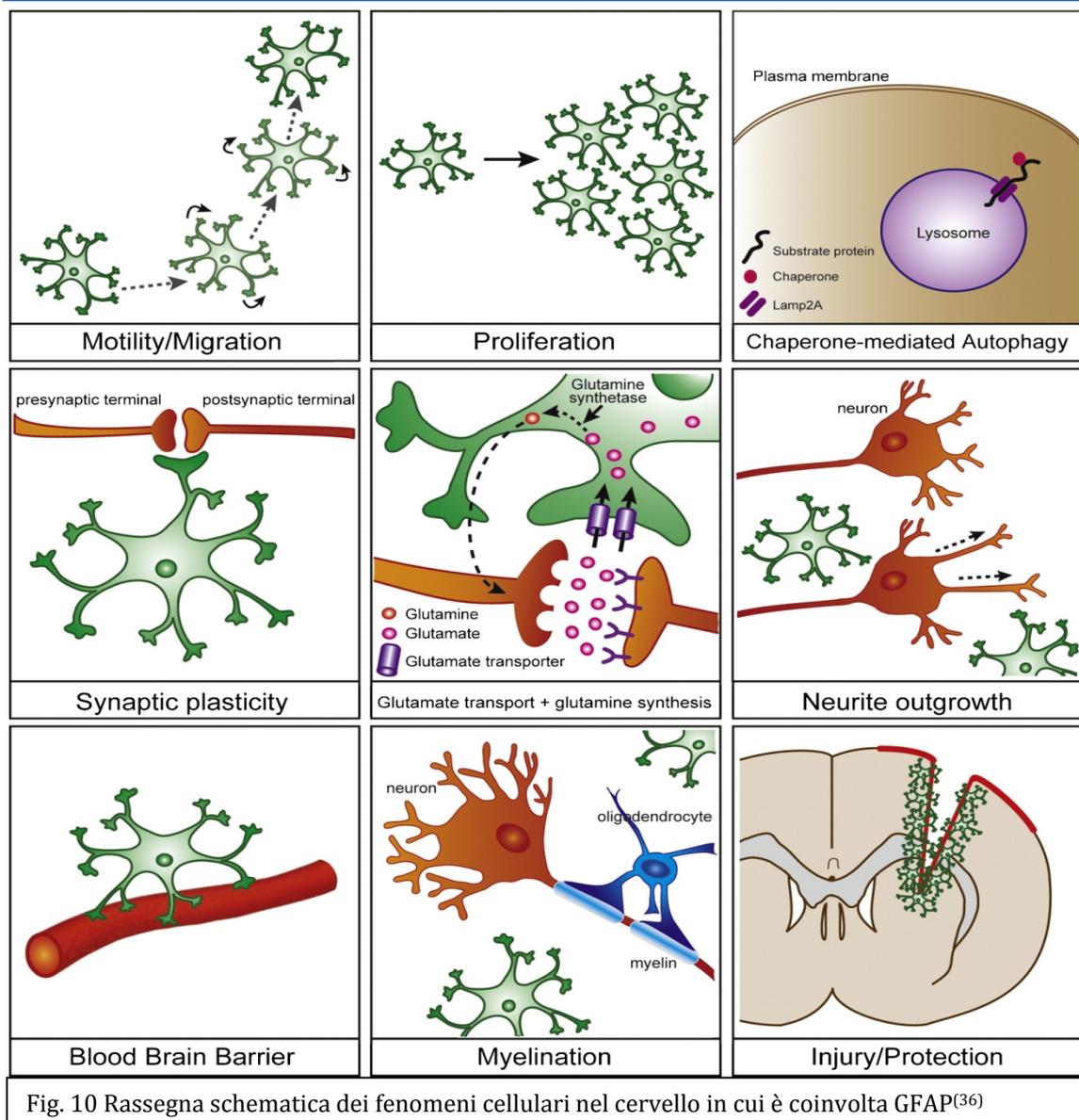
La Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) è la principale proteina dei filamenti intermedi (IF) di tipo III del SNC e infatti è un marcatore comune degli astrociti maturi e della glia radiale. Negli ultimi dieci anni, tuttavia, è stata riportata espressione di GFAP al di fuori del SNC, non solo nella glia del SNP ma anche in cellule non appartenenti al tessuto nervoso come fibroblasti, condrociti, cellule mioepiteliali, linfociti e cellule stellate del Kupffer⁽³⁶⁾.

La GFAP ha dimensioni di 8-12nm, ed è composta da tre domini: testa N-terminale, bastoncino centrale (altamente conservato), coda C-terminale. La sua espressione è finemente regolata da un promotore con un'organizzazione molto complessa, in cui alla regione responsabile dell'espressione basale si affiancano

numerosi siti di legame per fattori di trascrizione differenziale. Nel sistema nervoso in sviluppo, GFAP è espressa nelle NSC della zona ventricolare⁽¹³⁾ e il suo grado di espressione aumenta gradualmente con il procedere della differenziazione degli astrociti, fino a che i livelli di GFAP non eccedono quelli di Vimentina, la principale proteina degli IF nel cervello embrionale. Con l'invecchiamento si è dimostrato un aumento dell'espressione di GFAP causato dall'incremento del tasso di trascrizione piuttosto che del numero di cellule astrocitarie, le quali tuttavia hanno dimensioni maggiori. Questo fenomeno, conosciuto come gliosi reattiva, è un biomarcatore dell'invecchiamento nel cervello di mammifero: esso è un fenomeno fisiologico che ha inizio al raggiungimento del pieno sviluppo dell'animale e sembra causato dal danno ossidativo⁽³⁷⁾.

Fermo restando il ruolo chiave della GFAP nel mantenimento dell'integrità del network degli IFs negli astrociti, è stato dimostrato il suo coinvolgimento in molti altri processi cellulari che sono di seguito elencati⁽³⁶⁾(Fig. 10):

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



1.4.2. S100 β

Le proteine S100 rappresentano la più grande famiglia proteica all'interno della super-famiglia delle Ca^{2+} -binding proteins contenenti il dominio EF [dominio con struttura a helix-loop-helix in grado di legare uno ione Ca^{2+}].

La famiglia S100 si è evoluta solo recentemente con la comparsa dei vertebrati (non è possibile trovare geni omologhi nel genoma degli invertebrati). Nell'uomo si trovano 20 membri che condividono il 40-60% d'identità della sequenza amminoacidica mentre nei teleostei ne sono stati individuati 14 membri, di cui 8 aventi un omologo nei mammiferi⁽³⁸⁾.

Le proteine S100 sono proteine acide, secrete o citoplasmatiche, di piccole dimensioni (9-14kDa), contenenti due domini EF (uno al C- e uno all’N-terminale) non identici tra loro. Mentre il dominio C-terminale è di tipo classico, il dominio N-term ha una struttura specifica nelle proteine S100 e mostra bassa o talvolta nulla affinità di legame per il Ca^{2+} .

Le proteine S100 sono in grado agire a più livelli sia nel comparto intra- sia extra-cellulare. Si può schematizzare come di seguito il modello d’azione delle proteine S100⁽³⁹⁾ (Fig. 11):

1. Omeostasi del Ca^{2+} intracellulare con effetto sulla modulazione del signalling intracellulare dipendente dal Ca^{2+} o sul controllo dell’attività di proteine Ca^{2+} -dipendenti che sono coinvolte soprattutto nell’organizzazione citoscheletrica, nell’attività trascrizionale e nello stato di fosforilazione proteica (via chinasi);
2. Omeostasi del Zn^{2+} e Cu^+ , derivante dall’affinità delle proteine S100 anche per questi ioni metallici, che ha un ruolo importante nel prevenire la neuro-degenerazione indotta da titoli elevati di Cu^+ nel tessuto nervoso.
3. Interazione Ca^{2+} dipendente/indipendente con target proteici spesso coinvolti nella progressione del ciclo cellulare;
4. Signalling extracellulare simile alle citochine agendo sui recettori transmembrana RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products) e attivando a valle la via delle MAP chinasi o la via NF- κ B.

Le forme attive di S100 sono omo- o etero-dimeri (Fig. 11); la loro composizione in subunità è cellula- e tessuto- specifica riflettendo un pattern spaziale di espressione differenziale dei paraloghi.

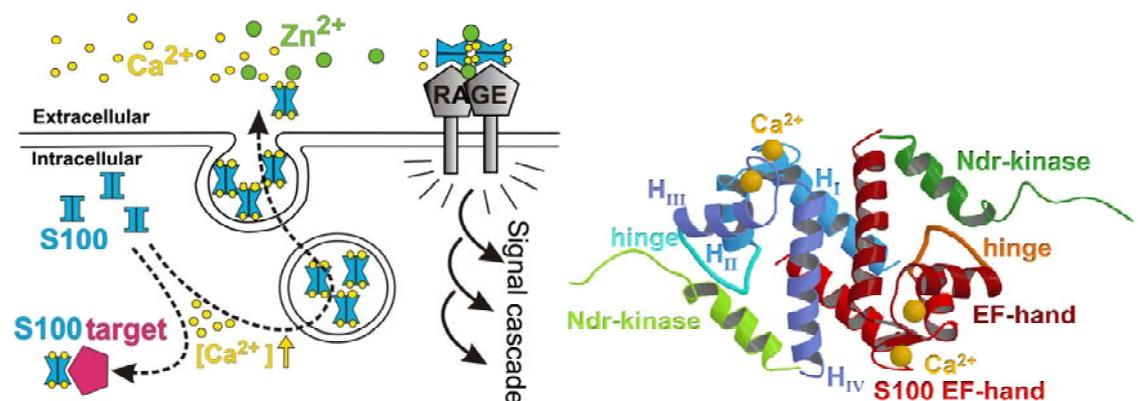


Fig. 11. a) Struttura di un omodimero S100 β coinvolto nel legame Ca^{2+} -dipendente di uno dei suoi target proteici (Ndr chinasi). b) funzioni intra ed extracellulari di S100⁽⁴⁰⁾

Il gene $s100\beta$ è espresso in una varietà di cellule e tessuti⁽⁴⁰⁾ come nel muscolo, nei vasi, nel sistema digerente, nella pelle, nel tessuto adiposo; in particolare, la sua espressione è un marker specifico delle cellule gliali del SNC (cellule dell'astroglia ma anche oligodendrociti) e del SNP (cellule di Schwann). Nel tessuto nervoso $S100\beta$ è coinvolto nell'organizzazione strutturale del citoscheletro, nello sviluppo e nella plasticità neuronale e nella crescita assonale. Inoltre è noto da tempo il suo ruolo chiave nello sviluppo del sistema nervoso attraverso la regolazione sincrona e parallela della differenziazione neurale e della proliferazione della glia al fine di mantenere questi due fenomeni in equilibrio⁽⁴¹⁾

1.4.3. Musashi1, Msh1

Le RNA-binding proteins (RBP) svolgono un ruolo di primo piano nei pathways che regolano la proliferazione e la scelta del destino cellulare. Si conoscono due principali famiglie di neural-specific RBPs: le Elav e le Musashi. Mentre l'espressione delle proteine Elav è ristretta ai neuroni post-mitotici, si è osservato che le proteine Musashi sono espresse nei progenitori neurali multipotenti proliferanti del SNC in sviluppo e nelle aNSCs e scompaiono rapidamente in seguito agli eventi di differenziazione terminale⁽⁴²⁾. Queste proteine possiedono due RNA-Binding Domains (RBD) altamente conservati all'N-terminale⁽⁴³⁾. Il primo gene appartenente alla famiglia di Musashi fu isolato in *Drosophila*, in cui è necessario affinché i precursori neuronali si dividano asimmetricamente e operino le corrette scelte differenziative. In seguito furono isolati anche gli omologhi nei vertebrati, i quali mantengono una funzione simile: in particolare *Msi1* è noto per essere un elemento chiave nel preservare la staminalità dei progenitori neurali indifferenziati e regolare la scelta del destino differenziativo⁽⁴²⁾ (Fig. 12). *Msi1* esercita la sua funzione legando la regione 3'UTR dell'mRNA di $p21^{WAF1}$ regolando negativamente la sua espressione a livello post-trascrizionale⁽⁴⁴⁾. Questo gene codifica per un inibitore delle CdK (cyclin-dependent-kinase) e svolge un ruolo di rilievo del controllo del destino differenziativo poiché determina il timing dell'uscita del precursore dal ciclo cellulare: la repressione post-trascrizionale della sua espressione induce l'aumento, indipendente da p53, dell'attivazione dei complessi ciclina/Cdk associati alla fase S e quindi dei livelli di fosforilazione di

Rb. L'mRNA di *msi1* è a sua volta target di proteine omologhe delle Elav nel mammifero⁽⁴⁵⁾, ovvero HuB, HuC e HuD: queste legano una regione ricca in A/U presente nel 3'UTR dell'mRNA e lo stabilizzano.

Msi1 non solo regola i pathways intrinseci dei precursori ma è coinvolto anche nella regolazione delle vie estrinseche di segnalazione, in particolare Notch. L'attivazione di segnale Notch determina il taglio proteolitico del suo segmento intracellulare (Ncd) il quale agisce da coattivatore della trascrizione. Numb è un repressore della via di segnalazione di Notch poiché ubiquitina Ncd e ne ostacola la sua traslocazione al nucleo. Si è dimostrato che Msi1 è in grado di reprimere tale repressione: esso infatti lega una regione cis-agente nella 3'UTR dell'mRNA di *numb*⁽⁴⁶⁾, inibendone la traduzione. Inoltre è stata riportata la presenza di un target per il legame di Msi1 nella 3'UTR dell'mRNA di *double-cortin* (Dcx)⁽⁴⁷⁾: questo ben correla con il fatto che l'espressione di Dcx inizia solo in seguito alla scomparsa di Msi1.

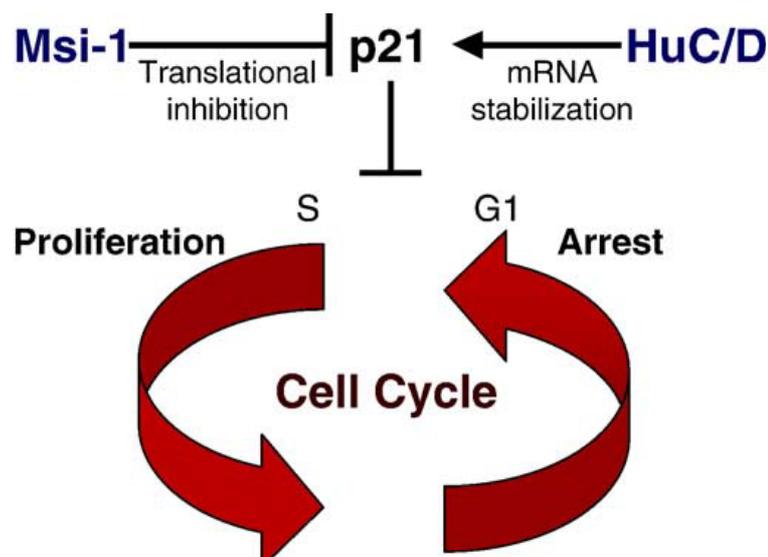


Fig. 12 Ruolo di Msi1 nel controllo del ciclo cellulare e, in conseguenza, del destino differenziativo dei precursori neurali ⁽⁴⁴⁾

1.4.4. Double-cortin, Dcx

Doublecortin (Dcx) è una proteina associata ai microtubuli. il suo significato funzionale è legato alla migrazione dei neuroblasti. Nel SNC, la sua espressione è specifica dei neuroblasti in migrazione⁽⁴⁸⁾ coerentemente con la sua funzione nell'organizzazione del citoscheletro micro tubulare. Nel SNC dell'adulto Dcx è espresso transientemente e limitatamente nelle nIPCs e nei neuroblasti; non appena

ha inizio l'espressione dei marcatori dei neuroni maturi l'immunoreattività per Dcx cala bruscamente fino a scomparire⁽⁴⁹⁾. Dcx non solo è un valido marcatore di neurogenesi, ma permette anche di quantificare il tasso di neurogenesi poiché questo correla positivamente con il suo livello di espressione⁽⁵⁰⁾.

1.5 Invecchiamento

1.5.1. Definizione e Teorie

Ogni organismo vivente possiede un'aspettativa di vita intrinsecamente limitata, ovvero sarebbe destinato a morire anche se fossero eliminate tutte le cause esterne di morte. La legge di Gompertz afferma che la probabilità di morte aumenta esponenzialmente con l'età⁽⁵¹⁾. A questo punto, è naturale interrogarsi sul significato funzionale e sui meccanismi che hanno condotto all'evoluzione dell'invecchiamento come epilogo imprescindibile della vita degli organismi. Partendo dal presupposto che l'evoluzione opera massimizzando la fitness e quindi il potenziale riproduttivo della specie, le teorie evoluzionistiche dell'invecchiamento si fondano sull'ipotesi che deve esistere un vantaggio riproduttivo derivante dall'evoluzione dell'invecchiamento. Secondo la teoria della "pleiotropia antagonista"⁽⁵²⁾, i geni responsabili dei fenomeni deleteri che si manifestano nell'individuo anziano sono gli stessi che conferiscono effetti benefici durante lo sviluppo o l'età riproduttiva. Questi geni sono stati selezionati positivamente perché la forza della selezione naturale declina con andamento sigmoidale in funzione dell'età, potendo agire efficacemente solo negli individui più giovani, prima che questi trasmettano il patrimonio genetico alla loro prole. In un certo senso la selezione naturale è estremamente attenta al contributo che deriva dall'espressione di un gene in giovane età, mentre diventa cieca agli effetti che possono essere associati all'espressione di quello stesso gene in età più avanzata. La migliore definizione d'invecchiamento lo descrive come "il deterioramento sincronizzato di tutti gli organi e apparati in conseguenza del complessivo grado di degradazione delle macromolecole principali". Questa definizione è perfettamente coerente dalla teoria del "disposable soma" o "corpo usa e getta"⁽⁵⁴⁾ per la quale esiste un intrinseco vantaggio evolutivo nell'invecchiamento. Il presupposto di base

è l'elevata spesa energetica che sarebbe richiesta all'organismo al fine di mantenere un bilancio complessivamente neutro tra degradazione e biosintesi e assicurare contemporaneamente la massima accuratezza dei pathways biosintetici. Nel quadro di risparmio energetico in cui gli organismi evolvono, una delle strategie evolutivamente più vantaggiose prevede di destinare gran parte delle risorse energetiche a accelerare lo sviluppo e promuovere la riproduzione piuttosto che alla massima accuratezza dei pathway biosintetici delle cellule somatiche, pagando però il prezzo del loro deterioramento progressivo. È possibile dimostrare che il logaritmo del tasso d'invecchiamento è inversamente proporzionale al logaritmo dell'età in cui è raggiunta la maturità sessuale, dimostrando quindi che la velocità di crescita (e invecchiamento) di un organismo deriva dal segno del rapporto (≥ 1) tra la spesa energetica investita da ciascun organismo per riuscire a riprodursi e quella pagata per mantenersi funzionale (Fig. 13).

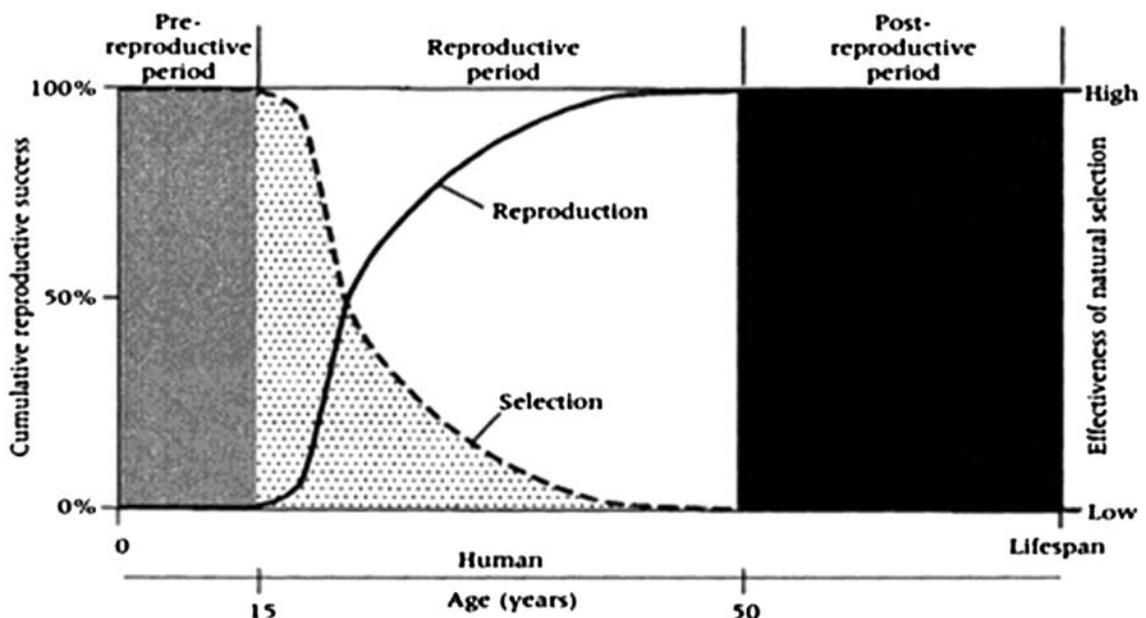


Fig. 13 Relazione tra pressione selettiva e potenziale riproduttivo in funzione dell'età.⁽⁵³⁾

In quest'ottica, l'invecchiamento appare come nient'altro che la naturale prosecuzione di fenomeni avviatisi nel corso dello sviluppo, senza perciò che sia possibile definire una soglia temporale, per così dire, un "giro di boa", in cui si passa dallo sviluppo all'invecchiamento.

Negli ultimi anni è stato definito un set di biomarcatori istologici dell'invecchiamento scelti sulla base del rispetto di alcuni parametri: i livelli di un biomarcatore devono permettere di predire fedelmente l'età biologica nell'uomo e

in altre specie animali; devono essere facilmente monitorabili; deve essere chiaro il nesso logico con i processi legati all'invecchiamento. Di seguito sono riportati i biomarcatori dell'invecchiamento riconosciuti universalmente validi:

- Diminuzione dei livelli ematici di IGF-1;
- Accumulo epatico di lipofuscina;
- Over-espressione della SA[Senescence Associated]- β -galattosidasi nella pelle;
- Riduzione delle funzioni cognitive;
- Gliosi nel cervello.

1.5.2. Effetto dell'invecchiamento sul cervello del mammifero

Le nicchie neurogeniche subiscono, come ogni altra porzione di tessuto, l'effetto dell'invecchiamento. Questo è stato bene caratterizzato nella SVZ⁽⁵⁵⁾ dove, nel topo di mezza-età, si sono riscontrate alterazioni morfo-strutturali, soprattutto a carico dello strato ependimale, e cambiamenti del tasso proliferativo e nel potenziale neurogenico delle aNSCs. Infatti, sia nella SGZ del giro dentato dell'ippocampo che nella SVZ⁽⁵⁶⁾ è stato dimostrato che la riduzione del tasso proliferativo non è causata dal calo numerico delle aNSCs ma dallo shift di queste verso uno stato di quiescenza. Infatti, per preservare l'attività delle aNSCs nel corso della vita adulta e dell'invecchiamento è necessario mantenere un rigido equilibrio tra i pool di precursori attivi e quello dei precursori quiescenti, poiché si previene l'esaurimento del potenziale neurogenico dovuto a un'eccessiva neurogenesi. Inoltre le aNSCs sembrano diminuire la loro recettività agli stimoli differenziativi. Questi eventi si sommano alla gliosi reattiva (descritta in §1.4.1), fenomeno diffuso al tutto il SNC.

1.6. *N. furzeri* come modello animale dell'invecchiamento

Il recente interesse per i pathways molecolari e metabolici, nonché per i fattori genetici e epigenetici, che controllano il decorso dell'invecchiamento ha sollevato l'esigenza di disporre di un opportuno modello animale di vertebrato. I primi studi furono condotti in *C. elegans* (anellide-invertebrato) e in *D. melanogaster* (insetto-vertebrato) ma questi si dimostrarono modelli non adatti allo scopo di traslare i risultati sull'uomo: la loro anatomia è molto differente da quella umana e la presenza di sole cellule post-mitotiche non permette l'analisi della senescenza

replicativa. Si è quindi cercato un modello animale specifico e ottimale per lo studio l'invecchiamento con le seguenti caratteristiche:

1. essere un vertebrato con un life-span ridotto (pochi mesi)
2. possibilità di isolare i geni legati all'invecchiamento [*igf-1r*, *mtp*, *sirt1*, *p66shc*]
3. possedere lo stesso set di marcatori istologici [accumulo della lipofuscina, attività della β -Galattosidasi Associata all'invecchiamento (SA- β Gal)] e comportamentali dell'invecchiamento già caratterizzati nell'uomo (vedi §1.4).

In generale il pesce è un ottimo modello sperimentale perché può essere stoccato ad alta densità, produce un gran numero di uova che possono essere sottoposte a protocolli di transgenesi e gene-interference ed è possibile fare degli studi di mutagenesi su larga scala. I teleostei (pesci ossei) sono il gruppo di vertebrati con il numero maggiore di specie descritte. Tra questi, i pesci annuali, soprattutto quelli del genere *Nothobranchius*, stanno emergendo come i migliori modelli animali per studiare l'invecchiamento. I pesci annuali sono animali che popolano bacini idrici stagionali dell'Africa orientale. Per adattarsi alla disponibilità limitata di acqua, questi pesci hanno evoluto un ciclo vitale annuale, con uno sviluppo estremamente rapido e il raggiungimento precoce della maturità sessuale. La loro peculiarità è la capacità di produrre uova in grado di entrare in uno stato di quiescenza, detto *diapausa*, in cui gli embrioni, bloccati allo stadio di blastule post-epiboliche, sono resistenti all'essiccamento: questo permette alle uova fecondate di sopravvivere 10 mesi (e anche oltre) nel fango secco (in laboratorio la diapausa può protrarsi anche per un 1 o 2 anni) e di riprendere lo sviluppo in condizioni di disponibilità d'acqua.

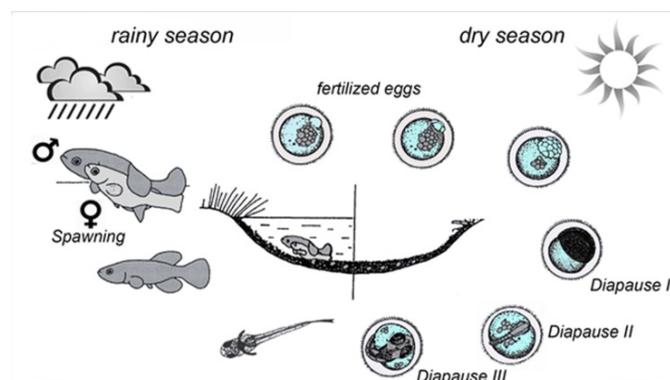


Fig.14. Ciclo vitale di *Nothobranchius furzeri* nel suo habitat naturale.

Confrontando specie diverse che popolano habitat diversi, si evidenzia una diretta correlazione tra disponibilità di acqua ed estensione del life-span^(57,58)(Fig. 15).

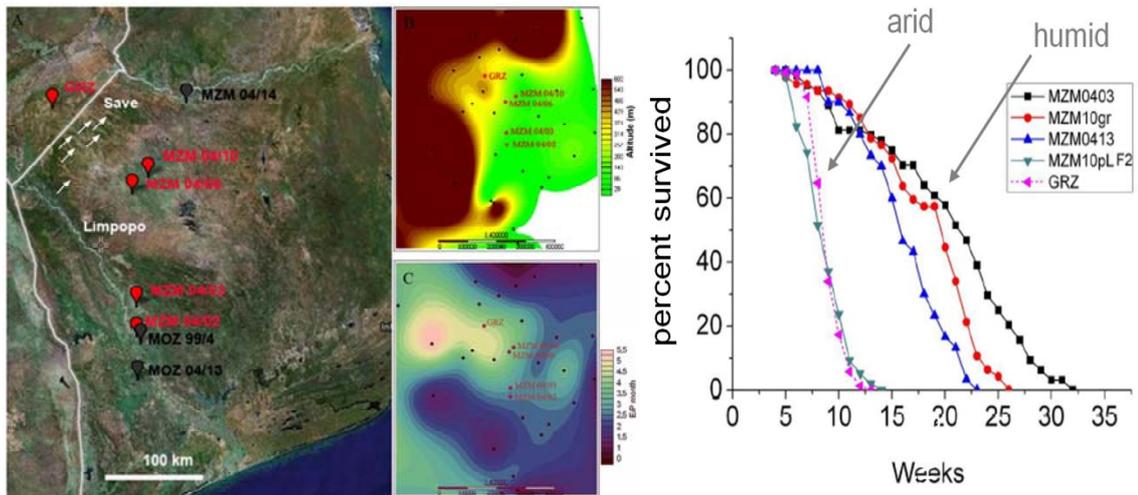


Fig.15 A) Immagine di Google Earth dove sono stati indicati i siti di raccolta degli strains B) stessa regione in una mappa altimetrica e C) in una mappa dove è riportato il rapporto evaporazione/precipitazioni negli ultimi 30 anni. D) Curve di crescita di diverse specie di *Nothobranchius* a evidenziare una diversa aspettativa di vita in funzione dell'aridità dell'habitat.

Sebbene queste specie furono caratterizzate e si dimostrò la comparsa dei marcatori istologici dell'invecchiamento⁽⁵⁹⁾ già negli anni '60 e '70, per molto tempo l'interesse per queste specie fu limitato agli hobbisti i quali ne apprezzarono il fenotipo colorato e brillante; solo recentemente la comunità scientifica ha riconosciuto il grande potenziale di questi animali nella gerontologia. Nello specifico, *Nothobranchius*, appartenente al super-ordine degli *Acanthopterygii*, ordine delle *Cyprinodontiformes*, (Fig. 16) è un genere di pesce annuale di cui si sono state descritte finora 50 specie; *Nothobranchius* deve il suo nome a una falsa branchia che si apre nell'opercolo.

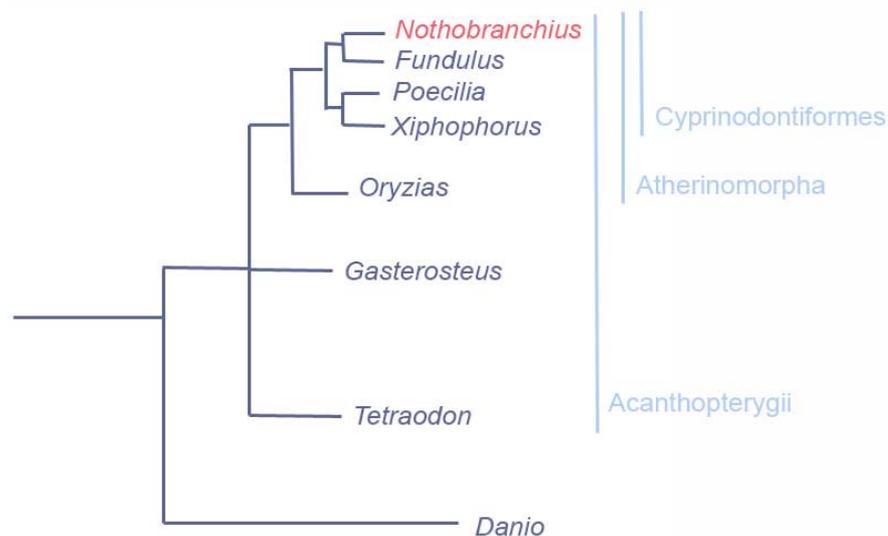


Fig. 16 Albero filogenetico dei Teleostei in cui è riportata la posizione di *N.furzeri*.⁽⁶²⁾

Queste specie sono caratterizzate da un marcato dicromatismo e dimorfismo sessuale, con maschi intensamente colorati e femmine prive di un fenotipo specie-specifico: la classificazione si basa infatti sul fenotipo cromatico degli esemplari di sesso maschile⁽⁶⁰⁾. Le dimensioni degli animali sono limitate [media di 5cm; range 4cm-15cm] (Fig. 17).

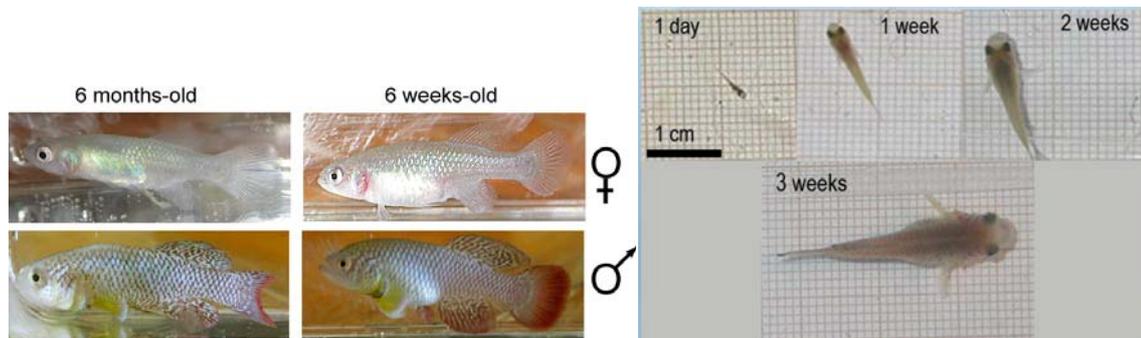


Fig. 17 a) dicromatismo e dimorfismo sessuale nell'esemplare vecchio e in quello giovane. b) crescita esplosiva dall'avanotto al pesce giovane.

La specie *N. furzeri* vive nelle valli dello Zimbabwe, in una zona semi-arida: negli ultimi sono stati collezionati in loco nuovi esemplari di animali dai quali si sono stabiliti diversi ceppi di laboratorio. Lo sviluppo di questa specie è il più rapido finora descritto nei vertebrati (Fig. 18) ed è coerente, per quanto descritto in §1.5.1., con il fatto che *N. furzeri* sia la specie animale con il life-span più limitato a oggi noto (Fig. 18).

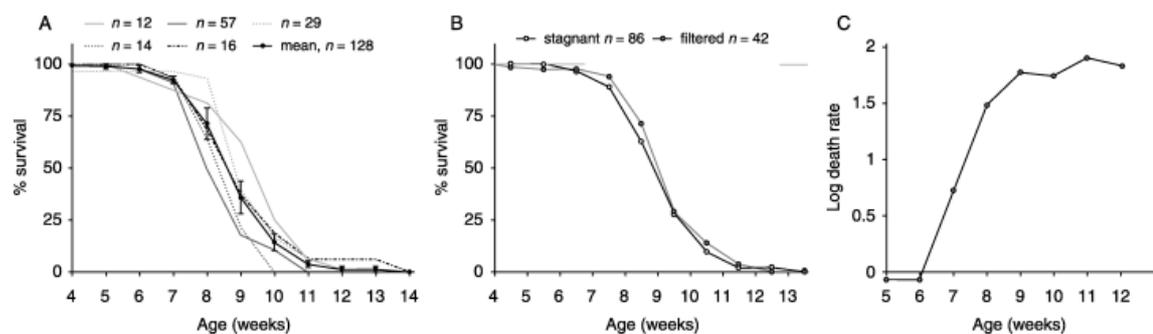


Fig. 18 *Nothobranchius furzeri* (ceppo Gona-re-Zhou). A, B) curve di sopravvivenza. In diverse condizioni di laboratorio l'aspettativa di vita rimane molto limitata (~11 wks). C) curva della mortalità in funzione dell'età.

Inoltre è stato dimostrato che con l'invecchiamento, questo pesce mostra tutti i biomarcatori già caratterizzati negli studi sul mammifero⁽⁶¹⁾.

Sfruttando la vicinanza filogenica di *N. furzeri* con le specie *Orizyas latipes* (anche noto come Medaka) e *Takifugu rubripes* (Fugu o pesce palla), di cui è già stato

sequenziato il genoma, si sono già ottenute le sequenze di alcuni tra i principali geni associati all'invecchiamento, mentre il genoma completo di *N. furzeri* è in corso di pubblicazione da parte di un gruppo del Leibniz Institute for Age-research di Jena. Queste peculiarità rendono perciò *Nothobranchius furzeri* un modello ottimale per studi, a vari livelli, sull'invecchiamento.

2. Scopo dello studio

Oggetto del mio studio è stata l'analisi immunohistochimica della presenza di specifici marcatori di cellule gliali [Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP), S100 β], precursori neurali [Musashi1 (Msh1)] e neuroni neo-differenziati [Double-cortin (Dcx)] nel cervello di *N. furzeri*.

Al fine di valutare l'effetto dell'invecchiamento sulla neurogenesi nell'adulto sono stati posti a confronto i pattern di marcatura in cervelli di individui giovani (5wks, corrispondenti a ~15% del life-span) e di individui vecchi (25wks, corrispondenti al ~85% del life-span).

La mia attenzione si è focalizzata nello specifico sull'analisi di due aree cerebrali:

1. il Tetto Ottico: zona mesencefalica caratterizzata dalla permanenza, nell'adulto, di una zona di proliferazione germinale di origine neuroepiteliale;
2. il Telencefalo: area analoga alle regioni del cervello di mammifero in cui è stata dimostrata la presenza di nicchie neurogeniche.

Inoltre ho cercato di riprodurre anche in *N. furzeri* i dati ricavati in zebrafish e riportati da März et al. ⁽⁶⁸⁾. In individui di 11 wks (~35% life-span) ho cercato le zone di attiva proliferazione cellulare e osservato la loro associazione con markers gliali al fine di offrirne una parziale caratterizzazione.

3. Materiali e Metodi

3.1. Animali: linee, condizioni di crescita e riproduzione

Lo studio è stato condotto su animali *N. furzeri* appartenenti allo strain MZM-04/10: i capostipiti di questa linea sono esemplari di *N.furzeri* collezionati nel 2004 in Mozambico. Il nome dello strain indica data e luogo di raccolta: MoZaMbico, 2004, località n°10 (Chefu). Questo strain ha un'aspettativa di vita massima di 50 settimane.

Gli animali sono stati allevati a 28°C in acqua acquario, ovvero non addizionata con antimicrobici. Non ci sono condizioni limitanti per il valore di pH che può variare tra 6 e 8. L'acquario è composto da vasche (capacità ~100l) tra loro comunicanti: i singoli gruppi di animali sono tenuti separati dall'uso di filtri spugnosi che permettono unicamente il passaggio di acqua e non di cibo o pesci. Questi animali mal tollerano sistemi con ricircolo d'acqua a flusso forte come quelli usati per l'allevamento di zebrafish e perciò sono stati tenuti in vasche con moderato ricircolo d'acqua in cui il flusso è generato da una pompa ad aria attraverso filtri spugnosi e canalicchi. I residui di cibo sono stati rimossi manualmente ogni mattina: questo permette anche un parziale (~25%) rinnovamento dell'acqua dell'acquario. La densità degli animali per vasca è stata mantenuta intorno ai 100 larve o 10 individui adulti.

Un diverso regime alimentare è stato adottato per le larve e per i pesci adulti.

Le larve sono state nutrite due volte al giorno con nauplii di *Artemia* fresca (2 ml per 30-50 larve): nella prima settimana la dieta è composta da larve di *Artemia* mentre nelle successive due settimane (individui a 2-3 wks) l'*Artemia* è arricchita con microperle ($\varnothing=50\mu\text{m}$) contenenti estratti proteici e acidi grassi insaturi, al fine di sostenere in modo migliore l'esplosivo tasso di crescita. Le cisti disidratate di *Artemia* sono quotidianamente poste a schiudere per 24h in 1l circa di acqua a concentrazione salina del 20% con O₂ rigogliante. Al termine della schiusa si lascia decantare e quindi si eliminano le cisti non schiuse che si sono sedimentate nel fondo e i gusci che galleggiano in superficie. Si filtra perciò solo la parte centrale della colonna d'acqua (dove si trova l'*Artemia* vivente): una parte, pronta per l'uso

immediato, viene risciacquata e risospesa in acqua al fine di eliminare i residui di sale mentre una parte viene posta per ulteriori 24h in una seconda bottiglia da 500ml di acqua al 40% di sale con aria rigogliante e mezza capsula arricchente. L'*Artemia* di buona qualità si riconosce per il vivo colore arancione delle larve e per il loro alto grado di motilità. Spesso si sfrutta la fototropia dei naupli per separarli più efficacemente dalle cisti non schiuse.

Gli animali adulti sono stati nutriti con larve congelate del genere *Chironomus*: la quantità di cibo necessaria è quella consumata dai pesci nei primi 10-15 minuti. Lo svezzamento delle larve avviene nella terza settimana d'età (18-19° giorno) aggiungendo alla normale quantità di *Artemia* arricchita delle quantità crescenti di *Chironomus* tritato: questo regime viene mantenuto fino alla quinta settimana d'età sebbene già a partire dalla quarta settimana i pesci si nutrano esclusivamente di *Chironomus* (Fig. 19).



Fig.19 a) Sistema di schiusa dell'*Artemia*. Ogni bottiglia (forma conica, capacità = 500ml) è fornita di un tubo di areazione collegato a una pompa ad aria e di un rubinetto sul fondo. b) Ciclo vitale dell'*Artemia*. c) *Artemia* schiuse in un becker, pronta per l'uso. d) Larve del genere *Chironomus*.

Gli individui sessualmente maturi hanno bisogno di un substrato adeguato per deporre e fertilizzare le uova: in cattività in genere si usa la sabbia come sostituto del substrato naturale. Al pieno della maturità sessuale, per avere una grande quantità di uova deposte, è sufficiente porre nella vasca un piccolo contenitore con 1 cm di spessore di sabbia posta con una frequenza di due volte a settimana per 48h. Dopo la deposizione delle uova, la vaschetta con la sabbia viene passata in un filtro a maglie in grado di trattenere e separare le uova dalla sabbia. Le uova fertilizzate sono raccolte e poste equi-distanziate in piastre Petri (circa 70 uova/piastra) sopra a uno strato di torba leggermente umida. Le Petri sono chiuse e sigillate con l'ausilio di parafilm, in modo da mantenere stabile il microambiente e sono quindi conservate a temperatura ambiente fino al raggiungimento di un certo

grado di sviluppo. Con torba s'intende materiale organico decomposto formato da foglie e ramoscelli di muschio, erica e felci: a causa della presenza di acidi deboli organici la torba ha un elevato potere acidificante e perciò è necessario bollirla più volte prima dell'uso.

La prima settimana dopo la raccolta è un periodo critico in cui occorre un monitoraggio stretto delle piastre. Circa il 50% delle uova non sopravvive e forma delle muffe: queste uova devono essere rimosse altrimenti priverebbero di ossigeno le rimanenti sane, danneggiandole.

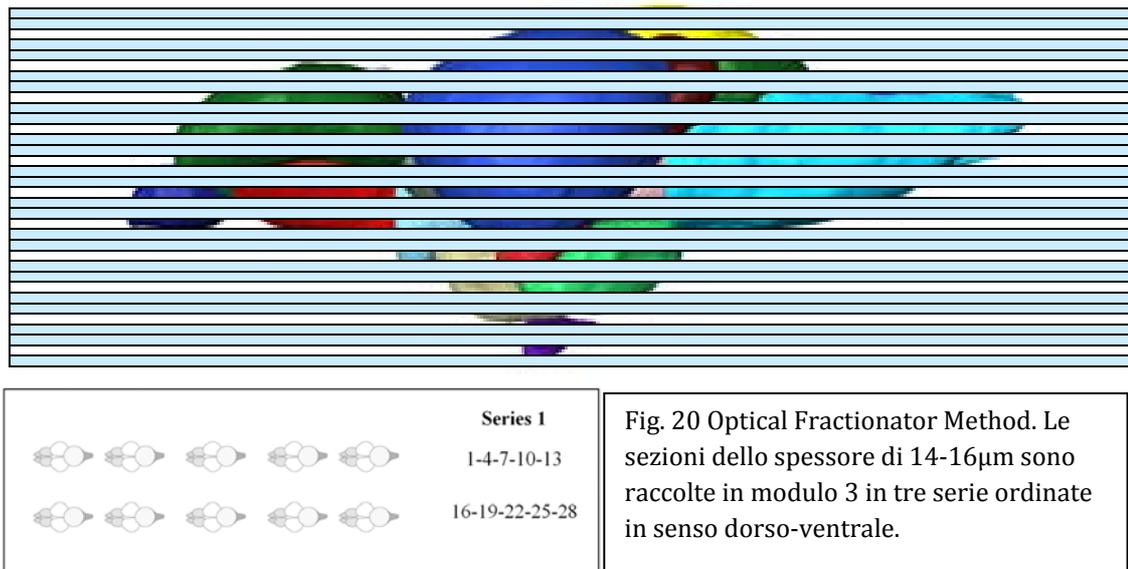
Le uova pronte alla schiusa sono riconosciute in base a due segni identificativi:

1. occhi iridati (blu/oro) in grado di rispondere agli stimoli luminosi;
2. aumento della frequenza cardiaca (+20 battiti/min) allo stimolo luminoso.

Si procede alla schiusa delle uova mature ponendole, insieme alla torba in cui si sono sviluppate, in un piccolo contenitore con 2-3 cm di acqua fredda (18°C): il ridotto spessore dell'acqua è necessario affinché gli avanotti riescano a emergere e gonfiare correttamente la vescica natatoria. Con il procedere della schiusa (24-36 h) le larve devono essere prelevate, poste in una nuova vaschetta e subito nutrite con *Artemia*.

3.2. Istologia

Pesci a 5, 11, 25 settimane (wks) sono stati uccisi con MS-322 e raffreddati in ghiaccio per 5 min prima della dissezione. I cervelli estratti sono stati fissati immergendoli per 24h in para-folmaldeide 4%/tampone fosfato 0,1M pH7,4. Per assicurare la crio-protezione, i tessuti sono stati prima lasciati O/N in saccarosio al 25% e poi inclusi in un mezzo di crio-inclusione analogo al TissueTek, il "Neg50" [Thermo scientific], e quindi congelati a -80°C. Sezioni orizzontali dello spessore di circa 14-16µm sono state ottenute al criostato e conservate su vetrini portaoggetto a -20°C. Le sezioni sono state raccolte seguendo i criteri dell'Optical Fractionator Method⁽⁶³⁾ (Fig. 20). Su uno stesso vetrino è stata posta una sezione ogni tre in modo da avere 3 serie di sezioni ordinate in senso dorso-ventrale, non contigue tra loro ma in grado di riprodurre con buona fedeltà l'intera struttura del cervello.



3.3. Immunoistochimica

Le criosezioni, poste su vetrino portaoggetti e conservate a -20°C , sono state essiccate in un fornello a 37°C per 2h al fine di ottimizzare la loro adesione al vetrino. L'area minima di reazione è stata in precedenza delimitata con l'uso di una Pap Pen permettendo di definire dei pozzetti e quindi di ridurre la quantità di reagenti necessaria. Le sezioni sono state re-idratate e i residui di mezzo d'inclusione sono stati rimossi con tre lavaggi in PBS (Sigma) di 3-5 minuti l'uno. Per saturare tutti i siti d'immunoreattività aspecifica è stata preparata una Blocking solution [BSA (Sigma) 5%, Triton X100 (Sigma) 0,3%, PBS], 300-500 μl /vetrino e incubata 2h a temperatura ambiente (RT, Room temperature). Al termine dell'incubazione la Blocking solution è stata rimossa senza ulteriori sciacqui ed è stata quindi applicata una opportuna diluizione di anticorpo primario (AbI°) [AbI° 1:X, TritonX100 (0,1%), BSA (1%), PBS]. In Tab1 sono riportate le specifiche, le diluizioni e le condizioni di reazione Ag/Ab per ogni singolo AbI° . Queste rappresentano ottimizzazioni delle indicazioni delle varie case produttrici che si riferiscono alla immunoreattività degli Ab in *Danio rerio* e non in *Nothobranchius*. L' AbI° non legato o in eccesso è stato rimosso al termine della reazione con sciacqui in PBS [3 x 3-5min]. Quindi la presenza di AbI° legato all'antigene è stata rivelata procedendo a incubare con soluzioni di AbII° anti IgG coniugato ad un opportuno fluorocromo: gli AbII° usati in questo studio sono stati AlexaFluor488-

aconiglio, AlexaFluor488- α topo, AlexaFluor568- α coniglio, AlexaFluor568- α topo (tutti Invitrogen). Gli AbII° sono stati tutti usati a una diluizione di 1/400 in una miscela identica a quella descritta per l'AbI° e incubati 2h a 4°C. Le sezioni sono state risciacquate con PBS [3 x 3-5min] e sono quindi pronte a una nuova reazione d'immunoistochimica, ad una rivelazione di EdU oppure ad essere montate. Il mezzo di mounting usato era a base di acqua contenete il marcatore nucleare DAPI [4',6-diamidino-2-fenilindolo].

Tab.1 Lista degli anticorpi usati nello studio

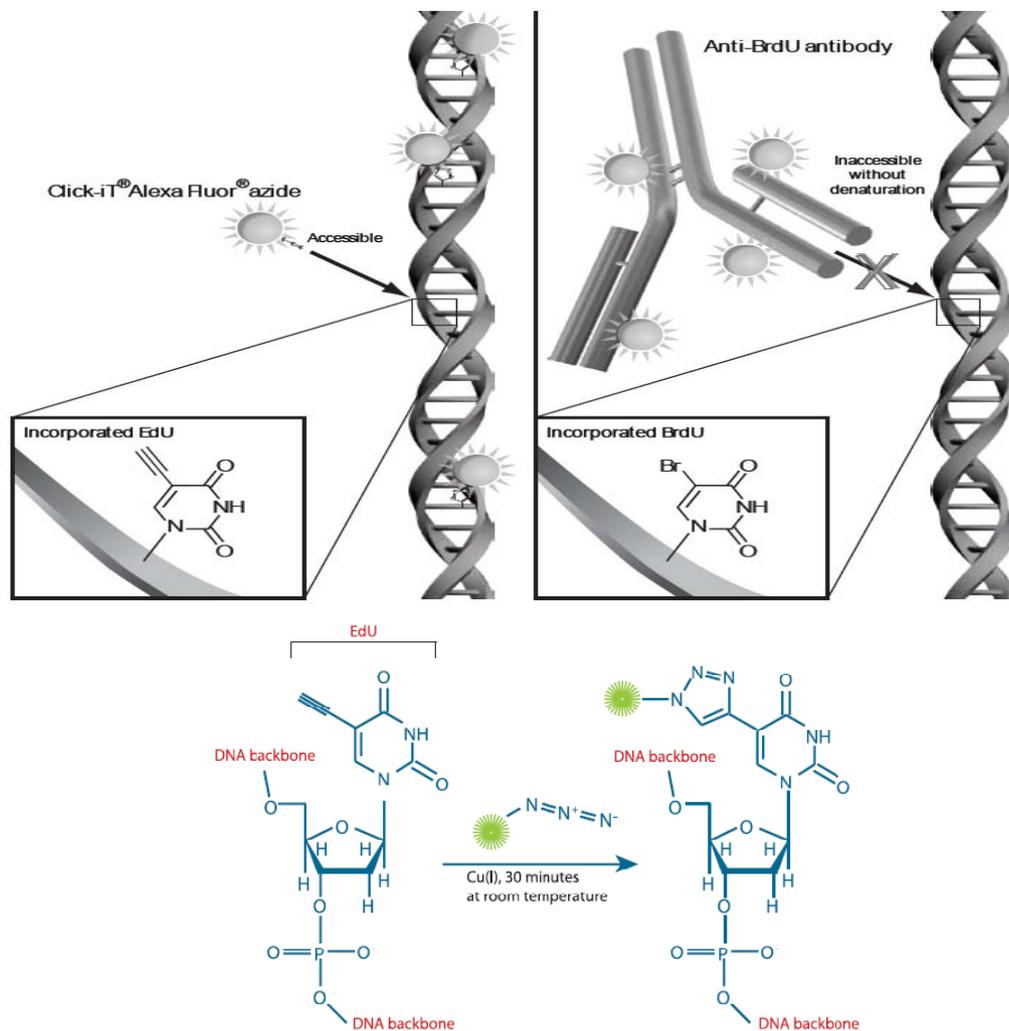
Specificità antigenica	Fonte	Origine	Diluizione	Condizioni di reazione
S100	Dako	Policlonale coniglio (Rp)	in 1:400	24h, 4°C
Musashi1 (Msh1)	CellSignalling	Monoclonale coniglio (Rm)	in 1:100	48h, 4°C
Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP)	Sigma	Monoclonal topo (Mm)	in 1:400	24h, 4°C
Doublecortin (Dcx)	AbCam	Policlonale coniglio	in 1:200	48h, 4°C

3.4. Saggio EdU

Il Click-iT® EdU HCS Assay (Invitrogen) (Fig.21) è un saggio innovativo e di qualità superiore a quelli tradizionali per la rivelazione di DNA di nuova sintesi. L'EdU [5-ethynyl-2'-deoxyuridine] è infatti un analogo della timidina in cui il gruppo 5-metile è stato sostituito da un gruppo 5-etinile. La marcatura con EdU permette di identificare specificamente le cellule che si trovano in fase S al momento della somministrazione di EdU: infatti queste incorporeranno l'analogo nucleotidico nel filamento di nuova sintesi e potranno poi essere rivelate. La rivelazione si basa sulla reazione, catalizzata da Cu(I), tra il gruppo etinile dell'EdU e un azide coniugato ad fluoroforo, nel nostro caso Alexa488. Questo saggio, sebbene

concettualmente identico alla classica marcatura con BrdU, offre numerosi vantaggi: il minor ingombro sterico dell'azide rispetto all'anticorpo anti-Br rinnova la necessità di agire in condizioni di denaturare il DNA con trattamenti ad alte temperature, HCl, DNasi che spesso causa alterazioni citomorfologiche; l'uso di una reazione chimica invece di una reazione antigene-anticorpo elimina problemi di cross-reattività tra l'anticorpo anti-Br ed altri antigeni tissutali o tra altri anticorpi e il BrdU; il numero ridotto di passaggi diminuisce il tempo richiesto per il saggio di proliferazione; l'uso di specie bioortogonali permette di avere alti livelli un elevato grado di sensibilità e un basso segnale di background.

EdU è stato iniettato e rivelato solo su animali a 11wks.



 Fluorescent dye or hapten

Fig. 21. a) Reazione tra il gruppo etinile dell'EdU e l'azide coniugata al fluoroforo AleFluo488
b) Confronto tra la reazione di rivelazione di EdU e di BrdU. Si noti come il minor ingombro sterico dell'azide rispetto all'anticorpo anti-Br elimini di fatto l'esigenza di denaturare il DNA.

3.3.1. Iniezione di EdU

Nella prima mattinata (h 8-10) I pesci, intenzionalmente lasciati a digiuno, sono stati rimossi dalle vasche e posti su un letto di carta assorbente bagnata e quindi iniettati intraperitonealmente con EdU in soluzione acquosa. A ogni animale sono stati iniettati 10 μ le e quindi 8 μ g EdU/g di p.c ([EdU]=10mM, il PM_{EdU} =252,22 Da, peso corporeo medio=2-3g/animale). Per le iniezioni sono state usate delle classiche siringhe “Hamilton microliter”. Dopo l’iniezione gli animali sono stati di nuovo liberati nelle vasche per il tempo necessario a metabolizzazione della EdU e poi sacrificati dopo 4h (4hours post injection, hpi).

3.3.2. Rivelazione di EdU

L’EdU è stata rivelata seguendo il protocollo standard della casa produttrice (Invitrogen). Poiché la rivelazione EdU è stata realizzata su sezioni precedentemente sottoposte a protocolli di immunoistochimica i passaggi di lavaggio e permeabilizzazione sono stati tralasciati in quanto già eseguiti. Le sezioni sono state incubate per 30 min con una soluzione fresca (preparata nei 15 minuti immediatamente precedenti il saggio) di EdU staining solution [CuSO₄ 4mM, Click-iT® EdU reaction buffer (con DMSO), Click-iT® EdU buffer additive, Alexa Fluor® coniugato ad azide]. Quindi le sezioni sono state lavate 2x5min nella washing solution (BSA3% in PBS) e 2x5min in PBS. Successivamente si è proceduto al montaggio dei vetrini con un balsamo contenente DAPI per la visualizzazione dei nuclei.

3.5. Microscopia

Le immagini per l’analisi qualitativa sono state acquisite con microscopio a epi-fluorescenza [Zeiss Axio Scope] a vari ingrandimenti (100x, 200x, 400x).

Le immagini per l’analisi quantitativa e Dcx sono state acquisite con microscopio confocale [Leica TCS SP2] a un ingrandimento 200x. Per eliminare problemi di fluorescenza del fluorocromo AlexaFluor568 anche a λ_{exc} =488nm, i due canali sono stati acquisiti separatamente ma sequenzialmente. Per ogni sezione sono stati raccolti 6÷8 piani ottici con un passo di 1 μ m, line average 8.

3.6. Analisi dell'immagine e quantificazione

L'analisi d'intensità di fluorescenza è stata condotta con un metodo semiquantitativo sulle sezioni doppiamente marcate GFAP-S100 di animali giovani (5wks) e vecchi (25wks). Innanzitutto le immagini sono state acquisite sequenzialmente nei due canali [$\lambda_{exc}=568\text{nm}$ per GFAP, $\lambda_{exc}=488\text{nm}$ per S100] mantenendo i parametri di acquisizione fissi a ogni successiva acquisizione (ingrandimento, apertura del pinhole, fotomoltiplicatore, intensità del laser, ect.). Dopo l'acquisizione, i segnali di auto-fluorescenza causati dalla presenza di eritrociti sono stati rimossi manualmente con l'ausilio di Gimp 2.6 [GNU Image Manipulation Programme]. Gli eritrociti possono essere inequivocabilmente identificati per la loro forma nucleata e la disposizione in fila nei capillari sanguigni. Le immagini finali sono state ottenute e analizzate usando ImageJ. Le sezioni ottiche sono state ricomposte facendo delle proiezioni lungo l'asse z (projection type: Standard Deviation). La quantificazione è stata condotta valutando la percentuale relativa di area con un'intensità di fluorescenza sopra soglia. Questa soglia è stata opportunamente stabilita in modo tale da considerare solo il segnale specifico ed eliminare il rumore di fondo. In questo passaggio l'intensità luminosa non assume più valori in un range continuo di scala di grigi ma segue un codice binario per cui a ogni pixel con intensità sotto-soglia è attribuita intensità nulla ($I=0$) mentre quelli con intensità sopra-soglia sono trasformati in pixel a intensità massima ($I=1$). Due diverse soglie sono state scelte per il segnale di GFAP e S100 a causa della diversa luminosità nei due canali. L'area d'interesse nell'immagine è stata selezionata manualmente usando gli stessi criteri anatomici per tutte le sezioni da analizzare (Fig. 22). La stessa selezione è stata quantificata nei due canali e quindi è stato calcolato il rapporto $\%area\ sopra - soglia\ GFAP / \%area\ sopra\ soglia\ S100$.

L'indagine è stata condotta su tre sezioni ($n=3$) per ciascun animale ($n=4$) di ogni categoria di età (giovani=5wks, vecchi=25wks). Le sezioni analizzate sono state scelte in modo che il piano di taglio corresse parallelo ai processi delle cellule gliali dell'OTc.

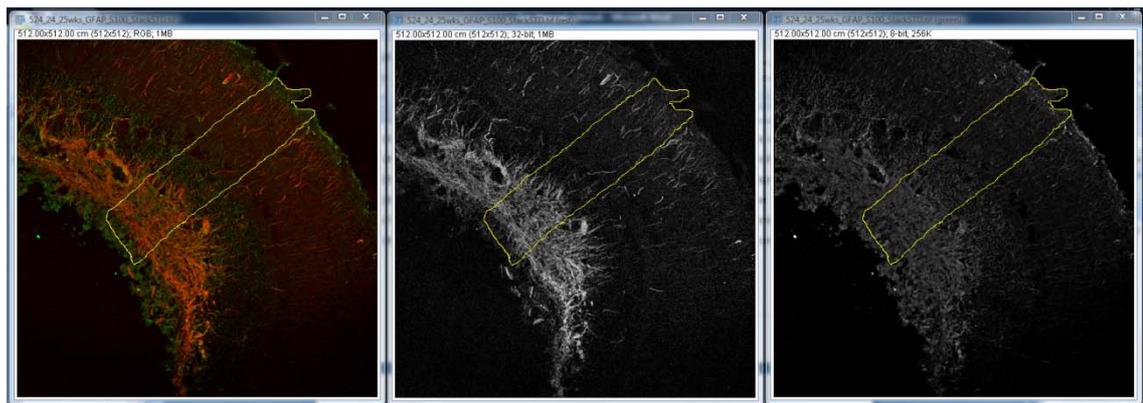


Fig. 22. La proiezione lungo l'asse z è stata separata nei due canali e la stessa area è stata selezionata per quantificare la percentuale di pixel con intensità di segnale soprasoglia.

3.7. Allineamento delle sequenze e costruzione degli alberi filogenetici

L'analisi del grado di divergenza dei markers proteici è stata condotta con l'ausilio del programma MEGA5 [Molecular Evolutionary Genetics Analysis]⁽⁶⁴⁾. Le sequenze aminoacidiche delle proteine nelle altre specie, ove disponibili, sono state acquisite dal browser pubblico Ensembl. Le sequenze aminoacidiche di *N.furzeri* sono state ricavate dalle sequenze nucleotidiche di cDNA concesse dal FLI-Leibniz Institute for Age Research: ogni sequenza di cDNA è stata analizzata per la presenza di ORF con il programma on-line "OrfFinder" messo a disposizione dall'*NCBI*⁽⁶⁵⁾.

Gli allineamenti sono stati ottenuti con il programma ClustalW (parametri standard di allineamento). Per ottenere una più precisa conferma della specificità della reazione anticorpo/antigene, sono state allineate le sequenze delle proteine di *N. furzeri* rispetto a quelle delle proteine immunogene (indicate dalle case produttrici degli anticorpi) ed è stato valutato il numero di siti amminoacidici conservati.

Gli alberi filogenetici sono stati realizzati a partire dalle sequenze precedentemente allineate e quindi elaborate con il metodo Maximum Likelihood che, basandosi sull'uso delle matrici Jones-Taylor-Thornton⁽⁶⁶⁾, mostra l'albero con la maggior probabilità di esser verosimile. Quando il numero di siti comuni era minore di 100 o comunque del 25% del numero di siti totali, è stato usato il metodo di massima parsimonia; altrimenti è stato usato il metodo BIONJ con una matrice di distanza

MCL. Una distribuzione discreta Gamma è stata usata per modellizzare la velocità di evoluzione tra siti diversi (5 categorie, il modello consentiva la presenza di alcuni siti invariabili). Gli alberi sono stati costruiti in scala, con la lunghezza dei bracci proporzionale al numero di sostituzioni per sito. Le posizioni contenenti più del 90% di gap e dati mancanti sono state eliminate.

4. Risultati

4.1. Neurogenesi

4.1.2. Neurogenesi nel Telencefalo

Nel 2010 März et al. ⁽⁶⁷⁾, nel corso di studi sulla neurogenesi nell'adulto di *D. rerio*, hanno classificato le cellule del telencefalo coinvolte nella neurogenesi in quattro tipi principali (I, II, IIIa, IIIb) sulla base della loro morfologia e dell'espressione di set specifici di markers (Fig. 23). Questi diversi tipi cellulari si differenziano anche per la lunghezza del loro ciclo cellulare: questo fornisce una spiegazione razionale all'osservazione che aree del telencefalo in cui alcuni tipi di progenitori sono maggiormente rappresentati rispetto agli altri si differenziano per grado proliferativo e neurogenico.

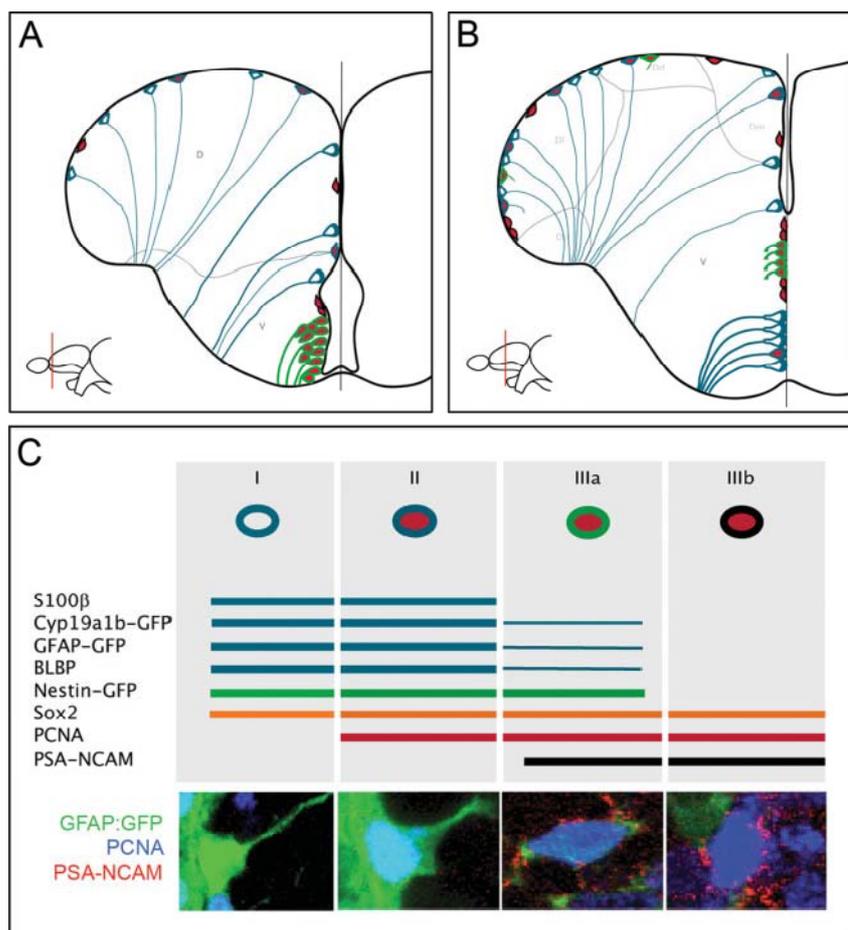


Fig. 23 Espressione dei markers in relazione al tipo cellulare nella zona ventricolare del telencefalo. Sezioni coronali a livello più rostrale (A) e più caudale (B). Schema dell'espressione differenziale ⁽⁶⁷⁾

Il cervello di *N. furzeri* adulto (11wks) è stato quindi studiato al fine di validare o meno questo modello di neurogenesi. Come negli altri teleostei finora studiati, anche in *N. furzeri* la proliferazione cellulare nel SNC persiste durante tutto il life-span dell'animale e interessa nicchie distribuite lungo l'intero asse rostro-caudale (Fig. 24).

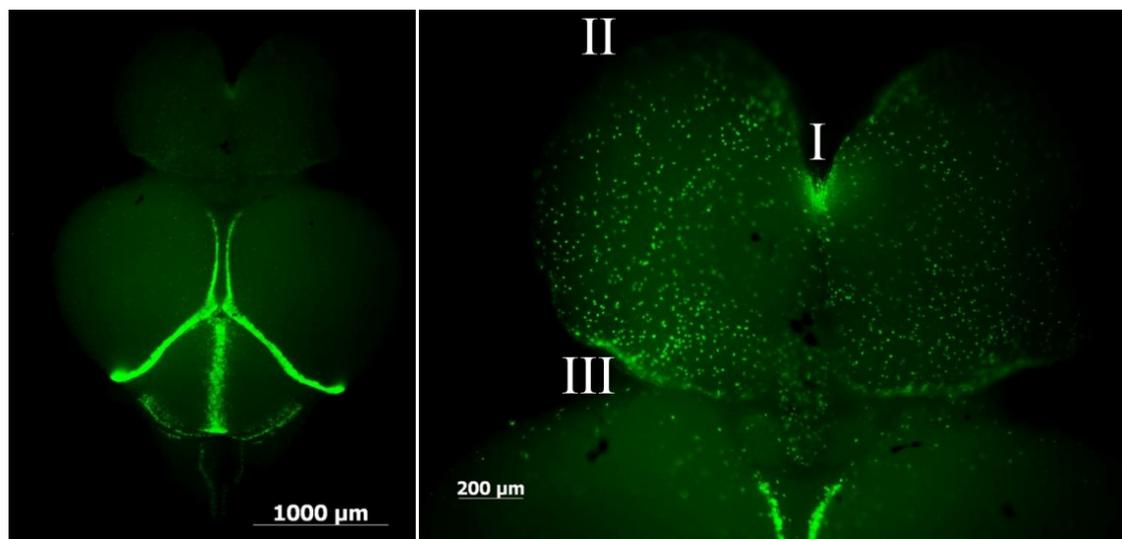


Fig. 24 Proliferazione cellulare nel cervello di *N. furzeri* adulto (). Marcatura whole-mouth con EdU, 4hpi [Terzibasi, 2011. Dati non pubblicati].

Pur non riproducendo integralmente gli esperimenti condotti su zebrafish, si è scelto di abbinare la marcatura con S100 β , specifica per le cellule gliali, alla marcatura con EdU, incorporata dalle cellule attivamente ciclanti, al fine di valutare il pattern spaziale e l'eventuale co-localizzazione dei due segnali.

Nel telencefalo *N. furzeri* adulto è stato così possibile evidenziare tre diverse aree proliferative (EdU⁺).

La prima zona (area I) si trova in posizione rostro-ventrale ed è formata da cellule di entrambi gli emisferi che si affacciano sul ventricolo telencefalico: l'estensione spaziale è limitata e in sezione orizzontale ha solitamente le dimensioni di 5x20 diametri cellulari in ciascuno dei due emisferi. Il dato più significativo è la totale esclusione di marcatura S100 β (cellule gliali) da questa area proliferativa. (Fig. 25).

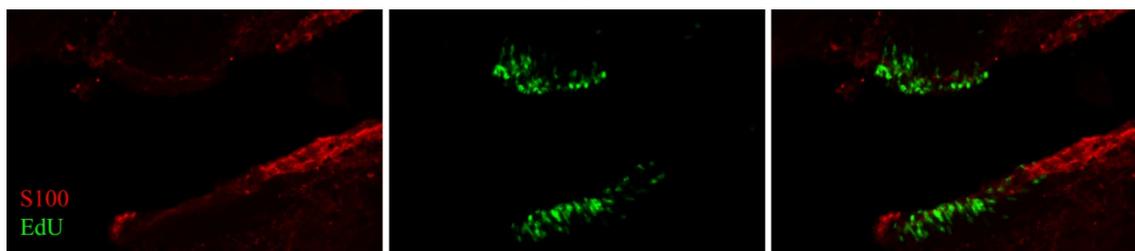


Fig. 25 . Area I di proliferazione nel ventricolo telencefalico.

La seconda area proliferativa (area II) si trova al margine rostrale del telencefalo lungo la superficie ventricolare del ventricolo everso: le cellule EdU⁺ si dispongono in ordine sparso tra le fibre gliali, ovvero S100 β ⁺, in stretta associazione rispetto a questa, senza che però si riesca a dimostrare la co-localizzazione dei sue segnali. In questa zona si osserva un numero di cellule proliferanti senza dubbio minore rispetto alla precedente area neurogenica. (Fig. 26)

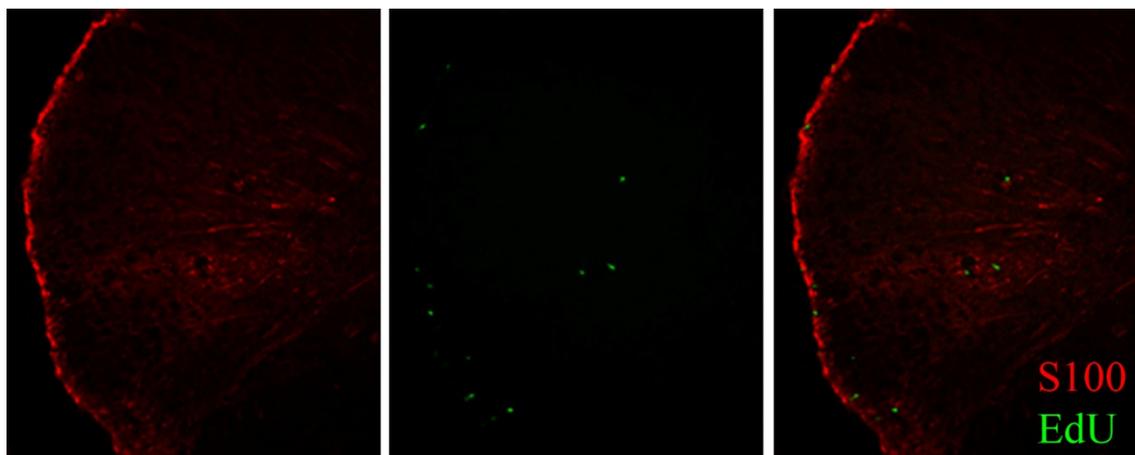


Fig. 26 . Area II di proliferazione nel margine rostrale del ventricolo telencefalico everso.

Infine, è stata riconosciuta una terza zona di proliferazione cellulare nel margine latero-posteriore del telencefalo (area III) che mostra un grado di proliferazione intermedio e, diversamente dalle precedenti, corrisponde alla superficie piaie (Fig. 27). Più nello specifico è possibile individuare un gradiente crescente in direzione rostro-caudale del tasso proliferativo. Sebbene il pattern con cui le cellule EdU⁺ si dispongono tra le cellule S100 β ⁺ è sostanzialmente invariato rispetto a quanto descritto per l'area II, si evidenzia comunque la presenza di alcune cellule doppiamente marcate EdU⁺/ S100 β ⁺. Questo dato può essere interpretato considerando che il maggior numero di eventi di divisione permette di catturare non solo le divisioni dei precursori proliferanti ma anche il raro evento in cui tali precursori proliferanti si originano dalle cellule della RG.

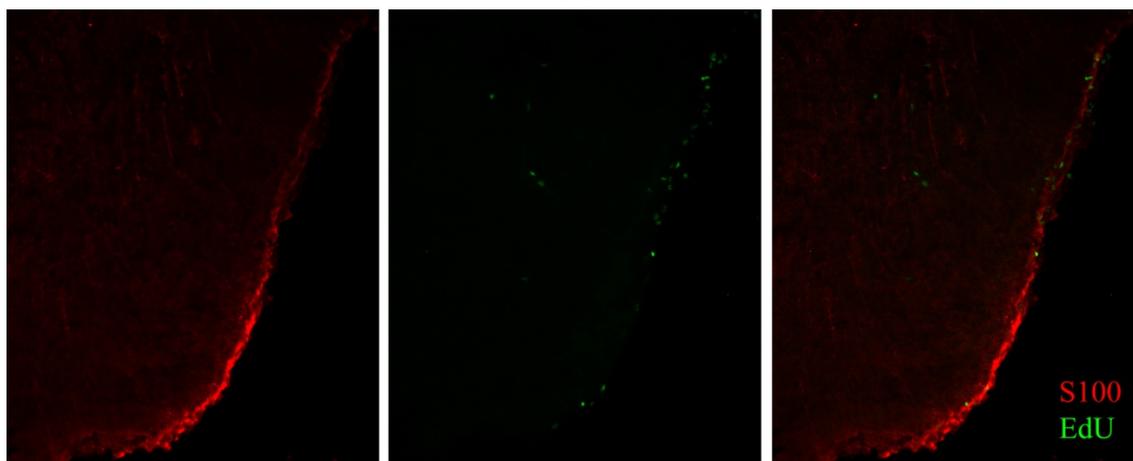


Fig. 27 . Area III di proliferazione nel margine latero-posteriore del telencefalo.

In aggiunta a quanto descritto in termini di localizzazione spaziale, in queste immagini è possibile apprezzare la particolare morfologia delle cellule $S100\beta^+$: queste possiedono un soma triangolare in cui uno dei lati è rivolto alla superficie mentre dal vertice opposto parte un processo che decorre per tutto il parenchima e raggiunge la superficie opposta.

4.1.2. Neurogenesi nel Tetto Ottico

Il Tetto Ottico è la zona del Mesencefalo che nei pesci è deputata all'elaborazione dell'immagine visiva. Analizzando nel Tetto Ottico (OT) la doppia marcatura descritta in §4.1.1. si notano due aree proliferative diverse per caratteristiche e localizzazione. Una prima zona proliferativa si disloca come un cordone di cellule EdU^+ lungo il margine dorsale dell'OT, che s'ispessisce in direzione ventro-caudale e in sezione orizzontale appare solitamente al margine posteriore dell'OT. Similmente a quanto riportato per l'area I nel telencefalo, le cellule EdU^+ sono strettamente ammassate in una zona totalmente esclusa dalla marcatura per le cellule gliali, indicando come questa sia una nicchia proliferativa di origine neuro-epiteliale (Fig. 28).

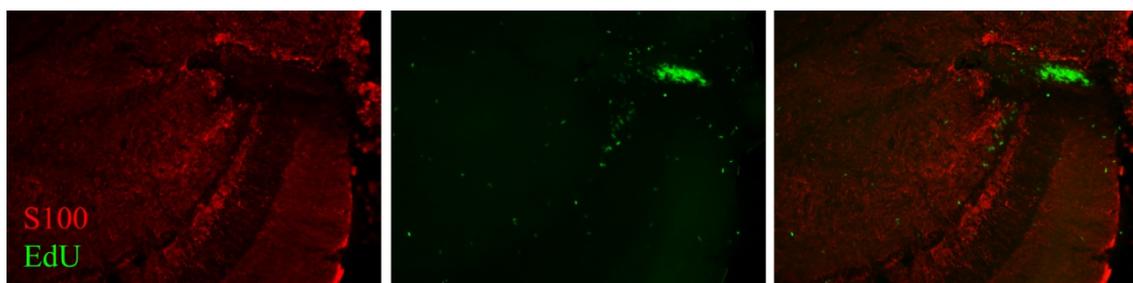


Fig. 28 . Margine germinativo nel Tetto Ottico posteriore.

La seconda area proliferativa si trova lungo la superficie ventricolare dell'OT, all'interfaccia con il *torus longitudinalis* ed è meno definita dal punto di vista spaziale (Fig. 29). Un elemento di forte differenza rispetto al margine posteriore risiede nella diversa distribuzione spaziale delle cellule EdU⁺, le quali si trovano in ordine sparso lungo tutto lo spessore del parenchima, senza che sia possibile definire precisamente una regione limitata nello spazio da cui queste cellule originano.

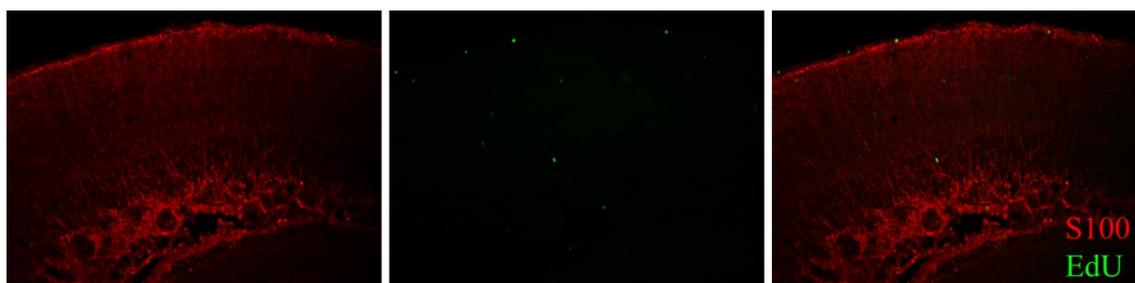


Fig. 29 . Area di proliferazione diffusa nel Tetto Ottico

4.2 Gliosi associata all'invecchiamento nel Tetto Ottico

Per valutare come l'invecchiamento modula il potenziale neurogenico, sono stati esaminati e posti a confronto due gruppi di animali a diverse età: un primo gruppo formato da animali (n=4) di 5 settimane (Giovani, 5wks) e un secondo gruppo (n=4) formato da animali di 25settimane (Vecchi, 25wks). Il dato più significativo che ne è emerso è l'instaurarsi, con l'invecchiamento, di una marcata risposta gliotica nel Tetto Ottico centrale, evidenziata dall'ingente aumento di fibre marcate GFAP⁺. Questo fenomeno è apprezzabile inequivocabilmente già all'analisi qualitativa delle immagini di fluorescenza (Fig. 30). Negli individui "Giovani", infatti, viene marcata debolmente solo una piccola zona della superficie ventricolare spostata verso il margine anteriore. Negli individui adulti tutto il parenchima del Tetto Ottico è invaso da fibre GFAP⁺: queste decorrono sia parallelamente al margine di interfaccia tra OT e *torus longitudinalis* sia, e soprattutto, radialmente, coprendo tutto lo spessore del Tetto Ottico [dallo strato nucleare interno, dove risiedono i nuclei delle cellule della glia radiale, alla superficie esterna della pia].

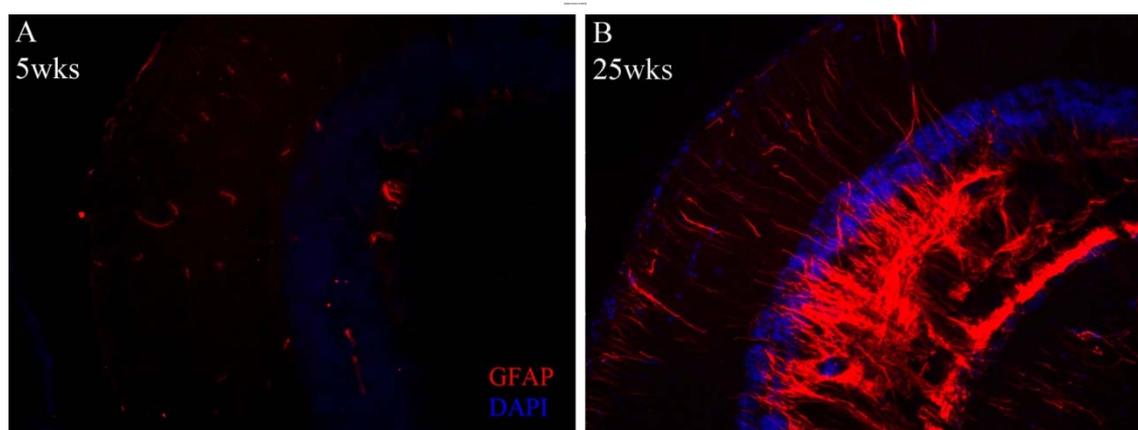


Fig. 30 Gliosi in funzione dell'invecchiamento: confronto tra la zona centrale del Tetto Ottico di un animale giovane (5wks) ed di uno Vecchio

L'altro marcatore delle cellule gliali, S100 β , non mostra evidenti modifiche né nei livelli né nel pattern spaziale di espressione (per maggiori dettagli vedi §4.3).

4.2.1 Quantificazione della Gliosi

Per caratterizzare più oggettivamente la gliosi, è stata condotta anche un'analisi quantitativa del segnale di fluorescenza. Prendendo come controllo interno la marcatura S100 β , il rapporto GFAP/S100 β mostra un aumento del 27% (t-Test $2,528 \cdot 10^{-6}$) nei pesci Vecchi rispetto ai pesci Giovani (Fig. 31).

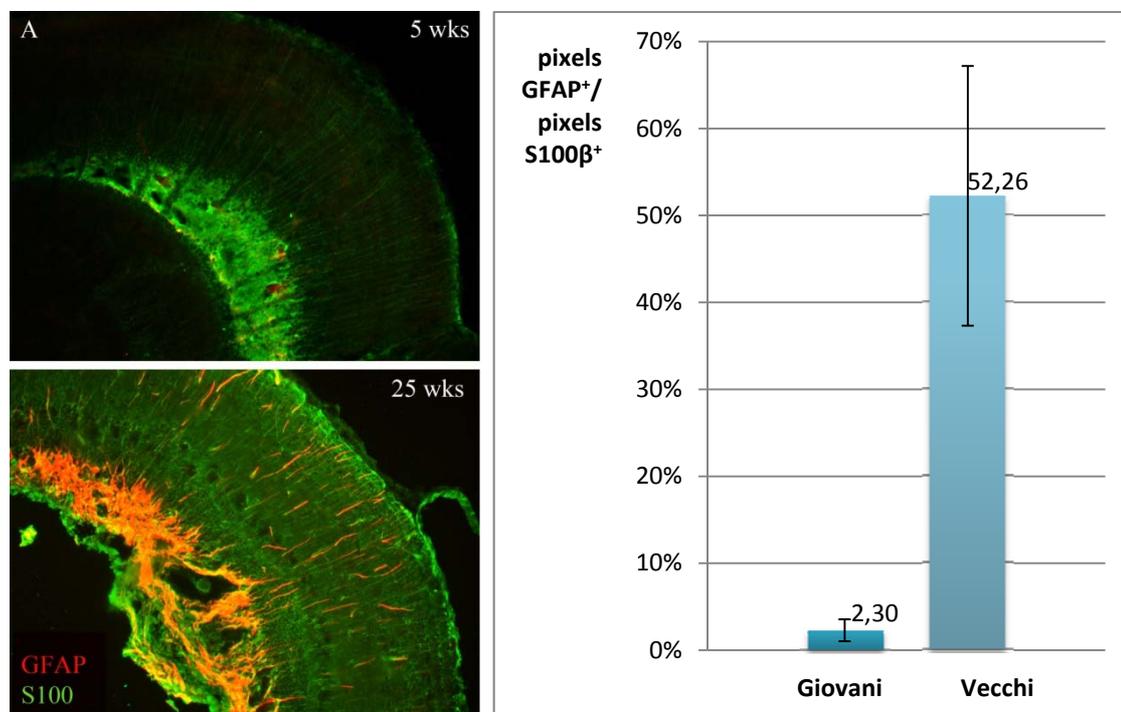


Fig. 31. GFAP nel tetto ottico centrale nel Giovane (5wks) e nel Vecchio (25wks). Immagini che mostrano qualitativamente l'aumento età-dipendente dell'espressione di GFAP; istogramma che riporta i dati della quantificazione del segnale di fluorescenza

Questi dati sono stati confermati con un'analisi di RT-PCR in cui, rispetto agli individui giovani di 5 settimane, si riporta un significativo aumento dei livelli trascrizionali di GFAP a 32 settimane (3x) e un calo, altrettanto rilevante, della trascrizione di PCNA (0,5x) a 25 settimane (Fig. 32) [Terzibasi, E. dati non pubblicati].

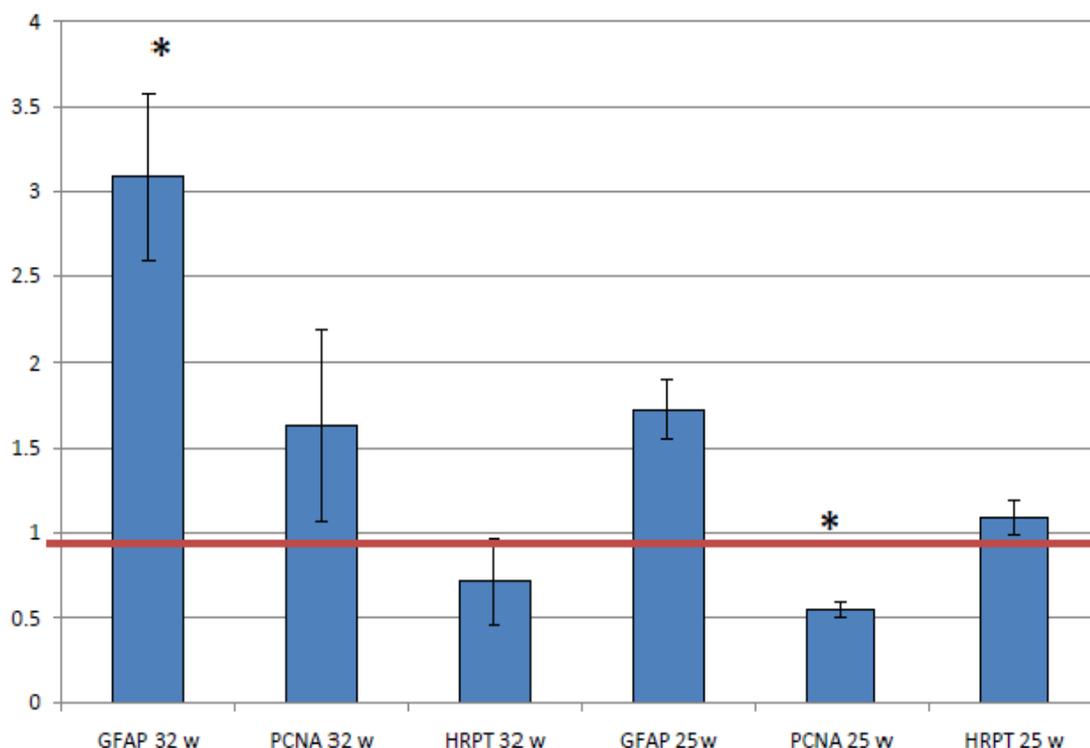


Fig. 32. Modulazione età-dipendente dei livelli di mRNA di GFAP e PCNA misurata con RT-PCR. (normalizzato con TBP, HRPT come controllo interno, linea rossa riferita alla GFAP a 5wks). [Baumgart M. dati non pubblicati]

4.3. Persistenza dei progenitori neurali nell'invecchiamento

Per meglio comprendere il significato della gliosi nell'invecchiamento si è valutata quindi l'espressione di GFAP in associazione con S100 β e Msh1. Il pattern di espressione di S100 β non mostra nessun cambiamento sostanziale con l'invecchiamento ma, diversamente dall'animale giovane, le fibre GFAP⁺ nell'animale più anziano co-localizzano perfettamente con tutte e sole le fibre S100 β ⁺ (Fig. 33) L'invecchiamento modula invece l'espressione di Msh1 (Fig. 34): nell'animale giovane a 5wks le zone Msh1⁺ sono ventricolari mentre nell'animale più anziano il fronte di espressione si trova in posizione più superficiale. Le cellule Msh1⁺ rimangono comunque distinte rispetto a quelle GFAP⁺ sebbene siano ad esse strettamente associate.

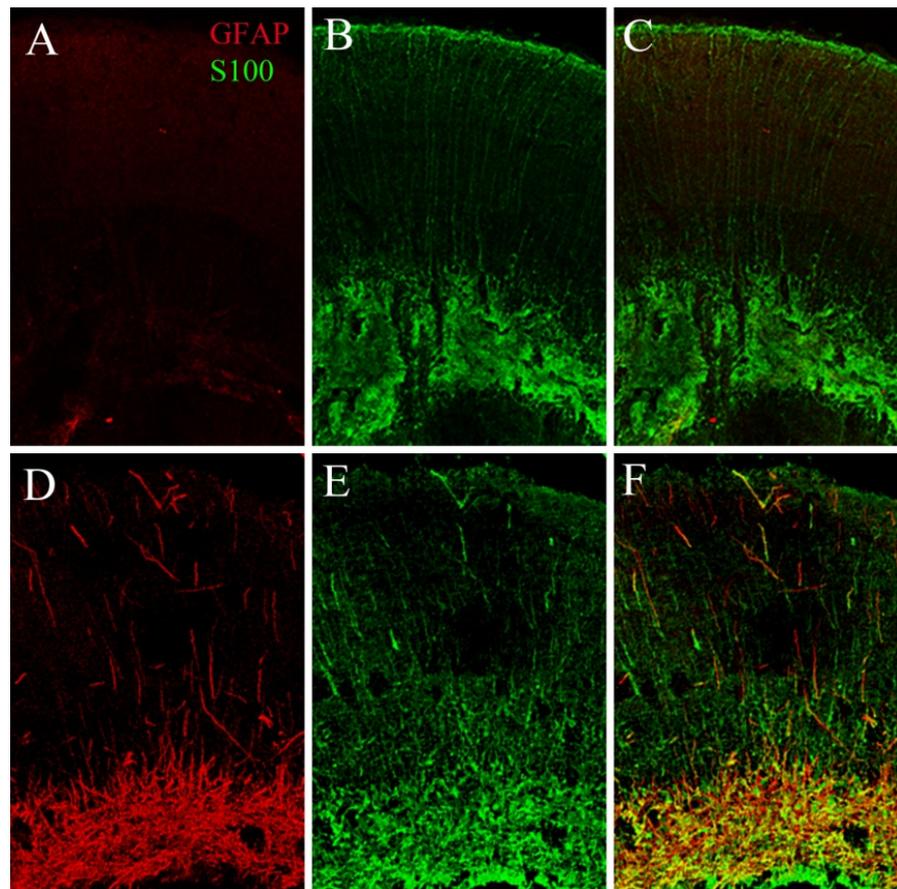


Fig. 33. Espressione di GFAP e S100 β nel Tetto Ottico centrale nel pesce Giovane (5wks) [A, B, C] e nel pesce Vecchio (25wks) [D, E, F].

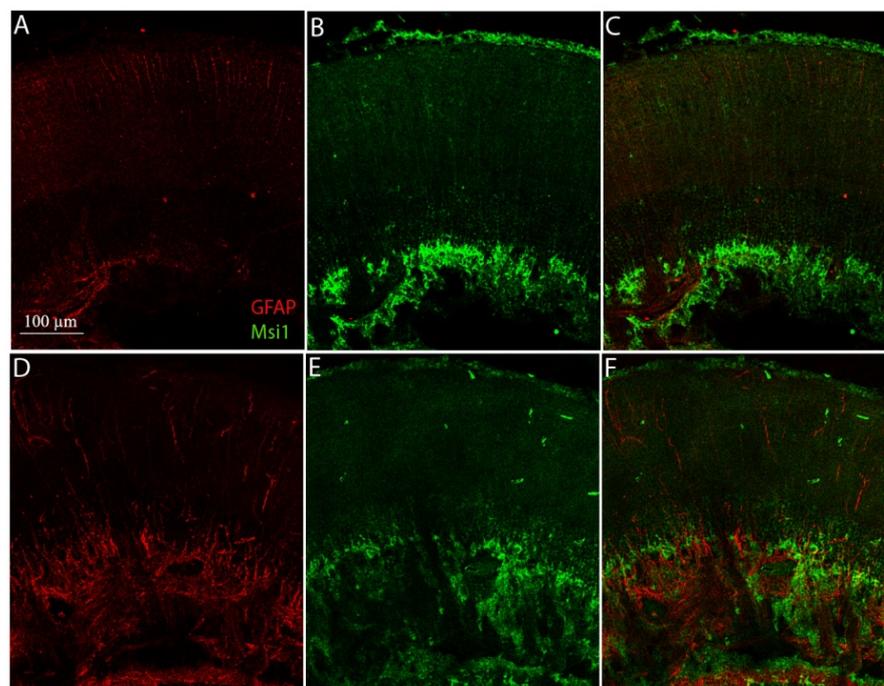


Fig. 34. Espressione di GFAP (rosso) e Msi1 (verde) nel Tetto Ottico centrale nel pesce Giovane (5wks) [A, B, C] e nel pesce Vecchio (25wks) [E, F, G].

4.4. Riduzione della neurogenesi in conseguenza all'invecchiamento

Dati non pubblicati (Terzibasi, 2011) dimostrano che, con il procedere dell'invecchiamento, nel cervello di *N. furzeri* si verifica una marcata e continua riduzione della proliferazione: questo fenomeno non si associa però in alcun modo ad una minore velocità di crescita dell'animale (Fig. 35), come provato dal confronto tra l'evoluzione nel tempo del numero totale di cellule EdU⁺ nel cervello e le curve di crescita (a pendenza costantemente positiva).

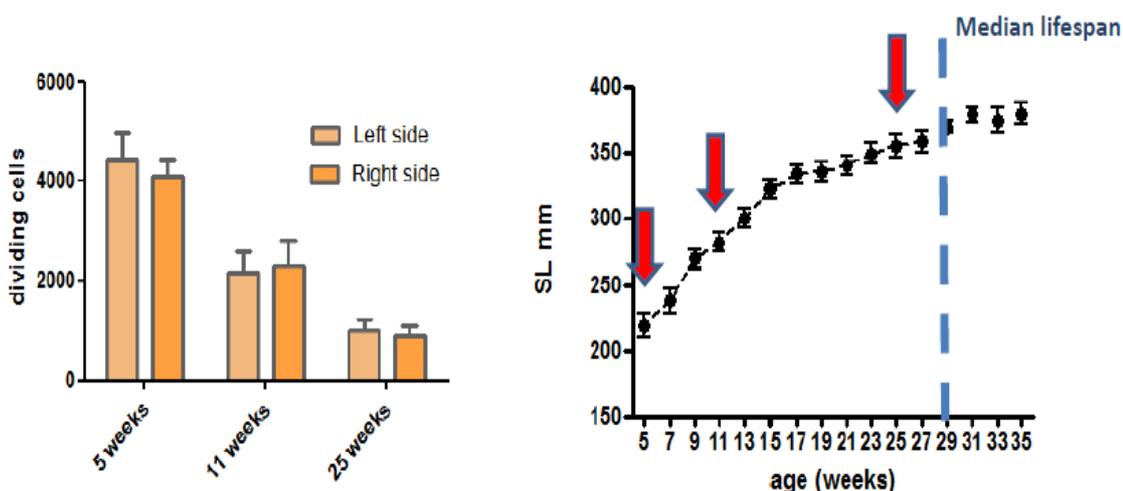


Fig. 35. Modulazione età-dipendente della neurogenesi nel Tetto Ottico. Il numero delle cellule PCNA⁺ cala bruscamente, mentre in parallelo la crescita procede a velocità sostenuta.

Tuttavia il numero di cellule Msi1⁺, e quindi di precursori neurali, non mostra deflessioni, almeno all'analisi qualitativa delle immagini. Questo dato, seppur non rappresenti una prova definitiva, indica che la modulazione negativa della neurogenesi in funzione dell'invecchiamento è dovuta alla riduzione dell'attività proliferativa e quindi neurogenica delle aNSCs piuttosto che all'esaurimento del pool. Per valutare quindi il potenziale neurogenico delle cellule progenitrici che persistono con l'invecchiamento, è stato misurato il grado di espressione di Dcx [Double-cortin], marcatore dei neuroni neo-differenziati, nei due diversi gruppi d'età (Fig. 36). Negli individui "Vecchi" si evidenzia un'evidente riduzione del numero di cellule Dcx⁺ rispetto ai "Giovani" in tutte le aree di principale neurogenesi caratterizzate in precedenza, sebbene il pattern spaziale di localizzazione della marcatura non subisca modificazioni. In particolare nell'OT posteriore così come nel ventricolo telencefalico si osserva che la zona di espressione di Dcx è contigua alle zone di attiva proliferazione, indicando che tale

potenziale proliferativo è a tutti gli effetti un potenziale neurogenico e che le cellule in differenziamento migrano in direzione centrifuga da queste nicchie di neurogenesi altamente localizzata.

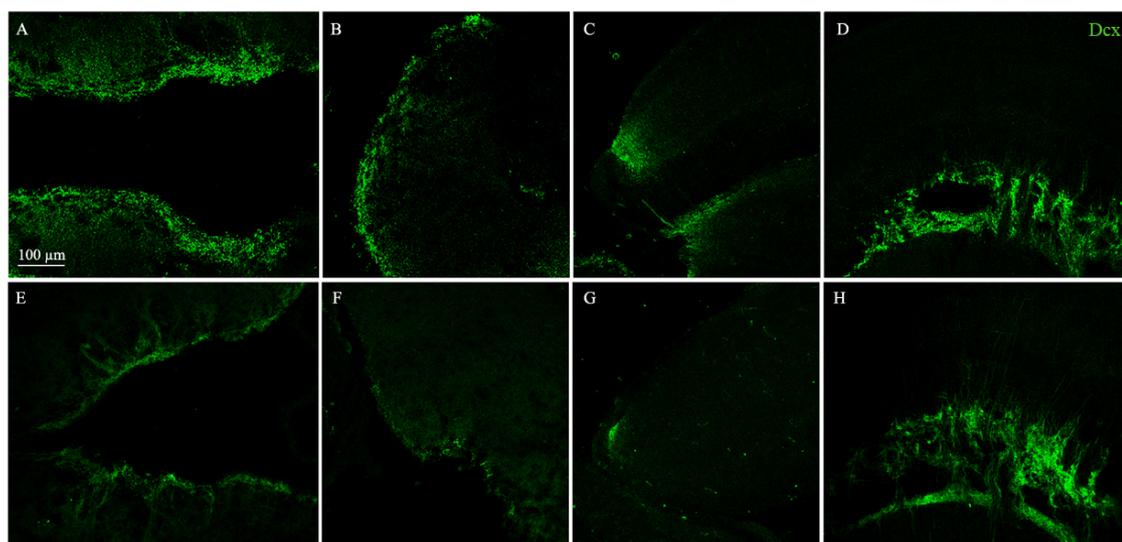


Fig. 36. Neurogenesi nel cervello Giovane e Vecchio. Le immagini si riferiscono al ventricolo telencefalico [A, E], al margine più rostrale del telencefalo [B, F], al margine germinativo posteriore del Tetto Ottico [C, G]. Come controllo interno è stato scelto il Tetto Ottico centrale.

4.5. Ridotta divergenza della sequenza proteica dei markers

Per evidenziare la conservazione evolutiva del fenomeno della Neurogenesi nell'Adulto è stata valutata la conservazione della sequenza amminoacidica dei marker proteici presi in considerazione in questo studio: GFAP, Msh1, S100 β , Dcx.

4.5.1. GFAP

La sequenza amminoacidica della GFAP, contrariamente a quanto atteso, possiede un considerevole grado di conservazione tra i vertebrati (identità 41,1%; similarità 54,78%): tuttavia negli allineamenti si osserva un certo grado di divergenza nella regione N-terminale, mentre dall'Arg49 (nella hGFAP) il grado di conservazione è significativamente maggiore (identità 51,4%, similarità 79,2%). Dall'albero di filogenesi molecolare (Fig. 37) è evidente la clusterizzazione di Zebrafish (*D. rerio*) rispetto agli altri teleostei e di questi rispetto ai due mammiferi modello (topo e uomo).

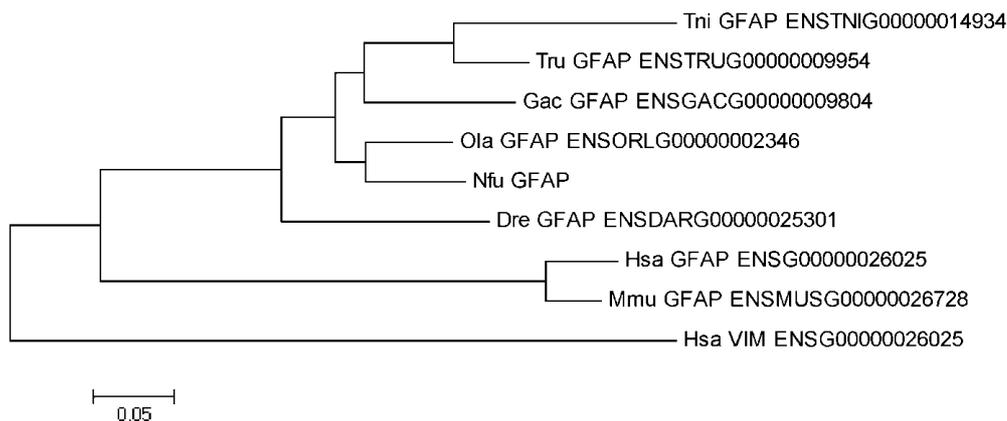


Fig. 37 Albero di filogenesi molecolare per la GFAP nei teleostei e nei mammiferi. Come out-group di riferimento è stata usata la Vimentina umana.

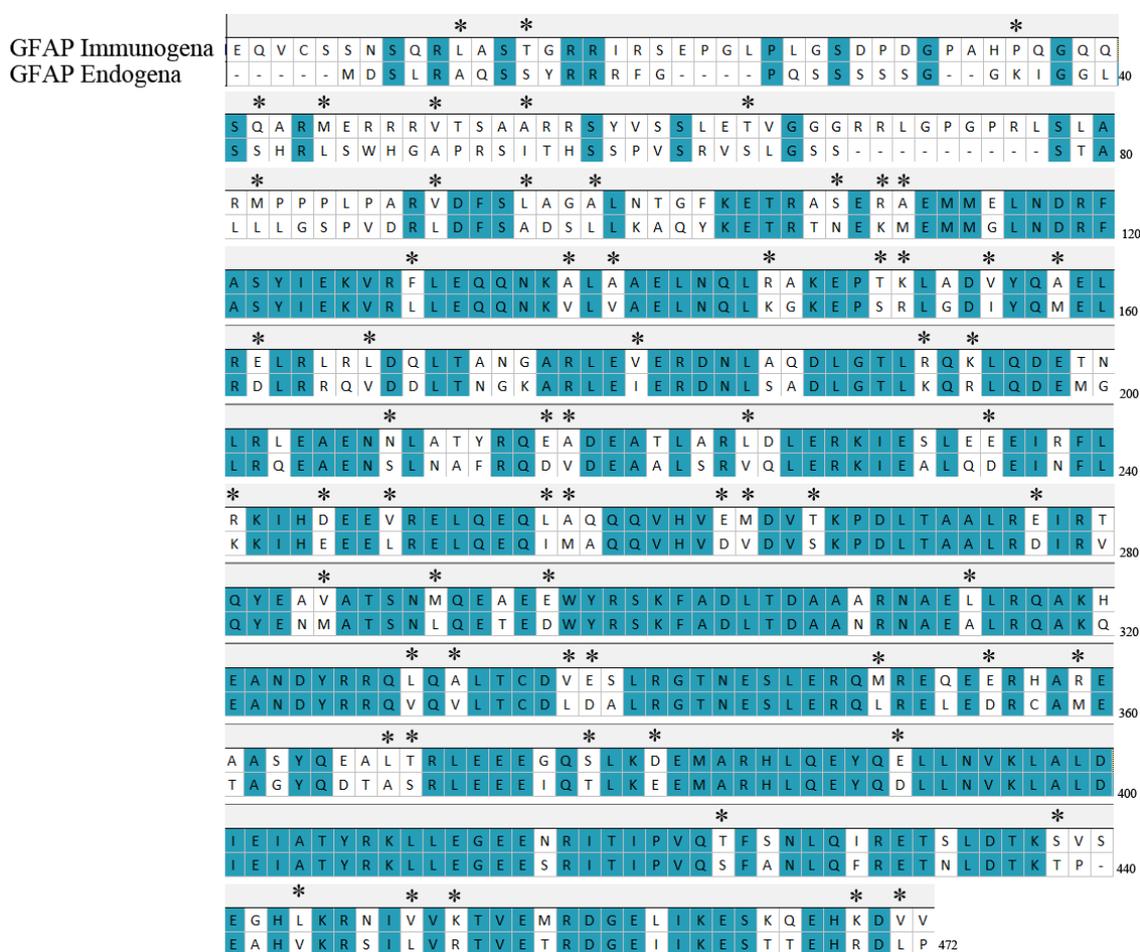


Fig. 38 Allineamento della sequenza amminoacidica della GFAP immunogena e antigenica. Il colore indica i residui identici, l'asterisco indica i residui simili

Valutando diversi anticorpi disponibili in commercio per il grado di sensibilità e pattern di marcatura, se n'è scelto uno prodotto dalla Sigma. Questo anticorpo, policlonale prodotto in coniglio, si ottiene immunizzando gli animali con GFAP

purificata dal midollo spinale di maiale (*S. scrofa*). Allineando le sequenze della proteina immunogena (di suino) e della proteina antigenica (di *Nothobranchius*) (Fig. 38) abbiamo trovato il 60,80% di siti identici e il 75,42% di siti sinonimi: ci sono poi delle estese regioni di identità che potrebbero essere, con buona probabilità, gli epitopi riconosciuti dall'anticorpo. L'elevato grado di specificità e sensibilità dell'immunoreazione tra anticorpo α GFAP e proteina endogena di *Nothobranchius* è un dato degno di nota. Questo differisce significativamente da quanto riportato per zebrafish, in cui l'immunoreattività è così scarsa che ormai per la rivelazione dell'espressione di GFAP è prassi comune l'uso di ceppi di pesci transgenizzati per esprimere GFP sotto il controllo del promotore di *gfap*.

4.5.2. S100 β

L'albero filogenetico della proteina S100 β ha una struttura inattesa (Fig. 39). Tuttavia, provando a cambiare i modelli e i parametri dell'analisi filogenetica, non si sono osservate modifiche significative, dimostrando che questa struttura è attribuibile ad un pattern insolito di evoluzione di sequenza proteica piuttosto che ad un errore commesso nell'allineamento o nelle sequenze stesse. Diversamente da quanto atteso, le proteine s100 β dei mammiferi sono filogeneticamente più vicine agli omologhi in *N. furzeri* e zebrafish di quanto questi lo siano rispetto agli omologhi S100 β negli altri teleostei come *T. rubripes*, *O. latipes* e *T. nigroviridis*.

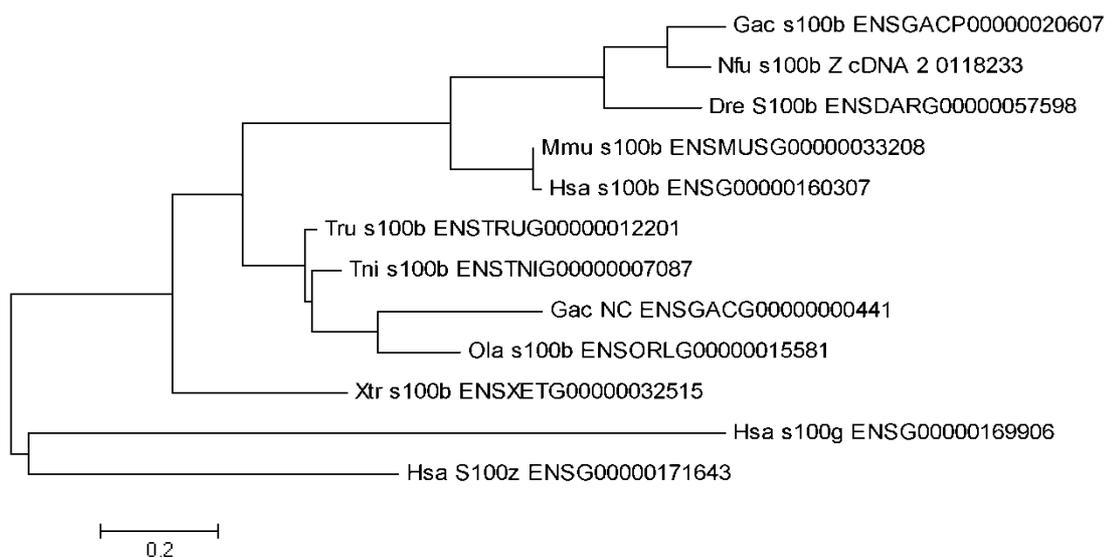


Fig. 39 Albero di filogenesi molecolare per S100 β . Le proteine out-group sono gli ortologhi umani S100g e S100z.

L'anticorpo usato per marcare le cellule S100 β ⁺ è stato un anticorpo policlonale prodotto in coniglio. Queste immunoglobuline sono purificate da animali immunizzati con S100 β di origine bovina. Dall'analisi comparata, la proteina omologa identificata in *N. furzeri* mostra il 59,57% d'identità e il 74,47% di similarità (Fig. 40).

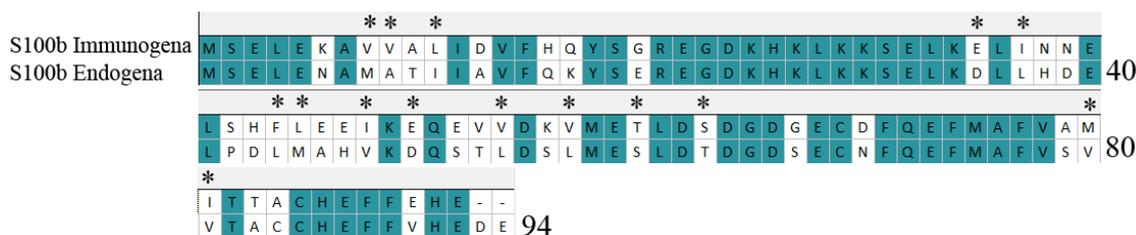


Fig. 40 Allineamento della sequenza amminoacidica della proteina S100 β immunogena con la sequenza immunogena di *N. furzeri*. Il colore indica i residui identici, l'asterisco indica i residui simili.

4.5.3. Musashi1, MSI1

Dall'analisi di filogenesi molecolare (Fig. 41) si evidenzia la presenza di due proteine Msi omologhe nei teleostei le quali clusterizzano tra loro e sono poste su un ramo evolutivo separato rispetto a quelle dei vertebrati superiori. L'albero filogenetico è coerente le recenti teorie sull'evoluzione dei genomi nei vertebrati. Prima della comparsa del progenitore dei vertebrati terrestri sarebbe avvenuta una prima duplicazione che avrebbe prodotto due geni omologhi *msi1* e *msi2*, la cui presenza è comune ai genomi dei teleostei e dei vertebrati superiori. Nei pesci poi si sarebbe verificato un secondo evento duplicativo, il FSGD (Fish Specific Gene Duplication), responsabile della pseudo-tetraploidia dei genomi dei teleostei: nel nostro caso specifico il FSGD rende conto della presenza di due proteine MSI1a/b paraloghe che si sono evolute su due rami paralleli. Poiché non tutte le sequenze proteiche sono disponibili full-length, l'analisi del grado di conservazione è stata condotta solo sulle sequenze che, in seguito all'allineamento avessero meno del 15% di siti gap rispetto al totale. Posti questi parametri, si ottiene il 60,78% di identità e il 69,61% di similarità di sequenza.

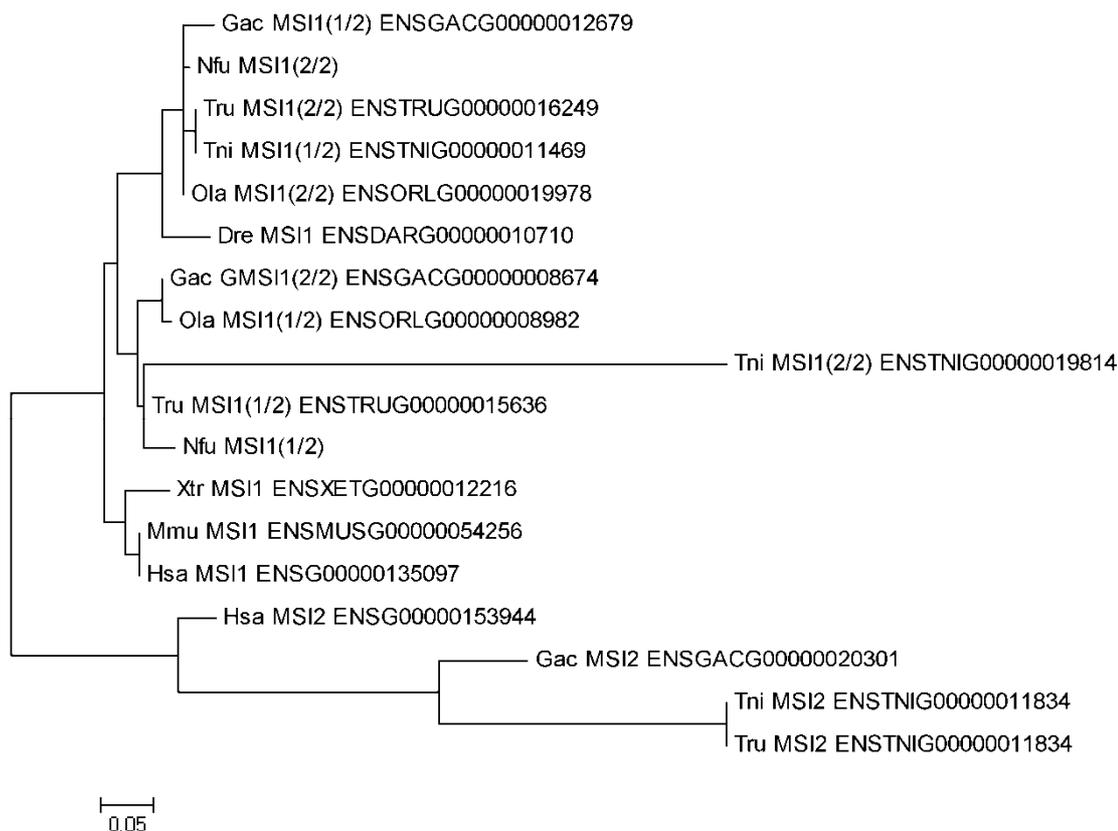


Fig. 41 Albero di filogenesi molecolare per Msi1. Le proteine out-group sono gli omologhi Msi2 di teleosteo.

Per rivelare le cellule esprimenti Msh1, si è fatto uso di un anticorpo monoclonale (in topo) specifico per riconoscere un peptide derivato da hMSI1 e centrato (± 20 aa) intorno alla Met190. Allineando tra le due sequenze di *N. furzeri* con la sequenza amminoacidica del peptide immunogeno di hMSI1 si osserva identità per il 90,24% dei residui e similarità per il 97,56% (Fig.42).

Msi1 Immunogena	H	F	H	E	I	N	N	*	K	M	V	E	C	K	K	A	Q	P	K	E	V	M	S	P	T	G	S	A	R	G	R	S	R	V	M	P	Y	G	M	D	A	F
Msi1_a Endogena	H	F	H	E	I	N	S	*	K	M	V	E	C	K	K	A	Q	P	K	E	V	M	T	P	T	G	S	A	R	G	R	S	R	V	M	P	Y	G	M	D	T	F
Msi1_b Endogena	H	F	H	E	I	N	N	*	K	M	V	E	C	K	K	A	Q	P	K	E	V	M	S	P	T	G	S	A	R	G	R	T	R	V	M	P	Y	G	M	D	A	F

Fig. 42 Allineamento della sequenza amminoacidica della proteina MSI1 immunogena e delle due sequenze antigeniche. Il colore indica i residui identici, l'asterisco indica i residui simili.

4.5.4 Double-cortin, Dcx

Allineando le sequenze amminoacidiche delle proteine Dcx, l'omologo umano mostra un lungo segmento N-term (81aa) che non è presente in nessuna altra delle proteine prese in esame mentre per pesce palla (*Oryzias latipes*) sembra mancare gran

parte della regione centrale e C-term: per l'analisi del grado di divergenza delle sequenze si sono omesse tali porzioni proteiche. Considerando i teleostei di riferimento e i modelli di vertebrato più noti, la sequenza è identica nel 68,04% dei siti e simile nel 79,06%. La regione a più alto grado di variabilità è l'estremità N-terminale (90aa). In *D. rerio* non esiste alcun gene omologo a Dcx, del quale però si trovano geni simili codificanti ad esempio le DCLK (Dcx-like-Kinase); l'albero conferma il ridotto grado di divergenza della sequenza di Dcx (Fig. 43).

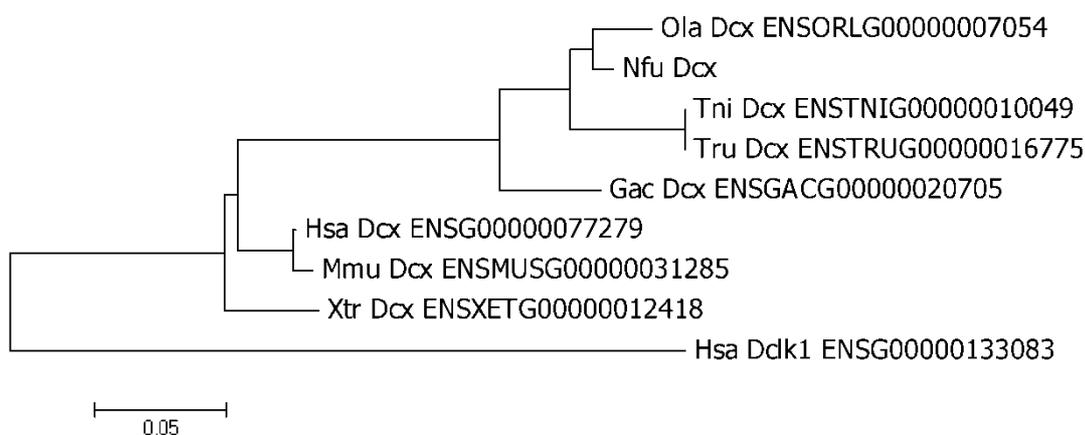


Fig. 43 Albero di filogenesi molecolare per Dcx. La proteina out-group è DCX-Like-Kinase1 di Uomo

L'alto livello di conservazione della proteina già nell'analisi di filogenesi molecolare fa supporre che l'anticorpo specifico per marcare hDcx reagisca con buona specificità anche con Dcx di *N. furzeri*. Per avere una prova più diretta, si è anche verificata l'omologia di sequenza tra Dcx isolato in *N. furzeri* con il frammento immunogeno dichiarato, ovvero la regione N-term dell'hDcx (da +300 alla fine) (Fig. 44) Questi due peptidi condividono il 77,42% di diti identici e l'87,10% di siti sinonimi e perciò, un anticorpo tale da reagire con Dcx bovina reagirà, con un elevato grado di specificità, con l'omologo nel nostro modello.

												*								*											
Dcx Immunogena	V	R	Y	I	Y	T	I	D	G	S	R	K	I	G	S	M	D	E	L	E	E	G	E	S	Y	V	C	S	S	D	N
Dcx di <i>N. furzeri</i>	V	R	F	I	F	T	I	D	G	S	R	K	I	S	T	L	D	E	L	E	E	G	E	S	Y	V	C	A	S	E	N

Fig. 44 Allineamento della sequenza amminoacidica della proteina Dcx immunogena (peptide N-term dell'hDcx) e Dcx antigenica di *N. furzeri*. Il colore indica i residui identici, l'asterisco indica i residui simili

5. Discussione

5.1. Neurogenesi nell'adulto di *N. furzeri*

N. furzeri è un modello animale straordinariamente utile nello studio dell'invecchiamento. In aggiunta a tutti i vantaggi sperimentali che condivide con zebrafish, il suo life-span ridotto permette di seguire agevolmente l'animale per tutto il corso della vita (dalla deposizione dell'uovo alla morte naturale), monitorando l'evoluzione temporale dei fenomeni associati all'invecchiamento in una scala di tempo dell'ordine di mesi, invece che di anni.

In particolare *N. furzeri* si rivela un modello estremamente efficace nello studio della neurogenesi nell'adulto: esso coniuga allo sviluppo e invecchiamento accelerato, il vantaggio di possedere un SNC con un cospicuo potenziale neurogenico. Sebbene l'ultimo punto derivi logicamente dall'appartenenza di *N. furzeri* all'infraclasse dei teleostei, con cui si suppone condivida numerose caratteristiche, finora nessuna prova era stata portata a sostegno della neurogenesi nel cervello dell'adulto *N. furzeri*. Quanto descritto in precedenza riguardo i fenomeni di Neurogenesi nell'Adulto in altri modelli animali (teleostei, mammiferi e uccelli) è stato confermato anche in *N. furzeri*. In particolare nel telencefalo di *N. furzeri* si possono riprodurre fedelmente i dati riportati in *Danio rerio* ⁽⁶⁷⁾ riguardanti l'attività proliferativa di alcune regioni specifiche del telencefalo; anche il Tetto Ottico mostra un comportamento del tutto analogo a quello già descritto in altri teleostei, come *D. rerio* ⁽⁶⁸⁾ e *O. latipes* (pesce medaka)⁽⁶⁹⁾.

5.2. Gliosi associata all'invecchiamento: possibili pathway molecolari e implicazioni funzionali

Un primo dato importante è la dimostrazione che la flessione negativa della neurogenesi con l'invecchiamento è riconducibile a una riduzione dell'attività neurogenica delle aNSCs piuttosto che a una loro riduzione in numero. Nel corso della vita adulta, le aNSCs allungano progressivamente il loro ciclo cellulare, fino ad uscirne e rimanere in uno stato quiescente non proliferativo (cellule PCNA⁻). Questo non si accompagna però alla perdita della staminalità, poiché viene conservata l'espressione di marcatori tipici come Msi1 lasciando supporre la

capacità di tali cellule Msi1⁺/PCNA⁻ di rientrare nel ciclo cellulare e proliferare, sebbene non sia affatto lecito il salto logico per cui da tali divisioni si generino neuroni piuttosto che altri tipi cellulari.

Il dato di maggior forza ed evidenza emerso da questo studio è l'ingente risposta gliotica dipendente dall'invecchiamento. Nel cervello di mammifero, questo evento ha un nome specifico, *gliosi reattiva*, e si può osservare precocemente in seguito a lesioni di varia natura (lesioni fisiche, ictus, malattie neurodegenerative) sebbene sia meglio nota per essere un biomarcatore dell'invecchiamento nel mammifero: non casualmente molti dei tumori del SNC nell'uomo sono di origine gliale e non nervosa⁽⁷⁰⁾. Nel mammifero la gliosi è causata dalla proliferazione degli astrociti nel sito di danno: questo fenomeno è privo di alcun potenziale neurogenico ma si caratterizza come una sorta di cicatrizzazione del tessuto cerebrale leso. Nel nostro modello la gliosi è associata unicamente all'invecchiamento e interessa la glia radiale invece che l'astroglia. Nell'animale anziano, infatti, si osserva un esplosivo aumento (27x) dell'espressione di GFAP sia a livello trascrizionale (mRNA) che traduzionale (proteina). La GFAP non è l'unico marcatore della glia radiale ma se ne conoscono molti altri come la BLBP (Brain Lipid Binding Protein), o S100 β . Tuttavia, la GFAP è peculiare in quanto è stato dimostrato che, nel corso della neurogenesi embrionale, il completo differenziamento della glia è segnato dall'aumentata espressione di GFAP fino a che essa diviene predominante sulle altre proteine gliali del citoscheletro. Sorprendentemente nel corso dell'invecchiamento di *N. furzeri* abbiamo osservato una situazione del tutto simile. La risposta gliotica associata all'invecchiamento non è causata dall'aumento generale delle fibre o dei corpi cellulari marcati come gliali (S100 β ⁺ o GFAP): ciò che avviene invece è la specifica induzione dell'espressione di GFAP nelle cellule o fibre S100 β ⁺ nel giovane.

Ormai è universalmente condivisa l'idea che l'origine delle cellule staminali neurali risieda nella glia radiale dell'embrione. Ciò che, invece, è ancora oggetto di discussione è la vera natura delle aNSCs: queste derivano direttamente dalla persistenza di qualche forma di Glia Radiale nell'adulto? Oppure le cellule RG-like che si osservano nell'adulto sono dei precursori che si sono formati precocemente nel corso della neurogenesi embrionale e che, invece di procedere nel

differenziamento, si sono mantenuti/sono stati mantenuti in uno stato di staminalità e quiescenza fino all'età adulta? La seconda ipotesi sta raccogliendo il maggior numero di consensi e anche i nostri dati sono concordi con essa. Sebbene sia solo un elemento indiziale, quanto sopra descritto per la gliosi in funzione dell'invecchiamento, è coerente con un modello di neurogenesi nell'adulto in cui le aNSCs ricapitolano fedelmente gli eventi tipici della neurogenesi embrionale in una scala di tempo dilatata. Secondo tale modello, al momento in cui le aNSCs si originano dalla Glia Radiale, il loro orologio molecolare trasla verso un diverso sistema di riferimento temporale pur continuando a regolare il programma trascrizionale in modo tale che le prime divisioni siano neurogeniche mentre le successive siano gliogeniche. Una delle ipotesi plausibili è che alla base di questo evento ci sia la diversa distribuzione di morfogeni al momento della divisione asimmetrica, un fenomeno studiato nel dettaglio nei neuroblasti di *Drosophila* ma riportato anche nei mammiferi ⁽⁷¹⁾: alcuni fattori di pluripotenza e staminalità (ad esempio Sox2, Oct4, Lin28, Klf4) ^(72, 73) potrebbero concentrarsi nella futura aNSCs e determinarne perciò un cambiamento del pattern trascrizionale il quale si ripercuote sull'orologio molecolare. Comprendere i meccanismi molecolari alla base di questi eventi rappresenta una tappa fondamentale per riuscire a capire molti degli aspetti della neurogenesi nell'adulto. L'osservazione che l'espressione di marcatori dei precursori (Msi1) si conserva nel SNC dell'adulto sembrerebbe però un dato in evidente contrapposizione con il modello proposto, ma solo ad una prima analisi superficiale. Si può, infatti, credere che le cellule della Glia Radiale divenute GFAP⁺ raggiungano con l'età uno stato di quiescenza, in cui escono dal ciclo cellulare e acquisiscono l'espressione dei marcatori della glia differenziata, pur conservando però il proprio potenziale neurogenico e quindi la capacità di de-differenziare, tornare a proliferare e comportarsi da progenitori neurali. Una situazione di questo tipo è stata descritta nel dettaglio nella retina dei teleostei, ed è estremamente plausibile che sia proprio ciò che accade nel cervello poiché la retina, come il cervello, fa parte del SNC. Inducendo un danno alla porzione nervosa della retina di Zebrafish, questa è in grado di rigenerare e la risposta rigenerativa è mediata dalla Glia di Müller (la forma di glia radiale retinica) che va incontro a reprogramming e de-differenzia ⁽⁷⁴⁾. A questo punto le cellule della Müller Glia de-

differenziata rientrano nel ciclo cellulare, sono mitoticamente attive solo in un ristretto intervallo temporale (circa 48 h) durante il quale, dividendosi asimmetricamente, producono sciami di cellule fusiformi. La progenie di queste poche iniziali divisioni cellulari rappresenta la popolazione dei progenitori neuronali che continuano a proliferare e in seguito differenziano nei neuroni da rigenerare. L'elemento più interessante è che in realtà la Müller Glia trascrive costitutivamente i geni di pluripotenza ma la loro espressione è repressa a livello traduzionale dalla famiglia di miRNA let-7: nel momento in cui la Müller Glia de-differenzia, viene indotta l'espressione di Lin28 la quale blocca la maturazione dei let7⁽⁷⁵⁾. Probabilmente anche nella Glia Radiale esiste un pathway di controllo di questo tipo, in cui certamente GFAP, S100, e Msi1 ricoprono ruoli cruciali che meritano di essere studiati più nel dettaglio, con analisi molecolari e funzionali.

5.3. I principali marcatori proteici sono evolutivamente conservati

La neurogenesi nel SNC in età adulta è un fenomeno comune a tutti i vertebrati. Il potenziale neurogenico però si perde gradualmente nel corso della filogenesi, passando dalla neurogenesi diffusa nei pesci alla presenza di due sole nicchie di neurogenesi nel cervello di mammifero. Una caratteristica ricorrente, è l'associazione tra neurogenesi e aree del SNC deputate all'elaborazione delle informazioni sensoriali: nei pesci è stata dimostrata correlazione tra il recupero della funzione visiva e l'aumento del grado di neurogenesi nel Tetto Ottico; nel canarino la nicchia neurogenica nell'HVC (High Vocal Center) riceve segnali dal sistema uditivo per l'apprendimento di nuove melodie; negli animali che si orientano con l'olfatto, come i roditori, c'è massiva neurogenesi nel bulbo olfattivo. Questo indica una possibile modulazione, nel corso della filogenesi, del potenziale neurogenico nell'adulto in funzione dell'importanza ricoperta dai sistemi sensoriali. Con l'evoluzione nei vertebrati superiori, si osserva la maggiore dipendenza della fitness dall'abilità cognitiva piuttosto che sensoriale parallelamente al minor grado di neurogenesi nel SNC. La neurogenesi che si osserva nei vari vertebrati è sostanzialmente lo stesso fenomeno modulato diversamente secondo le esigenze evolutive. Abbiamo potuto, infatti, osservare che i marcatori molecolari della neurogenesi nell'adulto sono comuni a tutti i taxa di vertebrati e mostrano una

straordinaria conservazione sia a livello d'identità di sequenza, sia a livello di similarità, indicando una forte pressione evolutiva. La famiglia dei geni *s100* può essere presa come paradigma di molte delle peculiarità evidenziate dall'evoluzione molecolare nei teleostei⁽⁷⁶⁾. Questi geni mantengono la stessa struttura a tre esoni e la stessa corrispondenza tra esone e dominio proteico codificato; la sequenza aminoacidica non è conservata nel suo complesso ma solo in alcuni domini strutturali importanti affinché la proteina possa essere funzionale. L'analisi comparata dell'organizzazione strutturale di questa famiglia genica⁽⁷⁷⁾ nel pesce e nel mammifero ha confermato la recente teoria per cui durante l'evoluzione si sarebbe verificate due duplicazioni del genoma comuni a tutti i vertebrati e quindi una terza duplicazione [FSGD, Fish Specific Genome Duplication] esclusiva del ramo evolutivo degli *Actinopterygii* (pesci con le pinne raggiate)⁽⁷⁸⁾. Ad esempio i geni *s100a*, ritenuti i geni ancestrali della famiglia, si distribuiscono in due sottogruppi i quali sono presenti come un singolo cluster nel genoma del mammifero e come duplice cluster nel genoma dei teleostei. *s100b*, invece, non ha ortologhi in alcuno dei teleostei presi in esame ad eccezione di *G. aculeatus*: questo indica che *s100b* si è originato per duplicazione genica all'interno di uno dei due cluster in seguito alla FSGD e perciò è presente come gene singolo. Diversamente da *s100b*, *musashi* mostra un comportamento molto simile a quanto riportato per *s100a*: due paraloghi (*msi1* e *msi2*) sono presenti in tutti i genomi di vertebrato, ma nei teleostei si evidenziano due cluster distinti di geni *msi1*. I due cluster, nonostante la scarsa risoluzione offerta dal metodo di analisi filogenica, sembrano ricapitolare in parallelo gli stessi eventi evolutivi.

III. Bibliografia

1. Ramón y Cajal, S.R. (1913–14) *Estudios sobre la degeneración del sistema nervioso*. Moya. [ristampa e seconda edizione con traduzioni aggiuntive ad opera di J. DeFelipe and E.G. Jones (1991) *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System*, pp. 375–392, 429f, 616, 672–677 e 747–750, Oxford University Press
2. Altman J, Das GD (1965) *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 124(3):319-35.
3. Altman J (1966) *Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis*. Exp Neurol, 16(3):263-78.
4. Altman J (1969) *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb*. J Comp Neurol, 137(4):433-57.
5. Kaplan MS, Hinds JW (1977) *Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs*. Science, 9;197(4308):1092-4.
6. Goldman SA, Nottebohm F (1983) *Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain*. Proc Natl Acad Sci U SA. 80(8):2390-4
7. Gage FH, Ray J, Fisher LJ. (1995) *Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS*. Annu Rev Neurosci 18:159-92
8. Gage FH (2000) *Mammalian neural stem cells*. Science 287, 1433–1438.
9. Emlen JM (1973) *Ecology: an evolutionary approach*. Addison-Wesley, New York
10. Schofield R (1978) *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells 4:7–25.
11. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) *Stem cells find their niche*. Nature 414, 98-104
12. Gotz M, Hartfuss E, Malatesta P, (2002). *Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice*. Brain Res.Bull. 57, 777–788.

13. Chapouton P, Jagasia R, Bally-Cuif L (2007) *Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates*. *Bioessays* 29(8):745-57.
14. Nottebohm F, Alvarez-Buylla A, Cynx J, Kirn J, Ling CY, Nottebohm M, Suter R, Tolles A, Williams H, (1990) *Song learning in birds: the relation between perception and production*. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 329, 115–124.
15. Scharff C, Kirn, JR, Grossman M, Macklis JD, Nottebohm F, (2000) *Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behavior in adult songbirds*. *Neuron* 25, 481–492.
16. Lopez-Garcia C, Molowny A, Nacher J, Ponsoda X, Sancho-Bielsa F, Alonso-Llosa G (2002) *The lizard cerebral cortex as a model to study neuronal regeneration*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 74, 85–104.
17. Reynolds BA, Weiss S (1992) *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. *Science* 255, 1707–1710
18. Ming GL, Song H (2011) *Adult neurogenesis in the Mammalian brain: Significant Answer and Significant Question*. *Neuron* 26;70(4):687-702.
19. GrandPré T (2007) *Adult Neurogenesis: Do new neurons develop in the brain?*, <http://www.bioedonline.org/hot-topics/adult-neurogenesis.cfm>
20. Whitman MC, Greer CA (2009) *Adult neurogenesis and the olfactory system* *Prog Neurobiol.* 89(2):162-75.
21. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) *Neurogenesis in the adult human hippocampus* *Nature Medicine*, 4:1313-1317.
22. Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M (2006) *Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate*. *Dev. Biol.* 295, 263–277.
23. Mueller T, Dong Z, Berberoglu MA, Guo S. (2011) *The dorsal pallium in zebrafish, Danio rerio (Cyprinidae, Teleostei)*. *Brain Res.* 1381:95-105
24. Sauer FC (1935) *Mitosis in the neural tube*. *J. Comp. Neurol.* 62, 377–405
25. Campbell K, Götz M (2002) *Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development*. *Trends Neurosci* 25:235–238.

26. His W (1889) *Die Neuroblasten und deren Entstehung im embryonalen Marke*. Abh. Math.Phys. Cl. Kgl. Sach. Ges. Wiss. 15, 313–372
27. Malatesta P, Hartfuss E, Götz M (2000) *Isolation of radial glial cell by fluoerescent-activated cell sortin reveals neuronal lineage*. Development 127, 5253-5263
28. Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) *Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system*. Neuron 41:881–90
29. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2011) *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. Annu Rev Neurosci 32: 149-184
30. Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, et al. (2006) *The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells*. Nat Neurosci 9:743–51.
31. Del Bene F, Wehman AM, Link BA, Baier H (2008) *Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient*. Cell. 134:1055–65.
32. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007) *In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2(+) neural stem cells in the adult hippocampus*. Cell Stem Cell 1:515–28.
33. Breunig JJ, Macklis JD, Pakic P (2007). *Evolving methods for the labeling and mutation of postnatal neuronal precursor cells: a critical review*. In *Adult neurogenesis*, F.H. Gage, G. Kempermann, and S. Hongjun, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 49–80.
34. Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S. (2003) *Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches*. Neuron 39(6):937-50.
35. Han YG, Spassky N, Romaguera-Ros M, García-Verdugo JM, Aguilar A, et al. (2008) *Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells*. Nat Neurosci 11:277–84.
36. Middeldorp J, Hol EM (2011) *GFAP in health and disease*. Prog Neurobiol. 93(3):421-43.
37. Morgan TE, Xie Z, Goldsmith S, Yoshida T, Lanzrein AS, Stone D, Rozovsky I, Perry G, Smith MA, Finch CE (1999) *The mosaic of brain glial*

-
- hyperactivity during normal ageing and its attenuation by food restriction.* Neuroscience 89, 687–699.
38. Donato R (2001) *S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EFhand type with intracellular and extracellular functional roles* Int. J. Biochem. Cell Biol. 33:637–668.
39. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). Biochem Biophys Res Commun 322(4):1111-22.
40. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W (1995) *The S100 protein family: history, function, and expression.* Brain Res Bull. 37(4):417-29.
41. Selinfreund RH, Barger S W, Pledger W J; Van Eldik LJ (1991) *Neurotrophic protein S100b stimulates glial cell proliferation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3554–3558.
42. Sakakibara S, Okano H (1997). *Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implications of their roles in neuronal and glial cell development.* J. Neurosci. 17(21):8300– 8312.
43. Sakakibara S, Nakamura Y, Satoh H, Okano H (2001). *Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS.* J. Neurosci. 21:8091– 8107.
44. Battelli C, Nikopoulos GN, Mitchell JG, Verdi JM (2006) *The RNA-binding protein Musashi-1 regulates neural development through the translational repression of p21WAF-1.* Mol Cell Neurosci. 31(1):85-96
45. Ratti A, Fallini C, Cova L, Fantozzi R, Calzarossa C, Zennaro E, Pascale A, Quattrone A, Silani V (2006) *A role for the ELAV RNA-binding proteins in neural stem cells: stabilization of Msi1 mRNA.* J Cell Sci 119:1442-52.
46. Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weinmaster G, Nakafuku M, Okano H (2009) *The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA.* Mol Cell Biol 21:3888-900.
47. Horisawa K, Imai T, Okano H, Yanagawa H (2009) *3'-Untranslated region of doublecortin mRNA is a binding target of the Musashi1 RNA-binding protein.* FEBS Lett. 21;583(14):2429-34..

-
48. Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA (1998) *Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein*. Cell, 92:63–72.
 49. Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) *Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis*. J. Comp. Neurol. 467:1–10.
 50. Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. (2005) *Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis*. Eur J Neurosci. 21(1):1-14
 51. Gompertz B, (1825) *On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode of determining life contingencies*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 115:513–585.
 52. Williams GC (1957) *Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence*. Evolution 11: 398–411
 53. Carnes BA, Olshansky SJ, Grahn D, (1996) *Continuing the search for a law of mortality*, Population and Development Review 22:231–264
 54. Kirkwood TBL (1977) *Evolution of aging*, Nature 270:301–304.
 55. Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas A, Kempermann G, Taylor V, Giachino C (2010) *Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging*. Cell Stem Cell 6:445–456.
 56. Bouab M, Paliouras GN, Aumont A, Forest-Bèrard K, Fernandes KJL (2011) *Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood* Neurosci. 173:135-149
 57. Genade T, Benedetti M, Terzibasi E, Roncaglia P, Valenzano D, Cattaneo A, Cellerino A (2005) *Annual fishes of the genus Nothobranchius as a model system for ageing research*. Aging Cell 4:223–233.
 58. Terzibasi E, Valenzano DR, Benedetti M, Roncaglia P, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. (2008) *Large differences in aging phenotype between strains of the short-lived annual fish Nothobranchius furzeri*. PLoS One 3(12):e3866

-
59. Jubb R (1981) *Nothobranchius*. Neptune City, New Jersey: T.F.H. Publications.
 60. Dorn A, et al. (2011) *Phylogeny, genetic variability and colour polymorphism of an emerging animal model: The short-lived annual Nothobranchius fishes from southern Mozambique*. Mol. Phylogenet. Evol. 2011 Jun 24. [Epub ahead of print] doi:10.1016/j.ympev.2011.06.010
 61. Terzibasi E, Valenzano DR, Cellerino A (2007) *The short-lived fish Nothobranchius furzeri as a new model system for aging studies*. Experimental Gerontology 42:81–89
 62. NFIN [The *Nothobranchius furzeri* Information Network]-Phylogeny <http://www.nothobranchius.info/pages/biology/phylogeny.php>
 63. Gardi JE et al. (2006) *Using biased image analysis for improving unbiased stereological number estimation - a pilot simulation study of the smooth fractionator*. J Microsc. 222(Pt 3):242-50
 64. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Molecular Biology and Evolution (In Press).
 65. ORFFinder, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>
 66. Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. (1992). *The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences*. Computer Applications in the Biosciences 8: 275-282.
 67. März M, Chapouton P, Diotel N, Vaillant C, Hesl B, Takamiya M, Lam CS, Kah O, Bally-Cuif L, Strähle U. (2010) *Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon*. Glia 58(7):870-88
 68. Alunni A, Hermel JM, Heuzé A, Bourrat F, Jamen F, Joly JS. (2010) *Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones* Dev Neurobiol. 70(10):693-713.
 69. Ito Y, Tanaka H, Okamoto H, Ohshima T. (2010) *Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum*. Dev Biol. 1;342(1):26-38

-
70. Stiles CD, Rowitch DH, (2008) *Glioma stem cells: a midterm exam* Neuron 58, 832–846
 71. Zhong W, Chia W. (2008). *Neurogenesis and asymmetric cell division*. Curr Opin Neurobiol. 18(1):4-11
 72. Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP, (2009) *Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNA*. Stem Cells Dev. 18(7): 1093-108,
 73. Takahashi K, Yamanaka S (2007) *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*, Cell 124(4):663-676, 2006
 74. Fimbel S, *Regeneration of Inner Retinal Neurons after Intravitreal Injection of Ouabain in Zebrafish* J. Neurosci 27(7): 1712-1724
 75. Ramachandran R, Fausett BV, Goldman D, (2010) *Ascl1a regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin28-dependent, let7 microRNA signalling pathway*, Nat Cell Biol 12(11):1101-7,
 76. Kraemer AM, Saraiva LR, Korsching SI. (2008) *Structural and functional diversification in the teleost S100 family of calcium-binding proteins* BMC Evol Biol. 14;8:48.
 77. Shang X, Cheng H, Zhou R (2008) *Chromosomal mapping, differential origin and evolution of the S100 gene family*. Genet Sel Evol. 40(4):449-64.
 78. Meyer A, van de Peer Y, (2005) *From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD)*, Bioessays 27:937–945

IV. Appendici

A. Sox2

Sox2 è un fattore di trascrizione altamente conservato, membro della famiglia genica Sox (SRY-related HMG box transcription factor). Nel SNC in sviluppo viene espresso dai progenitori neurali nei quali è responsabile del mantenimento dello stato indifferenziato e, al momento del commitment, dell'indirizzamento al lineage neuronale. Sox2 viene perciò comunemente usato come marcatore di progenitori neurali: in particolare, essendo un fattore di trascrizione, la presenza di proteina Sox2 dovrebbe localizzarsi nel nucleo.

Data la rilevanza dell'espressione di questo marcatore, sono stati saggiati tre diversi anticorpi α Sox2 [Cell Signalling (1:100), Abcam (1:100), Millipore (1:500)] al fine di sceglierne quello con la maggiore specificità e sensibilità di marcatura. Tuttavia nessun anticorpo ha soddisfatto le nostre esigenze per motivi di scarsa sensibilità [Cell Signalling, Millipore] o aspecificità di legame [Abcam]. L'anticorpo prodotto dalla Abcam (policlonale in coniglio) ha mostrato una buona sensibilità di legame ma una nulla specificità di legame: le cellule Sox2⁺ sono marcate nel citoplasma e non nel nucleo come dovrebbero (Fig I).

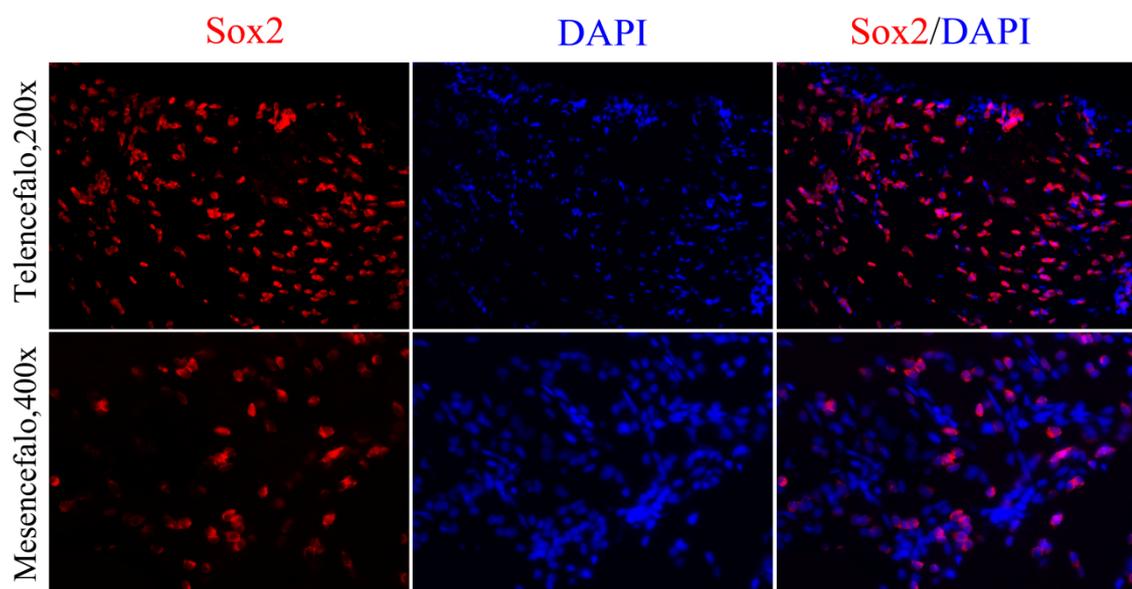


Fig. I. Aspecificità di un anticorpo α Sox2. Complementarietà tra il segnale dell'anticorpo e quello del marcatore nucleare DAPI nel telencefalo(200x) e nel mesencefalo (400x)

B. Abbreviazioni

3'-UTR	[3'-UnTranslated Region], Regione Non Trascritta al 3'
Ab(I, II)	[Antibody], anticorpo primario (I) e secondario (II)
Ag	[Antigen], Antigen
aNSC	[adult Neural Stem Cell], Cellula Staminal Nervosa Adulta
BLBP	[Brain Lipid-Binding Protein], Proteina Legante i Lipidi nel Cervello
C-term	Carbossi-terminale
DAPI	[4',6-diamidino-2-phenylindole] 4',6-diamidino-2-fenilindolo
Dcx	Double-cortin
DCLK	[Double-Cortin Like Kinase], Chinasi Simile a Double-cortin
DG	[Dentate Girus], Giro Dentato
EdU	[5-ethynyl-uridine], 5-etinil-uridina
ESC	[Embryonic Stem Cell], Cellula Staminal Embrionale
GFAP	[Glial Acidic Fibrillary Protein], Proteina Fibrillare Acida della Glia
GLAST	[Astrocyte-Specific Glutammate Transporter], Trasportatore del Glutammato Specifico degli Astrociti
GS	[Glutamine Synthetase], Glutamina Sintetasi
hpi	[hours post injection], ore dopo l'iniezione
HVC	[High Vocal Center], Centro Vocale Superiore
IF	[Intermediate Filament], Filamento Intermedio
MEC	Matrice Extra Cellulare
Msi1	Musashi 1
NE	[Neuroepitelio]
Nicd	[Notch intra-cellular domain], Dominio intra-cellulare di Notch
nIPC	[neural Intermediate Progenitor Cell], Cellula Progenitrice neurale Intermedia
N-term	Ammino-terminale
OB	[Olfactory Bulb], Bulbo Olfattivo

OT	[Optic Tectum], Tetto Ottico
RAGE	[Receptor for Advanced Glycation End-products], Recettore dei Prodotti Avanzati della Glicazione
RBP	[RNA-Binding Protein], Proteina che Lega l'RNA
RG	[Radial Glia], Glia Radiale
RG-like	[Radial Glia-like], simile alla Glia Radiale
RMS	[Rostral Migratory Stream], Flusso di Migrazione Rostrale
SA- β -galattosidasi	[Senescence Associated- β -galattosidasi], β -galattosidasi Associata all'Invecchiamento
SGZ	[Sub Granular Zone], Zona Sub Granulare
Shh	Sonic-hedgehog
SNC	Sistema Nervoso Centrale
SNP	Sistema Nervoso Periferico
Sox2	[SRY-related HMG-box Transcription Factor], Fattore di Trascrizione con boxHGM correlato a SRY
SVZ	[Sub Ventricular Zone], Zona Sub Ventricolare
TAP	[Precursori Trans Amplificanti]
wks	[weeks], settimane

V. Ringraziamenti

Scrivere la prima parola è difficile quanto lo è scrivere l'ultima. Questo lavoro di tirocinio e tesi è stato concepito per essere l'inizio e non la conclusione di un percorso, di studio e di ricerca, e perciò queste ultime righe sono scritte con lo scopo di ringraziare coloro il cui apporto è stato importante affinché io muovessi questi primi passi.

Desidero innanzitutto ringraziare il dott. Alessandro Cellerino per avermi accolta in laboratorio, avermi seguita con estrema disponibilità nell'elaborazione dei risultati e nella stesura di questa tesi, ma anche e soprattutto per i mille insegnamenti non solo nel campo della biologia. Un sentito grazie va anche alla dott.ssa Eva Terzibasì per il fondamentale aiuto nella realizzazione degli esperimenti e delle immagini e, ancor più, per il sostegno morale offertomi in questi mesi. Ringrazio anche il dott. M. Baumgart, dottorando al FLI-Leibniz Institute for Age Research di Jena (Germania), per avermi fornito i risultati di RT-PCR nonostante non abbiamo avuto alcuna occasione di conoscerci.

Ringrazio il prof. Andreazzoli per gli spunti di riflessione e approfondimento che ha saputo offrirmi ad ogni occasione di discussione di questo lavoro.

Un ringraziamento va al CNR di Pisa, in particolare agli Istituti di Biofisica e Fisiologia Clinica, e alla Scuola Normale, per aver reso possibile, nella pratica, questa esperienza.

In questi anni non sono mancati momenti di forti emozioni, positive e negative. A gioire e patire insieme a me negli ultimi tre anni ci sono stati Marco, Luca, Arianna, Rosa, Chiara e Matteo ai quali va un enorme "grazie!". Gli amici non sono solo quelli con cui si condivide molta parte della propria giornata: vorrei perciò ringraziare Claudia, Giulio, Matteo, Matteo, Gabriele e Claudio per aver smentito chi dice che la lontananza logora l'amicizia.

Infine, se son arrivata fin qui, lo devo soprattutto ai miei genitori che mi hanno sempre motivato e spinto a pormi obiettivi ambiziosi. Spero di averli resi orgogliosi e di continuare a farlo in futuro, così da ripagarli (in parte) di tutto ciò che hanno investito in me, sia economicamente che umanamente. Per ringraziare mia sorella Roberta non basterebbero mille parole, perciò non ne aggiungo nemmeno una.

Ultimo, ma non per importanza, un ringraziamento speciale al pesciolino Notho!

Giorgia