
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Farmacia

Dipartimento di Endocrinologia, Fisiopatologia e Biologia applicata

Corso di Dottorato in
SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE (XXIV CICLO)



Tesi di Dottorato
**COINVOLGIMENTO DELLA NEURITINA NELLA MIGRAZIONE DEI NEURONI GnRH:
EVIDENZE SPERIMENTALI IN VITRO ED IN VIVO**

Settori scientifico disciplinari: BIO 09, BIO 13, MED 13

Dottoranda: Dott.ssa Arianna Zito
Matricola: R08073

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa Mariarita Galbiati

Coordinatore del Dottorato: Chiar.mo Proff. Paolo Beck-Peccoz

A.A.
2010/2011

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 2
SCOPO DELLA RICERCA	Pag. 68
MATERIALI E METODI	Pag. 69
RISULTATI	Pag. 77
DISCUSSIONE	Pag. 99
BIBLIOGRAFIA	Pag. 106

1) I NEURONI GnRH

1.1 IL PEPTIDE GnRH

Il Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH), chiamato anche GnRH, è un decapeptide (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) che ha un ruolo chiave nel processo riproduttivo. Viene prodotto da neuroni secernenti ipotalamici e rilasciato nel circolo portale ipotalamo-ipofisario attraverso il quale viene trasportato all'ipofisi anteriore. Dopo essersi legato al suo specifico recettore (recettore GnRH di tipo I) su cellule specializzate dell'ipofisi anteriore, l'ormone stimola la biosintesi e la secrezione delle gonadotropine LH (luteinizing hormone) e FSH (follicle stimulating hormone), che a loro volta vengono liberate nella circolazione sistemica, attraverso la quale giungono alle gonadi, ove regolano la steroidogenesi e la gametogenesi in entrambi i sessi.

La presenza di un'attività rilasciante l'ormone luteinizzante (LH) in estratti acidi di ipotalami di ratto fu dimostrata da McCann e collaboratori già nel 1960 (McCann and Friedman 1960), ma la struttura del decapeptide non venne determinata fino al 1971 simultaneamente dal laboratorio di Schally (Matsuo, Baba et al. 1971) e di Guillemain (Amoss, Burgus et al. 1971). Qualche anno dopo mediante dosaggio radioimmunologico il GnRH venne localizzato nell'ipotalamo mediobasale e nelle regioni rostrali preottica e sovrachiasmatica in diverse specie animali. Il gene codificante per il prepropeptide GnRH è stato sequenziato da Seeburg and Adelman nel 1984 (Seeburg and Adelman 1984).

Dalla sua scoperta sono stati sviluppati e studiati molti analoghi del GnRH con potenza biologica maggiore. Alcuni di questi analoghi sintetici sono stati utilizzati in modo efficace in clinica, in una ampia gamma di endocrinopatie riproduttive, mentre altri sono stati largamente adottati nei regimi di iperstimolazione ovarica controllata per la riproduzione assistita. Infine, gli analoghi del GnRH sono utilizzati anche quali soppressori della proliferazione tumorale.

L'azione dei neuroni GnRH-secernenti si esplica mediante il rilascio pulsatile di GnRH a livello del circolo portale ipofisario; è da notare che, benchè le modalità di secrezione di questo ormone siano differenti a seconda della specie, del sesso e dello stato fisiologico, la pulsatilità o comunque l'episodicità della secrezione è stata sempre osservata in tutti i sistemi ad oggi analizzati (Gore, Oung et al. 2002).

Fino ad ora sono stati isolati nei vertebrati più di 12 isoforme di GnRH, che condividono il 10-50% degli aminoacidi. La maggior parte delle specie di vertebrati possiede due/tre forme di GnRH che differiscono nella loro sequenza aminoacidica, nella loro localizzazione e nell'origine embrionale. Nell'uomo, accanto al GnRH-I (che in questa tesi verrà sempre indicato come GnRH), è stato isolato anche un secondo tipo di GnRH, chiamato GnRH-II, strutturalmente identico al GnRH originariamente isolato nel pollo (White, Eisen et al. 1998). Questa seconda isoforma del GnRH differisce dalla prima per tre residui aminoacidici nelle posizioni 5, 7, 8 (His5Trp7Tyr8GnRH-I). Una delle specifiche funzioni biologiche del GnRH-II è quella di servire da potente inibitore dei canali del potassio nel ganglio simpatico degli anfibi, facilitando la trasmissione eccitatoria rapida da parte dei neurotrasmettitori convenzionali e potrebbe costituire un meccanismo neuromodulatorio generale per il GnRH-II nel sistema nervoso. Recentemente, per questa seconda isoforma del GnRH è stato suggerito un ruolo nel coordinamento tra la disponibilità energetica ed il comportamento riproduttivo (Temple, Millar et al. 2003).

Analisi immunostochimiche effettuate su sezioni seriali di cervelli di ratti adulti maschi e femmine hanno indicato la presenza di un totale di 1200-1400 neuroni contenenti GnRH (Wray and Gainer 1987). I corpi cellulari di circa 800 di questi neuroni sono localizzati, in modo disperso, nell'area preottica (POA) dell'ipotalamo, ad una considerevole distanza dai loro terminali situati a livello della regione dell'eminenza mediana e del nucleo arcuato (ME-ARC), dove possono entrare in contatto diretto con lo spazio perivascolare: questa situazione anatomica permette di regolare l'attività dei neuroni GnRH-secernenti in modo indipendente, sia a livello dei corpi cellulari sia delle sinapsi (King and Letourneau 1994; Kaur, Heera et al. 2002). Altri 400-600 neuroni contenenti GnRH risiedono nel bulbo olfattorio e sono importanti per il controllo del comportamento riproduttivo. La concentrazione più alta di GnRH è a livello dell'eminenza mediana e nell'organo vascoloso della lamina terminale (OVL) (Sagrillo, Grattan et al. 1996).

1.2 DESCRIZIONE DEL SISTEMA GnRH

Il "sistema GnRH" è costituito da neuroni ipotalamici che producono e secernono il decapeptide GnRH, dalle cellule gliali ad essi associate, oltre che da altre popolazioni neuronali che ne possono modulare l'attività; questo network cellulare permette di integrare

molteplici fattori, sia endogeni sia ambientali, implicati nella regolazione della secrezione degli ormoni sessuali e, di conseguenza, delle funzioni riproduttive.

Infatti, il sistema GnRH è sottoposto ad una stretta regolazione da parte di fattori ambientali e di ormoni steroidei e peptidici. Per quanto riguarda gli ormoni è possibile osservare tre diversi tipi di feedback: quello lungo, operato dagli steroidi gonadici, quello breve, da parte degli ormoni ipofisari LH ed FSH e quello ultrabreve, da parte dello stesso GnRH. Questi segnali di feedback possono essere sia positivi che negativi e modulare la sintesi e/o il rilascio del GnRH, e si possono esplicitare sui diversi componenti del sistema GnRH, cioè i neuroni GnRH-secernenti, i neuroni ad essi afferenti e le cellule gliali che li circondano. Infatti, nel corso degli ultimi 15 anni è stato messo in luce, e via via sempre meglio caratterizzato il ruolo delle cellule gliali in questo network, evidenziandone un'importante funzione regolatoria sui neuroni GnRH sia in vitro che in vivo (Ojeda and Ma 1999; Melcangi, Martini et al. 2002).

1.3 REGOLAZIONE STEROIDEA DEL SISTEMA GnRH

Tutti i processi che portano a sintesi e rilascio di GnRH (velocità di trascrizione, stabilità dell'mRNA, processi post-traduzionali, ecc.) sono selettivamente regolati nei neuroni GnRH attraverso una serie di diversi sistemi di controllo. Tra questi uno dei più importanti è quello dato dai meccanismi di feedback steroideo.

Il concetto che gli steroidi modulano il rilascio di GnRH e di gonadotropine venne postulato per la prima volta negli anni '30; nonostante siano passati quasi 80 anni, come e dove gli ormoni agiscano per esercitare i loro effetti di feedback negativi o positivi resta ancora un argomento controverso e dibattuto della neuroendocrinologia. Ad oggi, si pensa che i livelli di gonadotropine circolanti riflettano le variazioni dei livelli di GnRH nella circolazione portale. Inoltre, poiché in entrambi i sessi la rimozione degli ormoni steroidei mediante castrazione causa un aumento della secrezione di GnRH, si pensa che gli estrogeni (E) e gli androgeni (A) agiscano nel sistema nervoso centrale (SNC) inibendo il rilascio di questo decapeptide (Kalra and Kalra 1989). Deve però essere evidenziato che gli studi sul controllo dell'espressione genica del GnRH esercitato dagli ormoni steroidei hanno dato luogo a risultati contraddittori.

1.3.1 ANDROGENI

Diversi autori hanno esaminato l'effetto della castrazione sull'espressione genica del GnRH nel ratto maschio, partendo dall'ipotesi di lavoro che un aumento dell'attività secretoria di neuroni peptidergici possa essere accoppiata con una aumentata sintesi del peptide. I risultati di questi studi hanno riportato livelli di GnRH-mRNA aumentati, diminuiti o invariati dopo orchidectomia (Sagrillo, Grattan et al. 1996; Gore and Roberts 1997). Analizzando il *time-course* delle variazioni di GnRH ottenute in alcuni studi, si può osservare che i livelli di mRNA del decapeptide aumentano 1-3 giorni dopo la castrazione, ritornano ai livelli basali dei controlli dopo 5-7 giorni e infine, aumentano ancora dopo 14-21 giorni dall'operazione (Emanuele, Jurgens et al. 1996). In ratti maschi castrati, il trattamento con testosterone (T) o diidrotestosterone (DHT) ha dato luogo a differenti risultati. Anche in questo caso, alcuni autori hanno riportato un aumento, altri una diminuzione, altri ancora una non variazione dei livelli di GnRH-mRNA. Ad esempio, Park e collaboratori hanno evidenziato un aumento di GnRH-mRNA dopo trattamento con T (Park, Park et al. 1988), mentre Spratt e Herbison non hanno trovato alcun effetto del DHT (Spratt and Herbison 1997). Infine, Toranzo e collaboratori hanno osservato che il DHT diminuisce la quantità di GnRH-mRNA riportandola ai livelli della precastrazione (Toranzo, Dupont et al. 1989). Inoltre, va anche ricordato che in uno studio è stato riportato che, a dosi fisiologiche, gli A sono in grado di regolare negativamente i livelli di GnRH-mRNA attraverso un meccanismo dipendente dal recettore androgenico (AR). Un'analisi approfondita di questi studi dimostra però che essi sono stati svolti con metodiche differenti (diverse tecniche di ibridazione, diversi intervalli di castrazione, diverso tipo di steroide utilizzato e diverse dosi e tempi di trattamento), e questo potrebbe aiutare a spiegare le discrepanze tra gli studi dei diversi laboratori.

1.3.2 ESTROGENI

Il primo impatto tra neuroni GnRH secernenti ed E si ha durante lo sviluppo, quando l'estradiolo e l'estrone, derivanti dall'aromatizzazione degli A, agiscono sul sistema GnRH (anche se apparentemente non in modo diretto sui neuroni GnRH secernenti) per differenziare in senso maschile diversi e specifici parametri (Herbison 1998). In questo modo, la risposta del sistema GnRH agli E resta fissata per tutto il periodo post-natale, in quanto il sistema GnRH maschile o femminile risponderà per sempre in modo diverso alle influenze degli E.

Nella femmina adulta, gli E esercitano un'influenza stimolatoria sul GnRH secreto agendo a livello dell'eminenza mediana, dove danno inizio al picco di LH (Caraty, Locatelli et al. 1989). Gli E sono anche in grado di regolare la biosintesi di GnRH attraverso modificazioni della trascrizione genica e delle modificazioni post-trascrizionali (Kelly, Garrett et al. 1989). Il picco preovulatorio di GnRH richiede diverse ore di pre-esposizione del sistema GnRH agli E. L'azione stimolatoria degli E sembra essere mediata, nel ratto, da neuroni localizzati nell'area preottica rostrale (Wiegand and Price 1980; Wiegand and Terasawa 1982). Il prolungato periodo di esposizione agli E inizia una cascata di eventi neuronali che si riflettono sulla sintesi e sulla secrezione del GnRH.

Gli effetti inibitori degli E sui neuroni GnRH secernenti sono molto controversi, ma diverse evidenze supportano il fatto che gli E possano avere questi effetti sulla secrezione del GnRH e in particolare diminuiscano l'ampiezza dei pulsii di GnRH e la sua espressione genica (Chongthammakun and Terasawa 1993). L'influenza inibitoria degli E si esplica in modo più rapido (entro 1-2 h) rispetto a quella stimolatoria e potrebbe correlare con una diretta e parallela inibizione della attività elettrica dei neuroni GnRH (Caraty, Locatelli et al. 1989). L'effetto inibitorio degli E sulla sintesi di GnRH non può però essere automaticamente attribuito all'ovariectomia, in quanto questa operazione elimina oltre che gli E anche il progesterone (P), le inibine, le activine e altri peptidi attivi dal punto di vista ormonale. A causa di queste interazioni è stato riportato che l'ovariectomia diminuisce, aumenta o non ha effetto sull'espressione genica del GnRH (Gore and Roberts 1997).

Diversi studi hanno esaminato le variazioni nell'espressione genica del GnRH durante il ciclo estrale o indotte dal trattamento con steroidi dopo ovariectomia. Il rilascio pulsatile del decapeptide aumenta durante il picco di gonadotropine indotto artificialmente in scimmie (Xia, Van Vugt et al. 1992) o pecore (Gore and Roberts 1997) ovariectomizzate. Gore e Roberts hanno anche dimostrato, mediante *RNase protection assay*, che né i livelli di GnRH-mRNA, né i livelli di trascritto primario vengono variati dal trattamento estro-progestinico durante il picco di LH indotto in ratte ovariectomizzate (Gore and Roberts 1995). Questo dato è stato confermato anche da un altro laboratorio mediante ibridazione *in situ* (Marks, Lent et al. 1994). Al contrario uno studio più recente ha riportato che i livelli di trascritto primario di GnRH possono essere modificati prima che il GnRH-mRNA inizi a fluttuare nel giorno del picco di LH (Jimenez-Linan and Rubin 2001).

Infine, gli E possono anche regolare la traduzione e il processamento del peptide pro-GnRH. Quest'ultimo viene diminuito nell'area preottica anteriore e nell'ipotalamo anteriore

di ratte ovariectomizzate, sia in presenza sia in assenza di variazioni parallele di GnRH-mRNA (Sagrillo, Grattan et al. 1996; Herbison 1998). I livelli di peptide pro-GnRH vengono aumentati diversi giorni dopo l'inizio del trattamento con E (Roberts, Dutlow et al. 1989).

L'andamento dell'espressione genica del GnRH è stato valutato anche in femmine di ratto durante le diverse fasi del ciclo ovarico ed anche in questo caso si sono ottenuti risultati contraddittori. L'analisi dei livelli del peptide GnRH hanno indicato che si ha un picco di GnRH poco prima o simultaneamente a quello dell'LH (Gore and Roberts 1997). Per quanto riguarda l'espressione genica del GnRH, alcuni autori hanno riportato che i livelli di GnRH-mRNA non variano durante il ciclo estrale (Malik, Silverman et al. 1991; Marks, Lent et al. 1994), mentre altri autori indicano un aumento dell'espressione genica nel pomeriggio del proestro (Gore and Roberts 1997).

1.3.3 PROGESTERONE

Vi sono sostanziali evidenze che indicano un importante ruolo del P nell'indurre o nel facilitare il picco delle gonadotropine. Questo steroide sembra agire a diversi livelli, in quanto esso esercita un effetto regolatorio diretto sulle cellule dell'ipofisi anteriore, ma è anche in grado di agire a livello ipotalamico modulando la sintesi e il rilascio pulsatile di GnRH (Ramirez, Dluzen et al. 1980; Kim, Lee et al. 1989). Inoltre, il P sembra essere indispensabile per poter avere una piena responsività dell'ipofisi al GnRH. Infatti, dopo ovariectomia e adrenalectomia i soli E non sono in grado di indurre un picco preovulatorio di gonadotropine (Mahesh and Brann 1998). Probabilmente, la modulazione della secrezione di GnRH da parte del P riflette la modulazione parallela dell'espressione del decapeptide. Infatti è stato riportato che il P aumenta i livelli di GnRH-mRNA nel MBH e nella POA del ratto (Kim, Lee et al. 1989) e che, sotto influenza del P, i livelli del trascritto per il GnRH diminuiscono dopo il picco di gonadotropine (Gore and Roberts 1995; Petersen, McCrone et al. 1995). Inoltre, in ratte prepuberi ovariectomizzate e trattate con E, il P è in grado di aumentare i livelli ipotalamici di GnRH-mRNA (Kim, Lee et al. 1989). Questa azione potrebbe essere mediata dagli aminoacidi eccitatori, poiché l'aumento dell'espressione genica del GnRH viene completamente abolito dalla preventiva somministrazione di MK-801, un antagonista del recettore NMDA (Seong, Lee et al. 1993).

Esperimenti effettuati su frammenti ipotalamici hanno suggerito un sito d'azione di membrana per il P (Park and Ramirez 1989). Molti studi hanno anche riportato che gli steroidi derivati dal P possano influenzare la secrezione delle gonadotropine con un meccanismo

d'azione che non coinvolge i classici recettori intracellulari del P (Sim, Skynner et al. 2001). In questo contesto, è stato dimostrato che le cellule GT1 esprimono il recettore GABAA e che il THP (un metabolita del P in grado di legare il recettore GABAA) ha una azione rapida (entro i 3 minuti), correlata alla dose e bifasica sul rilascio di GnRH (El-Etr, Akwa et al. 1995). L'ipotesi che l'effetto del THP sia mediato dal recettore GABAA è supportata dal fatto che antagonisti di questo recettore quali la bicucullina e la picrotossina, sono in grado di abolire la secrezione di GnRH indotta dal THP in questo sistema (El-Etr, Akwa et al. 1995). Inoltre, la rapidità dell'azione del THP suggerisce che questo steroide non venga retroconvertito a DHP e quindi non agisca mediante il recettore del P. Recentemente lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che il pregnenolone solfato (pur non legando alcun recettore steroideo intracellulare classico) è in grado di potenziare la secrezione del GnRH indotta dal glutammato grazie ad una modulazione allosterica positiva dei recettori NMDA (El-Etr, Akwa et al. 2006).

1.3.4 SITO D'AZIONE

L'esatto sito d'azione degli steroidi sul sistema GnRH non è ancora stato completamente chiarito. Nella femmina adulta di ratto, il nucleo AVPv (anteroventrale-periventricolare), una zona dell'area preottica in cui sono stati localizzati numerosi neuroni che esprimono le isoforme α e β del ER e il PR, potrebbe essere il sito critico dove agiscono gli E per indurre la biosintesi del GnRH (Wiegand and Price 1980; Wiegand and Terasawa 1982). Il nucleo AVPv potrebbe essere anche il sito in cui i segnali steroidei e gli input circadiani vengono integrati prima di essere trasmessi ai neuroni GnRH (Watson, Langub et al. 1995).

Anche il sito in cui gli E esercitano la loro azione inibitoria sulla secrezione del GnRH non è ancora completamente chiarito e sembra essere diverso da quello in cui si ha la stimolazione. Di particolare importanza è la dimostrazione che l'espressione genica del GnRH è aumentata a livello dell'OVLt al momento del picco di LH, mentre il contenuto di GnRH aumenta in aree ipotalamiche più caudali prima del picco di gonadotropine (Porkka-Heiskanen, Urban et al. 1994). Questo potrebbe suggerire l'esistenza di sotto-popolazioni di neuroni GnRH che rispondono diversamente agli steroidi. La regione più importante a questo proposito è ancora l'AVPv.

Molti neuroni entrano in contatto diretto con i neuroni GnRH (Pfaff and Keiner 1973; Fuxe, Cintra et al. 1987), sia a livello dei corpi cellulari sia a livello dei terminali nella ME, e possono produrre differenti neurotrasmettitori o peptidi neuroattivi che vanno a modulare la

secrezione di GnRH a livello della eminenza mediana e/o la sua produzione a livello dei corpi cellulari; tra i più importanti si possono ricordare il GABA che, agendo sui recettori GABAA a livello dei corpi cellulari dei neuroni GnRH, ha un effetto inibitorio sulla loro attività secretoria (Jarry, Leonhardt et al. 1991), e gli aminoacidi neuroeccitatori quali il glutammato e l'aspartato, che hanno un ruolo importante nella generazione della pulsilità della secrezione del GnRH (Ping, Mahesh et al. 1994; Zanisi, Galbiati et al. 1994).

Recentemente è stato dimostrato che i neuroni GnRH nella pecora possiedono anche i recettori GABAB, ma non nei terminali dell'eminenza mediana, quindi probabilmente non sono coinvolti nella regolazione della secrezione del GnRH (Sliwowska, Billings et al. 2006).

1.3.5 MODALITÀ D'AZIONE

Per quanto riguarda il modo d'azione degli ormoni sessuali steroidei sulla secrezione di GnRH, sono stati postulati almeno tre diversi tipi di meccanismo: a) un'azione diretta degli E sui neuroni GnRH; b) un'azione indiretta mediata dai neuroni situati vicino ai neuroni GnRH; c) un'azione indiretta che coinvolge l'interazione tra le cellule gliali e i neuroni GnRH secernenti.

Per poter postulare una azione diretta degli ormoni steroidei sui neuroni GnRH è necessaria la dimostrazione della presenza dei recettori steroidei in questi neuroni. Shivers e collaboratori hanno riportato che i neuroni GnRH non sono in grado di concentrare E (Shivers, Harlan et al. 1983). Questo dato è supportato dalla dimostrazione dell'assenza di mRNA che codifica per il recettore degli E (ER) α e della corrispondente proteina nei neuroni GnRH (Herbison, Pape et al. 2001). La scoperta di un secondo tipo di ER, chiamato ER β (Kuiper, Enmark et al. 1996; Mosselman, Polman et al. 1996), ha riaperto la questione se i neuroni GnRH posseggono i ER. I dati ottenuti in diversi laboratori indicano la presenza del messaggero e della proteina per ER β nei neuroni GnRH (Butler, Sjoberg et al. 1999; Skynner, Sim et al. 1999; Hrabovszky, Shughrue et al. 2000; Kalló, Butler et al. 2001). Questi studi potrebbero indicare che gli effetti esercitati dagli E sui neuroni GnRH potrebbero essere diretti e mediati da ER β . Va fatto notare però che solo una piccola parte di neuroni GnRH esprime ER β , e quindi bisogna essere cauti nell'affermare che i neuroni GnRH rappresentino un bersaglio diretto dell'azione degli E. Resta comunque la possibilità che ER siano espressi dai neuroni GnRH solo durante l'embriogenesi e/o durante le prime fasi della vita postatale. Questa possibilità è supportata dal fatto che ER sono espressi nelle cellule GT1 (Poletti,

Melcangi et al. 1994; Radovick, Wray et al. 1994; Kallo, Butler et al. 2001), le quali potrebbero essere molto simili a neuroni GnRH immaturi.

I neuroni GnRH in vivo non esprimono neppure il AR (Huang and Harlan 1993); anche in questo caso, è stato riportato che le cellule GT1 esprimono AR-mRNA ed hanno livelli dosabili di siti di legame ad alta affinità per gli A (Poletti, Melcangi et al. 1994; Belsham, Evangelou et al. 1998). Le cellule GT1 esprimono anche ARA70, uno specifico co-attivatore ligando-indipendente di AR, che è in grado di aumentare la transattivazione di AR (Yeh and Chang 1996).

La scoperta che anche nelle cellule GT1 sono stati trovati bassi livelli di recettori steroidei, potrebbe spiegare perché questi non siano ancora stati identificati nei neuroni GnRH in vivo. Cioè, l'apparente assenza di recettori steroidei nei neuroni GnRH in vivo potrebbe essere dovuta a diversi motivi: i) i neuroni GnRH sono pochi e molto distribuiti; ii) questi neuroni possiedono pochi recettori per gli steroidi; iii) le metodiche fino ad ora utilizzate in questo campo di ricerca non hanno ancora sufficiente sensibilità. Inoltre, è possibile che solo sottogruppi di neuroni GnRH contengano recettori steroidei, come è stato evidenziato per il recettore del P (PR) (King and Rubin 1995). Infatti, nel porcellino d'india una piccola sottopopolazione di neuroni GnRH, non superiore al 5%, è in grado di esprimere il PR (King and Rubin 1995).

Per quanto riguarda il secondo tipo di meccanismo, va tenuto in considerazione che diversi sistemi di neurotrasmettitori sono presenti nei neuroni che fanno parte del sistema GnRH. Ovviamente quindi, gli E potrebbero stimolare i neuroni GnRH prima del picco di gonadotropine mediante l'attivazione di una o più di queste vie di neurotrasmettitori. Per esempio, è risaputo che gli aminoacidi neuroeccitatori e la norepinefrina vengono utilizzati dagli E per attivare l'attività dei neuroni GnRH a livello del loro corpo cellulare. Neuropeptide Y e norepinefrina hanno lo stesso ruolo ma a livello dei terminali nervosi (Herbison 1998). Gli E potrebbero anche utilizzare vie inibitorie, quale ad esempio quella della β -endorfina, dando luogo ad una disinibizione dell'attività dei neuroni GnRH (Herbison 1998). Gli E possono variare la responsività dei neuroni GnRH all'attivazione di diversi sistemi recettoriali ai loro rispettivi messaggeri specifici. Ad esempio gli E possono variare la responsività cellulare all'attivazione da parte del glutammato dei recettori ionotropici (Malyala, Kelly et al. 2005). In aggiunta, gli E possono alterare il legame di recettori accoppiati a proteine G, quali quelli degli oppioidi (μ e κ), quello per il GABAB e il D2 per la dopamina, ai rispettivi sistemi effettori intracellulari (Malyala, Kelly et al. 2005).

Anche nel caso del P, c'è la possibilità che esista un controllo indiretto dei neuroni GnRH tramite neuropeptidi e/o classici neurotrasmettitori (Herbison 1998). Infatti, mentre non vi sono chiare evidenze dell'espressione di PR nei neuroni GnRH, i PR sono stati trovati nei neuroni che circondano i neuroni GnRH (Leranth, MacLusky et al. 1992; King and Rubin 1995; Sim, Skynner et al. 2001).

La terza possibilità d'azione degli ormoni sessuali steroidei sulla secrezione di GnRH, cioè quella di un'azione indiretta che coinvolge l'interazione con le cellule gliali, sarà analizzata in dettaglio più avanti.

1.4 INTERAZIONI TRA CELLULE GLIALI E NEURONI GnRH-SECERNENTI

Le cellule gliali oltre ad avere un importante ruolo strutturale, svolgono anche funzioni regolatorie nel sistema nervoso centrale (SNC): esse possono infatti comunicare con le altre cellule producendo molti degli stessi neurotrasmettitori che vengono normalmente usati nella comunicazione neuronale.

Le modalità di comunicazione tra cellule gliali e neuroni e cellule gliali possono essere sia dirette mediante gap junction, canali intercellulari che permettono un flusso diretto unidirezionale (Nedergaard 1994) o bidirezionale (Froes, Correia et al. 1999) di ioni, secondi messaggeri e metaboliti a basso peso molecolare, sia indirette tramite la secrezione di messaggeri intercellulari quali fattori di crescita, eicosanoidi, neuropeptidi e neurotrasmettitori, che sono riconosciuti da recettori di membrana sia a livello degli astrociti sia dei neuroni, permettendo in questo modo lo scambio di informazioni fra gli stessi astrociti e fra astrociti e neuroni (Barres 1991; Martin 1992).

Per quanto riguarda l'azione che gli ormoni steroidei potrebbero svolgere nei neuroni GnRH mediante variazioni nelle interazioni tra glia e neuroni, va ricordato che molti dati indicano importanti interazioni strutturali e chimiche tra cellule gliali e neuroni GnRH secernenti (Ojeda and Ma 1999). I neuroni GnRH sono relativamente poco innervati e più o meno avvolti dalle cellule gliali (Witkin, Ferin et al. 1991; Silverman and Witkin 1994). Variazioni nell'avvolgimento delle cellule gliali sui corpi cellulari dei neuroni GnRH potrebbero alterare la quantità e il tipo di contatti sinaptici che arrivano a questi neuroni. Molti studi hanno dimostrato che gli steroidi gonadici esercitano azioni modulatorie sull'interazione tra cellule gliali e neuroni ipotalamici (Witkin, Ferin et al. 1991; Witkin 1996). Per esempio, nella scimmia, Witkin e collaboratori hanno dimostrato che, dopo

ovariectomia, i neuroni GnRH hanno una minor percentuale di spine dendritiche, che l'avvolgimento gliale è aumentato e che vi è una piccola diminuzione nei loro contatti sinaptici (Witkin, Ferin et al. 1991; Witkin 1996).

Gli steroidi gonadici sono anche in grado di influenzare il rimodellamento che coinvolge i terminali GnRH e i terminali dei taniciti a livello dell'eminenza mediana, indicando un importante ruolo per gli steroidi anche nelle variazioni morfologiche che modulano il rilascio di GnRH nei vasi portali (King and Rubin 1995).

In aggiunta a queste connessioni strutturali, vi sono anche interazioni chimiche bidirezionali tra cellule gliali e neuroni GnRH. Gli studi che dimostrano l'esistenza di questa influenza chimica sui neuroni GnRH, derivante dalle cellule gliali, sono stati svolti quasi interamente su linee cellulari GnRH secernenti, quali ad esempio le cellule GT1. Questi studi hanno identificato una serie di fattori di crescita rilasciati dalle cellule gliali, che sono in grado di influenzare il differenziamento e/o l'attività dei neuroni GnRH.

Per quanto riguarda il sistema GnRH, le cellule gliali collaborano alla sua regolazione secondo due differenti modalità :

- Variando il proprio grado di apposizione e di avvolgimento sui neuroni GnRH-secernenti ed il numero di contatti assosomatici con essi (Hatton, Perlmutter et al. 1984; Fernandez-Galaz, Naftolin et al. 1999).
- Rilasciando fattori modulatori, che vanno ad agire sui neuroni GnRH, come fattori di crescita, interleuchine, aminoacidi neuroeccitatori, GABA, etc. (Sawada, Kondo et al. 1989; Gadiant, Cron et al. 1990; Barres 1991; LoPachin and Aschner 1993).

Una conferma della prima modalità d'azione è data dal fatto che la membrana dei neuroni GnRH secernenti è ricoperta dalle cellule gliali per il 98%, lasciando quindi solo un minimo spazio per la connessione con altri neuroni. Inoltre, grazie alla microscopia confocale ed elettronica, sono state evidenziate interazioni strutturali nell'eminenza mediana tra le terminazioni dei neuroni GnRH e le cellule astrogliali o le cellule ependimali (King and Letourneau 1994); queste ultime, chiamate taniciti, sono disposte lungo la parete ventrale del terzo ventricolo e proiettano le loro estroflessioni fino all'eminenza mediana, dove stabiliscono un contatto con la parete endoteliale dei vasi portali, prevenendo così il contatto diretto tra i neuroni GnRH e le cellule dell'endotelio capillare.

E' stato inoltre dimostrato, che queste relazioni strutturali non sono statiche, ma possono variare in funzione di diverse situazioni fisiologiche o patologiche (King and Rubin 1995). Ad

esempio, la copertura dei neuroni GnRH-secernenti da parte delle cellule gliali, nel ratto femmina, varia durante le diverse fasi del ciclo estrale, essendo massima nel diestro e minima nel proestro, quando sono invece massimizzati i contatti fra i neuroni GnRH e le cellule dello spazio pericapillare (Prevot, Croix et al. 1999; Kaur, Heera et al. 2002). Questi effetti sono dovuti ad un rimodellamento del citoscheletro delle cellule gliali, oltre che a variazioni nell'espressione di proteine di adesione cellulare, come NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*), specialmente nella sua isoforma polisialilata (PSA-NCAM), spesso associata a fenomeni di plasticità neuronale (Kaur, Heera et al. 2002).

Per quanto riguarda invece il secondo tipo di interazione, cioè quella mediata dai principi attivi rilasciati dagli astrociti ed in grado di modulare i neuroni GnRH-secernenti, i nostri studi si sono focalizzati sui fattori di crescita, a cui è da attribuire sicuramente un ruolo di primo piano; infatti gli astrociti possono produrre e secernere differenti fattori di crescita, che agiscono con modalità differenti e specifiche sui neuroni GnRH-secernenti.

1.4.1 REGOLAZIONE DA PARTE DELLA KISSPEPTINA

La Kisspeptina è una proteina che è stata identificata per la prima volta in cellule tumorali non metastatiche (Lee, Miele et al. 1996; Lee and Welch 1997). Tuttavia, oltre che in cellule tumorali, questa proteina è stata osservata anche in cellule ipotalamiche e della placenta con una funzione di regolazione dell'impianto dell'embrione (Muir, Chamberlain et al. 2001; Bilban, Ghaffari-Tabrizi et al. 2004). A livello cerebrale dei mammiferi si possono identificare due gruppi principali di cellule esprimenti la Kisspeptina: uno è presente a livello di ARC, mentre l'altro si osserva a livello dell'ipotalamo rostrale e nell'area POA; diversamente, nei roditori, il secondo gruppo è localizzato nel nucleo periventricolare antero-ventrale (AVPV) e in quello periventricolare preottico (PeV) (Gottsch, Cunningham et al. 2004; Smith, Cunningham et al. 2005; Smith, Dungan et al. 2005; Clarkson, d'Anglemont de Tassigny et al. 2008). Il recettore della Kisspeptina è il recettore 54 accoppiato alle proteine G (GPR54), entrambi sembrano essere essenziali per l'attivazione e la regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Infatti, l'analisi dell'RNA di colture di neuroni GnRH estratti dall'ipotalamo, hanno rilevato l'espressione del GnRH, della Kisspeptina e di GPR54. Altri studi, condotti sulla linea cellulare di HEK 293, hanno indicato una etero-oligomerizzazione tra il recettore del GnRH e il GPR54. Così come accade per altri recettori accoppiati alle proteine G, nei quali la formazione di etero-oligomeri porta ad un cambiamento delle proprietà di legame o di segnale (Rocheville, Lange et al. 2000; Charest, Terrillon et al.

2005), la formazione dell'etero-oligomero GnRHR-GPR54 potrebbe contribuire nella modulazione del segnale che regola la secrezione del GnRH e di Kisspeptina dai neuroni GnRH. Esperimenti di patch-clamp effettuati su neuroni GnRH indicano un'iniziale depolarizzazione indotta dalla Kisspeptina, seguita da un aumento di potenziale d'azione. In cellule GT1-7 perfuse, la Kisspeptina induce un aumento dell'ampiezza e della durata del segnale. Il mantenimento del rilascio pulsatile del GnRH durante trattamenti con Kisspeptina indica che l'attivazione del GPR54 non interferisce con la via di segnale di rilascio del GnRH, in cui l'attivazione di Gs e Gq è indispensabile per dare inizio alla secrezione pulsatile e dove l'attivazione di Gi ne causa il termine (Krsmanovic, Mores et al. 2003; Khadra and Li 2006; Wada, Hu et al. 2006). Per quanto riguarda il GPR54 è stato osservato accoppiarsi con Gq/11 sia in neuroni ippocampali che in COS-7 trasfettate con GPR54 (Stafford, Xia et al. 2002; Brailoiu, Dun et al. 2005); inoltre, attraverso analisi predittive, si pensa possa accoppiarsi anche con Gi/0 e Gs. L'inibizione della secrezione della Kisspeptina, indotta da trattamenti con GnRH, porta a pensare che l'attivazione del complesso GnRHR/GPR54 favorisca il legame con Gi/0. L'espressione dell'mRNA della Kisspeptina e di GPR54 in neuroni GnRH ipotalamici, così come la secrezione di Kisspeptina, indicano che questa proteina possa agire in un modo paracrino/autocrino nella regolazione dei neuroni GnRH. La stimolazione della secrezione del GnRH indotta dalla Kisspeptina e l'effetto opposto dato dal GnRH sulla Kisspeptina, indicano che i sistemi di autoregolazione di GnRHR/GnRH e GPR54/Kisspeptina sono integrati nella regolazione a feedback negativo al fine di controllare la secrezione del GnRH e di Kisspeptina dai neuroni GnRH (Quaynor, Hu et al. 2007). Infatti, è stato osservato che la Kisspeptina non sembra essere in grado di regolare direttamente la secrezione delle gonadotropine pituarie (Smith, Rao et al. 2008); tuttavia, la presenza delle proiezioni dei neuroni esprimenti la Kisspeptina a livello dell'eminenza mediana (Ramaswamy, Guerriero et al. 2008), e diverse evidenze sperimentali indicano una regolazione diretta sui neuroni GnRH nel rilascio ormonale (Messenger, Chatzidaki et al. 2005; d'Anglemont de Tassigny, Fagg et al. 2008; Keen, Wegner et al. 2008).

1.4.2 REGOLAZIONE DELL'EFFETTO DEGLI ORMONI STEROIDEI SUI NEURONI GnRH

Come precedentemente descritto gli ormoni sessuali regolano la secrezione dei neuroni GnRH, tuttavia, non era ancora chiaro come questo potesse avvenire dato che solo un'esigua parte di neuroni GnRH presentano i recettori steroidei (Huang and Harlan 1993; Herbison, Skinner et al. 1996). Recentemente si è osservato che, in ratti e topi femmina, molte delle

cellule esprimenti la Kisspeptina a livello del AVPV e PeV esprimono ER α (Smith, Popa et al. 2006; Adachi, Yamada et al. 2007; Clarkson, d'Anglemon de Tassigny et al. 2008). Partendo da questa considerazione è stato osservato che i neuroni presenti a livello del AVPV/PeV sono coinvolti nella regolazione a feedback positivo indotta dagli estrogeni (Smith, Clifton et al. 2006; Wintermantel, Campbell et al. 2006). Inoltre, sembra che un tipo particolare di cellule esprimenti la kisspeptina, la neurochinina B, la dinorfina (le cellule KNDy) e che presentano sia il recettore α degli estrogeni che quello per il progesterone, agiscano regolando anche il feedback negativo indotto dal progesterone. Infatti, l'espressione di Kisspeptina nel ARC risulta ridotta nella fase luteale del ciclo estrale (Goodman, Coolen et al. 2004; Smith, Li et al. 2009; Cheng, Coolen et al. 2010).

1.5 MALATTIE DOVUTE A MUTAZIONI DEL GnRH E DEL SUO RECETTORE

L'ipogonadismo ipogonadotropo idiopatico (IHH) è un disordine clinico che è caratterizzato da un ritardo nello sviluppo sessuale e livelli non corretti di gonadotropine e di steroidi sessuali bassi, pur non essendoci anomalie funzionali o anatomiche dell'asse ipotalamico-pituitario (Seminara, Hayes et al. 1998). I pazienti affetti da questa patologia presentano diversi fenotipi: dall'ipogonadismo parziale a quello completo, inoltre può essere sia sporadico che familiare. In questa malattia due sono i geni che possono essere coinvolti, localizzati nel braccio corto del cromosoma x e sono: KAL-1 e DAX-1, queste mutazioni inducono oltre all'IHH anche anosmia ed insufficienza surrenale (Franco, Guioli et al. 1991; Zanaria, Muscatelli et al. 1994). Diverso il caso in cui l'IHH sia dovuto alla mutazione del recettore del GnRH, infatti, in questa ipotesi, non si osserva il manifestarsi degli altri sintomi, ma è responsabile dell'ereditarietà autosomica della malattia. In quest'ultimo caso sono state osservate sino a 15 differenti mutazioni nel GnRH-R, di queste una è una mutazione tronca, nove sono date da eterozigosi (de Roux, Young et al. 1997; Karges, Karges et al. 2003) e le restanti cinque sono date da omozigosi (Pralong, Gomez et al. 1999; Pitteloud, Boepple et al. 2001; Soderlund, Canto et al. 2001). Studi funzionali condotte su sistemi eterologhi di cellule hanno dimostrato che mutazioni del recettore del GnRH ne aumentano l'espressione cellulare, il legame col ligando e la trasduzione del segnale (Brothers, Janovick et al. 2003; Ulloa-Aguirre, Janovick et al. 2003).

2) ***LA MIGRAZIONE NEURONALE***

La migrazione neuronale è uno dei meccanismi fondamentali a cui si assiste durante lo sviluppo cerebrale nell'embrione. I neuroni migrano secondo una precisa direzione: partendo dall'epitelio proliferativo attraversano il tubo neurale ed arrivano alla zona ventricolare (VZ) della corteccia, da qui possono poi raggiungere la loro destinazione finale attraverso una migrazione radiale o trasversale (Marin and Rubenstein 2003). Nella migrazione radiale i neuroni seguono una traiettoria che è perpendicolare alla VZ, spostandosi attraverso fibre gliali radiali che si estendono all'interno del tubo neurale; mentre nella migrazione tangenziale i neuroni seguono traiettorie parallele alla VZ e ortogonali rispetto alle fibre radiali gliali (Marin and López-Bendito 2006). Una delle strutture che meglio illustra questi due tipi di migrazione è la corteccia cerebrale. Questa è caratterizzata dalla presenza di due classi di neuroni: i neuroni glutammatergici delle proiezioni corticali e gli interneuroni GABAergici. Le cellule piramidali vengono generate nella zona ventricolare del pallio embrionale (situato nel tetto del telencefalo) ed arrivano alla loro posizione finale attraverso una migrazione radiale (Rakic 2007). Diversamente, gli interneuroni corticali sono generati nel subpallio (situato alla base del telencefalo) e raggiungono la corteccia attraverso una migrazione tangenziale (Corbin, Nery et al. 2001). Nel topo i neuroni corticali allo stadio embrionale di 10 giorni formano una struttura transiente chiamata *preplate* in cui vi sono le cellule di Cajal-Retzius e il primo strato di neuroni piramidali. Le cellule di Cajal-Retzius giungono da diverse aree del pallio e colonizzano la superficie della corteccia per mezzo di una migrazione tangenziale; lo strato successivo di cellule piramidali formano la placca corticale (CP) andando a posizionarsi nella zona marginale e nella sottopacca corticale (SP). Le cellule piramidali che migrano in un secondo momento vanno a posizionarsi in regioni sempre più marginali andando così a costituire dal secondo al quarto strato della corteccia in un meccanismo denominato "*inside-out*" (Marin and Rubenstein 2003). Parallelamente a questo processo gli interneuroni GABAergici migrano nella corteccia dove si disperdono tangenzialmente a livello della zona mediale (MZ) e SP, la regione più bassa della zona intermedia (IZ) e la zona subventricolare (SVZ) (Lavdas, Grigoriou et al. 1999). Infine, gli interneuroni cambiano tipo di migrazione da tangenziale a radiale per occupare la loro posizione finale nella corteccia (Ang, Haydar et al. 2003).

2.1 MECCANISMI CELLULARI ALLA BASE DELLA MIGRAZIONE CELLULARE

I neuroni che migrano sono altamente polarizzati nella direzione verso cui si spostano; generalmente essi presentano un prolungamento guida che è in grado di riconoscere gli stimoli presenti nell'ambiente circostante direzionando la cellula (Rakic 1990). Il movimento dei neuroni è costituito da tre fasi principali:

- la cellula estende il prolungamento guida;
- il nucleo trasloca all'interno del prolungamento guida (nucleo-cinesi);
- il prolungamento guida si ritira trascinando tutto il corpo cellulare.

Tuttavia, non tutti i neuroni presentano il prolungamento guida, per esempio, le cellule piramidali sfruttano gli assoni per spostarsi (Schwartz, Rakic et al. 1991; Noctor, Martinez-Cerdeno et al. 2004). Il ciclo migratorio risulta semplificato quando il prolungamento guida raggiunge la sua destinazione finale o nel caso dei neuroni piramidali appena nati. Quest'ultimo processo, conosciuto come traslocazione somale, coinvolge la nucleocinesi e il rimodellamento del prolungamento guida, senza che avvenga l'estensione di un prolungamento guida addizionale (Miyata, Kawaguchi et al. 2001; Nadarajah and Parnavelas 2002; Miyata and Ogawa 2007).

2.2 IL PROLUNGAMENTO GUIDA

Il prolungamento guida agisce dando una direzionalità ai neuroni, seguendo dei segnali chemotattici. Inoltre, esso dà la polarizzazione ai neuroni che stanno migrando, la quale può variare in diverse fasi della migrazione. Una dimostrazione di ciò sono le cellule piramidali appena generate che presentano un unico prolungamento guida in quanto esse risiedono nella VZ del pallio (Noctor, Flint et al. 2001), tuttavia esse diventano multipolari per un breve periodo nella SVZ. Durante questa fase, i neuroni generano diversi processi orientati tangenzialmente (Tabata and Nakajima 2003), tuttavia dopo ciò le cellule piramidali ritornano ad essere altamente polarizzate e formano un prolungamento guida che resta in contatto con le fibre della glia radiale fino a quando si arresta la migrazione (Rakic 1972). La morfologia del prolungamento guida è molto variabile a seconda del tipo di cellula neuronale, ciò è probabilmente dovuto al tentativo di assecondare i diversi requisiti della migrazione. Negli interneuroni corticali si forma un processo guida che sviluppa ramificazioni come parte del ciclo migratorio (Bellion, Baudoin et al. 2005; Kappeler, Saillour et al. 2006; Martini,

Valiente et al. 2009). Questo fenomeno sembra essere comune a diversi neuroni che migrano tangenzialmente (Okada, Keino-Masu et al. 2007). Contrariamente, nella migrazione radiale si osserva un unico prolungamento guida (Rakic 1972). In alcuni esperimenti è stato osservato che difetti nell'interazione tra cellule piramidali e cellule della glia radiale portano alla formazione di ramificazioni non corrette del prolungamento guida (Gupta, Sanada et al. 2003; Elias, Wang et al. 2007), suggerendo che la morfologia bipolare delle cellule che migrano radialmente potrebbe essere imposta dalla glia. Negli interneuroni corticali, le due ramificazioni sono orientate sul fronte della cellula con un comportamento dinamico ed esploratore, sino a quando la cellula sceglie la direzione da seguire. A questo punto solo uno dei due rami continua ad estendersi, mentre l'altro si retrae. Questo evento è poi seguito dalla nucleocinesi nella quale il nucleo avanza fino al successivo punto di ramificazione. L'abilità di creare un prolungamento guida che si ramifica, tipica dei neuroni che migrano tangenzialmente, sembra essere strettamente collegata agli stimoli guida. Infatti, chemoattrattori e chemorepulsori inducono la formazione di un prolungamento guida parzialmente già orientato verso od in direzione opposta alla sorgente della molecola segnale (Ward, Jiang et al. 2005; Martini, Valiente et al. 2009). Ciò permette ai neuroni di cambiare direzione durante la migrazione senza dover riorientare i prolungamenti; ad esempio, gli interneuroni giungono alla CP attraverso la generazione di nuove ramificazioni che sono orientate ortogonalmente alla loro direzione (Polleux, Whitford et al. 2002; Yokota, Gashghaei et al. 2007; Martini, Valiente et al. 2009). Questo meccanismo sembra essere molto diverso da quello descritto per gli assoni che si stanno formando, in cui è il cono di crescita che determina la direzione del movimento (Lin and Holt 2007). Nelle cellule migranti che presentano il prolungamento guida ramificato, l'angolo che si forma tra le ramificazioni rimane costante tra i vari cicli di migrazione, perciò la cellula sceglie la direzione in base a due opzioni pre-esistenti in modo binario (Ward, Jiang et al. 2005; Martini, Valiente et al. 2009). Non tutti i neuroni che presentano una migrazione tangenziale utilizzano questo meccanismo guida per trovare la direzione di migrazione, infatti, vi sono alcuni tipi cellulari che presentano un meccanismo molto più simile a quello di guida assonale. Questo è il caso, ad esempio, dei neuroni pontini, i quali generano un prolungamento guida molto lungo fino a quando avviene la nucleocinesi (Yee, Simon et al. 1999). In questo caso di traslocazione somale, i coni di crescita sembrano essere i responsabili della direzionalità nella migrazione, così come accade durante la guida assonale, anche se questo non è il comportamento più comune nei neuroni che migrano nel sistema nervoso centrale. Poco è conosciuto a proposito

dei meccanismi molecolari che regolano la dinamica del prolungamento guida durante la migrazione. Tra le molecole che sembrano essere coinvolte si annoverano:

- CDK5, una serina/treonina chinasi ciclina dipendente che modula l'estensione del prolungamento guida attraverso la fosforilazione di Pak1 e p27Kip1, due regolatori dell'actina (Nikolic, Chou et al. 1998; Dhavan and Tsai 2001; Kawauchi, Chihama et al. 2006). La fosforilazione di Pak1 da parte di CDK5 riduce l'attività di Pak1, regolando così la dinamicità dell'actina nei coni di crescita (Nikolic, Chou et al. 1998). Se CDK5 è fosforilata, p27Kip1 risulta stabile nei neuroni, situazione critica per mantenere la giusta quantità di F-actina nel processo guida (Kawauchi, Chihama et al. 2006).
- Lisencefalia 1 (Lis1) e Doublecortin (DCX), due proteine associate ai microtubuli che sono meglio conosciute per il loro ruolo durante la nucleocinesi, sono anch'esse connesse alla regolazione dello sviluppo delle ramificazioni del prolungamento guida negli interneuroni che hanno proprietà migratorie (Kappeler, Saillour et al. 2006; Nasrallah, McManus et al. 2006). In neuroni che non esprimono DCX il prolungamento guida forma ramificazioni più numerose ed instabili. Ciò suggerisce che DCX è necessaria alla stabilizzazione delle ramificazioni del prolungamento guida (Kappeler, Saillour et al. 2006). Diversamente, interneuroni che presentano una mutazione eterozigote per Lis1, formano meno ramificazioni e conseguentemente prolungamenti più lunghi (Nasrallah, McManus et al. 2006).

2.3 NUCLEOCINESI

La traslocazione del nucleo all'interno del prolungamento guida è il meccanismo che meglio descrive la migrazione neuronale. Due sono le fasi che caratterizzano questo processo:

- La formazione di un rigonfiamento citoplasmatico nel prolungamento guida, in vicinanza del nucleo. Il centrosoma, che è normalmente posizionato nella parte anteriore del nucleo, si sposta nel rigonfiamento (Bellion, Baudoin et al. 2005; Schaar and McConnell 2005; Tsai and Gleeson 2005).
- Il nucleo segue il centrosoma.

Questi due passaggi sono ripetuti producendo i tipici movimenti saltatori dei neuroni migranti. Si pensa che le forze generate dal prolungamento guida vengano trasmesse al centrosoma, il quale avanza. Quest'ultimo è strettamente connesso col nucleo attraverso un sistema di microtubuli che lo avvolgono in un modo definito a "forchetta" o a "gabbia" (Rivas

and Hatten 1995; Xie, Sanada et al. 2003). Seguendo il movimento del centrosoma, il nucleo è spinto avanti dalle dineine associate con i microtubuli (Rivas and Hatten 1995; Xie, Sanada et al. 2003; Solecki, Model et al. 2004; Tsai and Gleeson 2005). In aggiunta, la contrazione del complesso actomiosina, nella parte posteriore della cellula, contribuisce allo spostamento del nucleo (Bellion, Baudoin et al. 2005; Schaar and McConnell 2005). A livello molecolare è noto che Lis1 si associa ai microtubuli promuovendone la stabilità (Sapir, Elbaum et al. 1997). Un'altra molecola che potrebbe essere coinvolta è Nde11, necessaria per spostare Lis1 e la dineina al centrosoma, facilitando la nucleazione e l'ancoraggio dei microtubuli al centrosoma (Guo, Yang et al. 2006). Inoltre, Nde11 facilita l'interazione tra Lis1 e dineina e regola il trasporto retrogrado dineina dipendente (Li, Zhang et al. 2000; Smith, Niethammer et al. 2000; Gupta, Sanada et al. 2003; Mesngon, Tarricone et al. 2006). Il mal funzionamento di Lis1 impedisce il corretto accoppiamento tra nucleo e centrosoma, aumentando la distanza tra i due organelli (Sasaki, Shionoya et al. 2000; Aumais, Tunstead et al. 2001; Dawe, Caldwell et al. 2001; Shu, Ayala et al. 2004; Tsai and Gleeson 2005). DCX e DCLK sono proteine associate ai microtubuli ed entrambe agiscono promuovendo la polimerizzazione e la stabilizzazione dei microtubuli (Francis, Koulakoff et al. 1999; Gleeson, Lin et al. 1999; Horesh, Sapir et al. 1999). Sempre più evidenze indicano che queste due proteine partecipano nella regolazione della nucleocinesi durante la migrazione neuronale (Kappeler, Saillour et al. 2006). Infatti, mutazioni di queste proteine, portano alla perdita di polarizzazione dei neuroni migranti con formazione di rigonfiamenti citoplasmatici che si formano anche in direzione opposta alla migrazione, con conseguente perdita di direzionalità e di correlazione spaziale con il nucleo (Sapir, Shmueli et al. 2008). CDK5 e i suoi attivatori p35 e p39 svolgono un'altra importante funzione nei neuroni che migrano e nella nucleocinesi; infatti, Nde11 contiene 5 siti di fosforilazione per CDK5, la fosforilazione agisce mediando l'interazione tra Nde11 e Lis1/dineina. Innanzitutto CDK5 potrebbe agire regolando la migrazione neuronale attraverso la modulazione del complesso Lis1/Nde11/dineina e potrebbe agire fosforilando diverse proteine associate ai microtubuli tra cui: DCX, MAP1 e tau modulandone l'interazione con i microtubuli (Tanaka, Serneo et al. 2004). Infine, CDK fosforila anche altre chinasi, quale ad esempio FAK (*focal adhesion protein*), una proteina necessaria per l'organizzazione perinucleare dei microtubuli (Xie, Sanada et al. 2003).

2.4 MECCANISMI E CARATTERISTICHE DEI NEURONI CHE MIGRANO RADIALMENTE

Tra le cellule più importanti che utilizzano questo tipo di migrazione vi sono le cellule della glia radiale. Queste cellule sono i progenitori delle cellule piramidali (Noctor, Flint et al. 2001); esse presentano il loro corpo cellulare a livello della VZ, ed estendono i loro lunghi prolungamenti per ricoprire tutto lo spessore della corteccia che si sta sviluppando. Man mano che lo spessore della corteccia aumenta, i neuroni che migrano utilizzano questi prolungamenti come guida per raggiungere la CP (Rakic 1972; Campbell and Gotz 2002). Varie sono le molecole di adesione cellulare legate alla membrana che mediano l'interazione tra i neuroni migranti e le fibre della glia radiale, tra cui: l'astrotactina, la neuroregulina e varie integrine (Edmondson, Liem et al. 1988; Stitt and Hatten 1990; Fishell and Hatten 1991; Anton, Marchionni et al. 1997; Adams, Tomoda et al. 2002). Le integrine, recettori transmembrana che mediano le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, sono composte da due subunità (a e b) che formano eterodimeri. Molte delle subunità di tipo a sono espresse nella corteccia che si sta sviluppando tra cui a3, a5 e a6, ciascuna subunità dimerizza con l'integrina b1. Molte sono le funzioni associate alle integrine, infatti sembra che esse servano anche per la migrazione neuronale in quanto permettono l'adesione dei neuroni migranti alle fibre della glia, permettendo così il raggiungimento della destinazione finale ed una corretta laminazione della corteccia (Anton, Kreidberg et al. 1999; Dulabon, Olson et al. 2000; Marin and Rubenstein 2003; Schmid, Shelton et al. 2004). Inoltre, servono alla regolazione del deposito di laminina lungo le fibre della glia radiale, elemento indispensabile in quanto permette ai neuroni di arrestarsi e localizzarsi nel corretto strato della corteccia (Georges-Labouesse, Mark et al. 1998). Sebbene il modo in cui interagiscono le integrine non sia del tutto chiaro, si pensa vi sia un coinvolgimento di CDK5/p35, che media riarrangiamenti citoscheletrici (Li, Zhang et al. 2000), e della filamina A che mantiene le corrette giunzioni aderenti, soprattutto a livello della VZ (Loo, Kanner et al. 1998). Potrebbe, inoltre, essere coinvolta Dab1, una proteina adattatrice della fosforilazione delle tirosine, che media il segnale della reelina e sembra agire permettendo l'internalizzazione delle integrine, permettendo in questo modo il distacco dei neuroni dalle fibre radiali (Dulabon, Olson et al. 2000; Schmid, Jo et al. 2005). Recentemente è stato mostrato che l'interazione tra le fibre radiali e i neuroni migranti dipende anche dalle proprietà adesive delle giunzioni Gap (Elias, Wang et al. 2007; Cina, Maass et al. 2009). Infatti, diverse connesine, il principale

componente delle giunzioni Gap, sono espresse sia nelle fibre radiali che nei neuroni migranti e sembra che la loro associazione in trans sia necessaria per la guida gliale nella migrazione.

Un gran numero di molecole extracellulari sembra essere coinvolta nella migrazione, tra cui Slit, le netrine, le semaforine e la reelina. La funzione delle prime tre sembra essere relazionata alla migrazione tangenziale; diverso è il caso della reelina. Essa viene secreta dalle cellule di Cajal-Retzius localizzate nella zona marginale e lega due membri della famiglia dei recettori delle lipoproteine, VLDLR e ApoER2 (D'Arcangelo, Homayouni et al. 1999; Hiesberger, Trommsdorff et al. 1999). Studi biochimici suggeriscono che il legame della reelina al suo recettore induce la fosforilazione di Dab1 (Howell, Herrick et al. 1999; Howell, Herrick et al. 2000), ciò induce una cascata di segnali che indirizzano i neuroni alla loro posizione finale nella corteccia. La fosforilazione delle tirosine di Dab1 risulta ridotta se viene modificata l'espressione delle due chinasi responsabili: Src e Fyn (Arnaud, Ballif et al. 2003; Bock and Herz 2003). La fosforilazione di Dab1 regola la dinamicità dei microtubuli. La fosforilazione della tirosina di Dab1 è accoppiata all'attivazione di PI3K nel prolungamento guida dei neuroni migranti. Ciò, a sua volta, causa l'attivazione di AKT che induce la fosforilazione della serina di GSK3b, inibendone l'attività (Beffert, Weeber et al. 2004). Il substrato di GSK3b è la proteina tau associata ai microtubuli, che agisce stabilizzandoli quando non fosforilata. In condizioni fisiologiche, l'attivazione di Dab1 agisce mantenendo la proteina tau fosforilata, perciò, mantenendo la stabilità dei microtubuli (Hiesberger, Trommsdorff et al. 1999). Tuttavia, il segnale di reelina induce la fosforilazione di GSK3b attivandola ed essa a sua volta attiva CDK5 che fosforila MAP1B, un'altra proteina associata ai microtubuli (Gonzalez-Billault, Del Rio et al. 2005). La fosforilazione di MAP1B sembra regoli la stabilità dei microtubuli e la comunicazione tra i microtubuli e i filamenti di actina nei coni di crescita assonali (Kawauchi, Chihama et al. 2005). Gli effetti opposti di MAP1B e tau riflettono la regolazione dinamica dei microtubuli da parte della reelina che varia a seconda del contesto, del compartimento cellulare o della fase di migrazione.

2.5 MECCANISMI E CARATTERISTICHE DEI NEURONI CHE MIGRANO TANGENZIALMENTE

La migrazione tangenziale dei neuroni non sembra utilizzare le fibre della glia radiale, ma utilizza altri tipi cellulari (Corbin, Nery et al. 2001; Marin and Rubenstein 2001). In generale, le cellule che migrano tangenzialmente si possono muovere in gruppo, come nel caso degli

interneuroni dei bulbi olfattori, o individualmente come accade nel caso degli interneuroni corticali o delle cellule di Cajal-Retzius. Le interazioni cellulari possono differire a seconda della natura del substrato. Queste possono essere omotipiche o eterotipiche. Le prime sono molto permissive quando i neuroni si muovono attraverso zone ostili alla migrazione. Questo è il caso dei neuroblasti che, nell'adulto, migrano dal ventricolo laterale del telencefalo fino ai bulbi olfattori (Wichterle, Garcia-Verdugo et al. 1997). In questo tipo di migrazione collettiva, nota come catena di migrazione, i neuroblasti si mettono in fila man mano che slittano in avanti, utilizzando come substrato della migrazione le cellule adiacenti. Questo modello di migrazione permette ai neuroni di formare un ambiente in cui ciascuna cellula promuove la migrazione delle altre. I neuroni possono effettuare anche interazioni omotipiche di tipo inibitorio. Questo metodo è noto come inibizione da contatto. Questa strategia permette ai neuroni di scegliere la direzione in assenza di gradienti chemoattrattori; infatti, esso favorisce il movimento delle cellule attraverso aree a minor densità cellulare. Recenti studi hanno suggerito che le cellule di Cajal-Retzius derivino dalla zona marginale corticale e potrebbero utilizzare questo meccanismo per disperdersi sulla superficie della corteccia cerebrale durante la fase iniziale della corticogenesi (Borrell and Marin 2006). La maggior parte dei neuroni che migrano tangenzialmente sfruttano interazioni eterotipiche con i loro substrati. Nella maggior parte dei casi, i neuroni per direzionare la loro migrazione rispondono a stimoli presenti nella matrice extracellulare o sulla superficie cellulare. Un esempio di migrazione eterotipica è data dai neuroni che si muovono lungo gli assoni per raggiungere la loro destinazione finale. Questo tipo di migrazione richiede fascicolazioni assionali, questa è la tipica migrazione dei neuroni GnRH. Durante lo sviluppo questi neuroni attraversano il prosencefalo, attraverso i bulbi olfattori fino all'ipotalamo, seguendo gli assoni vomeronasali (Wray 2002).

2.5.1 CHEMOTASSI NELLA MIGRAZIONE TANGENZIALE

I neuroni che migrano tangenzialmente molte volte decidono la direzione attraverso l'interpretazione di segnali chemotattici. Molte delle molecole che influenzano la guida assonale sono coinvolte nella migrazione tangenziale, tra queste non vi sono solo le famiglie classiche dei fattori guida quali le molecole slit, le netrine, le semaforine, ma anche fattori di crescita e proteine morfogenetiche. Attualmente sono noti diversi segnali responsabili della guida degli interneuroni corticali, in particolar modo per quelli che derivano dalla eminenza ganglionica mediana (MGE). Gli interneuroni derivanti dalla MGE decidono la direzione di

migrazione attraverso l'integrazione di segnali chemoattrattori e di repulsione (Marin, Plump et al. 2003). Inoltre, diversi fattori di crescita come BDNF, NT4 e HGF aumentano la capacità migratoria degli interneuroni della MGE sia in vivo che in vitro (Polleux, Whitford et al. 2002; Pozas and Ibanez 2005). Si pensa che i meccanismi alla base di questa risposta migratoria coinvolgano l'attivazione delle vie di segnale PI3K/AKT ed ERK (Polleux, Whitford et al. 2002; Segarra, Balenci et al. 2006). Il chemoattrattore che è stato analizzato meglio è la Neuregulina-1 (Nrg1), la quale agisce principalmente attraverso ErbB4 (Yau, Litchie et al. 2003), una proteina che fa parte della famiglia recettoriale di EGF (Buonanno and Fischbach 2001). Nel telencefalo in sviluppo sono state osservate due isoforme di Nrg1 (Flames, Long et al. 2004). Nrg1 III (CRD-Nrg1), che viene espressa nella via migratoria degli interneuroni, necessaria per oltrepassare l'eminenza ganglionica laterale (LGE) per andare verso la corteccia. Questa forma di Nrg1 è legata alla membrana, perciò si pensa che agisca come substrato permissivo per la migrazione degli interneuroni. Al contrario, l'espressione di Nrg di tipo I/II (Ig-Nrg1) è ristretta alla regione del pallio in sviluppo. Questa molecola viene staccata dalla membrana, per cui si pensa che la sua azione sia data dalla formazione di un gradiente che guida gli interneuroni verso la corteccia (Flames, Long et al. 2004; Neddens and Buonanno 2010). Sembra che gli interneuroni rispondano a questo gradiente generando nuove ramificazioni del prolungamento guida che risultano essere meglio allineate con la sorgente del gradiente (Martini, Valiente et al. 2009). Perciò, in contrasto con il suo ruolo nella guida assonale (Lopez-Bendito, Cautinat et al. 2006) Nrg1 non influenza la migrazione neuronale attraverso il riorientamento dei coni di crescita pre-esistenti. La progressione delle cellule che derivano dalla MGE attraverso la corteccia viene guidata da segnali chemorepulsivi che gli impediscono di andare in regioni sbagliate. Per esempio, gli interneuroni ricevono stimoli dalle regioni preottiche in modo che non vadano nelle direzioni ventrali (Marin, Plump et al. 2003; Wichterle, Alvarez-Dolado et al. 2003). Inoltre, questi neuroni evitano lo striato grazie alla classe di tipo II delle semaforine (Sema3A e Sema3F) che vengono espresse in quest'area (Marin and Rubenstein 2001; Nobrega-Pereira, Kessar et al. 2008). Questo meccanismo coinvolge Nrp1 e Nrp2, i recettori per le semaforine Sema3A e Sema3F. Inoltre, i recettori per Robo potrebbero essere coinvolti nella regolazione della migrazione degli interneuroni corticali attorno allo striato, in un meccanismo indipendente dalle Slit (Marin, Plump et al. 2003; Andrews, Barber et al. 2008). Gli interneuroni che partono dall'eminenza ganglionica si disperdono tangenzialmente attraverso la corteccia seguendo due rotte principali: l' MZ e la SVZ (Lavdas, Grigoriou et al. 1999), inizialmente evitando la CP (Lopez-Bendito, Cautinat et al. 2006). La chemocinesi è responsabile del

mantenimento degli interneuroni tra la MZ e la SVZ man mano che si disperdono attraverso la corteccia (Lopez-Bendito, Cautinat et al. 2006; Tiveron, Rossel et al. 2006; Li, Adesnik et al. 2008). Le cellule in questi strati esprimono Cxcl12, un potente chemoattrattore per le cellule derivanti dalla MGE. Gli interneuroni, come risposta, esprimono Cxcr4, un recettore per le chemochine (Tiveron, Rossel et al. 2006).

2.5.2 COORDINAZIONE DELLA MIGRAZIONE NEURONALE E GUIDA ASSONALE

La migrazione neuronale e la guida assonale generalmente vengono studiate come processi indipendenti, ma lo sviluppo dei circuiti neurali necessita della loro coordinazione. Le cellule guida rappresentano un chiaro esempio di questa coordinazione; infatti, queste cellule danno la direzionalità agli assoni. Esse guidano tre delle maggiori proiezioni del prosencefalo, quella del corpo calloso, quelle talamo corticali e quelle del tratto olfattorio laterale. Gli assoni della commissura corticale si basano sul segnale dato da un gruppo di cellule note come *glial sling* per superare la linea mediana. I neuroni che formano le *glial sling* derivano dalla SVZ e migrano attraverso la linea mediana a circa E17.5, poco prima dell'arrivo degli assoni della commissura (Marin, Valiente et al. 2010). Un importante fattore per le cellule *glial sling* è il *Nuclear factor I* (Nf1a), senza il quale non avviene lo sviluppo del corpo calloso. I neuroni GABAergici servono come target intermedio per gli assoni talamo-corticali. Questi neuroni derivano dalla LGE e migrano tangenzialmente in direzione ventrale fino alla regione in cui gli assoni talamo-corticali (TCAs) entrano nel telencefalo (Lopez-Bendito, Cautinat et al. 2006). Attraverso un meccanismo che coinvolge CRD-Nrg1/ErbB4, le cellule cosiddette *corridoio* facilitano la migrazione delle TCAs della regione ventrale del sub-pallio, la regione più ostile alla crescita degli assoni talamici. La migrazione delle cellule del tratto olfattorio laterale (LOT) è quella meglio caratterizzata; infatti, è noto che queste cellule iniziano la loro migrazione molto precocemente durante lo sviluppo (E10.5) a partire dalle cellule progenitrici localizzate nel pallio. Successivamente migrano lateralmente attraverso la MZ fino a raggiungere il confine tra pallio e sub-pallio, dove poi girano di 90° e si disperdono nella direzione rostro-caudale attorno alla corteccia piriforme. Questa migrazione richiede l'attività coordinata di: Sema3F, che restringe la migrazione delle LOT sulla superficie piaie, di efrina A5, che previene la migrazione nel sub-pallio, di Netrina-1 che le guida attorno alla corteccia piriforme. La localizzazione finale delle cellule LOT prepara la strada al tratto olfattorio laterale, i cui assoni navigheranno attraverso lo spazio creato dalle cellule LOT nella corteccia piriforme (Marin, Valiente et al. 2010).

2.5.3 INTERAZIONE TRA MIGRAZIONE E GUIDA ASSONALE

La coordinazione tra la migrazione e la guida assonale non è un evento che avviene solo tra popolazioni diverse di cellule, ma anche tra cellule individuali. In generale, si reputa che la migrazione sia incompatibile con fenomeni di differenziamento perché, quest'ultimo processo induce nelle cellule cambiamenti morfologici che sono incompatibili con la migrazione. In modo particolare, il differenziamento neuronale comporta crescita dendritica e assonale che porta a riduzione della motilità e a perdita della polarità di cui le cellule necessitano per migrare. Per evitare che ciò avvenga, i neuroni migranti esprimono specifici geni che reprimono il differenziamento cellulare. Negli interneuroni corticali, Dlx1 e Dlx2 reprimono l'espressione di altri geni coinvolti nella crescita assonale, sinaptogenesi e ramificazione assonale e dendritica (Cobos, Borello et al. 2007). Uno di questi geni è PAK3, una chinasi intracellulare che viene attivata normalmente alla fine della migrazione degli interneuroni corticali, che è coinvolta nella guida della crescita dei dendriti e degli assoni. Tuttavia è noto che alcuni neuroni sono capaci di migrare mentre estendono un assone nella direzione opposta. Questo è il caso delle cellule piramidali, le quali estendono il loro assone mentre iniziano il processo migratorio attraverso la CP (Noctor, Martinez-Cerdeno et al. 2004; de la Iglesia and Schwartz 2006). Per questo fenomeno sono state date varie spiegazioni, una di queste è che in realtà non avvengono contemporaneamente i due processi ma in un modo ciclico; infatti è stato osservato che le cellule piramidali estendono i loro assoni quando si fermano dalla migrazione nella SVZ. Perciò, la formazione dell'assone è preceduta da una fase in cui la cellula perde la sua polarizzazione iniziale e diventa multipolare, fino a quando uno dei processi viene selezionato come assone e orientato verso la VZ (Kriegstein and Noctor 2004). Ciò suggerisce che la migrazione cellulare e la crescita assonale potrebbero non avvenire esattamente allo stesso tempo, almeno in questa fase precoce.

2.6 LA MIGRAZIONE DEI NEURONI GnRH

I neuroni GnRH originano a livello del placode olfattorio o dell'organo vomero nasale e migrano per mezzo dei nervi olfattori a livello della lamina cribriiforme, facendo da legame tra il sistema olfattorio periferico e il prosencefalo. I neuroni GnRH durante la loro migrazione seguono caudalmente il nervo vomeronasale fino a raggiungere l'ipotalamo (Yoshida, Tobet et al. 1995). Una volta arrivati alla loro destinazione finale, iniziano ad estendere dei processi che raggiungono i capillari presenti nell'eminenza mediana al fine di regolare la produzione e

il rilascio delle gonadotropine pituitarie: l'ormone luteinizzante (LH) e follicolo stimolante (FSH). La mancanza di questi neuroni o la loro incapacità a migrare correttamente causa immaturità sessuale sia nell'uomo che nel topo (Wierman, Kiseljak-Vassiliades et al. 2011).

La migrazione dei neuroni GnRH può essere suddivisa in quattro fasi, ciascuna delle quali è caratterizzata dall'influenza di diversi fattori che permettono la corretta migrazione e finale localizzazione di questa popolazione neuronale. Purtroppo gli studi di questo processo sono fortemente limitati dal fatto che non sono ancora stati trovati marker specifici al di là del GnRH stesso. Inoltre, anche in topi transgenici che presentano i neuroni GnRH fluorescenti verdi (GnRH-GFP) si ha una sottostima dei neuroni GnRH realmente presenti, soprattutto a livello della prima fase di sviluppo embrionale (Bless, Walker et al. 2005).

2.6.1 ORIGINE DEI NEURONI GnRH

Molti studi sostengono che i neuroni GnRH si generino a livello del placode nasale, tuttavia vi è la possibilità che la formazione di questi neuroni avvenga prima della formazione del placode nasale e che essi vengano incorporati in quell'area dove differenziano e si preparano alla migrazione. Bisogna, inoltre, tener conto che, nei mammiferi, i neuroni GnRH sono stati rilevati già a livello del pre-impianto dell'embrione e nello stadio di morula e blastocisti. In pollo, l'espressione di GnRH è stata rilevata prima della gastrulazione e in stadi più tardivi; è inoltre stata osservata associata alla regione anteriore della cresta neurale anteriore. Successivamente, l'espressione di GnRH è ristretta a livello della zona della cavità nasale e del placode olfattorio. Quest'ultimo è stato suggerito come punto di origine dei neuroni GnRH presenti nel SNC perché è stata la prima zona in cui sono stati rilevati, a livello dell'organo vomeronasale e a livello olfattorio. Il placode olfattorio è la regione in cui si creano l'epitelio olfattorio sensoriale (OE) e non sensoriale respiratorio. L'OE produce la maggior parte dell'epitelio chemosensoriale e dell'organo vomeronasale, necessario per la ricezione dei ferormoni. La localizzazione dei neuroni GnRH induce a pensare che i neuroni GnRH originino in un'area del placode olfattorio associata con le strutture derivate dall'OE (Wray 2010). Tuttavia, in esperimenti condotti nel pollo, la rimozione dell'area posteriore del placode nasale, elimina le strutture derivate da OE, ma risparmia la popolazione nasale. Contrariamente, la rimozione della regione anteriore elimina anche la formazione delle cellule GnRH e delle cellule epiteliali respiratorie, ma risparmia le strutture OE. Anche negli studi condotti in topo è stato evidenziato che i progenitori OE sono distinti da quelli del GnRH; infatti nei progenitori OE non si osservano i marker espressi dai neuroni GnRH: Mash-1,

Math4A, Math4C/neurogenin1 e NeuroD e sono stati osservati neuroni GnRH ectopici che emergono dall'epitelio respiratorio in topi che non esprimono *Activator protein 1* che viene generalmente espressa nell'epitelio respiratorio ma non nell'OE (Kramer and Wray 2000). Questi studi indicano che i neuroni GnRH divergono precocemente dalla linea cellulare OE e che i progenitori cellulari dei neuroni GnRH sono associati alle regioni respiratorie o anteriori durante le prime fasi di differenziazione del placode. I progenitori delle cellule GnRH sono stati localizzati in un'area intermedia tra le cellule dell'area respiratoria anteriore e le cellule sensoriali dell'OE (Kramer and Wray 2000), anche se la posizione precisa è tuttora sconosciuta. Un recente lavoro effettuato in topo (Metz and Wray 2010) ha dimostrato che l'origine dei progenitori dei neuroni GnRH potrebbe essere associata al placode nasale. La cresta neurale può contribuire allo sviluppo della area del placode. La cresta neurale è costituita da una popolazione cellulare caratteristica dei vertebrati che da origine ad una varietà di cellule derivate sia neurali che non, tra cui neuroni periferici, cellule gliali, cellule dello scheletro cranio-facciale e cellule neuroendocrine (Wray 2010). Le cellule GnRH hanno in comune alcuni marker con le cellule della cresta neurale (per esempio AP-2) (Kramer and Wray 2000). Tuttavia, non è stato possibile dimostrare una discendenza precisa nei mammiferi. Domini di espressione genica sono stati utilizzati per delineare il confine anteriore della placca neurale, regione da cui nasce il placode olfattorio (Arai, Murakami et al. 1994), ed è noto che gli organi olfattori differenziano a partire dal placode olfattorio, comprendendo le strutture transienti che giacciono lateralmente alla fine anteriore del tubo neurale che si sta formando. Tuttavia, è difficile dire se i neuroni GnRH differenziano dai precursori nel placode nasale, in quanto i neuroni GnRH non sono rilevabili in topo fino a 1-2 giorni prima della loro divisione finale (E9.5-E10.5)(Wray, Grant et al. 1989). Tuttavia è anche noto che molti tipi cellulari che emergono dal placode nasale e migrano nel sistema nervoso centrale, esprimono marker neurali quali: GnRH, galanina, Hu, NPY e tirosina idrossilasi (Wray 2002). Tutte queste cellule migrano dalla regione nasale fino al prosencefalo, ad eccezione di quelle sensoriali. Perciò in modo simile ai neuroni GnRH, vi sono altre cellule neuronali non sensoriali associate a questa struttura o lo divengono abbastanza precocemente durante lo sviluppo. Tuttavia non è ancora del tutto chiaro se altre cellule come i neuroni GnRH sorgono dal placode primordiale collocato al confine della placca neurale e migrano poi attraverso la lamina cribriiforme dell'etmoide verso il SNC. Sebbene gli esatti precursori dei neuroni GnRH non siano del tutto noti, si ritiene che i neuroni GnRH siano associati al placode nasale.

2.6.2 FASI DELLA MIGRAZIONE DEI NEURONI GnRH E FATTORI COINVOLTI:

DAL NASO VERSO IL PROSENCEFALO

In questa prima fase che avviene all'incirca all'età di E10.5 nel topo, i neuroni GnRH, che alla nascita sono localizzati a livello dell'area del placode olfattorio, iniziano la loro migrazione seguendo gli assoni vomeronasali attraverso il mesenchima nasale verso il prosencefalo.

In questa fase i neuroni GnRH necessitano di una duplice regolazione: sono presenti sia fattori che promuovono l'adesione dei neuroni agli assoni, sia fattori che stimolano la migrazione.

Molecole che promuovono l'adesione dei neuroni GnRH alle fibre olfattorie

L'identificazione di queste molecole risulta essere complicata dal fatto che i neuroni GnRH sono una popolazione molto eterogenea a livello fenotipico e sebbene la motivazione non sia ancora nota, sono state formulate varie ipotesi a questo riguardo (Todman, Han et al. 2005). Questa potrebbe essere una strategia per modulare la migrazione sia a livello di tempistiche che a livello di quantità di neuroni migranti; altra ipotesi è quella che sia una strategia onde evitare che una mutazione singola possa andare ad interferire con la migrazione di tutti i neuroni GnRH verso la destinazione finale.

Psa-NCAM

I neuroni GnRH migrano preferenzialmente lungo assoni che esprimono una forma di acido polisialico specifico per l'adesione di molecole di cellule neuronali, più brevemente chiamato PSA-NCAM. La rimozione di questa molecola attraverso digestione enzimatica porta al blocco completo della migrazione di questi neuroni. Tuttavia, esperimenti condotti su topi che non esprimono NCAM o NCAM-180 non presentano modificazioni significative nella migrazione dei neuroni GnRH; ciò probabilmente è dovuto al fatto che questi neuroni sono comunque in grado di migrare su assoni esprimenti NCAM-140 (Yoshida, Rutishauser et al. 1999; Murakami and Arai 2002).

Glico-coniugati comprendenti glicoproteine di superficie cellulare

In alcuni esperimenti è stato osservato che la migrazione dei neuroni GnRH può essere influenzata da glicoconiugati di superficie cellulare (Bless, Raitcheva et al. 2006). Tra questi la β 1,3-N-acetilglucosaminiltransferasi-1 (β 3GnT1) aiuta nella sintesi di lactosamina addizionale, una proteina indispensabile ai neuroni GNRH. La sua espressione raggiunge i massimi livelli a E13 per poi diminuire a E18.5 facendo così pensare ad un suo ruolo nella migrazione dei neuroni GnRH. Infatti, in topi E15 che non presentano la β 3GnT1, si

osservano neuroni GnRH trattenuti a livello del compartimento nasale con pochi neuroni rilevati a livello del prosencefalo, principalmente a livello dorsale invece che ventrale.

Anosmina

L'anosmina è stata una delle prime proteine ad essere stata descritta come coinvolta nella normale migrazione dei neuroni GnRH e nella sindrome di Kallmann legata al cromosoma X, patologia che causa una combinazione di ipogonadismo ipogonadotropo e anosmia (Ballabio and Camerino 1992). Feti umani affetti da questa sindrome presentano i nervi olfattori, vomeronasali e terminali aggrovigliati a livello dell'area cribriforme senza sviluppo dei tratti e dei bulbi olfattori (Schwanzel-Fukuda and Pfaff 1989). L'anosmina è una glicoproteina della matrice extracellulare, si ritiene sia importante nell'adesione dei nervi olfattori nei primi stadi della migrazione, uscendo dalla placode olfattorio. Essa è una proteina secreta, costituita da 680 aminoacidi e presenta dei motivi che sono simili a quelli osservati nei fattori di guida degli assoni (Rugarli, Di Schiavi et al. 2002; Albuisson, Pecheux et al. 2005). Tra le proprietà dell'anosmina sono annoverate: matrice cellulare che guida gli assoni, un chemoattrattore secreto che permette agli assoni di svilupparsi nella corretta direzione e, viene considerata una proteina secreta in grado di digerire la matrice cellulare per permettere agli assoni dei nervi olfattori di comunicare con i bulbi olfattori (Cariboni, Pimpinelli et al. 2004). Probabilmente gli effetti della mutazione di KAL-1 sulla migrazione dei neuroni GnRH è indiretta. Recentemente è stato dimostrato che l'anosmina è anche coinvolta nella via di segnale del recettore per FGF, via di segnale importante per lo sviluppo dei neuroni GnRH (Dode and Hardelin 2004).

Molecole guida

EphA5

L'efrine sono un gruppo di molecole di superficie che agiscono attraverso i recettori di membrana per le tirosino kinasi e svolgono un ruolo nella guida assonale in diverse aree dello sviluppo cerebrale (Gamble, Karunadasa et al. 2005). Una mutazione nel recettore EphA5 porta ad una sovra-espressione dei neuroni GnRH con conseguente anormale migrazione e con formazione di aggregati di neuroni GnRH lungo i neuroni olfattori. La sovra-espressione di EphA5 sembra induca un'anormale adesione dei neuroni GnRH all'inizio della migrazione. Nell'adulto anche se solo il 12% dei neuroni GnRH raggiunge la destinazione corretta nell'ipotalamo, la maturazione sessuale avviene normalmente, suggerendo che sono sufficienti anche pochi neuroni GnRH affinché vi sia un normale sviluppo. Tuttavia, analisi più accurate hanno dimostrato che in queste condizioni le femmine risultano essere sterili, o

poco fertili, a causa di un'alterazione della produzione dell'LH (Herbison, Porteous et al. 2008).

NELF

Il *nasal embryonic LHRH factor* (NELF) fu isolato per la prima volta da un profilo d'espressione effettuato su neuroni GnRH primari di roditori, sia migranti che non (Kramer and Wray 2000). Questo fattore è stato osservato essere espresso nella membrana dei neuroni GnRH e olfattori durante la migrazione nell'area nasale, ma non viene più riscontrato una volta che i neuroni sono entrati nel prosencefalo (Kramer and Wray 2000). Inoltre, dopo silenziamento di NELF in espianti nasali si verifica una diminuzione del numero dei neuroni GnRH, della lunghezza e della complessità delle fibre del nervo olfattorio. Recentemente sono state identificate mutazioni in NELF in pazienti normosomici affetti da ipogonadismo ipogonadotropico idiopatico e dalla sindrome di Kallmann (Pitteloud, Quinton et al. 2007; Xu, Bhagavath et al. 2010).

Neurotrasmettitori che modulano la migrazione dei neuroni GnRH.

In esperimenti condotti su sezioni di cervello di topo è stato osservato che i neuroni GnRH, dopo essere penetrati nel cervello, si muovono con molti cambiamenti di direzione (Bless, Walker et al. 2005) seguendo segnali specifici, probabilmente, con un coinvolgimento dei neurotrasmettitori.

GABA (acido gamma-amminobutirrico)

Coerentemente col fatto che i neuroni GnRH sono una popolazione eterogenea, solo una parte di essi (30% circa) esprime il GABA durante lo sviluppo (Tobet, Chickering et al. 1996); tuttavia, quasi tutti questi neuroni presentano il recettore GABA_A anche se con subunità piuttosto eterogenee (Fueshko, Key et al. 1998; Bless, Westaway et al. 2000). Nei neuroni GnRH il GABA è prodotto attraverso un'isoforma della glutammico decarbossilasi di 67 KDa (GAD67) La sovra-espressione della GAD67 non sembra influenzare la maturazione sessuale, tuttavia in topi femmina si osservano alterazioni del ciclo estrale e del numero di gravidanze (Heger, Seney et al. 2003). Al contrario, topi che non esprimono GAD67, mostrano un numero maggiore di neuroni GnRH al di fuori del placode olfattorio a E14.5, E17.5 (Lee, Tiong et al. 2008). Il GABA, nell'adulto, potrebbe svolgere un ruolo anche nelle normali funzioni riproduttive in quanto topi che non esprimono la subunità GABA_BR1 presentano una normale funzionalità sessuale, ma un alterato ciclo estrale e una alterata fertilità (Catalano, Bonaventura et al. 2005; Catalano, Di Giorgio et al. 2010).

Colecistochina

La colecistochina (CCK-8) è un neuropeptide coinvolto nel comportamento riproduttivo delle femmine ed è modulato dagli steroidi sessuali (Vijayan, Samson et al. 1979). Essa interagisce con un recettore accoppiato alle proteine G, CCK-1R, che è espresso nei neuroni GnRH e ne modula la migrazione (Giacobini, Kopin et al. 2004). Questo probabilmente svolge un'azione inibitoria nella migrazione, infatti in topi che non esprimono CCK-1R si sono osservati un aumento nel numero dei neuroni GnRH nel cervello già all'età di E14.5. Tuttavia, vi deve essere un meccanismo compensatorio in quanto nell'adulto non si osservano variazioni né nel numero di neuroni né nella maturazione sessuale. In recenti studi condotti nell'adulto si è osservato che la CCK può avere un effetto inibitorio diretto sui neuroni GnRH (Giacobini and Wray 2007).

Fattori di crescita

Il *fibroblast growth factor 8* (FGF8), interagendo con il recettore FGFR1 svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella funzione dei neuroni GnRH. I vari tipi di FGF svolgono un'azione proliferativa e differenziante in diversi tipi cellulari. Embrioni che non esprimono l'FGF non sono vitali e all'età E9.5-12, presentano alterazioni nella migrazione. La sovra-espressione del recettore FGFR-1 dominante negativo nei neuroni GnRH comporta una riduzione nella migrazione e nella loro capacità di sviluppare proiezioni all'eminenza mediana, suggerendo l'importanza dell'FGF a diversi stadi della migrazione e sviluppo dei neuroni GnRH. Infatti, questi topi hanno un ritardo nel raggiungimento della pubertà ed un anticipo della menopausa. Molti sono i ligandi di FGF che sono espressi nel cervello in sviluppo, tuttavia si pensa che particolare importanza vada data al FGF8 in quanto è importante per lo sviluppo del sistema olfattorio. Topi omozigoti per un allele ipomorfico di FGF8 non presentano neuroni GnRH nell'ipotalamo, mentre topi eterozigoti presentano il 40% dei neuroni e risultano fertili. Anche nell'uomo è stato osservato che pazienti affetti da ipogonadismo ipogonadotropo normosomico e anosmia presentano mutazioni in FGFR-1 e/o FGF8; in modo particolare, sembrano essere principalmente coinvolte le varianti FGF8e e FGF8f (Wierman, Kiseljok-Vassiliades et al. 2011). Nella linea cellulare neuroepiteliale olfattoria fetale umana FNCB4 è stato osservato che l'anosmia causa dei riarrangiamenti strutturali del citoscheletro e sviluppo dei neuriti grazie all'interazione tra FGF/FGFR1/HSPG. Tuttavia in altri studi condotti su *C. Elegans* è stato indicato che non vi è una modulazione dell'FGF1 da parte di KAL-1 (ortologo dell'anosmina). Tra gli eparan solfati, che agiscono sulla migrazione dei neuroni GnRH, vi sono SDN-1 (syndecan) e GPN-1

(glypican) che vanno ad interagire e a modulare i complessi anosmina-1/Kal-1 e FGFs/FGFR1. Inoltre, anche PROK2, HGF, netrina, Axl, Tyro3 possono essere modulati dagli HSPGs, suggerendo che questi ultimi agiscano amplificando la “comunicazione” tra i fattori della superficie cellulare o della matrice per modulare la migrazione dei neuroni GnRH.

Recettori accoppiati alle proteine G

E' stato dimostrato che la prochinetina 2 (PROK2) e il suo recettore (PROKR2) sono coinvolti nella migrazione dei neuroni GnRH. PROK2 è un ligando del recettore accoppiato alle proteine G PROKR2 (Ng, Li et al. 2005); topi che non esprimono questo recettore non presentano la maggior parte dei neuroni GnRH nel prosencefalo sia nell'adulto che all'età di E13.5; inoltre, questi neuroni formano grovigli con gli assoni olfattori vomeronasali, sintomo di un'alterata migrazione (Matsumoto, Yamazaki et al. 2006). Invece, topi che non esprimono PROK2 mostrano un alterato sviluppo dei neuroni GnRH dovuto ad un non corretto sviluppo dei bulbi olfattori. Tuttavia, i neuroni GnRH non esprimono né PROK2 né il suo recettore indicando che l'alterazione di questi neuroni è un effetto indiretto dato dalle alterazioni dei bulbi olfattori e delle fibre che li guidano fino al prosencefalo. Recenti studi hanno dimostrato che PROK2 presenta caratteristiche di legame simili a quelle dell'eparansolfato suggerendo una interazione con la via di segnale che vede coinvolte anosmina ed FGF . Nell'uomo mutazioni di questo ligando e del suo recettore portano ad un fenotipo molto variabile: in alcuni simile a quello della sindrome di Kallmann, in altri simile all'ipogonadismo ipogonadotropo, ed in altri ancora completamente asintomatico (Monnier, Dode et al. 2009).

Fattori di trascrizione

Ebf2 fa parte della famiglia dei fattori di trascrizione *helix-loop-helix*, coinvolti nello sviluppo neuronale. Esso viene espresso nei neuroni GnRH migranti all'età di E11 (28,22 wierman). Topi che non esprimono Ebf2 presentano i neuroni GnRH bloccati a livello del mesenchima nasale, per cui sembra che questo fattore agisca direttamente sui neuroni GnRH in quanto lo sviluppo del sistema olfattorio non sembra venir alterato.

DAL NERVO VOMERONASALE AL PROSENCEFALO

A livello della lamina cribriiforme, il nervo vomeronasale si divide in due rami; i neuroni GnRH seguono quello che gira caudalmente a livello del prosencefalo.

Netrina e DCC (deleted in colon cancer)

La direzionalità dei neuroni GnRH verso il ramo caudale del nervo vomeronasale verso il prosencefalo è data dall'effetto chemoattrattore della netrina-1. Questo ramo esprime una proteina della famiglia delle immunoglobuline: DCC. Questa, in altri sistemi, media la guida assonale data dalla netrina-1. Analisi condotte sulle variazioni delle traiettorie degli assoni e la posizione dei neuroni GnRH in topi mutati per DCC hanno dimostrato che in assenza di questa proteina gli assoni virano ventralmente migrando a livello della corteccia. La perdita di Unc5h3, il recettore alternativo della netrina, non va ad influire sulla traiettoria degli assoni esprimenti DCC o dei neuroni GnRH, indicando la specificità dell'interazione tra ligando e recettore. Infine, è stato osservato che la via di segnale data da Netrina/DCC è mediata da HSPG (Wierman, Kiseljak-Vassiliades et al. 2011).

Semaforine e plexina

La semaforina 4D (Sema4D) è una proteina legata alla membrana che dopo essere tagliata proteoliticamente lega la plexina B1 a livello del placode olfattorio e lungo la via di migrazione dei neuroni GnRH. La plexina b1 colocalizza con NCAM a livello del sistema olfattorio all'età di E12.5, ma non si è osservata lungo il nervo vomeronasale o nei neuroni GnRH alle età di E14.5 e E17.5. Ciò probabilmente è dovuto al fatto che questa proteina è necessaria alla fase iniziale dello sviluppo; infatti, anche in colture cellulari è stata osservata una colocalizzazione solo nelle prime divisioni cellulari. La mancanza di Plexina-1 da luogo ad un'alterazione della migrazione dei neuroni GnRH che causa la presenza di un minor numero di neuroni a E14.5, e una riduzione del 20% all'età di P3 con accumulo a livello della regione dei bulbi olfattori ed una riduzione delle fibre dei neuroni GnRH a livello dell'eminenza mediana (Giacobini, Messina et al. 2008). Altri studi hanno dimostrato il coinvolgimento di più semaforine nella secrezione dei neuroni GnRH attraverso il rimodellamento delle fibre di questi neuroni a livello dell'eminenza mediana. Esperimenti condotti su cellule GN-11 indicano che le semaforine agiscono attraverso un'interazione con plexina/Met al fine di modulare la migrazione dei neuroni GnRH. Sebbene topi che non esprimono la semaforina 4D, non presentano un fenotipo riproduttivo, probabilmente vi è un meccanismo compensatorio indotto da altre semaforine (Wierman, Kiseljak-Vassiliades et al. 2011).

Semaforine e neuropilina 2

Oltre all'interazione tra semaforina4D/plexina/HGF/Met, la classe 3 delle semaforine ha un ruolo importante nello sviluppo dei neuroni GnRH. Queste semaforine sono un gruppo di proteine legate alla membrana in grado di essere anche secrete e di legarsi al recettore

neuropilina-2 (Npn2). Esse sembrano essere responsabili della modulazione della migrazione lungo il cono di crescita assonale (Cariboni, Rakic et al. 2005). Topi che non esprimono Npn2 hanno una diminuzione del 25% nel numero di neuroni GnRH nell'adulto e di un aumento a livello del setto nasale (Cariboni, Rakic et al. 2005). Questa alterazione è probabilmente dovuta alla defascicolazione degli assoni del nervo vomeronasale che causa la distruzione della normale via e traiettoria dei neuroni GnRH.

Reelina

La reelina è una proteina extracellulare coinvolta nella migrazione neuronale in diverse regioni del cervello (Caviness, So et al. 1972). Anche se è stato dimostrato che solo il 5% dei neuroni GnRH esprime uno dei recettori della reelina (ApoER2/Lrp8), topi che non esprimono la reelina presentano una diminuzione di neuroni GnRH a livello del prosencefalo ed una conseguente riduzione della fertilità. La reelina viene espressa a livello del nervo vomeronasale, ma non dai neuroni GnRH, suggerendo che le alterazioni nei neuroni GnRH sono date da un effetto indiretto (Cariboni, Rakic et al. 2005).

DALLA LAMINA CRIBRIFORME ALL'IPOTALAMO ED ESTENSIONE DEI PROLUNGAMENTI DAL PROSENCEFALO ALL'EMINENZA MEDIANA

Dopo aver superato la lamina cribriiforme ed essere giunti all'ipotalamo, sono necessari dei fattori specifici che inducano i neuroni GnRH ad emettere dei lunghi processi che attraversano il prosencefalo basale ed arrivano fino all'eminenza mediana.

HGF (hepatocyte growth factor)/cMET

Met è un recettore di membrana tirosino-chinasi che viene attivato dalle citochine e da HGF. Esso ha azioni mitogeniche, migratorie e chemoattrattive in diverse popolazioni neuronali (Ieraci, Forni et al. 2002). HGF fa parte della famiglia dei fattori di crescita regolati dal plasminogeno. pro-HGF è tagliato dall'uroplasminogeno (uPA), plasminogeno tissutale (tPA) o fattori di coagulazione per attivare cMet. La via di segnale di HGF e cMet risulta essere importante nei neuroni GnRH in quanto ne promuove la motilità e la migrazione (Giacobini, Messina et al. 2008). Infatti, è stato osservato che la somministrazione di HGF ad espianti nasali embrionali aumenta la distanza di migrazione delle cellule, mentre l'inibizione di HGF riduce la crescita assonale sia dei neuroni GnRH che degli assoni olfattori. Anche se topi che non esprimono cMet non sono vitali, in topi che non esprimono tPA/uPA (ovvero incapaci nell'attivazione di HGF), si è osservata una riduzione del 35% nel numero dei

neuroni GnRH nei giorni P60, P90, associati a ridotta fertilità e riduzione nella frequenza dell'ovulazione indotta dal rilascio delle gonadotropine (Cariboni, Rakic et al. 2005).

Axl e Tyro3

Axl, Tyro3 e Mer fanno parte della famiglia TAM di recettori tirosinochinasici che svolgono vari ruoli nella modulazione immunitaria, nelle funzioni intellettuali e nella tumorigenesi. In alcuni esperimenti è stato mostrato che Axl e Tyro3 vengono espresse in cellule NLT, modello dei neuroni GnRH nella fase iniziale della migrazione, mentre Mer viene espressa solo in GT1-7, modello di neuroni GnRH non più migranti. Nella linea cellulare NLT, Gas6 (growth arrest specific gene 6) che è il ligando per la famiglia TAM, induce la migrazione neuronale dei neuroni GnRH attraverso la via di segnale di p38MAP chinasi e attraverso la protezione dalla morte cellulare attraverso la via di ERK MAP chinasi e PI3 chinasi data dal segnale di Akt (Wierman, Kiseljak-Vassiliades et al. 2011), suggerendo un potenziale ruolo di Akt e Tyro3 nello sviluppo dei neuroni GnRH. Studi condotti su topi adulti che non esprimono Akt o Tyro3, mostrano una riduzione del 25% nel numero di GnRH totali, con una riduzione del 34% nell'area preottica e con un leggero aumento nella regione rostrale. Analisi condotte sullo sviluppo dei neuroni GnRH in embrioni E15 mostrano una riduzione del 36% dei neuroni che raggiungono il prosencefalo ventrale, mentre il numero presente a livello del naso e del prosencefalo dorsale non è alterato, indicando che probabilmente Akt e Tyro3 sono importanti nel momento in cui i neuroni GnRH attraversano la lamina cribriiforme. Altri studi hanno indicato un aumento dell'apoptosi dovuta all'attivazione della caspasi 3 nella fase iniziale della migrazione in neuroni GnRH di topi transgenici per questi recettori chinasi, fenomeno che si esplica con ritardo nel primo ciclo estrale, aciclicità successiva e anormalità nell'aumento dell'LH (Pierce, Bliesner et al. 2008).

Attrattori delle chemochine SDF-1/CXCR4

Basandosi sull'ipotesi che la chemoattrazione è un meccanismo importante per guidare i neuroni GnRH durante la loro migrazione nel prosencefalo, SDF-1 (*stromal cell derived factor-1*) poi rinominato CXCL12 potrebbe essere un potenziale candidato a svolgere questo ruolo. Infatti, già in precedenza, questo fattore è stato descritto essere importante nella migrazione dei precursori delle cellule sensoriali, cerebrali e del cervelletto. Nel sistema nervoso centrale SDF-1 svolge la sua funzione da chemoattrattore anche verso le cellule precursori della granulosa. Ciò avviene tramite legame con il recettore accoppiato alle proteine G CXCR4; la mancanza di espressione del recettore o di SDF-4 porta ad uno sviluppo non corretto del cervelletto e alterata proliferazione neuronale. Inoltre, CXCR4 viene

espresso a livello embrionale nel sistema olfattorio ed è stato rilevato anche in diversi neuroni GnRH, ma non in tutti. SDF-4 è stato osservato a livello del mesenchima caudale nasale a E10, con un massimo d'espressione in cellule che sono direttamente adiacenti alla lamina cribriforme e al prosencefalo dove i neuroni GnRH migrano. In topi che non esprimono CXCR4 la migrazione dei neuroni GnRH è compromessa; infatti: in questo caso, a E12, il 40% dei neuroni GnRH che dovrebbe aver già oltrepassato l'organo vomeronasale, è ancora localizzato a livello di quest'ultimo; a E13, quando il 50% dovrebbe essere a livello del prosencefalo, meno del 3% ha attraversato la lamina cribrosa e nessuno è migrato caudalmente a raggiungere l'ipotalamo. Nei topi che non esprimono CXCR4, a E13, è stato osservato che vi è una ritenzione dei neuroni GnRH a livello del quadrante rostro-ventrale dell'organo vomero nasale e proprio in questa zona sono state osservate un maggior numero di cellule in apoptosi. Questi risultati indicano che l'interazione SDF-1 e CXCR4 è importante per la migrazione dei neuroni GnRH, inoltre vi è una recente evidenza indicante che HGF, attraverso Met, agisce sinergicamente con SDF1 e con CXCR4 (Wierman, Kiseljak-Vassiliades et al. 2011).

Fattore di trascrizione: Nhlh2

Nhlh2 è una proteina *helix-loop-helix* che viene espressa a livello delle regioni arcuata e antero-ventrale periventricolare dell'ipotalamo così come nell'ipofisi durante lo sviluppo e nell'adulto (Good, Porter et al. 1997). Essa fa parte della famiglia delle proteine che vengono espresse nei neuroni post-mitotici agendo come fattore di differenziamento nella fase tardiva dello sviluppo. Durante lo sviluppo embrionale Nhlh2 è espresso in alcuni dei neuroni GnRH, ma non viene più espresso nella fase tardiva; esso è stato rilevato nei neuroni esprimenti la kisspeptina a livello dell'ipotalamo e dell'ipofisi, ma tardivamente nello sviluppo. Topi che non esprimono Nhlh2 hanno un numero ridotto di neuroni GnRH. A P0 si osserva un leggero aumento di neuroni a livello dell'area preottica e olfattoria ed una riduzione nell'area ipotalamica OVLT/caudale. Sebbene questi topi presentino un ritardo del primo ciclo estrale e anomalie nel ciclo, la loro esposizione ai maschi induce l'ovulazione. Anche i livelli di LH risultano ridotti, suggerendo che Nhlh2 svolge un ruolo nella regolazione dell'asse riproduttivo. Tuttavia è stato anche osservato che Nhlh2 agisce attraverso *necdin*, substrato di Nhlh2 che aumenta la trascrizione di GnRH attraverso l'inibizione della repressione di *Msx* (Miller, Wevrick et al. 2009). In topi che non esprimono *necdin* si è osservata, nell'adulto, una riduzione nel numero dei neuroni ipotalamici inclusi quelli GnRH, e un'incapacità di attraversare la lamina cribriforme e di estendere gli assoni verso l'eminenza mediana (Miller, Wevrick et al. 2009). Sebbene non siano state osservate mutazioni di Nhlh2 nell'uomo,

sembra che *needin* sia coinvolta nella sindrome di Prader Willi che porta all'obesità e a sviluppare ipogonadismo ipogonadotropo (Wierman, Kiseljak-Vassiliades et al. 2011).

DISPERSIONE DEI NEURONI GnRH NELL'IPOTALAMO E FINE DELLA MIGRAZIONE

Come ultimo passaggio i neuroni si distaccano dalle loro guide assonali e si disperdono nell'ipotalamo dove termina la loro migrazione.

Kisspeptina/KissR

Mentre il GABA agisce riducendo la migrazione dei neuroni GnRH nel compartimento nasale (Fueshko, Key et al. 1998), interferendo con l'associazione dei neuroni alle fibre guida (Bless, Walker et al. 2005), poco è conosciuto a proposito delle molecole che agiscono inibendo la migrazione dei neuroni GnRH una volta arrivati a destinazione nell'ipotalamo. La kisspeptina è una proteina di 154 aminoacidi che va incontro a vari tagli proteolitici. È il prodotto del gene *Kiss1*, ed è stata inizialmente indicata come soppressore delle metastasi in cellule tumorali (Seminara, Messenger et al. 2003). La kisspeptina si lega ed attiva GPR54 mediando la riduzione della motilità cellulare (Ohtaki, Shintani et al. 2001), sebbene il ruolo di questa proteina sia anche quello di aumentare la secrezione di GnRH nel periodo della pubertà (Seminara, Messenger et al. 2003), essa è stata identificata nell'embrione di topo a livello di alcuni neuroni del nucleo arcuato suggerendo un suo ruolo anche nella regolazione dei neuroni GnRH anche durante lo sviluppo embrionale.

2.6.3 PATOLOGIE DOVUTE A MUTAZIONI DI GENI COINVOLTI NELLO SVILUPPO E MIGRAZIONE DEI NEURONI GnRH:

Nove sono i geni che sono stati osservati essere coinvolti nello sviluppo di due principali patologie umane legate a disregolazioni dei neuroni GnRH quali la Sindrome di Kallmann e l'ipogonadismo ipogonadotropo normosomico: *KAL-1*, *FGF-8*, *FGFR-1*, *PROK2*, *PROKR2*, *CHD7*, *NELF*, *KISSR* e *Axl*. I primi cinque (*KAL-1*, *FGF-8*, *FGFR-1*, *PROK2*, *PROKR2*), se mutati, causano un'alterazione nel numero e nella traiettoria dei neuroni GnRH; non è ancora ben chiaro che ruolo svolga *CHD7*, mentre *KISSR* si pensa alteri la secrezione di GnRH durante la pubertà, ma potrebbe avere anche degli effetti nella fase iniziale dello sviluppo neuronale sia a livello di maturazione che di migrazione. Mutazioni in *NELF* e *Axl* sono state riscontrate in un piccolo numero di pazienti (Wierman, Kiseljak-Vassiliades et al. 2011).

2.7 GLI INTERNEURONI GABAERGICI

Gli interneuroni del SNC sono tipicamente inibitori, e utilizzano come neurotrasmettitori GABA o glicina. Tuttavia, esistono anche quelli eccitatori che utilizzano il glutammato, così come quelli che rilasciano neuromodulatori come l'acetilcolina. In linea generale gli interneuroni possono essere classificati come:

- INTERNEURONI SPINALI:
 - 1) Neuroni inibitori che si trovano nella lamina VII
 - 2) Neuroni inibitori che si trovano nella lamina V, VI, VII
- INTERNEURONI CORTICALI
 - 1) interneuroni contenenti Parvalbumina
 - 2) interneuroni contenenti CCK
 - 3) interneuroni contenenti VIP
- INTERNEURONI CEREBELLARI
 - 1) Interneuroni dello strato molecolare (cellule a canestro, cellule stellate)
 - 2) Cellule del Golgi
 - 3) Cellule della granulosa

Nel cervello dei mammiferi la neocorteccia rappresenta il punto di arrivo di tutte le informazioni sensoriali ed il luogo dove queste informazioni vengono accumulate, processate e utilizzate per comportamenti complessi. L'organizzazione anatomica della neocorteccia è molto simile in specie diverse. L'architettura della corteccia cerebrale consiste di sei strati in cui sottotipi specifici di neuroni inibitori ed eccitatori si connettono formando reti molto intricate. Inoltre, i neuroni inibitori della corteccia cerebrale generano, mantengono e modulano a diverse frequenze l'attività oscillatoria di vaste popolazioni neuronali. L'attività ritmica di queste reti neuronali governa complesse funzioni cerebrali, quali, ad esempio, funzioni cognitive, memoria ed inizio del movimento. I gangli della base includono differenti nuclei subcorticali interconnessi coinvolti nella carica motivazionale, nella pianificazione del movimento e nell'apprendimento. Lo striato rappresenta il principale nucleo d'ingresso per la formazione dei circuiti presenti a livello dei gangli della base. Esso riceve afferenze eccitatorie (glutammatergiche) dalla corteccia e dal talamo ed è densamente innervato da neuroni dopaminergici del mesencefalo. La maggioranza dei neuroni striatali è GABAergica; molti di questi neuroni sono neuroni di proiezione di medie dimensioni ricoperti di spine dendritiche. Questi interneuroni possono presentare proteine leganti calcio come la parvalbumina, la calretinina e il neuropeptide Y, oppure la somatostatina o la NADH

diaforasi. Di conseguenza sono stati classificati rispettivamente come neuroni a scarica veloce (*fast-spiking*, FS), neuroni con scarica persistente e a bassa soglia (PLTS) e neuroni con scarica a bassa soglia (LTS) (Tepper, Tecuapetla et al. 2010). Uno studio relativamente recente ha identificato un nuovo gruppo di neuroni GABAergici che esprimono la tirosina idrossilasi. Oltre alla popolazione numericamente superiore di neuroni GABAergici, lo striato contiene anche una piccola percentuale di neuroni che possiede i livelli di acetilcolina più alti del cervello. Sono questi i grandi interneuroni colinergici sprovvisti di spine dendritiche (ChIs) caratterizzati da una densa arborizzazione assonale locale (Tepper, Tecuapetla et al. 2010; Wilson, Chang et al. 1990). E' ormai risaputa la centralità degli interneuroni ChIs striatali nella rete di circuiti dei gangli della base sia per il controllo del movimento volontario sia nella patogenesi di malattie quali il morbo di Parkinson (PD) e la distonia; infatti, i farmaci anticolinergici sono stati a lungo la prima scelta per la terapia di queste malattie (Smith, Bolam et al. 1990).

2.8 LA MIGRAZIONE DEGLI INTERNEURONI GABAERGICI

Gli interneuroni GABAergici sono una popolazione cellulare che nasce dalle eminenze ganglioniche del sub pallio e migrano verso il pallio che si sta sviluppando (De Carlos et al. 1996; Tamamaki et al. 1997). Questa popolazione cellulare non è destinata solo alla neocorteccia, ma anche all'ippocampo e ai bulbi olfattori (Anderson et al. 1997; Lavdas et al. 1999; Wichterle et al. 1999; Pleasure et al. 2000; Wichterle et al. 2001). In vari studi è stato osservato che vi sono due vie di migrazione: una che passa attorno all'incisura cortico-striatale e una che li indirizza verso la corteccia tangenzialmente (Corbin et al. 2001; Nadarajah & Parnavelas 2002; Marin & Rubenstein 2003). Un primo gruppo che origina nella eminenza ganglionica mediana (MGE), inizia a migrare a E12 in topo e a E14 in ratto ed innerva principalmente la preplacca. Queste cellule sono orientate tangenzialmente e presentano caratteristiche simili alle cellule Cajal-Retzius. Un secondo gruppo, che origina anch'esso nella MGE, migra principalmente nella zona intermedia (IZ), anche se leggermente più tardi nello sviluppo (tra E13-15 in topo e E15-17 in ratto). Un terzo gruppo, in uno stadio più tardivo della corticogenesi, origina principalmente nella eminenza ganglionica laterale (LGE), ma anche nella MGE, e migra nella zona intermedia (IZ) e sub-ventricolare (SVZ) (Anderson et al., 2001). Più recentemente è stato osservato che anche a livello della LGE vi sono interneuroni che migrano nella fase iniziale della corticogenesi (Jimenez et al. 2002). In altri studi è riportato che anche dalla eminenza ganglionica caudale partono degli interneuroni

destinati alla corteccia e all'ippocampo (Nery et al. 2002). Il gruppo di Yozu (Yozu et al. 2005) ha osservato che, mentre gli interneuroni che partono dalla MGE migrano lateralmente e si diffondono nella corteccia, molti di quelli che nascono dall'eminenza ganglionica corticale (CGE) migrano nella regione caudale e nel telencefalo; alcune cellule sono state viste migrare lateralmente e rostralmente. Questa differente direzionalità sembra essere dovuta sia a fattori attrattivi e repulsivi circostanti, sia a fattori cellulari intrinseci. Gli interneuroni sono una popolazione eterogenea e con una distribuzione abbastanza selettiva, infatti è stato osservato che gli interneuroni che esprimono parvalbumina e somatostatina derivano principalmente dalla MGE, mentre quelli contenenti calretinina partono dalla CGE (Wichterle et al. 2001; Valcanis & Tan 2003). Da alcuni studi appare che questi interneuroni utilizzano per migrare le fibre corticofugali esprimenti TAG-1 (Denaxa et al. 2001; Morante-Oria et al. 2003; McManus et al. 2004). Gli interneuroni sorgono dal telencefalo ventrale e migrano attraverso la VZ raggiungendo il telencefalo dorsale, dopo una pausa in questa zona proliferativa, essi migrano radialmente nella direzione della superficie piaie per stabilizzarsi nella placca corticale (Nadarajah 2002). Sembra che, una volta che gli interneuroni raggiungono la neo-corteccia, sia attraverso la via di migrazione verso l'MZ che IZ/SVZ, essi migrino radialmente nella fase finale del loro percorso attraverso la corteccia per prendere posizione nella corretta zona (Polleux et al. 2002; Ang et al. 2003; Tanaka et al. 2003; Hevner et al. 2004). Non è ancora ben noto se questa migrazione è di tipo neurofilica (comunicazione con le proiezioni di neuroni della stessa età di quelli di Cajal-Retzius) e/o gliofilica (comunicazione con la glia radiale). Anche se non in tutti gli studi è condivisa questa opinione, si ritiene che, come le cellule piramidali, gli interneuroni corticali, sono disposti in un modo "*inside-out*" nella corteccia in sviluppo. In più si ritiene anche che le cellule piramidali e gli interneuroni appena nati risiedano nella stessa zona (Ang et al. 2003; Miller, 1985; Fairen et al. 1986; Peduzzi 1988; Valcanis and Tan 2003; Hevner et al. 2004), posizione determinata dal contatto con le proiezioni neuronali. Allo stesso tempo sembrerebbe che gli interneuroni stessi che risiedono negli strati corticali più bassi, tramite rilascio di Reelina, influenzano la migrazione delle cellule piramidali della zona corticale più alta.

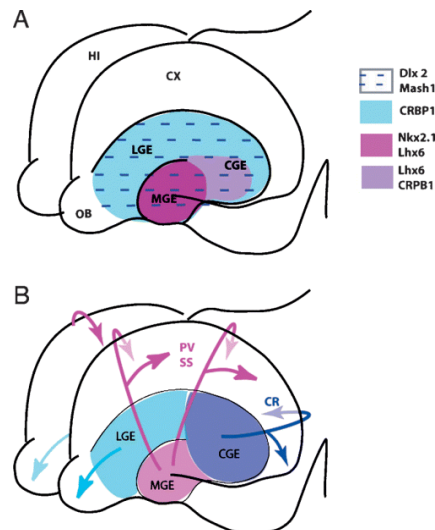


Fig.1 A) divisione delle tre are importanti per la migrazione degli interneuroni; B) Direzione della migrazione dei vari interneuroni a seconda della loro origine (Metin, Baudoin et al. 2006).

2.8.1 MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA MIGRAZIONE DEGLI INTERNEURONI

La migrazione degli interneuroni GABAergici verso la corteccia è dovuta a fattori motogenici presenti nella MGE, a fattori repulsivi presenti principalmente nella LGE e nel telencefalo, così come a fattori attrattivi e permissivi a livello della corteccia. Uno dei fattori che sembra essere coinvolto nella funzione motogenica è l'HGF/SF (*hepatocyte growth factor/scatter factor*) che agisce per mezzo del suo recettore MET (Powell et al. 2001). Cambiamenti nella normale espressione di questo fattore si traducono in una drastica riduzione degli interneuroni nella corteccia al momento della nascita. Altri fattori importanti per la migrazione degli interneuroni sono le neurotrofine, in particolar modo BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) ed NT-4 (*neurotrophic factor*) (Polleux et al. 2002 Pozas, Ibanez 2005). BDNF sembra avere una duplice funzione: stimolare la migrazione, agendo come fattore chemoattrattivo e promuovere la differenziazione cellulare. Infatti in uno studio recente (Petridis 2010) è stato osservato che BDNF agisce da chemoattrattore nei confronti degli interneuroni se espresso a concentrazioni fisiologiche (1ng/ml), mentre induce il differenziamento di questi neuroni se espresso a concentrazioni più elevate (10ng/ml). Tuttavia, l'effetto di chemoattrazione è stato osservato a livello della SVZ, ma non negli interneuroni destinati ai bulbi olfattori. Secondo questo studio sembra che quest'azione mediata da BDNF sia dovuta all'attivazione di CREB attraverso TrkB e le MAPK. Inoltre,

sembra anche che PSA sia in grado di modulare la quantità di BDNF che interagisce con TrkB. Studi condotti da Marin e colleghi (Marin et al., 2001) hanno dimostrato che gli interneuroni destinati alla corteccia esprimono neuropilina (Npn)1 e Npn2, in modo tale da rendere gli stimoli repulsivi dovuti all'effetto delle semaforine di classe 3 presenti nella zona dello striato, effettivi solo in quell'area, delineando così la traiettoria degli interneuroni. Inoltre, sembra che gli interneuroni siano indotti a girare attorno allo striato attraverso segnali indotti da Npn/Sema e Robo1 (Marin, Plump et al. 2003). In modo simile alle semaforine, anche le neureguline (NRGs) sembrano essere coinvolte nella regolazione della traiettoria degli interneuroni (Falls, 2003); in modo particolare quattro di queste interagiscono con ErbB, mediando quest'azione (Buonanno and Fischbach 2001). NRG1 sembra essere un chemoattrattore per le cellule che derivano dalla MGE (Flames, Long et al. 2004). Inoltre NRG-1 solubile risulta essere espressa a livello nelle zone corticali, suggerendo un ruolo nell'attrazione del gruppo di cellule che migrano tangenzialmente verso la SVZ, mentre la forma ancorata alla membrana viene espressa nella GE, dove probabilmente facilita la migrazione degli interneuroni attraverso quest'area (Flames, Long et al. 2004). Il recettore ErbB4 viene espresso negli interneuroni che migrano verso la corteccia e colocalizza con il marker Dlx2 (Yau et al. 2003), se questo recettore viene meno si ha una riduzione dei neuroni migrati in corteccia dovuta all'incapacità degli interneuroni di attraversare la MGE (Flames et al. 2004). I neuroni che partono dalla MGE e sono destinati alla corteccia esprimono *lhx6* e *lhx7* (*LIM homeodomain gene*) (Lavdas et al. 1999; Grigoriou et al. 1998; Asbreuk et al. 2002). *Lhx7* risulta essere importante nello sviluppo dei neuroni colinergici nel prosencefalo, mentre *lhx6* sembra avere una funzione nell'indirizzare gli interneuroni solo verso la corteccia (Asbreuk et al. 2002; Marin et al. 2000; Zhao et al. 2003), ma non sembrano avere una funzione nella neurotrasmissione.

2.8.2 MECCANISMI CELLULARI COINVOLTI NELLA MIGRAZIONE DEGLI INTERNEURONI

Contrariamente ai neuroni corticali piramidali che aderiscono ai processi della glia e presentano una morfologia bipolare (Rakic, 1972), i precursori degli interneuroni che migrano estendono molti prolungamenti e sono in grado di migrare su vari substrati (Marin and Rubenstein 2001; Nadarajah and Parnavelas 2002; Polleux et al. 2002). Infatti, le cellule della MGE migrano: nella CP sui corpi cellulari dei neuroni postmitotici, nella SVZ sui progenitori, nella bassa IZ sui processi delle cellule della glia radiale e lungo gli assoni cortico-fugali

(Denaxa et al. 2001; Nadarajah et al. 2002). Similarmente ai precursori degli astrociti della SVZ, le cellule della MGE cambiano direzione estendendo un nuovo processo (Kakita and Goldman,1999). Queste cellule generalmente dividono il cono di crescita in cima al neurite guida, estendendo poi le ramificazioni divergenti presenti frontalmente. Successivamente, una delle due ramificazioni viene retratta, mentre dalla rimanente si formano due nuove ramificazioni. Questo comportamento dà dinamicità permettendo a questi neuroni di integrare sia il movimento migratorio che quello di ramificazione. Tuttavia, gli interneuroni presentano un altro modo per cambiare direzione, ovvero invertendo la polarità (Nadarajah et al. 2002), comportamento osservato quando gli interneuroni raggiungono la SVZ o la VZ (Noctor et al. 2004).

3) LA NEURITINA

La neuritina-1 (nota anche come CPG15-1 o NRN-1), è stata scoperta per la prima volta dalla Dottoressa Elly Nedivi attraverso il clonaggio di 52 geni che vengono attivati a livello ippocampale dal kainato, un analogo del glutammato. Questi geni sembrano essere coinvolti nel fenomeno della plasticità a lungo termine; infatti il nome del gene che codifica per la neuritina, come menzionato sopra, è CPG15 ovvero: *candidate plasticity related gene 15* (Nedivi, Hevroni et al. 1993). Studi più recenti di Fujino et al. (Fujino, Wu et al. 2008) hanno portato alla luce un'altra isoforma della neuritina: CPG15-2. Questa seconda isoforma, identificata come unico paralogo di CPG15 nel topo e nell'uomo, varia leggermente nella sequenza, risulta essere localizzata in aree differenti rispetto a CPG15, ma sembra avere le stesse funzioni di crescita neuritica e sopravvivenza neuronale.

3.1 STRUTTURA DELLA NEURITINA

3.1.1 CPG15

Il gene *cpg15* nell'uomo è stato localizzato a livello del cromosoma 6, più precisamente nella regione p24 e p25. Il cDNA identificato consiste di 1604 paia di basi e contiene una sequenza ORF putativa che codifica per una proteina di 143 aminoacidi con una massa di 15,3 KDa.

Nella porzione N terminale della sequenza ORF codifica per una regione idrofobica di circa 27 aminoacidi codificante per un peptide segnale deputato alla secrezione della proteina. La porzione C terminale codifica per una sequenza, anch'essa di 27 aminoacidi, ricca di residui idrofobici e contenente un sito di taglio che generalmente è presente nelle proteine ancorate alla membrana cellulare tramite una ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI), suggerendo così che la proteina viene secreta e legata alla membrana cellulare con un ancora GPI.

Questa ipotesi è stata confermata tramite analisi Western di linee cellulari stabilmente esprimenti la neuritina dopo trattamento con PI-PLC (fosfatidil inositolo fosfo lipasi C) che è in grado di tagliare il sito di ancoraggio della neuritina (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997). La proteina matura è di 90 aminoacidi (12KDa) e contiene sei residui di cisteine utilizzabili per potenziali legami inter- o intra-molecolari. La sequenza non contiene evidenti siti di

fosforilazione o di glicosilazione. La sequenza del cDNA umano è al 97% uguale a quella di ratto e le due proteine mature risultano praticamente identiche.

```

rat      1  M G L K L N G R Y I S L I L A V Q I A Y
human   atgggacttaagttgaacggcagatatatcttcaactgactectcgcggtgcaaatagcttac 60
                                     g t

rat      21  L V Q A V R A A G K G D A V P K G F S D
human   ctggtgcagggccgtgagagcagcagggcaagtgcgatgcagtcctttaagggcttttcagac 120
                                     g c g

rat      41  C L L K L G D S M A N Y P Q G L D D K T
human   tgtttgctcaagctgggtgacagcatggccaactacccgcagggcctgggcgacaagacg 180
                                     c

rat      61  N I K T V C T Y W E D F H S C T V T A L
human   aacatcaagaccgtgtgcacatactggggaggatctccacagctgcacpggtccacagctctt 240
                                     c

rat      81  T D G Q E G A K D M W D K L R K E S K N
human   acggattgcccagusaaggggcgaagatattgtgggataaactgaqaaaagaatcgaaaaaac 300
                                     c

rat     101  L N I Q G S L F E L C G S G N G A A G S
human   ctcaatatccaaggcagcttatttcgaactctgcccagcggcaacggggcggcggggctcc 360
                                     c

rat     121  L L P A L S V L L V S L S A A L A T W L
human   ctgctcccggcgtttccgtgtctctctgtctctctcctcggcagcttttagcgaacctggctt 420
                                     t cc g
                                     Z P

rat     141  S F *
human   tccttctga 429

```

Figura 2 Sequenza della neuritina: la regione N-terminale sottolineata corrisponde al peptide segnale di secrezione, mentre quella C-terminale sottolineata corrisponde alla zona di legame della proteina alla membrana mediante una ancora GPI (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997).

Nel topo è stata caratterizzata anche la zona promotrice del gene che codifica per la neuritina (Fujino, Lee et al. 2003). Nel topo questo gene è costituito da 3 esoni che codificano rispettivamente per le sequenze aminoacidiche 1-19, 19-67 e 67-142. E' stato osservato che la sequenza di 1,9 Kb a monte del sito d'inizio della traduzione contiene un promotore funzionale ed è sufficiente per la regolazione attività-dipendente. Il promotore della neuritina contiene diversi potenziali siti di legame per fattori trascrizionali che vengono regolati dall'attività sinaptica. In questa regione sono state identificate delle sequenze simili al sito di legame per CREB, CRE, tre sequenze simili a quelle per il sito di legame per AP-1 e due per il sito di legame della famiglia di EGR (*early growth response*) e *EGR responsive element* (EGR RE). In aggiunta sono stati identificate anche delle sequenze similari a CaRF *binding site*, CaRE1, osservato anche nel promotore di BDNF. Di questi siti, due CRE-like, uno TRE-like e il CRE1-like risultano essere conservati nell'uomo e nel topo (Fujino, Lee et al. 2003). Quindi, il promotore di CPG15 contiene almeno nove siti potenziali di legame a fattori di

trascrizione noti per essere coinvolti nell'attività neuronale (Saffen, Cole et al. 1988; Sukhatme, Cao et al. 1988; Sheng and Greenberg 1990; Worley, Cole et al. 1990; Worley, Christy et al. 1991; Tao, West et al. 2002).

3.1.2 CPG15-2

Questa seconda isoforma è stata identificata, tramite ricerche in banche dati genomiche, essere l'unico potenziale paralogo della neuritina nel topo e nell'uomo. La proteina CPG15-2 predetta è di 162 amminoacidi, risultando perciò più lunga di 20 amminoacidi rispetto a cp-g-15. Gli amminoacidi aggiuntivi sono localizzati a livello C terminale. A livello amminoacidico nel topo le due proteine risultano essere identiche per il 28% e simili per il 50%. Nonostante questo, i due geni mantengono diverse caratteristiche strutturali comuni quali: la sequenza segnale sita nell'N-terminale, la sequenza dell'ancora GPI a livello del C-terminale e le sei cisteine. Inoltre, presentano similarità nella loro struttura genomica: entrambi i geni presentano tre esoni separati dagli introni in posizioni equivalenti, mentre risultano essere differenti nella regione che codifica per la proteina e a livello di alcune regioni del promotore, dove CPG15-2 risulta essere più compatto con introni più corti (Fujino, Wu et al. 2008). Anche CPG15-2 risulta essere attivata dal kainato, facendo così pensare che, anche se la regione del promotore è diversa da quella di CPG15, probabilmente sono comunque presenti dei siti di legame per CREB, USF e NeuroD, fattori implicati nella trascrizione attività dipendente, così come accade per CPG15 (Shieh, Hu et al. 1998; Tao, Finkbeiner et al. 1998; Chen, West et al. 2003; Aizawa, Hu et al. 2004; Gaudilliere, Konishi et al. 2004).

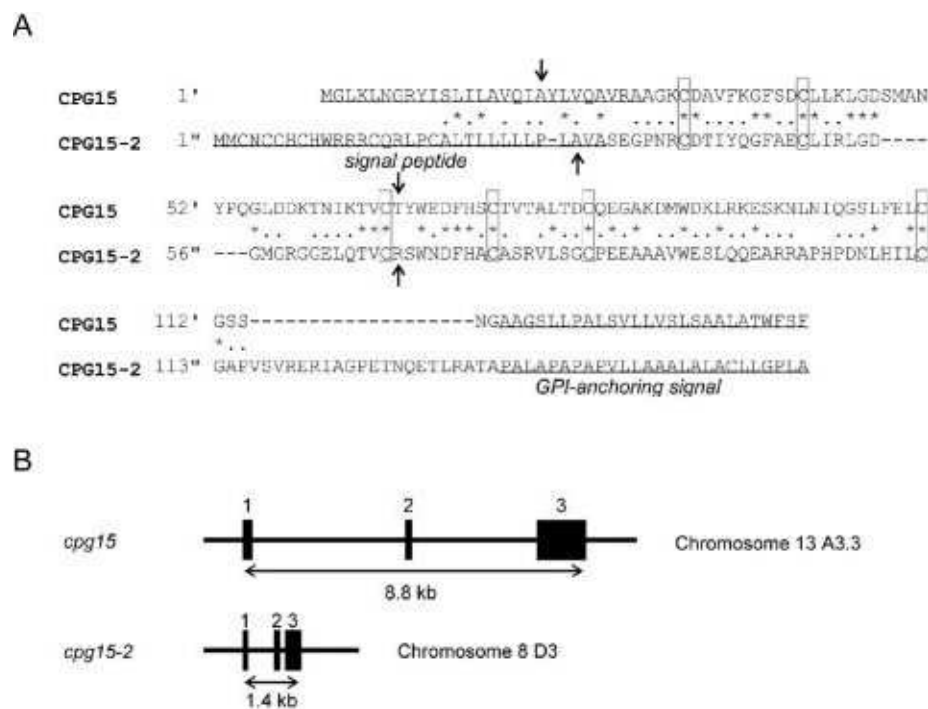


Figura 3 A) Differenze nella sequenza aminoacidica tra NRN-1 e NRN-2. B) paragone tra le strutture genomiche di mNRN1 e mNRN2 (Fujino, Wu et al. 2008).

3.2 LOCALIZZAZIONE

3.2.1 CPG15

La neuritina, in ratto, viene espressa anche a livello del fegato e dei polmoni, ma principalmente a livello del cervello ed in particolare a livello del giro dentato. Inoltre, è stato osservato attraverso esperimenti d'ibridazione in situ, effettuati in ratti E12-E15-E20, che la neuritina viene maggiormente espressa con lo sviluppo dell'embrione e aumenta ulteriormente dopo la nascita. una caratterizzazione più dettagliata della localizzazione della neuritina a livello del sistema nervoso centrale è riportata in ratti E15; più precisamente si può osservare l'espressione della neuritina a livello delle zone sub ventricolare e intermedia della neocorteccia, della corteccia cingolata e dell'ippocampo, del nervo trigemino, del nervo ganglio facciale-acustico, del nervo glossofaringeo, del nervo vago e a livello dei gangli della spina dorsale (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997). Questi dati sono stati poi riconfermati e approfonditi dal lavoro svolto da Putz e colleghi (Putz, Harwell et al. 2005), che, sempre tramite ibridazione in situ su cervelli di ratto, ha confermato ed approfondito i risultati precedentemente ottenuti. in questo lavoro è stata osservata l'espressione di CPG15:

- In ratti E14 ed E15: a livello della placca corticale, nella zona ventricolare del talamo dorsale e a livello delle cellule gangliari della retina.
- In ratti E17 ed E19: nelle zone sub ventricolari telencefaliche e diencefaliche dorsali e nell'ippocampo primordiale.
- In ratti E19 - P7: nei gangli del trigemino, nel talamo sensoriale e in diversi nuclei del tronco encefalico.
- In ratti P7: nello strato granulare esterno del cervelletto.
- In ratti da P0 a P14 la neuritina risulta assente nella corteccia
- I ratti in età successive a P14: la neuritina risulta nuovamente espressa a livello della corteccia, ma in zone differenti da quella ventricolare e sub-ventricolare.

Nel complesso questi risultati indicano l'espressione di questo gene a livello delle regioni proliferative in cui sono presenti i progenitori, tanto è vero che è stato correlato con la capacità di promuovere la sopravvivenza di queste cellule ed con una funzione pro-apoptotica nei confronti dei fibroblasti superflui. La neuritina risulta, invece, completamente esclusa dall'epitelio olfattorio e dalle eminenze ganglioniche, facendo pensare che la sua espressione sia cellula specifica (Putz, Harwell et al. 2005).

Nell'adulto l'RNA messaggero della neuritina risulta essere presente in regioni note per la loro plasticità: nel corno di Ammone e nel giro dentato dell'ippocampo; inoltre è presente un'elevata espressione di neuritina nei differenti strati delle proiezioni della tenia tecta verso il bulbo olfattorio e nel principale bersaglio delle cellule gangliari della retina, lo strato del nervo ottico situato a livello del collicolo superiore. Si osserva una localizzazione diffusa a livello della corteccia cerebrale, nei nuclei talamici, nelle cellule granulari del cervelletto e a livello delle cellule di Purkinje (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997).

La proteina è stata rilevata nelle stesse regioni osservate per l'mRNA, tuttavia oltre ad essere localizzata a livello dei neuroni granulari del giro dentato si è osservata una localizzazione marcata in alcune cellule del Purkinje a livello della regione ilare del giro dentato e a livello del complesso subiculare dell'ippocampo (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997).

A livello cellulare, nei neuroni, la proteina si localizza sulla membrana a livello del corpo cellulare e lungo le proiezioni dei neuriti nelle regioni cerebrali prive di mielina (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997).

La neuritina è stata studiata anche a livello della corteccia visiva di gatto, ed è stata rilevata un'elevata espressione nel nucleo genicolato laterale che decresce all'aumentare dell'età, mentre negli strati superficiali e profondi della corteccia visiva la neuritina aumenta con l'aumentare dell'età (Corriveau, Shatz et al. 1999).

3.2.2 CPG15-2

A livello della distribuzione tissutale, è stato osservato che l'mRNA di CPG15-2 risulta essere più espresso a livello degli occhi e del cervello, ma meno nei testicoli, diversamente da CPG15 che è espresso più a livello del cervello e del fegato. Tuttavia anche a livello del sistema nervoso centrale la localizzazione è differente in quanto CPG15-2 viene espressa a livello dei bulbi olfattori e, come CPG15-1, nella retina e nello striato, ma con livelli molto più elevati rispetto CPG15-1. A livello della retina si localizza solo a livello delle cellule bipolari e delle cellule site nello strato più interno della retina.

La differente localizzazione a livello della retina suggerisce che anche là dove sembra che vi sia una colocalizzazione tra i due geni, in realtà potrebbero essere espressi in sottotipi cellulari differenti.

Differente è anche il momento d'insorgenza dell'espressione di CPG15-2, che risulta essere bassa fino a E17.5 (in topo), mentre *cpg15-1* ha livelli elevati già a E12.5. Per entrambi i geni si verifica un picco d'espressione dalle 2 alle 4 settimane dopo la nascita, suggerendo che svolgano simili funzioni nello sviluppo tardivo (Fujino, Wu et al. 2008).

3.3 PROTEINA DI MEMBRANA O SECRETA

La neuritina (CPG15-1, CPG15-2), com'è stato precedentemente detto, nella sua sequenza presenta sia un segnale di secrezione che un segnale per l'ancoraggio alla membrana cellulare (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997; Fujino, Wu et al. 2008). L'ancora GPI può indirizzare direttamente le proteine ai *lipid rafts* (Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002), perciò potrebbe svolgere la funzione di traghettare la neuritina in una sotto regione della membrana cellulare in modo tale da aumentarne la concentrazione locale. L'ancora GPI potrebbe fornire un meccanismo per produrre sia proteina ancorata alla membrana sia una forma solubile a partire dallo stesso gene, come accade per altre proteine (Faivre-Sarrailh and Rougon 1997). Entrambe le forme di neuritina possono subire il distacco dalla membrana, ma le quantità di

proteina secreta sono diverse, probabilmente a causa di variazioni nei processi post-traslazionali (Fujino, Wu et al. 2008). Il fenomeno di secrezione della neuritina è stato ampiamente studiato anche dal gruppo di Cantalops e colleghi (Cantalops and Cline 2008); essi riportano che la proteina GPI-CPG15 viene trasportata a livello della membrana assonale attraverso un meccanismo attività-dipendente. Questo comportamento risulta essere differente da altre proteine GPI, in quanto essa si sposta da e verso la superficie assonale attraverso un meccanismo calcio-dipendente. Durante gli spostamenti la neuritina presente negli assoni risulta essere associata a vescicole e ad endosomi. La neuritina dalla superficie cellulare si distribuisce lungo tutta la lunghezza degli assoni, dato confermato dal fatto che le vescicole calcio dipendenti si distribuiscono allo stesso modo, indipendentemente dall'apposizione delle strutture post-sinaptiche (Cantalops and Cline 2008). Ciò induce a pensare che la neuritina venga coinvolta nel processo di esocitosi, ma non limitatamente alla regione sinaptica. Infatti, le vescicole sinaptiche possono accumulare neuritina grazie all'alto livello di ciclicità delle membrane a livello delle sinapsi (Lin and Scheller 2000). Sebbene la neuritina continui a spostarsi da e verso la membrana plasmatica, è stato osservato un aumento del 30% sulla superficie cellulare rispetto alla quantità totale di neuritina, seguito da una sua diminuzione dopo elevata depolarizzazione. Cantalops et al. (Cantalops and Cline 2008) hanno osservato che vi è sia un arrivo che una rimozione di neuritina a livello della membrana plasmatica in un momento di depolarizzazione, suggerendo che, in queste condizioni, avvengano sia l'endocitosi che l'esocitosi, ma l'equilibrio è più spostato verso la seconda. Tuttavia se si blocca l'esocitosi, non si ha un aumento, ma una riduzione totale di CPG15 presente; infatti, in altri studi è stato riportato che bloccando l'endocitosi probabilmente s'interferisce anche sulla distribuzione delle proteine alla membrana plasmatica, interferendo con il meccanismo di riciclo degli endosomi (Kennedy and Ehlers 2006). Nella guida assonale, l'adesione mediata da L1, una proteina d'adesione importante durante lo sviluppo neurale, viene regolata attraverso l'endocitosi che controlla i livelli della superficie cellulare di L1 (Long, Asou et al. 2001). Dati recenti indicano che le molecole guida, quali i recettori per le semaforine, possono indurre un'endocitosi coordinata del recettore, neuropilina, con il quale risulta associata la molecola di adesione L1 (Castellani, Falk et al. 2004; Piper, Salih et al. 2005). Questo meccanismo permette un controllo spazio temporale delle caratteristiche di guida assonale e dei cambiamenti necessari per il cono di crescita.

3.4 FUNZIONI DELLA NEURITINA

3.4.1 PLASTICITÀ SINAPTICA A LUNGO TERMINE

La plasticità sinaptica è stata ampiamente studiata, in quanto risulta essere fondamentale sia durante lo sviluppo che nell'adulto. Infatti, anche nell'adulto, in modo particolare a livello della corteccia, avvengono dei cambiamenti dinamici (Nedivi, Fieldust et al. 1996), indispensabili per varie funzioni, tra cui la memoria e l'apprendimento, nonché per il rimodellamento delle connessioni neuronali durante lo sviluppo (Hevroni, Rattner et al. 1998). Questo fenomeno porta all'attivazione e alla regolazione di vari geni tra cui i CPGs. L'attivazione dei recettori del glutammato sembra essere coinvolta nella riorganizzazione sinaptica durante lo sviluppo embrionale e nella plasticità sinaptica nell'ippocampo adulto. Per questo motivo Nedivi e colleghi (1998) hanno selezionato i CPGs che vengono attivati dal kainato nel giro dentato dell'ippocampo. Tra questi sono stati selezionati quelli che potevano essere coinvolti nella plasticità sinaptica attività-dipendente nella neocorteccia. Tra questi è stata identificata la neuritina (CPG15).

3.4.2 REGOLAZIONE DELLA NEURITINA NELLA PLASTICITÀ NEURONALE

REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELLA NEURITINA DALL'INFLUSSO DI CALCIO ATTRAVERSO I RECETTORI NMDA E VSCCs DI TIPO L

In vari esperimenti è stato osservato che l'espressione di neuritina attività-dipendente, indotta da PTX, causa una stimolazione sinaptica che necessita di Ca^{2+} sia attraverso i recettori NMDA che VSCC di tipo L. Questa doppia richiesta porta all'attivazione di questi due canali del calcio o in modo sequenziale o contemporaneo. In neuroni striatali è stato osservato che l'attivazione di questi due tipi recettoriali si traduce nella fosforilazione di CREB e c-fos (Rajadhyaksha, Barczak et al. 1999). In questi neuroni è stata identificata una via di segnale sequenziale in cui si ha l'attivazione dei recettori AMPA/Kainato che attiva i recettori NMDA, che a loro volta, attivano i recettori VSCCs. Con l'attivazione di questi ultimi inizia l'ultimo passaggio essenziale per l'attivazione della via dei secondi messaggeri. L'espressione di neuritina indotta da alti livelli di potassio porta alla depolarizzazione solo dei recettori VSCCs, suggerendo che questa stimolazione non comporta l'attivazione dei recettori NMDA, ma solo di VSCCs. Questi risultati sono consistenti col fatto che anche dopo stimolazione da parte di c-fos o BDNF si ha la diretta attivazione di VSCCs di tipo L ed è sufficiente per l'induzione della trascrizione (Murphy, Worley et al. 1991; Shieh, Hu et al.

1998; Tao, Finkbeiner et al. 1998) e supporta anche la tesi del ruolo dell'attivazione sequenziale da parte di CPG15 dei recettori NMDA e VSCCs di tipo L in risposta a stimolazione sinaptica. Alternativamente, questa richiesta di duplice attivazione recettoriale indotta dal calcio al fine di regolare l'attività-dipendente di neuritina, potrebbe riflettere una dipendenza dalla via di segnale originata dai recettori NMDA e VSCCs di tipo L, in quanto entrambi i canali sono direttamente accoppiati alla via di trasduzione del segnale (Deisseroth, Bito et al. 1996; Husi, Ward et al. 2000; Dolmetsch, Pajvani et al. 2001). I recettori di tipo L possono attivare la via delle MAPK attraverso il legame diretto del calcio con la calmodulina, la quale funziona come sensore del calcio a livello del recettore (Peterson, DeMaria et al. 1999; Zuhlke, Pitt et al. 1999; Dolmetsch, Pajvani et al. 2001). Il recettore NMDA fa parte di un complesso multi-proteico in associazione con diverse chinasi appartenenti alla via delle MAPK come di CaMKII e PKA. Questo è un requisito indispensabile per la convergenza di segnali provenienti da vie differenti che vengono attivate dall'ingresso del calcio, infatti è stato osservato che un aumento di calcio locale a livello del sito d'ingresso è più importante al fine dell'attivazione della via di segnale che un aumento generalizzato (Fujino, Lee et al. 2003). Queste evidenze confermano che la regolazione attività dipendente di neuritina richiede l'attivazione delle due vie di segnale: delle CaMK e delle MAPK, ma non di PKA. La necessità di attivare entrambe le vie di segnale per l'induzione di neuritina dopo stimolazione sinaptica, suggerisce che le vie delle CaMK e MAPK agiscono su vari fattori di trascrizione, alcuni dei quali non sono direttamente coinvolti, ma che insieme attivano l'espressione di neuritina. Un esempio è quello dell'attivazione di c-fos che agisce attivando due fattori di trascrizione CREB e Elk-1. Per c-fos sono importanti entrambe le vie di trascrizione, ma MAPK attiva anche Elk-1. Tuttavia, non è stato ritrovato alcun sito di legame per Elk-1 nella regione di 1.9 Kb della neuritina. Questo suggerisce che probabilmente anche CaMKIV risulta essere coinvolto nell'espressione di neuritina, nonostante non sia stato riscontrato un coinvolgimento diretto; infatti risulta essere importante nella regolazione della trascrizione dipendente dal calcio (Chawla, Hardingham et al. 1998; Ho, Liauw et al. 2000; Impey, Fong et al. 2002) ed è stato osservato un coinvolgimento delle CAMKs nella regolazione di CPG15. Il coinvolgimento delle CAMKs e non di CAMKIV suggerisce che anche altre CAMKs possano essere coinvolte, come nel caso di CAMKII che è presente nelle sinapsi ed è strettamente associata ai recettori VSCCs di tipo L e NMDA (Deisseroth, Bito et al. 1996; Husi, Ward et al. 2000; Dolmetsch, Pajvani et al. 2001). CaMKII potrebbe regolare, indirettamente, la trascrizione di molecole segnale che traslocano nel nucleo (Hook and Means 2001). Un'altra ipotesi è che potrebbero essere coinvolte le isoforme nucleari di

CaMKII (Soderling, Chang et al. 2001). Sembra che l'attivazione di PKA non venga richiesta per mediare la risposta della neuritina all'attività sinaptica. Tuttavia, i livelli basali di PKA potrebbero svolgere un ruolo permissivo nell'espressione dell'attività della neuritina. L'attività di PKA sembra essere richiesta per la traslocazione nucleare dei segnali di MAPK necessari per la trascrizione di CREB (Impey, Obrietan et al. 1998). L'attività basale di PKA potrebbe essere sufficiente per la regolazione di neuritina.

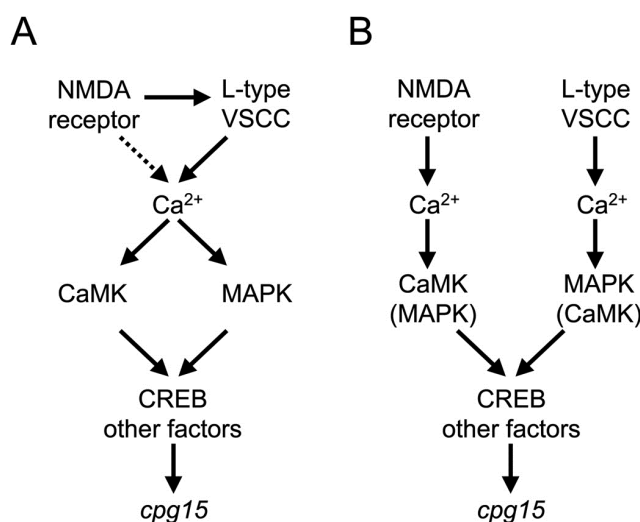


Figura 4 Due modelli alternativi per l'induzione attività dipendente di neuritina.

REGOLAZIONE DELLA NEURITINA MEDIANTE FATTORI DI TRASCRIZIONE

In vari esperimenti si è sottolineata l'importanza di CREB nella regolazione della neuritina durante i processi di plasticità che vedono coinvolta la corteccia nell'adulto (Fujino, Lee et al. 2003). Sembra che CREB regoli direttamente neuritina legandosi ai tre siti CRE posti nella regione del promotore di neuritina. Tuttavia questi siti presentano sia effetti positivi che negativi nella regolazione della neuritina; il legame di CREB alla regione di CRE di 0.04 kb presenta effetti positivi. Diverso è il caso del legame di CREM con la regione di 1.56 kb che porta ad effetti negativi, in quanto le isoforme di CREM sono note essere degli inibitori della trascrizione mediata da CREB (Foulkes, Borrelli et al. 1991). Si pensa che mutazioni nei siti CRE o EGR RE possono essere più significative quando avvengono su più di un sito, così come accade anche per i siti di legame per i fattori di trascrizione. La sequenza della regione promotrice della neuritina e il fatto che questa proteina veda coinvolte diverse vie di segnale delle chinasi, suggerisce che vari fattori di trascrizione, tra cui CREB, regolino l'espressione della neuritina utilizzando diversi siti della regione promotrice.

ATTIVAZIONE DI CPG15 ATTRAVERSO LA VIA DEL cAMP

Da studi condotti da Fujino e collaboratori (Fujino, Lee et al. 2003) risulta che la trascrizione della neuritina è cAMP dipendente; tuttavia, l'attivazione di PKA non è sufficiente a permettere l'espressione di neuritina, ma è necessaria un'attività elettrica mediata dai recettori NMDA e VSCCs di tipo L. L'attività elettrica spontanea risulta in una attivazione modesta di MAPK o CaMK, vie che potrebbero convergere con quella di PKA per permettere l'espressione di neuritina. La sua attivazione indotta da cAMP suggerisce che la neuritina possa essere attivata non solo dalla stimolazione sinaptica, ma anche da segnali extracellulari quali: neurotrasmettitori, ormoni, fattori di crescita che agiscono attivando recettori accoppiati all'adenilato ciclasi (Fujino, Lee et al. 2003).

3.4.3 NEURITOGENESI E CRESCITA DENDRITICA

Una delle funzioni attribuite a questa proteina è la neuritogenesi; infatti cellule esprimenti neuritina presentano differenze sia nel soma che nei lamellipodi dei neuriti; in particolare, risultano avere dei corpi cellulari ben differenziati e delle ramificazioni più sottili e definite (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997).

Lo sviluppo cerebrale è caratterizzato da un periodo di crescita delle ramificazioni assionali e dei dendriti oltre che dalla sinaptogenesi. Durante questo periodo vi è una stretta relazione tra la formazione della morfologia neuronale e la formazione delle connessioni sinaptiche. Un'ipotesi nella formazione delle strutture pre- e post-sinaptiche e delle connessioni è che le nuove ramificazioni degli assoni e dei dendriti formano delle sinapsi solo dove vengono espressi recettori NMDA. Quando le sinapsi maturano richiedono recettori AMPA che vanno a stimolare le ramificazioni sui cui le sinapsi si sono collegate. A questo punto le ramificazioni stabilizzate sono in grado di collegarsi a nuove ramificazioni, formando sinapsi esprimenti solo recettori NMDA e che verranno poi, a loro volta, stabilizzate dai recettori AMPA o vengono retratte (Cantalops, Haas et al. 2000).

Una delle funzioni attribuite alla neuritina è quella della crescita e arborizzazione dendritica. Infatti, è stato osservato che sia in colture di cellule tettali della retina di xenopus che in colture ippocampali di ratto, la sovra-espressione della neuritina porta ad un aumento della lunghezza e del numero di tutte le ramificazioni dendritiche; questo avviene attraverso la stessa sequenza di eventi vista in precedenza: iniziazione delle ramificazioni, formazione delle sinapsi, maturazione delle sinapsi e stabilizzazione delle ramificazioni (Nedivi, Wu et al. 1998; Cantalops, Haas et al. 2000). L'aumento della crescita delle ramificazioni degli assoni

delle cellule della retina risulta essere accompagnato dalla diminuzione delle ramificazioni che si ritraggono, per cui, probabilmente il meccanismo attraverso cui avviene questo fenomeno è quello della stabilizzazione delle ramificazioni appena formate assieme all'aumento del numero di sinapsi mature. Per cui, l'espressione di neuritina nelle cellule tettali aumenta la crescita delle arborizzazioni degli assoni e la formazione di sinapsi retino-tettali, il tutto con un meccanismo "*non-cell-autonomous*". Sono stati suggeriti tre meccanismi attraverso cui la neuritina potrebbe svolgere questa funzione:

- potrebbe agire stabilizzando le ramificazioni assonali a livello della retina, mentre i cambiamenti nella morfologia e nella fisiologia delle sinapsi potrebbero avvenire in un secondo momento per aumentare la stabilità degli assoni presinaptici.
- potrebbe indurre maturazione dei neuroni vicini che, a loro volta, attraverso un meccanismo di feedback agirebbero sugli assoni presinaptici aumentando la stabilità delle ramificazioni, permettendone quindi la crescita. La maturazione indotta da neuritina causerebbe una elaborazione complessa dei dendriti da parte delle cellule tettali, aggiungendo recettori AMPA alle sinapsi. Questa ipotesi è supportata dagli esperimenti condotti da Cantalops e collaboratori (Cantalops, Haas et al. 2000), secondo cui l'abilità della neuritina di aumentare il rapporto AMPA/NMDA in presenza di APV suggerisce che essa potrebbe avere un effetto diretto sui dendriti, ma indipendente dall'attivazione dei recettori NMDA indotta dall'attività sinaptica. Inoltre, i cambiamenti nel rapporto AMPA/NMDA, la riduzione del numero delle sinapsi che si ritraggono e l'aumento nella frequenza mEPSC, sono tutti correlati ad un'azione a livello post-sinaptico della neuritina. A livello pre-sinaptico la neuritina potrebbe causare un aumento di induzione di segnale che si tradurrebbe in un aumento dell'ampiezza della corrente mediata sia dai recettori AMPA che NMDA e in un aumento dell'ampiezza di mEPSC di AMPA.
- potrebbe interagire in modo indipendente sia con le cellule della retina che con quelle tettali.

La neuritina perciò agisce sia promuovendo la maturazione sinaptica che mantenendo le sinapsi neo-formate (Nedivi, Wu et al. 1998; Corriveau, Shatz et al. 1999; Cantalops, Haas et al. 2000). Diverso è il caso della forma solubile la quale sembra agire riducendo il rapporto AMPA/NMDA, aumentando il numero di neuroni con sinapsi solo NMDA, portando a retrazione sinaptica (con conseguente blocco della normale maturazione delle sinapsi retino-tettali) e inibendo l'arrivo di recettori AMPA nelle sinapsi (Nedivi, Wu et al. 1998; Corriveau, Shatz et al. 1999; Cantalops, Haas et al. 2000). Inoltre, è stato osservato che la crescita

assonale e dendritica è caratterizzata da due fasi: una precoce responsabile di una rapida crescita delle ramificazioni ed una tardiva in cui la crescita rallenta. La fase iniziale si ha quando gli input sinaptici di tipo glutammatergico vengono gestiti dai recettori NMDA. La rapida crescita viene ridotta da antagonisti per i recettori NMDA ed aumentata dalla neuritina (Nedivi, Wu et al. 1998). Il secondo meccanismo attività-dipendente, che richiede CaMKII post sinaptica, normalmente agisce riducendo la crescita delle ramificazioni assionali e dendritiche (Cantalops, Haas et al. 2000). L'espressione post-sinaptica di neuritina aumenta la crescita di assoni complessi, mantenendoli in uno stato dinamico e di crescita veloce caratteristico degli assoni semplici. L'espressione di neuritina in colture di neuroni corticali può essere indotta tramite due vie di segnale: attraverso l'attivazione dei recettori per BDNF e trkB o attraverso la depolarizzazione delle membrane, dei canali calcio dipendenti e di CaMKII (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997).

Questo effetto della neuritina si esplica non solo sui neuroni esprimenti la neuritina, ma anche su quelli posti nelle vicinanze, suggerendo un effetto mediato dalla proteina secreta. Tuttavia perché vi sia un effetto è necessario che vi sia il contatto cellula-cellula o con la cellula esprimente la neuritina o con la glia radiale e questa azione viene svolta solo quando la neuritina è nella sua forma ancorata alla membrana (Nedivi, Wu et al. 1998). L'ancora GPI può permettere alla neuritina di inserirsi nei *rafts* di membrana e di associarsi ad altri componenti di complessi segnale. Perciò, vista la capacità di mediare in modo bi-direzionale il segnale delle proteine aventi ancora GPI, la neuritina potrebbe coordinare la crescita assonale e dendritica e la maturazione sinaptica in questo modo. Molte delle proteine GPI che agiscono nella crescita assonale, come nel caso delle semaforine, fas-ciclina I, contactina, TAG1, NCAM, la caderina T e l'efrina A5 (Cantalops, Haas et al. 2000), svolgono una funzione anche nella plasticità sinaptica; ciò suggerisce che le proteine che tradizionalmente sono considerate coinvolte nella guida assonale, possono avere un ruolo addizionale nella formazione dei circuiti e nella plasticità.

3.4.4 INIBIZIONE DELL'APOPTOSI

Durante lo sviluppo, nei mammiferi, la corteccia subisce un elevato aumento di dimensioni, ciò è principalmente dovuto ad un aumento del numero delle cellule presenti. All'inizio della neurogenesi corticale le cellule sono confinate a livello della zona ventricolare, anche una minima modifica di queste cellule progenitrici porta ad evidenti modifiche nel numero di neuroni finali (Rakic 1995). Uno dei meccanismi che potrebbero

essere alla base dei cambiamenti morfologici del cervello in sviluppo potrebbe essere l'apoptosi (Kuan, Flavell et al. 2000). Infatti, è stato osservato che la caspasi 3, enzima chiave nell'apoptosi, viene espressa ad elevati livelli nel cervello di topo, intorno a E12, quando le cellule che muoiono sono prevalentemente presenti a livello delle zone proliferative della corteccia (Blaschke, Staley et al. 1996; Thomaidou, Mione et al. 1997). Per questi motivi Putz e collaboratori (Putz, Harwell et al. 2005) hanno indagato se questa proteina potesse avere una funzione anti-apoptotica. Innanzi tutto hanno osservato che la neuritina è capace d'impedire l'apoptosi dei neuroni corticali attraverso l'inibizione dell'attivazione della caspasi 3. Infatti, la riduzione dei livelli di neuritina porta ad un aumento dell'apoptosi dei progenitori corticali e ad una riduzione delle dimensioni della corteccia, mentre la sua sovra-espressione risulta nella diminuzione dei progenitori in apoptosi e nell'espansione della corteccia. In vari studi Bax, Bcl-XL (Bcl2/1), Apaf1, Casp9 e Casp3 sono stati identificati come elementi chiave nell'apoptosi neuronale che avviene durante lo sviluppo embrionale (Putz, Harwell et al. 2005). Queste proteine agiscono in una cascata che induce l'apoptosi, ovvero: il legame di Apaf1 alla caspasi 9 attiva la caspasi3 e Bcl-XL che agisce a monte con un effetto anti-apoptotico su Apf1 che, a sua volta, può essere bloccato da Bax (Roth, Kuan et al. 2000). Bax e Bcl-XL sono essenziali solo nei neuroni post-mitotici, mentre la caspasi 3 è unica nel suo effetto sull'apoptosi nelle cellule progenitrici neuronali (Roth, Kuan et al. 2000). In topi che non presentano la caspasi 3 si ha iperplasia ed una regione neocorticale di maggiori dimensioni (Kuida, Zheng et al. 1996). Anche nel caso della sovra-espressione di neuritina si ha un fenotipo simile suggerendo che elevati livelli di neuritina agiscono espandendo la linea progenitrice, probabilmente riducendo l'apoptosi, ma senza alterare il numero di cellule in mitosi o in uscita dal ciclo cellulare. La neuritina funziona da fattore anti-apoptotico sia per i neuroni corticali che per i progenitori corticali. Studi condotti in vitro suggeriscono che questo effetto possa essere mediato da BDNF e NT-3, anche se essi non influiscono direttamente sull'apoptosi (Putz, Harwell et al. 2005). Perciò la neuritina risulta essere una delle poche molecole essenziali per la sopravvivenza dei progenitori corticali indifferenziati. La neuritina sembra essere specifica per un determinato tipo di progenitori durante lo sviluppo cerebrale e sembra essere richiesto solo in questa popolazione, andando a regolare la dimensione e la forma del cervello durante la morfogenesi del prosencefalo. Tuttavia, è stato osservato che la neuritina viene espressa anche in alcuni neuroni differenziati durante la scelta dei bersagli e la formazione dei circuiti neuronali, facendo pensare che essa possa agire in modo simile alle neurotrofine come fattore di sopravvivenza dei neuroni che si sono differenziati.

3.4.5 CRESCITA ASSONALE DEI MOTONEURONI, SINAPTOGENESI NEUROMUSCOLARE E RIGENERAZIONE DEI MOTONEURONI

Lo sviluppo delle ramificazioni assonali è un fenomeno che avviene dopo che l'assone raggiunge la sua destinazione. Ciò comporta una serie di eventi quali: riconoscimento del sito di destinazione, formazione delle ramificazioni e successiva formazione delle sinapsi, oltre a rimodellamento delle sinapsi pre-esistenti ed eventuale retrazione di ramificazioni. Ad esempio, nello sviluppo delle arborizzazioni assonali dei motoneuroni si ha una prima fase in cui si formano molte ramificazioni, seguita da formazione di sinapsi e retrazione di alcune arborizzazioni. Uno dei primi siti in cui viene espressa la neuritina è la regione ventrale della spina dorsale, suggerendo che essa possa svolgere un ruolo nello sviluppo degli assoni dei motoneuroni e nella connessione sinaptica neuromuscolare (Nedivi, Javaherian et al. 2001). Attraverso esperimenti condotti su xenopus (Javaherian and Cline 2005) è stato osservato che la crescita totale assonale dipende dall'equilibrio tra le nuove ramificazioni che si formano, quelle che vengono retratte, rimosse o allungate. La neuritina, sembra svolgere un ruolo principale nello spostamento di questo equilibrio verso la formazione di nuove ramificazioni tramite aumento di arborizzazioni, di sinaptogenesi e riduzione della retrazione delle ramificazioni preformate. Vista questa funzione, è stato suggerito che questa proteina a livello dei motoneuroni possa essere coinvolta nella rigenerazione delle connessioni dopo danno a livello della midollo spinale. Infatti, studi condotti da Di Giovanni e collaboratori (Di Giovanni, Faden et al. 2005), hanno ulteriormente evidenziato questa sua caratteristica; inoltre, suggeriscono che vi sia una comunicazione tra varie proteine in grado di riparare il danno. Infatti, secondo questo studio la neuritina agirebbe tramite induzione dello sviluppo dei neuriti, creando una plasticità sinaptica, dendritica ed assonale, e questa sua funzione sembrerebbe essere aiutata dalla attractina che interagendo con MAP1a permette i riarrangiamenti citoscheletrici necessari per l'estensione dei neuriti. In un recente studio (Akten, Kye et al. 2011) è stata osservata una correlazione tra l'espressione di neuritina e la sclerosi muscolare atrofica (SMA). Infatti da questo studio emerge che la neuritina è un bersaglio del complesso SMN-HuD (due proteine che risultano essere diminuite nella SMA e causano difetti assonali); infatti la riduzione di SMN comporta una conseguente riduzione di neuritina, mentre la sovra-espressione di quest'ultima permette di risolvere i difetti assonali. In questo studio è stato ipotizzato che questo effetto possa essere dovuto al fatto che la neuritina permette la regolazione dell'estensione e della differenziazione dei terminali assonali.

3.4.6 ANGIOGENESI

L'angiogenesi consiste nella formazione di nuovi vasi che si generano da quelli pre-esistenti, questo fenomeno svolge un ruolo fondamentale in molti processi sia fisiologici che patologici quali: crescita tumorale, artrite reumatoide, ischemia cardiaca e retinopatia diabetica (Pandya, Dhalla et al. 2006). Il processo angiogenico è bilanciato da vari fattori sia pro- che anti-angiogenesi (Hanahan and Folkman 1996). Nel recente lavoro di Han et al. (Han, Qin et al. 2011) la neuritina è stata proposta come fattore angiogenico; infatti, essa induce una proliferazione ancoraggio-indipendente cellulo-specifica. Inoltre, è stato osservato che la neuritina non porta ad un aumento della proliferazione cellulare, anzi porta ad una riduzione della crescita tumorale, in quanto, probabilmente, aumenta la formazione di nuovi vasi che non sono funzionali

3.4.7 RIGENERAZIONE EPATICA

Come precedentemente detto, la neuritina viene espressa anche a livello del fegato, e principalmente dagli epatociti maturi, nello spazio sinusoidale, ovvero nell'area baso-laterale degli epatociti (Kojima, Shiojiri et al. 2005). E' stato osservato che in caso di deficienza epatica la sua espressione viene ridotta, specialmente si è osservata una riduzione ogni volta che gli epatociti entrano nella fase S del ciclo cellulare. Per questo motivo viene considerata come un possibile marker di differenziamento degli epatociti, oltre a far ipotizzare un suo ruolo nella rigenerazione epatica (Kojima, Shiojiri et al. 2005). Questa regolazione avviene solo se viene espresso C/EBP α , in quanto nella regione promotrice della neuritina è presente un sito di legame putativo per C/EBP.

3.5 MODULAZIONE DELLA PROTEINA

3.5.1 STIMOLI LUMINOSI

L'espressione del gene della neuritina viene modulata, a livello della corteccia, anche dalla variazione dell'attività neurale in risposta a stimoli luminosi: l'espressione di neuritina risulta essere ridotta dopo 2 settimane di segregazione al buio, torna normale dopo 4 ore di luce e viene sovra-espressa dopo 24 ore di stimolo luminoso. Inoltre, l'espressione della neuritina risulta essere aumentata nella corteccia piriforme ed entorinale con l'avanzare dell'età da 1 a

14 giorni dopo la nascita, mentre l'espressione neocorticale risulta aumentata tra il 14° e il 21° giorno post-natale per poi diminuire nell'adulto (Nedivi, Fieldust et al. 1996). Altri studi sono stati condotti in ratti, analizzando come varia l'espressione della neuritina nella corteccia visiva (Lee and Nedivi 2002). A questo livello si osserva la comparsa di neuritina solo dopo che gli animali aprono per la prima volta gli occhi, ma risulta essere attività-indipendente, ovvero non sono state osservate variazioni nell'espressione di neuritina dopo periodi di buio. La regolazione dell'espressione della neuritina risulta essere bifasica in varie strutture visive ovvero: una fase precoce in cui risulta essere attività indipendente, in cui non vi è una risposta ai segnali indotti dalla retina e una seconda fase caratterizzata da una regolazione attività-dipendente che insorge piuttosto tardivamente nello sviluppo (Crair, Gillespie et al. 1998; Lee and Nedivi 2002).

3.5.2 NEUROTROFINE

Le neurotrofine svolgono un ruolo fondamentale nella promozione della sopravvivenza neuronale, nel differenziamento, nella funzionalità e nella riparazione. Inoltre, è noto che agiscono nella regolazione della crescita assonale e nella crescita rigenerativa dopo danno (Karamoysoyli, Burnand et al. 2008). Le neurotrofine sono fattori trofici indispensabili per lo sviluppo del sistema nervoso, la competizione tra i diversi fattori trofici determina il numero di neuroni che sopravvivono durante l'innervazione da parte dei bersagli. Tra le principali si annoverano: NGF, BDNF, NT-3, NT-4

NGF

NGF (*nerve growth factor*) è stata una delle prime neurotrofine ad essere identificata e agisce su una ristretta popolazione cellulare. Nel sistema nervoso centrale, NGF promuove la sopravvivenza e la funzionalità dei neuroni colinergici presenti nel prosencefalo basale (Chen, Nishimura et al. 1997).

Anche l'NGF regola l'espressione della neuritina; infatti, studi svolti nel nostro laboratorio hanno indicato che l'NGF aumenta l'espressione della neuritina in cellule PC12, prima che il differenziamento diventi apprezzabile (Cappelletti, Galbiati et al. 2007). Allo stesso tempo la neuritina aumenta l'effetto di differenziamento indotto dall'NGF permettendo la formazione di neuriti più lunghi. Tuttavia, questo effetto non sembra essere mediato dai recettori generalmente utilizzati dalle neurotrofine: TrkA ed EGF, ma sembra essere regolata dalla via di segnale indotta dall'ossido nitrico (NO). La regione promotrice della neuritina contiene le

sequenze di legame per CREB, AP-1, TRE e due sequenze che riconoscono alla famiglia degli *early growth response genes* (Karamoysoyli, Burnand et al. 2008). Questi fattori di trascrizione sembrano essere implicati nella crescita neuritica indotta da NGF. La stimolazione di TrKA attraverso NGF porta all'attivazione di diverse vie di segnale intracellulari tra cui Ras-Raf-MEK-ERK and P1-3K-AKT. L'inibizione di MEK e PI-3K inibisce la crescita neuritica e, allo stesso tempo, previene la sovra-regolazione della neuritina indotta da NGF (Karamoysoyli, Burnand et al. 2008). Infatti, attraverso studi condotti da karamoysoyli e colleghi (Karamoysoyli, Burnand et al. 2008) è stato osservato che la neuritina potrebbe essere sovra-regolata tramite due vie: ERK/AKT o da un fattore non noto che viene rilasciato nel medium di coltura, probabilmente, dai neuroni stessi che permette il mantenimento costitutivo della neuritina attraverso l'attivazione di ERK.

BDNF e NT-3

BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) e NT-3 (*neurotrophin-3*) sono altamente espressi nelle aree ippocampali e corticali e sono stati collegati alla sopravvivenza e funzionalità di vari tipi cellulari.

L'espressione della neuritina è regolata dall'attività neuronale; in modo particolare è stato dimostrato che si ha un aumento di mRNA dopo trattamento con BDNF o NT-3 per un periodo di tempo limitato pari a 2-4 h, per poi tornare ai livelli normali. L'aumento di neuritina risulta essere prolungato, invece, dopo trattamento con KCl con un massimo di espressione dopo 6 h dall'induzione e viene mantenuto costante per 10 h (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997).

BDNF promuove la formazione degli assoni retino-tettali in *xenopus* e influisce sull'arborizzazione dendritica e la connettività sinaptica in modo attività-dipendente (Cantalops, Haas et al. 2000). Perciò, l'effetto di promozione della crescita delle ramificazioni dendritiche esercitato da BDNF, potrebbe essere mediato, almeno in parte, dalla neuritina (Cantalops, Haas et al. 2000). Questo dato è confermato anche dallo studio condotto da Cantalops e Cline (Cantalops and Cline 2008) in cui è stato osservato che i livelli di neuritina sulla superficie cellulare vengono aumentati allo stesso tempo con l'attività assonale e la trasmissione sinaptica. Infatti BDNF può indurre depolarizzazione nei coni di crescita assonale e indurre un entrata di calcio attraverso l'attivazione dei canali TRP (*transient receptor potential*) (Wang, Mercier et al. 2005).

3.5.3 ANDROGENI

Gli androgeni sono degli ormoni neuroattivi in grado di regolare eventi cellulari e molecolari in varie funzioni cerebrali, quali: comportamenti sessuali e aggressività, memoria, capacità cognitive, umore (Marron, Guerini et al. 2005). Molte di queste funzioni vengono regolate dal recettore per gli androgeni (AR), un fattore di trascrizione che appartiene alla famiglia dei recettori steroidei nucleari (Lamb, Weigel et al. 2001). Questo recettore viene espresso in diverse popolazioni neuronali del sistema nervoso centrale, ma in modo particolare a livello del corno anteriore del midollo spinale e nei neuroni sensoriali dei gangli dorsali (Poletti 2004; Marron, Guerini et al. 2005). Soprattutto a livello della spina dorsale è stato osservato che l'AR è altamente espresso a livello dei motoneuroni somatici collocati nei nuclei del trigemino, facciale, ambiguo e ipoglosso (Matsumoto et al. 1988; Freeman et al. 1995; Drengler et al. 1996; Lumbroso et al. 1996; Matsumoto 1997; Larkowski et al. 2000; Yu and McGinnis 2001). La sua attivazione in queste strutture risulta svolgere un ruolo importante nella rigenerazione dei nervi dopo danno, aumentando l'allungamento degli assoni dei nervi sciatico, facciale e ipoglosso, verso le loro destinazioni (Yu 1989; Kujawa et al. 1993). Inoltre, la mancata stimolazione androgenica causa la riduzione del soma e della lunghezza dei dendriti dei motoneuroni, così come riduce il numero di sinapsi presenti, mentre la successiva terapia androgenica elimina tutti gli effetti osservati (Matsumoto et al. 1988; Goldstein and Sengelaub 1992; Matsumoto 1997; Watson et al. 2001; Jordan et al. 2002). Tutte queste caratteristiche hanno portato allo studio della regolazione androgenica al fine di permettere la riparazione di danni al motoneurone attraverso l'allungamento assonale e la formazione di nuove sinapsi con il bersaglio di destinazione (Marron, Guerini et al. 2005). E' stato ipotizzato un possibile ruolo della neuritina nella regolazione degli effetti indotti dalla stimolazione androgenica, infatti, nell'analisi della regione promotrice della neuritina sono stati osservati sette siti putativi di elementi responsivi agli androgeni, i quali indicano una possibile regolazione diretta dell'espressione della neuritina indotta dagli androgeni. L'ipotesi è stata supportata da studi indicanti che, nella linea cellulare di motoneuroni NSC34, l'attivazione androgenica porta ad un aumento del numero di processi assonali simile a quello osservato dopo sovra-espressione di neuritina, che non si osserva in NSC34 in cui è stato attivato il recettore androgenico, ma silenziata la neuritina. Ciò suggerisce che la neuritina possa effettivamente essere un mediatore nella crescita assonale dei motoneuroni indotta dagli androgeni. Questa risposta androgenica dei motoneuroni è dovuta alla regolazione dei livelli trascrizionali della neuritina indotti dal DHT. Il DHT (5α -dihydrotestosterone) è il prodotto di

conversione del testosterone da parte dell'enzima 5 α -reduttasi (Wilson, Griffin et al. 1993). Il DHT sembra essere presente in rilevante quantità a livello dei motoneuroni ed è in grado di esercitare un effetto molto più elevato sull'attivazione dell'AR; ne è riprova il fatto che il trattamento con finasteride (inibitore della 5 α -reduttasi) blocca gli effetti di allungamento e riparazione neuronale indotte dagli androgeni (Marron, Guerini et al. 2005). Questo gruppo suggerisce che vi possa essere un coinvolgimento della neuritina anche in varie patologie in cui l'AR presenta mutazioni, quali: SBMA e ALS.

3.5.4 IPOSSIA

L'ipossia cellulare è una caratteristica comune di molte patologie umane. Nei tumori solidi l'equilibrio tra proliferazione cellulare e richiesta di ossigeno da parte delle cellule risulta essere sbilanciato, causando una diminuzione della pressione parziale dell'ossigeno (Helmlinger, Netti et al. 1997) Nei tessuti tumorali le cellule ipossiche modulano l'espressione di differenti geni per ottenere una migliore perfusione e un aumento della pressione parziale di ossigeno. L'aumento dell'espressione di alcuni geni, indotta dall'ipossia, è sotto il controllo degli HIFs (hypoxia-inducible factors) (Semenza 1998). Tra questi geni si annovera anche la neuritina che viene espressa e viene indotta da ipossia in cellule endoteliali (Le Jan, Le Meur et al. 2006). In questi studi, tramite ibridazione in situ, è stato osservato che l'mRNA della neuritina viene espresso in vari tumori umani tra cui il tumore prostatico, del colon, in cellule di carcinoma renale e in glioblastoma. La neuritina viene espressa sia in cellule epiteliali normali che tumorali e, più debolmente, nei vasi sanguigni di aree del colon e prostata normali e tumorali. Infatti, hanno anche osservato che la neuritina viene sovra-espressa nelle aree perinecrotiche di regioni tumorali di glioblastoma, dove si verifica ipossia (Le Jan, Le Meur et al. 2006).

3.6 PATOLOGIE CHE VEDONO COINVOLTA LA NEURITINA

3.6.1 DIABETE

Nella neuropatia diabetica è stato osservato che vi è una riduzione dei livelli di NGF, e che, in modelli animali o cellulari, la somministrazione di NGF porta ad un miglioramento della patologia (Karamoysoyli, Burnand et al. 2008). Come precedentemente riportato, NGF aumenta l'espressione di neuritina, la quale, a sua volta, permette la crescita neuritica. In un

recente studio è stato osservato che i pazienti che presentano questa patologia mostrano una riduzione delle arborizzazioni delle piccole fibre della cornea, fattore associato alla fase iniziale della neuropatia (Karamoysoyli, Burnand et al. 2008). Si potrebbe ipotizzare che questo effetto possa essere dovuto a cambiamenti di espressione della neuritina.

3.6.2 SCHIZOFRENIA

Mutazioni nel braccio corto del cromosoma 6 sono state reputate essere la causa di diversi tipi di schizofrenia (SZ) (Lewis, Levinson et al. 2003). I pazienti che presentano schizofrenia sono stati suddivisi in due sottotipi: il sottotipo che presenta deficit cognitivo (CD) e un sottotipo che presenta un deficit cognitivo meno severo (CS: *cognitively spared*). Il sottotipo CD presenta deficit nella regione cromosomica in cui viene localizzata anche la neuritina: 6p24-25 (Hallmayer, Kalaydjieva et al. 2005). Per questo motivo Chandler e collaboratori hanno indagato se vi fosse una correlazione tra questa patologia e la neuritina (Chandler, Dragovic et al. 2010). Anche se, in questo studio, non è stato rilevato un effetto diretto di polimorfismi della neuritina verso la sensibilità a contrarre la patologia, la neuritina sembra avere un effetto sull'intelligenza fluida. Infatti, è stato osservato che polimorfismi della neuritina vanno ad influenzare l'IQ dei pazienti schizofrenici. Il fatto che vi sia un effetto importante da parte della neuritina sulla capacità di astrazione e di ragionamento induttivo è particolarmente interessante nel contesto della relazione che intercorre tra l'intelligenza cristallizzata, quella fluida e il ruolo dell'influenza ambientale sullo sviluppo cognitivo. Tuttavia è stato osservato che entrambi i componenti dell'intelligenza generale sono sotto l'influenza genetica, l'intelligenza fluida è strettamente legata ad un'interazione dinamica con l'ambiente circostante fin dalle prime fasi dello sviluppo (Chandler, Dragovic et al. 2010). Sembra che la neuritina entri in gioco proprio su questo tipo d'interazione; infatti, è una proteina attività-dipendente, regolata da segnali sensoriali e da fattori neurotrofici (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997; Lee and Nedivi 2002; Fujino, Wu et al. 2008). La relazione tra l'espressione della neuritina, le abilità cognitive e i ritmi circadiani (Chandler, Dragovic et al. 2010) è in accordo con il fatto che la neuritina venga regolata dagli stimoli luminosi (Lee and Nedivi 2002) e dalla sua sovra-espressione nel cervelletto in periodi d'insonnia (Chandler, Dragovic et al. 2010). Mutazioni nell'allele considerato di rischio rs1475157 sono considerate una causa dell'incapacità di astrazione e del ridotto IQ osservato nei pazienti schizofrenici, probabilmente a causa della conseguente distruzione del sito di legame per E4BP4, un

soppressore della trascrizione correlato con il ritmo circadiano (Chandler, Dragovic et al. 2010).

3.6.3 ISCHEMIA

L'ischemia, che generalmente è causata da arresto cardiaco o da occlusione delle arterie, è una patologia che colpisce un numero di persone molto alto causando danni cerebrali debilitanti. Diverse sono le proteine che sono coinvolte nella neuritogenesi dopo danno ischemico quali: EGF (*epithelial growth factor*), HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*), FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*), SCF (*stem cell factor*), EPO (*erythropoietin*) e iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) (Han, Chen et al. 2007)). Come precedentemente riportato, la neuritina può agire inducendo la riparazione neuronale dopo danno o nella regolazione dell'apoptosi durante le prime fasi embrionali di sviluppo, per questo motivo Han e collaboratori (Han, Chen et al. 2007) hanno indagato se queste azioni della neuritina si esplicano anche dopo danno ischemico. Questo gruppo ha osservato che, in topi modello per l'ischemia globale transiente (TGI), vi è, a livello ippocampale, una sovra-regolazione della neuritina, dato in accordo con i precedenti risultati ottenuti da Liu e colleghi (Liu, Solway et al. 1998). In questo studio è stato osservato un picco di proliferazione cellulare a livello del giro dentato dopo attacco epilettico o TGI. Ciò suggerisce che la neuritina possa agire nel recupero dopo danno, idea ulteriormente supportata dal fatto che essa varia al variare delle cellule positive a BrdU, nella stessa area colpita da TGI, indicando una contemporanea regolazione di livelli di neuritina e proliferazione cellulare. Tuttavia, questi risultati sembrano in contrasto con la funzione precedentemente descritta come *immediate-early gene* (IEG) o come bersaglio della via di segnale che induce la plasticità sinaptica descritta per le culture primarie di neuroni corticali (Fujino, Lee et al. 2003). Uno dei meccanismi suggeriti attraverso cui la neuritina agirebbe come promotore della proliferazione cellulare al fine di riparare il danno è attraverso la via di CREB. Infatti, la via di CREB viene attivata dal segnale di cAMP-CREB che induce un aumento di cellule positive a BrdU (Fujino, Lee et al. 2003). Quest'azione della neuritina probabilmente è correlata alla sua capacità di indurre i neuroni danneggiati a ristabilire nuove connessioni e sviluppare nuove ramificazioni. Inoltre, un ruolo importante nella regolazione della rigenerazione sembra essere svolto anche dalla proteina nella sua forma solubile, in quanto in questo stato agisce diminuendo le connessioni neurone-neurone permettendo lo sviluppo di neuriti più corti con più ramificazioni per ciascun dendrite. Per cui il fenomeno di riparazione del danno neuronale

consiste in una cooperazione tra la forma solubile e quella ancorata alla membrana al fine di promuovere la neuritogenesi, fenomeno già descritto da Putz e colleghi. (Putz, Harwell et al. 2005).

Un'altra caratteristica di questa patologia è che causa una eccitotossicità da glutammato andando ad sovra-attivare i recettori NMDA (Chen, Lu et al. 2008). Il recettore NMDA (NMDAR) è costituito da due subunità: NR2A e NR2B. quest'ultima sembra essere responsabile degli effetti neurotossici da danno ischemico o epilettico, mentre la prima subunità sembra avere effetti neuroprotettivi . E' stato osservato che NR2A induce l'attivazione di CREB a livello ippocampale dopo danno ischemico, facendo pensare ad un possibile ruolo della neuritina nella regolazione degli effetti di recupero da danno ischemico tramite via di attivazione di CREB (come precedentemente suggerito da Han et al.). Quest'azione è limitata alla subunità NR2A, per cui l'alternanza tra questa subunità e NR2B, tramite attivazione di CREB, potrebbero regolare la proliferazione o morte cellulare (Chen, Lu et al. 2008).

3.6.4 TUMORI

La neuritina è stata correlata con un particolare tipo di tumore, il sarcoma di Kaposi (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*, KSHV), un tumore mesenchimale caratterizzato da anormali vasi sanguigni e linfatici (Raggio, Ruhl et al. 2005). Nello studio condotto da Raggio et al. (2005) sono stati analizzati i possibili geni coinvolti nella trasformazione cellulare indotta da KSHV. Alcuni di questi richiedono la via di segnale di c-Kit. Tramite microarrays è stata identificata anche la neuritina come gene sovra regolato in cellule infettate da KSHV e hanno notato che il silenziamento della neuritina porta all'inibizione del cambiamento morfologico tumorale. Inoltre, è stato osservato che la neuritina è coinvolta nella sovra-regolazione di cKit (Chen, Lu et al. 2008). Questo stesso gruppo ha condotto esperimenti anche sulla linea cellulare di NIH-3T3, osservando che la neuritina induce cambiamenti morfologici anche in questa linea cellulare, senza aumentarne la proliferazione.

4) *SCOPO DELLA TESI*

Il laboratorio in cui è stato svolto questo lavoro di tesi è da sempre interessato alla funzionalità dei neuroni GnRH; inoltre recentemente ha sviluppato un filone di ricerca focalizzato sullo studio della neuritina. Quest'ultima è una proteina coinvolta nello sviluppo e nell'allungamento dei neuriti, e nella corretta formazione delle sinapsi. Inoltre, la sua espressione genica risulta essere sotto controllo degli steroidi.

Questo studio è nato da una analisi Microarray che ha indicato la neuritina quale uno dei geni maggiormente espressi dalle cellule GN-11. Questa linea cellulare di neuroni GnRH secernenti viene utilizzata come modello per lo studio dello sviluppo dei neuroni GnRH e soprattutto per lo studio del peculiare processo di migrazione di questi neuroni che come noto durante lo sviluppo embrionale migrano dal placode olfattorio all'ipotalamo. A seguito di questa indicazione preliminare abbiamo quindi ipotizzato che la neuritina possa essere coinvolta anche nei processi di migrazione cellulare.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quindi stato quello di supportare l'ipotesi iniziale utilizzando diversi approcci sperimentali sia in vitro che in vivo e cercando un possibile meccanismo d'azione della neuritina. In particolare, abbiamo analizzato la migrazione delle cellule GN-11, dopo modulazione dei livelli di neuritina, mediante saggio di Boyden, test di wound healing e videomicroscopia time-lapse. La migrazione in vivo, dopo sovra-espressione di neuritina, è stata analizzata in colture dissociate di eminenza ganglionica e in sezioni cerebrali elettroporate. Infine, poiché per la migrazione neuronale risulta essere di enorme importanza il riarrangiamento del citoscheletro abbiamo analizzato cambiamenti morfologici delle cellule e livelli di modificazioni post-traduzionali della α -tubulina.

Gli studi effettuati ci hanno portato a dimostrare che:

- a. la modulazione dei livelli di neuritina correla con variazioni della capacità migratoria delle cellule GN-11 e di neuroni dissociati della eminenza ganglionica;
- b. l'azione pro-migratoria della neuritina è evidenziabile anche in vivo sugli interneuroni della eminenza ganglionica;
- c. la neuritina induce modificazioni morfologiche correlabili alla attività migratoria nelle cellule GN-11;
- d. i livelli di neuritina correlano con variazioni delle modificazioni post-traduzionali della α -tubulina.

5) MATERIALI E METODI

5.1 GLI ANIMALI

Tutte le procedure che hanno coinvolto gli animali sono state condotte rispettando le linee guida istituzionali e le leggi nazionali (D.L. no. 116, G.U. suppl. 40, Feb. 18, 1992, Circolare No.8, G.U., 14 luglio 1994) e internazionali (EEC Council Directive 86/609, OJ L 358, 1 DEC.12, 1987 e Commission Recommendation “C 2007–2525”). Sono state utilizzate ratte femmine gravide albine Sprague Dawley. L’età degli embrioni utilizzati è stata calcolata a partire dal giorno di controllo del tappo vaginale, considerando il giorno in cui è stato effettuato il controllo come giorno embrionale 1 (E1). Le ratte gravide sono state sacrificate per dislocazione cervicale, gli embrioni sono stati dissezionati in liquido cerebrospinale artificiale freddo. I cervelli sono stati rimossi e dissezionati o inclusi in agarosio a basso punto di fusione.

5.1.1 ESTRAZIONE DEI TESSUTI CEREBRALI

Dopo aver estratto i cervelli di ratti E15, E16, E17, E18, di ciascun embrione sono stati prelevati: i bulbi olfattori, i nasi, gli ipotalami, le cortecce e le eminenze ganglioniche. Le parti così estratte sono state congelate velocemente su ghiaccio secco e conservate a -80°C fino all’estrazione dell’RNA.

5.1.2 COLTURE PRIMARIE

Dai cervelli di embrioni di ratti E16 sono state estratte l’eminenze ganglioniche e microdissezionate: poste in una soluzione costituita dallo 0,05% di tripsina e 100 g/ml di DNase1 in *Neuro Basal Medium* (NBM). Dopo incubazione al 5% di CO₂ e a 37°C per 15 minuti, è stato effettuato un lavaggio in NBM al 10% di siero bovino fetale (FBS, Invitrogen-Gibco) e dissociate con una pipetta Pasteur. La sospensione cellulare è stata centrifugata per 3 minuti a 3000 rpm, il pellet risospeso in NBM contenente 2 mM/L- glutamina, penicillina/streptomina e B27 (diluito 1:50) (Invitrogen). Le cellule dissociate sono state seminate in multiwell da 6 pozzetti ad una densità di 2×10^6 cellule/pozzetto, le

piastre sono state precedentemente rivestite con laminina e polilisina (100 g/ml ognuna; Invitrogen).

Le cellule sono state transfettate due giorni dopo la semina, utilizzando la Lipofectamina 2000, in accordo con il protocollo fornito dal produttore (Invitrogen, Paisley, UK). Le colture sono state utilizzate 48h dopo la transfezione per il saggio di migrazione che sfrutta la camera di Boyden.

5.1.3 ELETTROPORAZIONE

Le sezioni di cervello sono state ottenute come descritto da Alifragis e colleghi (Alifragis, Liapi et al. 2004). I cervelli di ratti E16 sono stati inclusi in agarosio a basso punto di fusione (Sigma) e tagliate con uno spessore di 300 μm attraverso l'utilizzo di un vibratomo. Le sezioni coronali mediali sono state poste su filtri di nitrocellulosa (0.45 μm ; Millipore). Le fettine così ottenute sono state elettroporate con circa 60 nl di plasmidi (2 g/l) attraverso microiniezione a pressione (General Valve Picospritzer, Fairfield, NJ) utilizzando micro capillari di vetro (Drummond Scientific, Broomall, PA). Per elettroporare selettivamente l'eminenza ganglionica è stato utilizzato un elettrodo di platino orientato verticalmente verso la sezione (polo negativo) posta su un elettrodo orizzontale (polo positivo). Gli elettrodi sono stati collegati ad un "dual-pulse isolated stimulator" (Intracel, Herts, UK). I parametri settati sull'elettroporatore (Electro Square Porator, ECM 830; BTX, San Diego, CA) sono i seguenti: 100 Hz, 70 V, pulsazioni lunghe 5 ms, da 3 a 5 pulsazioni ogni 100 ms. Le sezioni sono poi state trasferite in medium di coltura contenente DMEM: F12 (Sigma, St. Louis, MO), 5% fetal bovine serum, 1x N-2, 100 μM L-glutamine, 2.4 g/L D-glucose (Sigma), 5 U/ml penicillina, and 5 mg/ml streptomina e conservate in incubatore al 5% CO_2 a 37°C. 48 ore dopo l'elettroporazione le sezioni sono state fissate in 4% di paraformaldeide in 0.1 M PBS (tampone fosfato, pH 7.4) per un ora e conservate a 4°C, montate su vetrini utilizzando il glycerogel (DAKO) come mezzo montante. Le sezioni sono poi state analizzate a microscopio confocale Leica (Nussloch, Germany) TCS SP1. Le immagini sono state analizzate con il software MetaMorph (Universal Imaging, West Chester, PA) e Adobe Photoshop.

5.2 COLTURE CELLULARI E TRANSFEZIONE

Le linee cellulari utilizzate sono le GN-11 (gentilmente donate da Dr. S. Radovick, Chicago, IL, USA) e le GT1-7 (gentilmente donate da Dr. R.I. Weiner, San Francisco, Ca, USA). Le GN-11 sono neuroni GnRH secernenti derivanti da un tumore, sviluppatosi nel bulbo olfattorio di un topo transgenico per un gene ibrido contenente il promotore del gene umano del GnRH fuso alla sequenza codificante per il large T-antigen del virus SV40 che conferisce alle cellule neuronali la capacità di duplicarsi. Da questo tipo di tumore sono stati ottenuti tre sottoclone: GN10, GN11 ed NLT (Radovick, Wray et al. 1991). Le GT1-7 sono sempre neuroni GnRH secernenti derivanti da un tumore, sviluppatosi a livello dell'ipotalamo di un topo transgenico per un gene ibrido contenente il promotore del gene di ratto del GnRH fuso alla sequenza codificante per l'oncogene large T-antigen del virus SV40. Da questo sono stati ottenuti tre sottoclone: GT1-1, GT1-3 e GT1-7 (Mellon, Windle et al. 1990). Entrambe queste linee cellulari sono state mantenute in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, contenente 4.5 g/L di glucosio (DMEM; Seromed, Biochrom KG, Berlin, Germany) addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS, Invitrogen, San Giuliano Milanese, Italy), 1 mM glutammina, 100 UI/mL penicillina G K-salt, and 100 µg/mL streptomicina solfato e cresciute in piastre da 10 cm.

Per quanto riguarda la sovra-espressione o il silenziamento della neuritina, la linea cellulare delle GN-11 è stata trasfettata con la Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguendo le istruzioni fornite dal produttore; dopo 4-5 ore dalla trasfezione il medium è stato cambiato. L'efficienza di trasfezione è stata stimata conteggiando le cellule che esprimono GFP rispetto alle cellule totali valutate mediante colorazione dei nuclei con DAPI. Per sovra-esprimere la neuritina, il cDNA della neuritina è stato inserito all'interno di un vettore pIRES2-enhanced green fluorescent protein (EGFP) (Clontech Laboratory, Palo Alto, CA, USA); nelle fettine di cervello elettroporate questo plasmide è stato cotrasfettato con il vettore pCAG-DsRed (gentilmente donato da Dr. M. Hoshino, Kyoto University, Kyoto, Japan) ad un rapporto 4:1 in quanto con questa tecnica il segnale del GFP tende a indebolirsi, oltre al fatto che il microscopio confocale utilizzato risulta essere più sensibile alla fluorescenza rossa; per il silenziamento della neuritina i plasmidi shRNA-Nrn1 e scramble shRNA, esperimenti siRNA contro Nrn1, sono stati cotrasfettati con pEGFP-N1 (Clontech Laboratory) in un rapporto 10:1. Il vettore esprime la Nrn-1, il shRNA-Nrn1 e il shRNA-scramble sono stati gentilmente forniti dalla Prof. Elly Nedivi (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA). Una valutazione attraverso l'utilizzo di un microscopio a

fluorescenza in vivo, ha permesso di determinare un'efficienza di trasfezione del 60%. Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di 150.000 cellule/pozzetto. Dopo 24 ore le cellule sono state trasfettate con 2 µg di plasmide e 5 µl di Lipofectamina 2000 per ciascun campione.

5.3 REAL-TIME RT-PCR

Le cellule sono state raccolte dopo 48h di transfezione con guanidina isotiocianato 4M (contenente 25 mM di sodio citrato pH 7.5, 0.5% di sarcosyl e 0.1% 2-mercaptoetanol) e l'RNA totale è stato isolato attraverso estrazione con fenolo-cloroformio, in accordo con la metodica descritta da Chomczynski e Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). La quantizzazione è stata effettuata attraverso lettura dell'assorbanza a 260 nm. Un'aliquota di RNA totale (1 µg) è stata trattata per 15 minuti a temperatura ambiente con 1 U di DNaseI (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Dopo aver inattivato la DNaseI, ciascun campione è stato retrotrascritto utilizzando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (PE Applied Biosystems, Monza, Italy) in accordo con le istruzioni fornite dal produttore in un volume totale di 20 µl. I primers utilizzati per i geni selezionati sono stati disegnati con il software Primer Express (PE Applied Biosystems) e prodotti ed ottenuti da Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Le sequenze dei primer utilizzati sono le seguenti: Nrn1: 5'- CGC GGT GCA AAT AGC TTA CC-3' (forward), 5'-AGA CTG CAT CAC ACT TGC CC-3' (reverse); GAPDH: 5'-CCA GAA CAT CAT CCC TGC AT -3' (forward), 5'-CAG TGA GCT TCC CGT TCA-3' (reverse). L'efficienza di amplificazione di entrambe le coppie di primers è molto vicina al 100%. La real-time PCR è stata effettuata utilizzando ABI Prism 7000 sequence detection system (PE Applied Biosystems) in un volume totale di 25 µl, utilizzando iTaq SYBR Green Supermix (BioRad Laboratories, Segrate, Italy) e 500 nmol di primers. Le condizioni dei cicli della PCR sono state le seguenti: 94°C per 10 min, 40 cicli a 94°C per 15 s e 60°C per 1 min. La analisi della *melting curve* è sempre stata effettuata alla fine del saggio di PCR per controllare la specificità. I risultati sono stati espressi come valori di cicli soglia (Ct) ed utilizzati per la quantificazione relativa dei target attraverso il calcolo dei $\Delta\Delta Ct$. Per escludere potenziali errori dati dalla conversione dei dati attraverso l'equazione $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tutti i valori statistici sono stati ottenuti utilizzando i valori di ΔCt . Ciascun campione è stato analizzato in doppio, in un totale di quattro campioni indipendenti.

5.4 ANALISI DI WESTERN BLOT

Per l'analisi di Western blot le cellule sono state seminate come per gli esperimenti di RT-PCR. Le proteine sono state estratte come descritto da Galbiati e collaboratori (Galbiati, Saredi et al. 2005), in breve: le cellule sono state lavate con PBS freddo, raccolte e centrifugate per ottenere un precipitato che è poi stato sonicato in ghiaccio con tampone di lisi. Quest'ultimo è costituito da: Tris HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, contenente un cocktail di inibitori delle proteasi e l'1% di Nonidet P40. Tutti questi reagenti sono stati ottenuti da Sigma Aldrich. I campioni sono stati centrifugati a 10.000 g per 15 minuti e il soprannatante con le proteine è stato separato e quantizzato tramite il metodo di Bradford. Il lisato cellulare è stato denaturato nel tampone di caricamento, bollito per 3 minuti e analizzato con SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis con gel al 12% in condizioni riducenti. Per il rilevamento della neuritina, i campioni sono stati trasferiti su membrana di nitrocellulosa (BioRad Laboratories), e riconosciuti attraverso l'utilizzo di anticorpi. Per quanto riguarda la neuritina è stato utilizzato il goat polyclonal anti-neuritina (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; 1:500 in TBS-T con il 5% in latte non grasso). Per il rilevamento delle forme modificate della α -tubulina, i campioni di proteine (25 μ g per pozzetto) sono stati trasferiti su membrana in PDVF (Immobilon™-P, Millipore, Billerica, MA), e riconosciuti con i seguenti anticorpi: α -tubulin mouse IgG (clone B-5-1-2, Sigma Aldrich; 1:1000); deTyr-tubulin rabbit IgG (Chemicon, Temecula, CA; 1:1000); Tyr-tubulin mouse IgG (clone TUB-1A2, Sigma Aldrich, 1:1000); Ac-tubulin mouse IgG (clone 6-11B-1, Sigma Aldrich, 1:1000). Gli *immunoblots* sono stati riconosciuti a temperatura ambiente con gli adeguati anticorpi secondary HRP coniugati (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; diluizione 1:5000), e rilevati con enhanced chemiluminescence detection kit reagents (ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Tutte le quantizzazioni sono state normalizzate per le proteine totali rilevate con colorante di Coomassie Blue, o per i livelli di α -tubulina. Le lastre ottenute sono state scannerizzate e analizzate con il software Image J.

5.5 SAGGIO DI CHEMOMIGRAZIONE ATTRAVERSO L'UTILIZZO DELLA CAMERA DI BOYDEN

Il saggio di chemomigrazione è stato effettuato utilizzando una camera di Boyden costituita da 48 pozzetti come descritto da Cariboni e collaboratori (Cariboni, Rakic et al.

2005). Dopo 48 h di trasfezione le cellule sono state risospese in medium senza siero (DMEM per le GN-11 e Neuro basal medium per le primarie) ad una concentrazione di 50.000 cellule/50µl per le GN-11 ed alla concentrazione di 80.000 cellule/50µl per le colture primarie e piastrate nei pozzetti presenti nel supporto superiore della camera. Questi pozzetti sono divisi da quelli inferiori da una membrana di policarbonato senza polivinilpirrolidone con pori di 8 µm, precedentemente ricoperta con gelatina (0.2 mg/ml in PBS) per le GN-11 e con laminina e polilisina per le colture primarie. Come chemoattrattore è stato utilizzato l'FBS (1% per le GN-11 e 10% per le colture primarie) e poste nei pozzetti del supporto inferiore della camera. La camera è stata conservata in incubatore a 37°C per 1 o 2 ore per le GN-11 e 6 o 8 ore per le colture primarie per permettere la migrazione delle cellule attraverso i pori della membrana e la loro adesione nella parte inferiore della membrana. Le cellule migrate sono state fissate in metanolo freddo, colorate utilizzando Diff-Quick stain kit (Biomap, Milan, Italy) e montate su vetrino. Per l'analisi quantitativa, le membrane sono state osservate utilizzando un microscopio Olympus light con un obiettivo 20X. Per ciascun pozzetto sono stati contati tre campi random e calcolate il numero di cellule pozzetto/mm² per ciascuna condizione sperimentale.

5.6 SCRATCH WOUNDING ASSAY

Le cellule sono state staccate dopo 48 ore di trasfezione e riseminate ad una densità di 5×10^5 cellule/ml negli inserti: IBIDI[®] Culture-Inserts (Martinsried, Germany) posti in piastre da 35mm e qui lasciate aderire per tutta notte. Dopo aver rimosso gli inserti, è stato sostituito il medium e analizzata la migrazione cellulare all'interno del setto attraverso acquisizione di immagini in contrasto di fase a diversi tempi con microscopio Axiovert 200 (Zeiss, Oberkochen, Germany) accessorio di photometric CoolSnap CCD camera (Roper Scientific, Trenton, NJ, USA). L'area rimasta libera dalle cellule migranti è stata quantificata considerando tre campi random delle cellule trasfettate e controllo, ciò è stato effettuato per tre esperimenti indipendenti attraverso l'utilizzo del software ImageJ.

5.7 IMMUNOFLUORESCIENZA

Le cellule sono state seminate in piastre con vetrini coprioggetto e transfettate. Dopo 48h di trasfezione i vetrini sono stati fissati con il 4% di paraformaldeide in PBS per 10 minuti,

permeabilizzate con 0.1% Triton-X 100 in PBS a temperatura ambiente e incubati con i seguenti anticorpi (gli stessi utilizzati nel saggio di Western blot): α -tubulin mouse, 1:500; deTyr-tubulin rabbit, 1:100; Tyr-tubulin mouse, 1:100; Ac-tubulin mouse, 1:100; γ -tubulin mouse IgG (clone GTU-88, Sigma Aldrich), 1:1000. Come anticorpi secondari sono stati utilizzati: Alexa FluorTM 568 donkey anti-mouse e Alexa FluorTM 488 goat anti-rabbit (Invitrogen), diluiti 1:1000. I coprivetrini sono stati montati con Mowiol[®] (Calbiochem, San Diego, CA) – DABCO (Sigma Aldrich) ed esaminati con un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) utilizzando l'obiettivo ad olio Plan neofluar 63x/1.25 NA.

5.8 ANALISI MORFOMETRICHE

Le cellule fissate sono state osservate al microscopio in contrasto di fase e sono state registrate diverse immagini di almeno 10 campi random di ciascuna piastra attraverso l'utilizzo di un microscopio Axiovert dotato di una fotocamera AxioCamHR (Zeiss, Oberkochen, Germany) con un ingrandimento 20x. Ciascun parametro morfologico analizzato è stato determinato utilizzando un software in grado di analizzare immagini digitali (Interactive measurement module, Axiovision, Zeiss). Tutte le cellule presenti nell'immagine sono state analizzate, per un totale di almeno 250 cellule per gruppo.

5.9 LIVE CELL IMAGING

Per analizzare la capacità migratoria, i controlli e le cellule transfettate sono state tenute in medium senza siero per 3 ore, dopodiché è stato sostituito con DMEM contenente il 10% di FBS e le colture sono state trasferite nella camera riscaldata a 37°C con CO₂ controllata e fissata al 5% (Okolab, Naples, Italy) che è stata posta sotto microscopio a inversione (Axiovert 200, Carl Zeiss). Sono state acquisite delle immagini ogni 10 minuti per circa 8 ore grazie ad una fotocamera (AxioCam HRM Rev. 2, Carl Zeiss).

5.10 ANALISI DELLA VITALITÀ CELLULARE

Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti ad una densità di 15.000 cellule pozzetto. Dopo 24 ore le cellule sono state transfettate con 0,8 μ g di plasmide e 2 μ l di

Lipofectamina 2000 per ciascun campione ad eccezione di alcuni campioni mantenuti alle condizioni basali. Dopo 48 h di transfezione è stato effettuato il saggio di vitalità cellulare attraverso MTT assay. La soluzione necessaria è stata preparata il giorno stesso dell'utilizzo nel seguente modo: la polvere di MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) (Sigma Aldrich) è stata sciolta in RPMI senza rosso fenolo (Seromed, Biochrom KG, Berlin, Germany) ad una concentrazione di 1,5mg/ml, riscaldata a 37°C e filtrata con filtro con pori da 0,22 µm. Il medium delle piastre è stato sostituito con 300µl di soluzione di MTT, dopo incubazione al 5% di CO₂ e a 37°C per 30 minuti, i sali di formazano dati dalla conversione del composto da parte delle deidrogenasi mitocondriali, insolubili in acqua, sono stati disciolti meccanicamente per mezzo di 500µl di isopropanolo assoluto addizionato di HCl 0,1N. L'assorbanza dei vari pozzetti è stata letta ad una lunghezza d'onda di 570nm.

5.11 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati con ANOVA, usando il test di Tukey per comparazioni multiple. I tests statistici sono stati effettuati mediante il programma di statistica Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA).

6) *RISULTATI*

6.1 DIFFERENTE ESPRESSIONE DI NEURITINA NELLE LINEE CELLULARI GN-11 E GT1-7

Nella parte in vitro di questo elaborato sono state utilizzate due linee cellulari neuronali GnRH secernenti ottenute per tumorigenesi mirata. Le GN-11 derivano da un tumore generatosi a livello del bulbo olfattorio di topo a seguito della transfezione in una cellula embrionale di un gene ibrido costituito dalla regione codificante per l'antigene T SV-40 sotto controllo dalla regione promotrice del gene umano per il GnRH (Radovick, Wray et al. 1991). Le GT1-7 derivano, invece, da un tumore generatosi a livello ipotalamico dopo transfezione di un gene ibrido costituito dalla regione codificante per l'antigene T SV-40 sotto controllo dalla regione promotrice del gene di ratto per il GnRH (Mellon, Windle et al. 1990). Queste due linee cellulari sono caratterizzate da una differente capacità migratoria, motivo per cui in molti lavori vengono utilizzate come modello per lo studio della migrazione neuronale (Maggi, Pimpinelli et al. 2000; Cariboni, Maggi et al. 2007). Le GN-11, essendo cellule del bulbo olfattorio, sito iniziale del percorso migratorio dei neuroni GnRH, presentano un'elevata capacità migratoria; diversamente, le GT1-7, derivando dall'ipotalamo, sito finale della migrazione dei neuroni GnRH, sono neuroni completamente differenziati che hanno perso questa capacità (Pimpinelli, Redaelli et al. 2003). Queste due linee cellulari differiscono anche a livello morfologico: le GN-11 presentano una forma bipolare, tipica delle cellule con una spiccata capacità migratoria, mentre le GT1-7 crescono in raggruppamenti e presentano una forma più ramificata, indice di una maggiore stabilità (Fig.5A). Tramite saggio di Boyden abbiamo confermato la differente capacità migratoria tra queste due linee cellulari, in particolare abbiamo notato che allo stimolo chemotattico dell'FBS (D-MEM all'1% di FBS), per due ore, queste due linee cellulari rispondono diversamente: le GN-11 aumentano la loro attività migratoria, mentre le GT1-7 non sembrano rispondere a questo stimolo (Fig.5B).

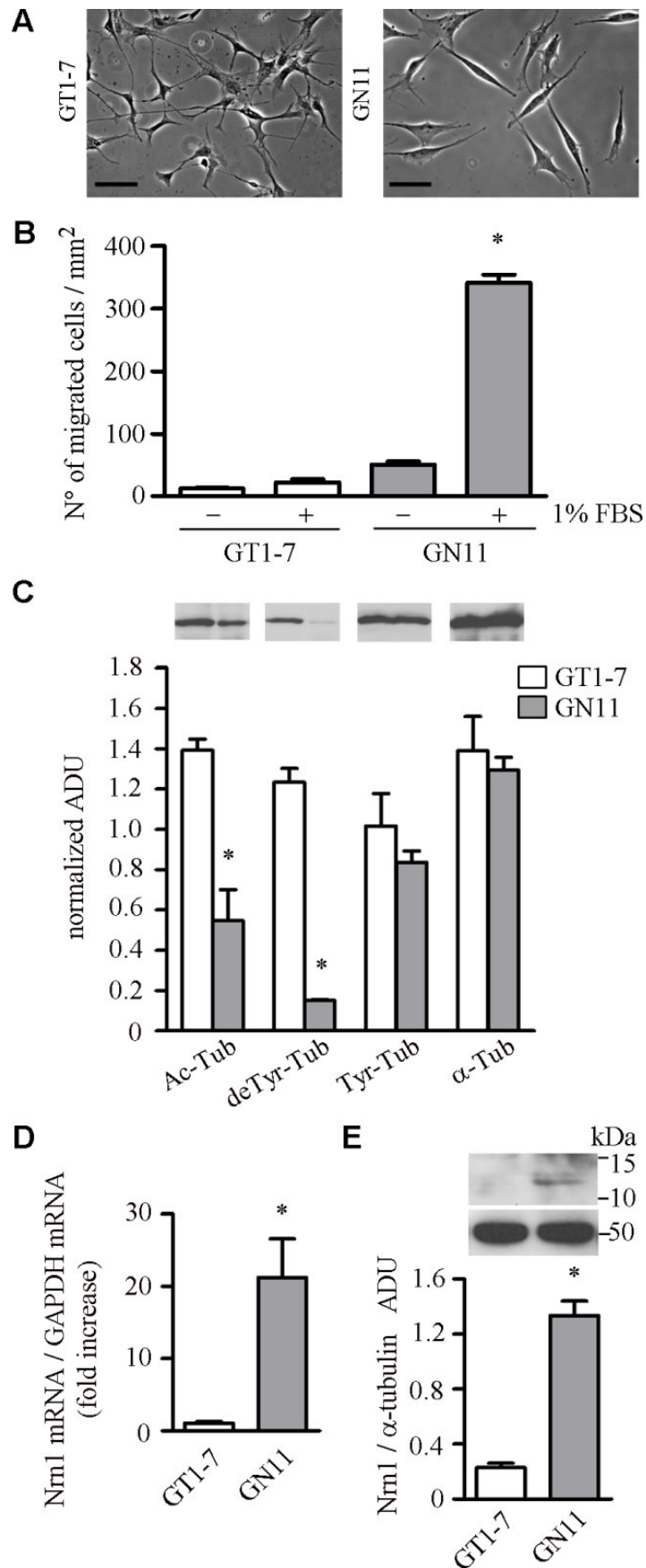


Figura 5 Differente espressione della neuritina nelle cellule GN-11 e GT1-7. A) Differente morfologia delle due linee cellulari (la scale bar indica 100 μ m) B) Differenze nella migrazione cellulare in risposta ad uno stimolo chemotattico C) Variazioni delle modificazioni post-traduzionali della tubulina. D-E) Variazione dell'espressione genica e proteica della neuritina.

Nella migrazione cellulare è fondamentale che avvengano delle modificazioni del citoscheletro. Esse coinvolgono in modo particolare modificazioni della tubulina e della sua polimerizzazione e depolimerizzazione, al fine di regolare la nucleocinesi e la retrazione assonale. Per questo motivo abbiamo analizzato le forme post-traduzionali modificate dell' α -tubulina; infatti, queste forme variano a seconda della dinamicità delle cellule: la forma acetilata e quella detirosinata vengono maggiormente espresse nelle linee cellulari più stabili, mentre la tirosinata è indice di una maggiore dinamicità (Westermann and Weber 2003). Attraverso analisi Western blot abbiamo osservato livelli delle forme stabili nettamente inferiori nelle GN-11 rispetto alle GT1-7 (Fig.5C).

In una analisi microarray (Affymetrix MOE430 2.0) preliminare avevamo precedentemente osservato un'elevata espressione della neuritina nella linea cellulare GN-11 (Tabella 1), abbiamo quindi voluto confermare questo dato e abbiamo ipotizzato che la neuritina possa essere coinvolta nei processi di migrazione cellulare.

GeneChip - Affymetrix MOE430 2.0				
<i>Symbol</i>	<i>Definition</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Unigene ID</i>	<i>Raw</i>
Nrn1	Neuritin-1	68404	Mm.232930	2034,1
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	14433	Mm.31648	5052,2
Nes	Nestin	18008	Mm.33112	218,6

Tabella 1. Livelli di espressione della neuritina in cellule GN-11.

Abbiamo quindi valutato i livelli di espressione genica e proteica della neuritina nelle due linee cellulari, osservando livelli molto più alti nelle cellule GN-11 rispetto alle cellule GT1-7 (Fig.5 D ed E). In particolare, per quanto riguarda l'espressione proteica, si può osservare, in accordo con i risultati ottenuti da Putz e collaboratori (Putz, Harwell et al. 2005), che l'anticorpo anti-neuritina rileva la presenza di due bande tra i 10 e i 15 KDa. La banda a più alto peso molecolare corrisponde alla forma ancorata alla membrana, mentre quella più bassa alla proteina secreta senza la coda GPI. Questi risultati indicano che l'espressione di neuritina è più elevata nei neuroni che hanno maggiore capacità migratoria.

6.2 LA NEURITINA MODULA LA MIGRAZIONE CELLULARE DELLE CELLULE GN-11

La differente capacità migratoria osservata tra GN-11 e GT1-7 e l'elevata differenza di espressione della neuritina ci hanno indotto a pensare che questi due fenomeni possano essere collegati, suggerendo un possibile ruolo della neuritina nella migrazione cellulare. Per dimostrare questa ipotesi abbiamo pensato di modulare i livelli di neuritina nelle cellule GN-11 e di valutare eventuali variazioni della loro attività migratoria. Per questo motivo abbiamo trasfettato in modo transiente le GN-11 sovra-esprimendo la neuritina o silenziando la sua espressione. La sovra-espressione è stata ottenuta tramite l'utilizzo di un vettore plasmidico pIRES contenente la sequenza codificante la neuritina in cui è stata inserita, prima della sequenza GPI, la sequenza Flag. Il silenziamento della neuritina è stato ottenuto tramite trasfezione di uno small hairpin RNA (shRNA) diretto contro l'mRNA della neuritina (ShRNA-Nrn1). I plasmidi utilizzati sono stati gentilmente forniti dalla Prof. Elly Nedivi, M.I.T., Cambridge, MA, USA (Putz, Harwell et al. 2005). L'efficienza di trasfezione, pari a circa il 60%, è stata valutata grazie ad osservazione al microscopio a fluorescenza e conta cellulare (Fig.6).

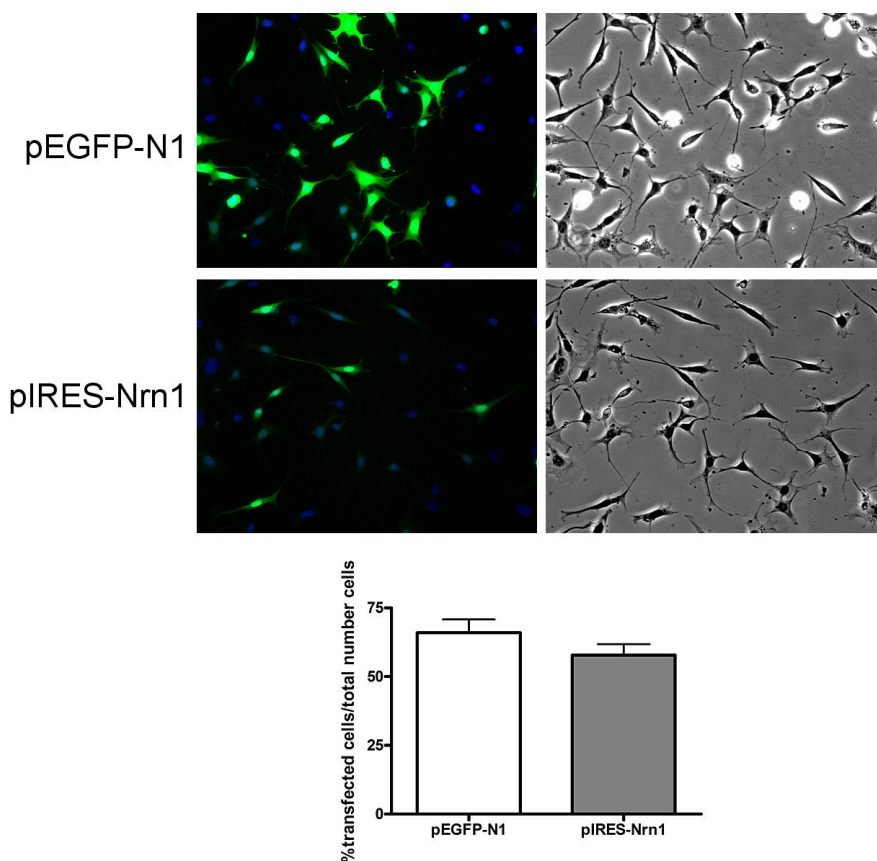


Figura 6 Efficienza di trasfezione della linea cellulare Gn-11

Innanzitutto abbiamo valutato l'effetto del silenziamento della neuritina sulla migrazione neuronale delle cellule GN-11. La figura 7A e B riporta i controlli dell'avvenuto silenziamento della neuritina mediante RT-qPCR e Western blot.

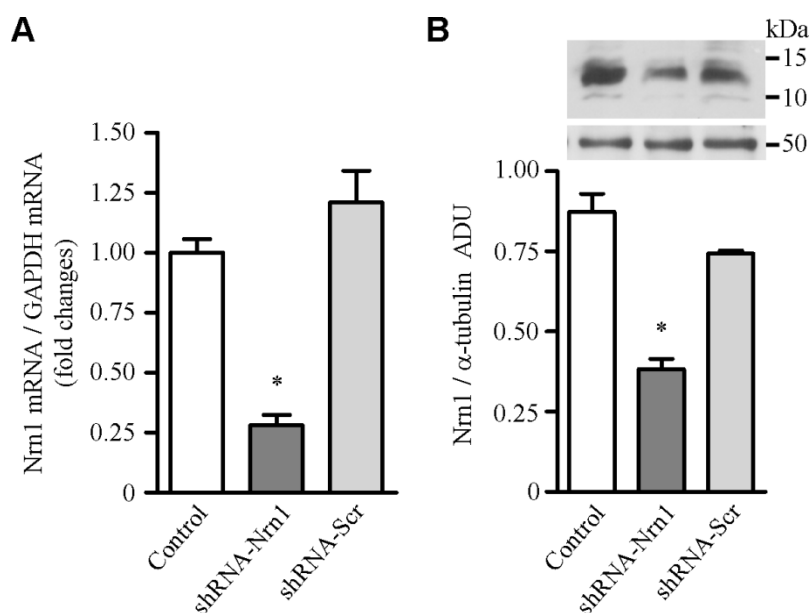


Figura 7 Riduzione dei livelli di neuritina dopo transfezione transiente con Sh-RNA-Nrn1. A) riduzione dell'espressione genica; B) riduzione dell'espressione proteica.

Per valutare la migrazione cellulare abbiamo utilizzato due metodiche: il test della camera di Boyden e il wound healing assay (Fig.8). Il primo è un saggio di microchemotassi che permette di valutare la migrazione cellulare in risposta ad un chemoattrattore (1% di FBS), in un modello tridimensionale. La migrazione è stata valutata mediante conta delle cellule migrate attraverso i pori della membrana di nitrocellulosa dopo un tempo di 2 ore. La conta delle cellule migrate ha dato i seguenti risultati: 70 ± 13 cells/mm² per il gruppo con cellule silenziate per la neuritina, 143 ± 10 cells/mm² e 135 ± 8 cells/mm² per i due gruppi controllo trasfettati rispettivamente con il plasmide fluorescente pEGFP-N1 e con il plasmide shRNA scramble (Fig.8A). Quindi dopo 2 h di migrazione le cellule in cui è stata silenziata la neuritina presentano una diminuzione della migrazione di circa il 50% rispetto ai controlli.

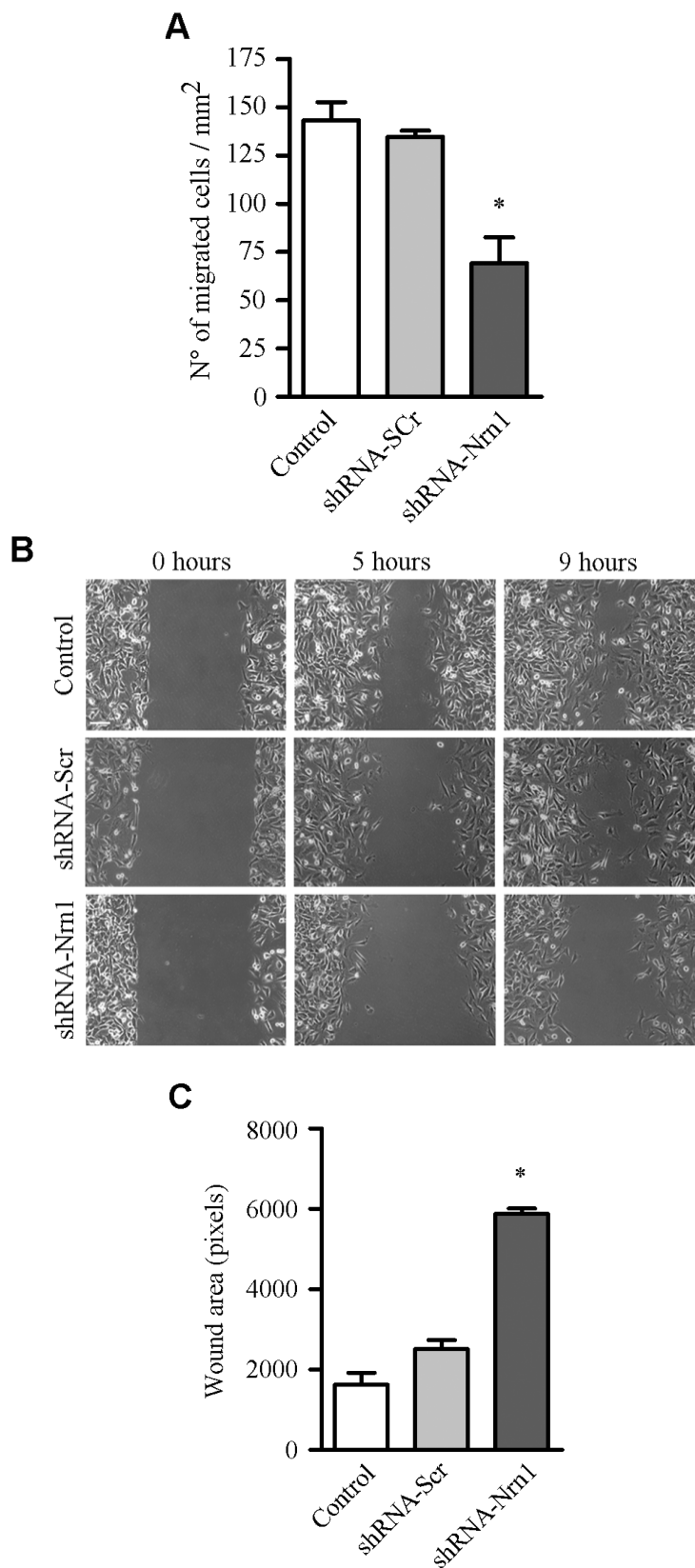


Figura 8 *Variazione della migrazione delle GN-11 dopo silenziamento della neuritina. A) Boyden assay, 2 h di migrazione con l'1% di FBS come chematrattore; B) wound healing assay, analisi dopo 5 e 9 h di migrazione; C) Quantizzazione del test di wound healing, dopo 9 h di migrazione cellulare tramite misurazione dello spazio rimasto libero da cellule.*

Il wound healing assay è stato effettuato mediante inserti Ibidi®; questi sono degli inserti in silicone costituiti da due piccole camere separate da un setto di circa 500 µm. All'interno delle camere sono state piastrate le cellule e lasciate crescere fino a confluenza, dopo di che è stato rimosso il setto e le cellule sono state lasciate migrare fino a 9 h e sono state fotografate a diversi tempi. Il tempo di migrazione è più lungo rispetto a quello della camera di Boyden (2 h), in quanto non si ha l'attrazione da parte di un chemoattrattore e le cellule devono percorrere una distanza maggiore. In questo esperimento si può notare che già dopo 5 h le cellule in cui è stata silenziata la neuritina presentano una netta riduzione della migrazione, diminuzione che diventa ancora più evidente a 9 h (Fig.8B). I risultati sono stati quantizzati misurando lo spazio libero rimasto tra i due bordi di cellule migranti (Fig.8C).

Gli stessi esperimenti sono stati condotti dopo sovra-espressione della neuritina. Anche in questo caso l'efficienza dell'sovra-espressione della neuritina è stata verificata sia mediante RT-qPCR (Fig.9A), sia mediante analisi Western blot (Fig.9B). L'analisi western è stata effettuata utilizzando sia un anticorpo anti-neuritina, sia un anticorpo anti-Flag.

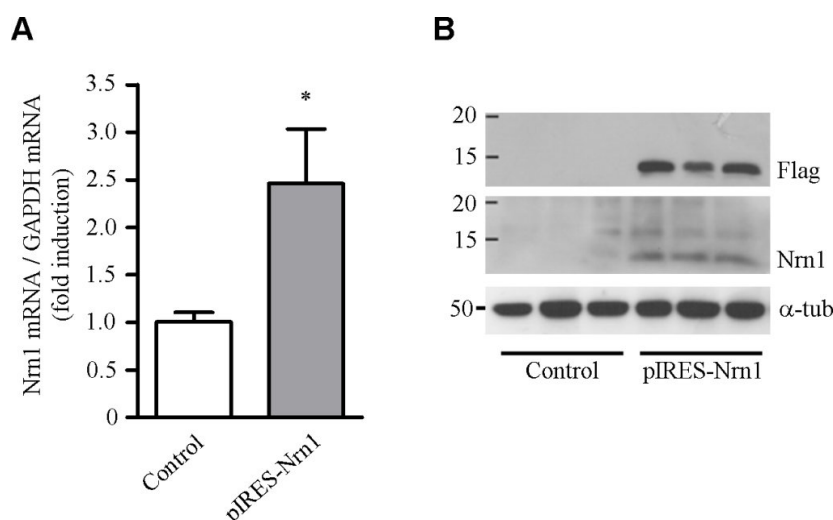


Figura 9 Aumento della neuritina dopo transfezione transiente del plasmide pIRES-EGFP-Nrn1. A) aumento dell'espressione genica; B) aumento dell'espressione proteica.

Gli esperimenti di migrazione sono stati condotti con tempi più brevi: 1h per il saggio di Boyden (Fig.10A) e 8 ore per il wound healing assay (Fig.10B). Come è possibile osservare dal grafico nella figura 10A, le cellule in cui è stato fatto sovra-esprimere il gene della neuritina mostrano nel test di microchemotassi un'attività migratoria significativamente differente, se confrontate con le cellule controllo. Infatti, le cellule che sovra-esprimono il gene della neuritina mostrano una capacità migratoria superiore del 27% rispetto alle cellule

controllo. Il numero di cellule controllo migrate risulta essere pari a $112 \pm 5 / \text{mm}^2$, mentre quello delle cellule che sovra-esprimono la neuritina è pari a $142 \pm 6 / \text{mm}^2$.

Anche il saggio di wound healing ha riconfermato lo stesso risultato. Le immagini ottenute dopo 4h e 8h di migrazione mostrano che le cellule transfettate con la neuritina migrano più velocemente rispetto alle cellule controllo andando a riempire maggiormente i $500 \mu\text{m}$ del setto (Fig.10B). Anche in questo caso è stata effettuata una quantizzazione dell'attività migratoria in relazione allo spazio rimasto libero (Fig.10C).

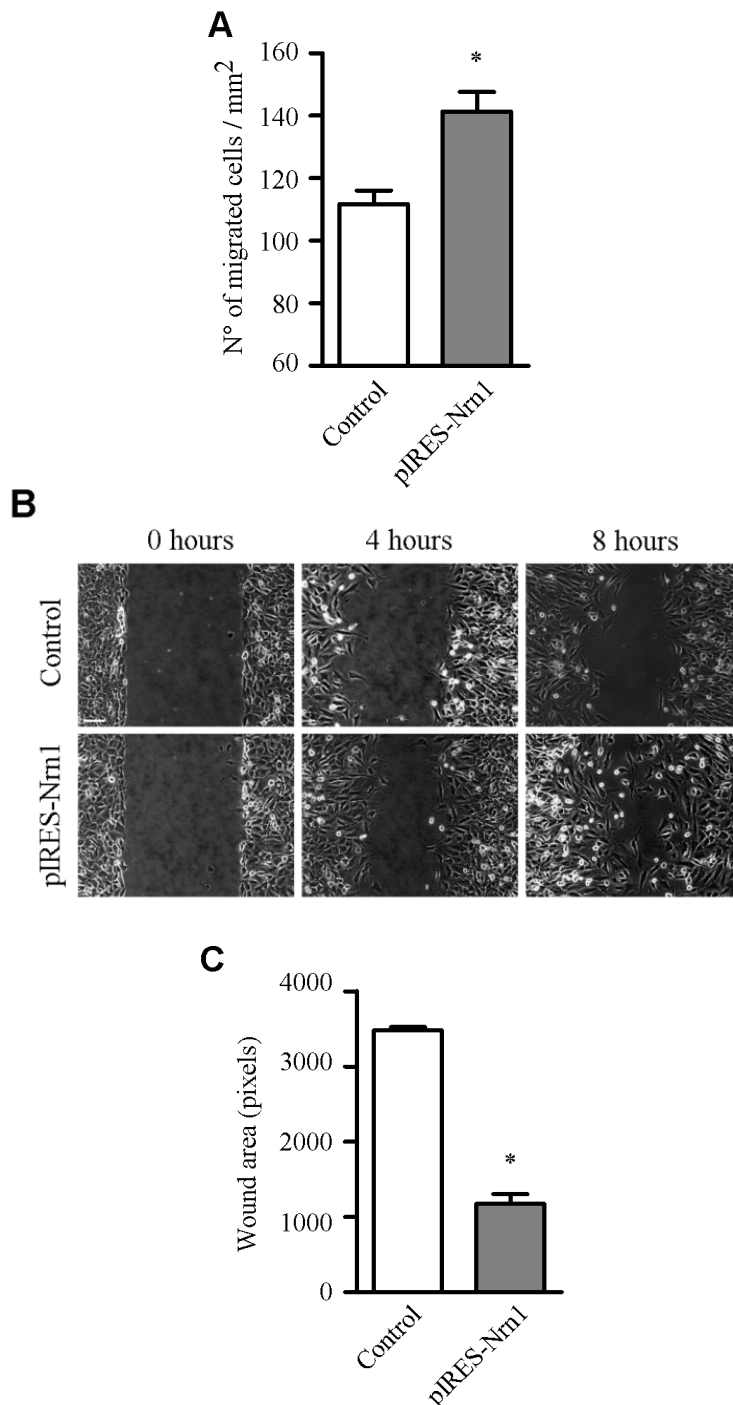


Figura 10 Variazione della migrazione delle GN-11 dopo sovra-espressione della neuritina. A) Boyden assay, 1 h di migrazione con l'1% di FBS come chemotratto; B) wound healing assay dopo 4 e 8 h di migrazione; C) Quantizzazione del test di wound healing dopo 8 h di migrazione cellulare tramite misurazione dello spazio rimasto libero da cellule.

Al fine di essere certi che gli effetti osservati non siano dovuti a variazioni della proliferazione cellulare, è stato effettuato un saggio di vitalità cellulare: l'MTT assay. Grazie a questo saggio abbiamo osservato che tra i diversi gruppi non vi è alcuna variazione di proliferazione. L'unica differenza significativa è data dal processo di transfezione in sé, che causando danni alla membrana cellulare per permettere l'entrata dei plasmidi, porta inevitabilmente ad una riduzione del numero di cellule nei gruppi transfettati rispetto ai controlli non transfettati. Ciò sta ad indicare che il silenziamento o la sovra-espressione della neuritina, dopo 48 h di trasfezione e in queste linee cellulari, non interferisce sulla proliferazione cellulare (Fig.11).

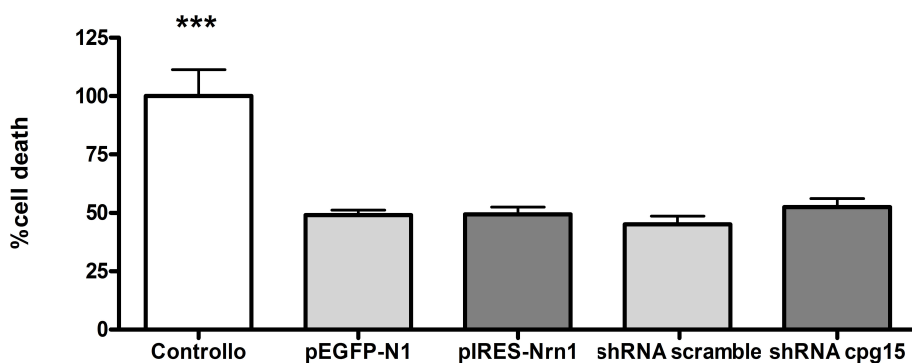


Figura 11 MTT: saggio di vitalità cellulare condotto su cellule GN-11 controllo e cellule GN-11 dopo 48 ore dalla transfezione con diversi plasmidi.

6.3 LA MODULAZIONE DEI LIVELLI DI NEURITINA INDUCE CAMBIAMENTI MORFOLOGICI NELLE CELLULE GN-11

La migrazione cellulare comporta notevoli modificazioni strutturali delle cellule. Quindi, nel tentativo di scoprire in che modo la neuritina modifica la migrazione neuronale, si è pensato di valutare le modificazioni morfologiche delle cellule GN-11 in relazione alla modulazione dei livelli d'espressione della neuritina. Il silenziamento e la sovra-espressione

della neuritina sono state ottenute con le stesse modalità degli esperimenti precedenti. I parametri da noi presi in considerazione sono: a) area e perimetro delle cellule; b) valore del diametro massimo e minimo della cellula e rapporto tra i due parametri; c) numero di cellule con forma bipolare (cellule che estendono due prolungamenti principali). I risultati, che si possono osservare nella figura 12, sono espressi come percentuale di variazione rispetto ai controlli che sono stati presi come riferimento e perciò posti al 100% (shRNA-Scr è il controllo per gli esperimenti di silenziamento e pEGFP-N1 per gli esperimenti di sovra-espressione). Il numero di cellule analizzate è stato di 250 per gruppo. Per quanto riguarda l'area totale delle cellule e il perimetro, non sono state riscontrate differenze significative tra le cellule in cui il gene della neuritina è stato silenziato e quelle in cui la neuritina è sovra-espressa (Fig.12). Si può invece notare che il rapporto tra il valore del diametro massimo e minimo del corpo cellulare risulta molto più alto nelle cellule che sovra-esprimono il gene della neuritina, in quanto queste cellule mostrano un diametro minimo più basso rispetto a quelle in cui il gene è stato silenziato (Fig.12). Questo risultato è indice di un maggiore allungamento della cellula. Infine, si ha anche una netta diminuzione del numero di cellule che presenta un forma bipolare (e quindi maggiormente prone a migrare) nel gruppo in cui è stata silenziata la neuritina.

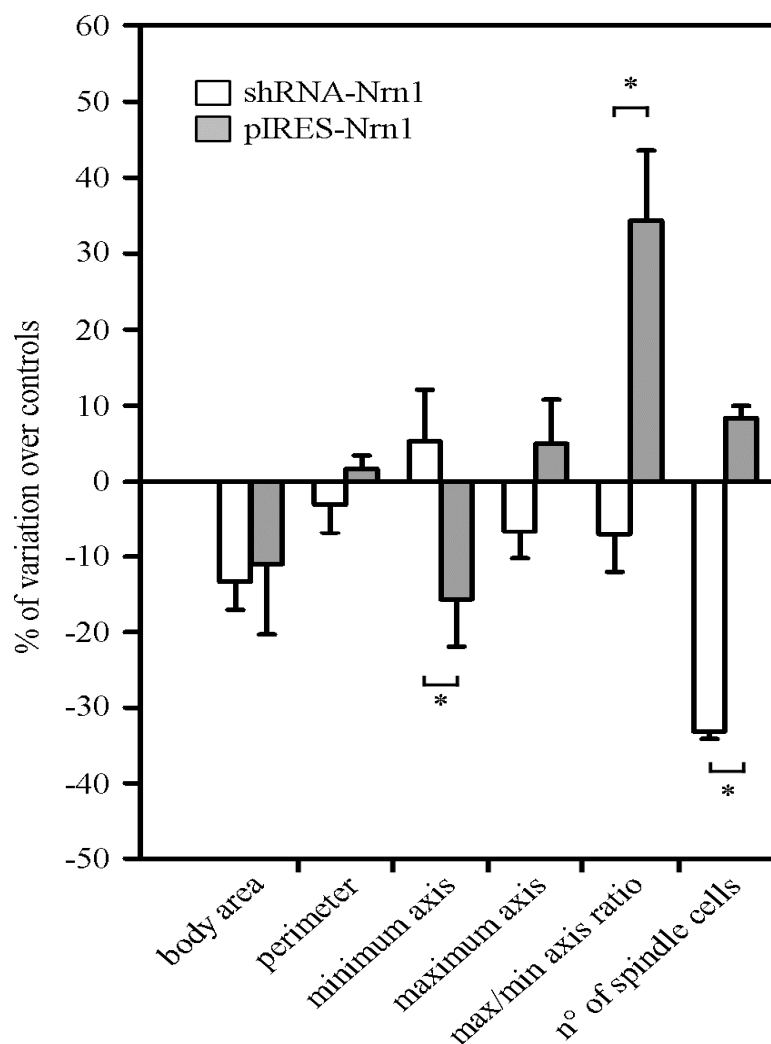


Figura 12 Cambiamenti morfologici in cellule GN-11 dopo silenziamento o sovra-espressione della neuritina. I dati sono espressi come percentuale di variazione rispetto ai controlli posti al 100%.

Per confermare la correlazione tra variazioni di attività migratoria e cambiamenti della morfologia cellulare dopo modificazione dei livelli di neuritina abbiamo effettuato esperimenti di videomicroscopia ottica in fluorescenza time-lapse, una metodica che permette l'osservazione, per tempi prolungati e ad intervalli definiti, del comportamento cellulare in termini di motilità. Le cellule prima della analisi sono state private di siero per 3 ore. Il tempo di osservazione, in condizioni di temperatura e CO₂ controllate, è stato di 8 ore, con registrazione delle osservazioni ogni 10 min. Nella figura 13 sono state riportate le immagini rappresentative prese all'inizio e dopo 4 e 8 ore di incubazione. Dall'analisi dei filmati ottenuti e delle immagini rappresentative si rileva che la capacità migratoria delle cellule controllo e delle GN-11 in cui è stata silenziata o sovra-espressa la neuritina è differente. Infatti, le cellule che sovra-esprimono la proteina migrano più lontano e più velocemente delle cellule controllo, mentre le cellule silenziate migrano più lentamente delle cellule controllo. Va sottolineato che le cellule silenziate che presentano una forma non più bipolare ma

multipolare, pur mostrando una migrazione ridotta, tendono comunque a spostarsi, anche se sembra mancare una specifica direzionalità.

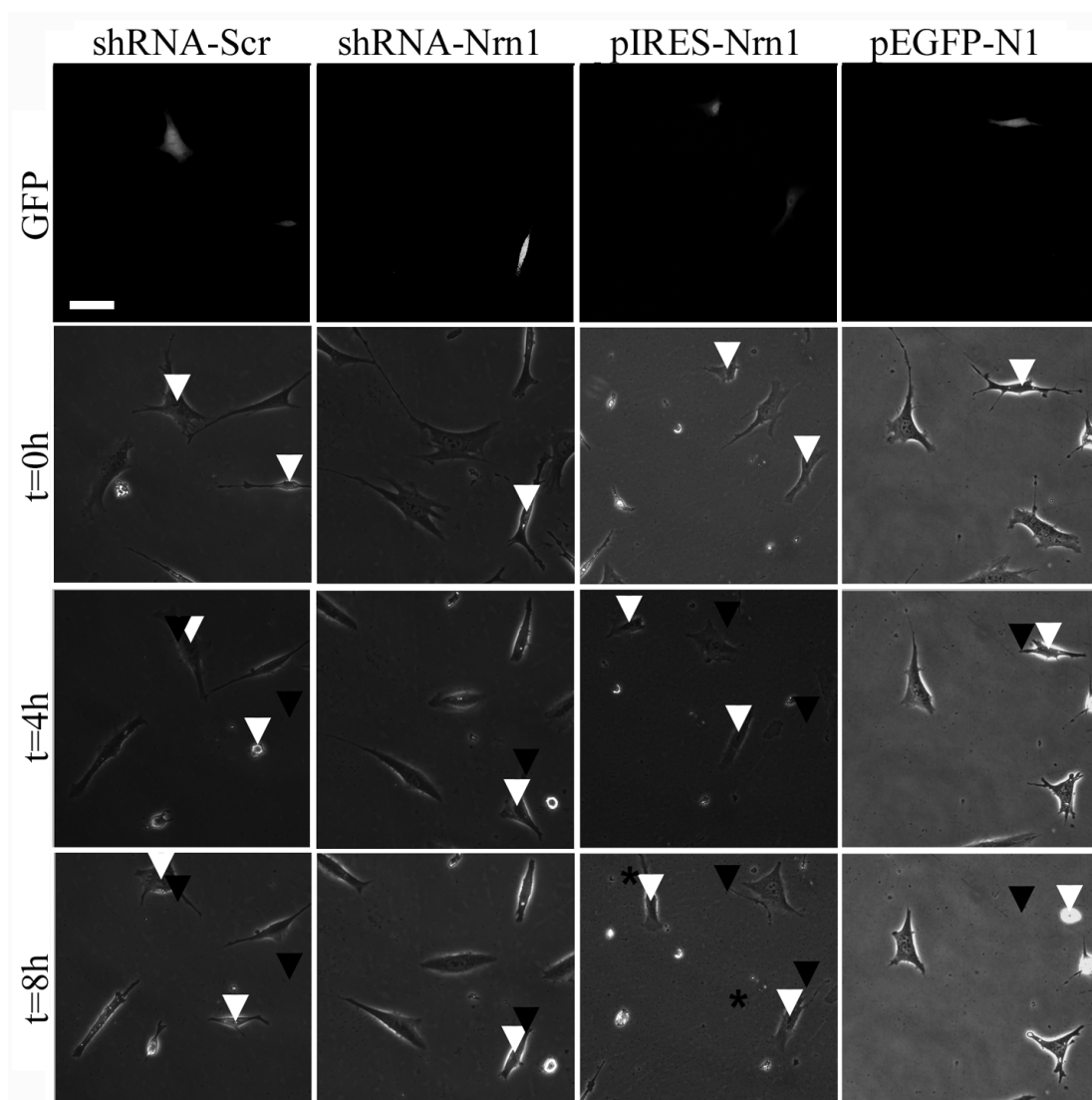


Figura 13 Videomicroscopia ottica in fluorescenza *time-lapse* indicante le variazioni nella migrazione dopo silenziamento o sovra-espressione della neuritina a diversi tempi. Le frecce bianche indicano sempre la posizione della cellula in esame; le frecce nere indicano la posizione della cellula al precedente tempo di analisi; l'asterisco indica la terza posizione raggiunta (presente solo nelle cellule trasfettate con il *pIRES-Nrn1* dopo 8 h di migrazione). Scalebar = 20 μ m

6.4 MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI DELLA TUBULINA

Durante il processo di migrazione cellulare la riorganizzazione del citoscheletro svolge un ruolo molto importante in quanto permette i cambiamenti morfologici necessari alla cellula per migrare. Un importante ruolo è quello ricoperto dalla tubulina. Al variare della capacità della cellula di migrare, varia anche la stabilità della tubulina, aumentando nelle cellule con

scarsa capacità migratoria e diminuendo in quelle che migrano maggiormente. La maggiore o minore stabilità della tubulina è espressione anche delle diverse modificazioni post-traduzionali a cui può essere sottoposta la α -tubulina. Per questo motivo abbiamo analizzato se la variazione della motilità cellulare, indotta dalla neuritina, correla con la variazione delle forme post-traduzionali della tubulina che ne regolano la stabilità. Le diverse forme modificate di tubulina prese in considerazione sono: 1) tubulina acetilata e tubulina de-tirosinata, associate a microtubuli più stabili, maggiormente presenti in cellule non migranti; 2) tubulina tirosinata: associata a microtubuli altamente dinamici, maggiormente presente in cellule che hanno capacità migratorie. Utilizzando anticorpi specifici per le tre diverse forme di tubulina, sono stati analizzati i livelli di espressione proteica delle varie isoforme modificate nelle cellule GN-11 sia in condizioni basali, sia dopo modulazione dei livelli di neuritina.

Tramite analisi Western blot (Fig.14 e 15) abbiamo osservato che silenziando la neuritina si osserva un corrispettivo aumento delle due forme più stabili, coerentemente con la ridotta capacità migratoria. Al contrario, aumentando l'espressione della neuritina si osserva un incremento della tubulina tirosinata che conferisce ai microtubuli una maggiore dinamicità e la conseguente possibilità di aumentare la motilità cellulare (Fig.16). La α -tubulina totale resta invariata ed è stata utilizzata per normalizzare i dati. Risultati in completo accordo sono stati ottenuti anche attraverso analisi immunocitochimica (Fig. 14, 15, 16).

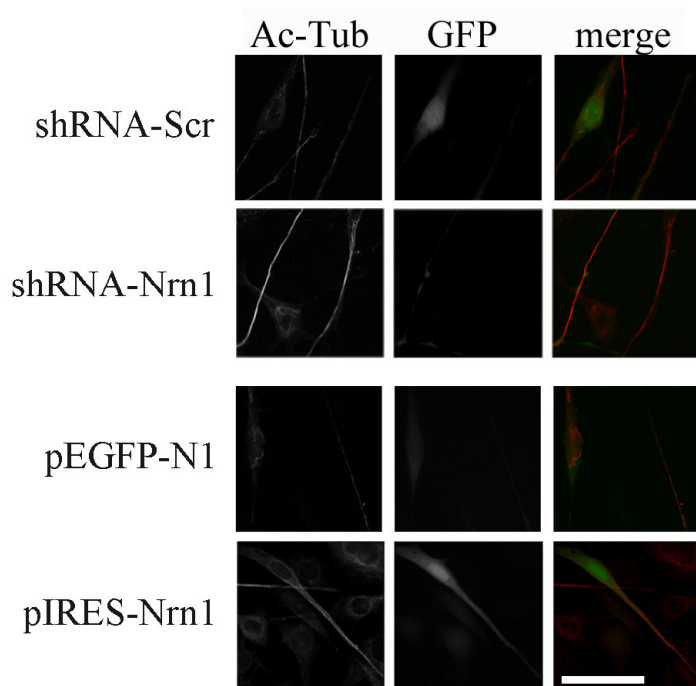
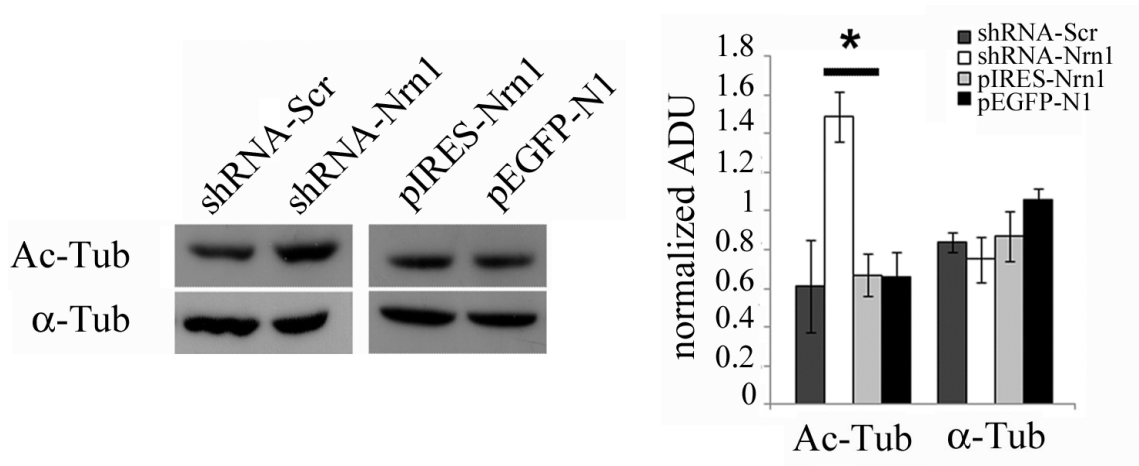


Figura 14 Variazioni della tubulina acetilata dopo silenziamento o sovra-espressione della neuritina. In alto a sinistra è riportata l'Analisi Western Blot e a fianco la quantizzazione delle modificazioni post-traduzionali normalizzate per l'alfa tubulina. L'immagine in basso riporta l'analisi immunocitochimica (scalebar = 20 μ m)

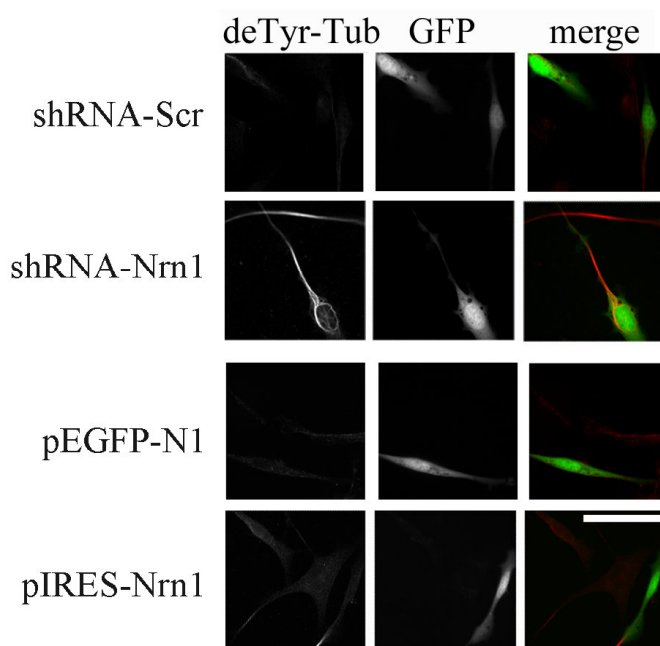
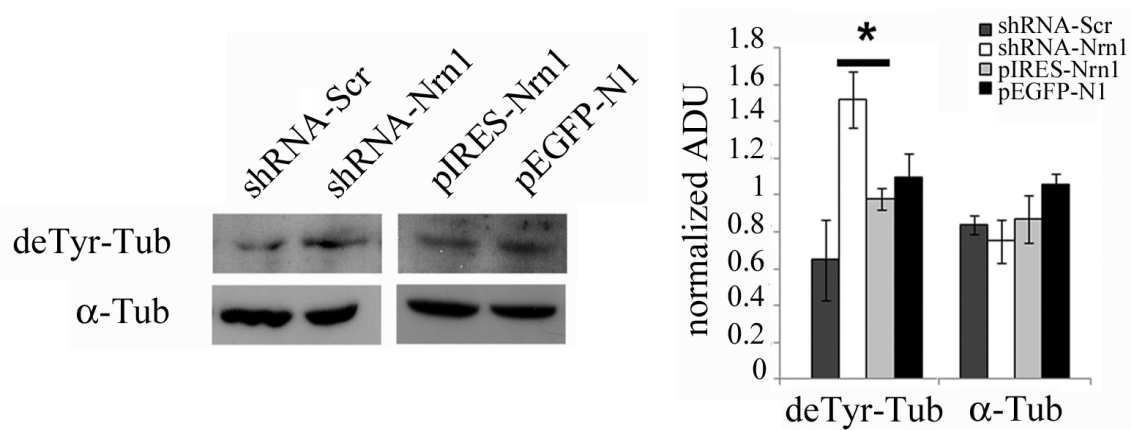


Figura 15 Variazioni della tubulina detirosinata dopo silenziamento o sovra-espressione della neuritina. In alto a sinistra è riportata l'Analisi Western Blot e a fianco la quantizzazione delle modificazioni post-traduzionali normalizzate per l'alfa tubulina. L'immagine in basso riporta l'analisi di immunocitochimica (scalebar = 20 μ m).

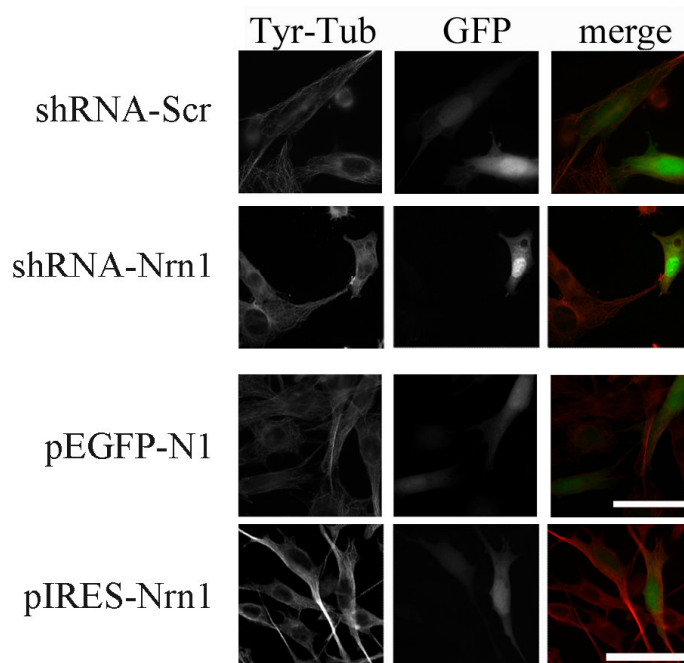
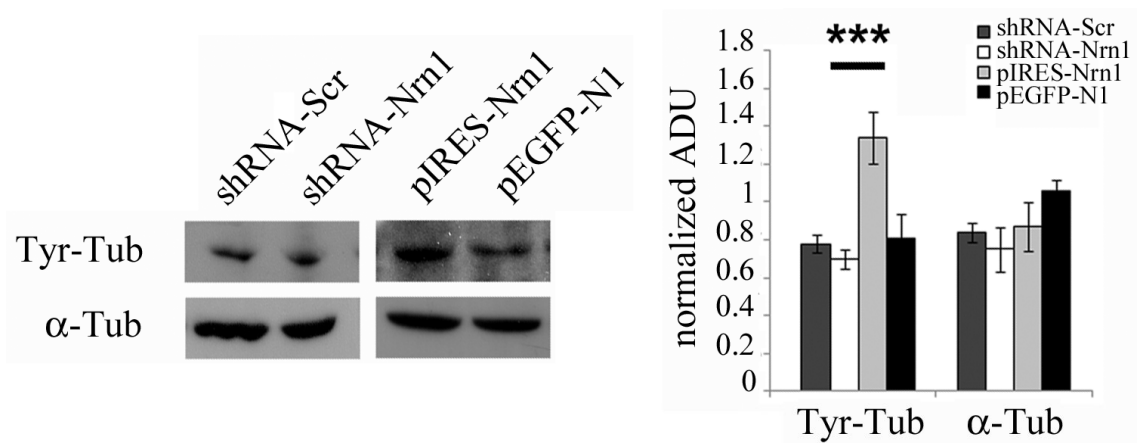


Figura 16 Variazioni della tubulina tirosinata dopo silenziamento o sovra-espressione della neuritina. In alto a sinistra è riportata l'Analisi Western Blot e a fianco la quantizzazione delle modificazioni post-traduzionali normalizzate per l'alfa tubulina. L'immagine in basso riporta l'analisi di immunocitochimica (scalebar = 20 μ m).

6.5 EVIDENZE IN VIVO DELLA MODULAZIONE DELLA MIGRAZIONE CELLULARE DA PARTE DELLA NEURITINA

Inizialmente, per confermare in vivo il ruolo della neuritina nella migrazione cellulare si è pensato di analizzare la peculiare migrazione dei neuroni GnRH. Tuttavia, i neuroni GnRH sono una popolazione cellulare molto esigua (circa 800 neuroni in un cervello di ratto adulto) ed anche dispersa in aree diverse (Wierman, Kiseljak-Vassiliades et al. 2011). In aggiunta, non è commercialmente disponibile un anticorpo che riconosca la neuritina e che funzioni correttamente in immuno-istochimica. Chiaramente, si è tentato di ovviare alla mancanza dell'anticorpo idoneo rilevando l'espressione genica della neuritina mediante ibridazione insitu, in topi transgenici GnRH-GFP, cioè in topi in cui i neuroni GnRH esprimono la proteina GFP rendendoli più facilmente riconoscibili. Purtroppo la tecnica dell'ibridazione in situ impedisce poi di evidenziare il GFP mediante immunofluorescenza. Abbiamo quindi cercato di risolvere il problema sperimentale utilizzando fettine contigue di cervello di embrioni in cui riconoscere la neuritina tramite ibridazione in situ e il GnRH tramite immunofluorescenza. Purtroppo anche questo tentativo è fallito in quanto i neuroni GnRH riconosciuti sono pochissimi e la tecnica d'ibridazione in situ non è così specifica per poter rilevare una colorazione su singole cellule.

Questo primo tipo di approccio sperimentale è risultato quindi essere molto difficoltoso e al momento non sono ancora stati superati i problemi tecnici.

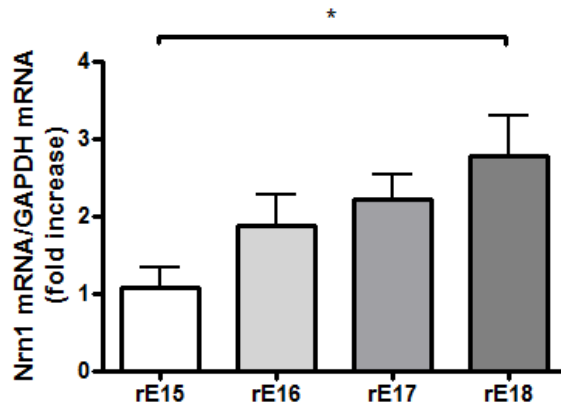


Figura 17 Espressione genica della neuritina nella eminenza ganglionica di ratto a diverse età embrionali. I livelli di neuritina-mRNA sono stati misurati mediante RT-qPCR. I dati sono stati normalizzati con i livelli di GAPDH mRNA, espressi rispetto ai livelli determinati ad E15. Ogni colonna rappresenta la media \pm SEM di 6 replicati. Analisi statistica condotta tramite anova, e Tukey post-hoc test. * $p < 0.05$.

Vista la difficoltà nel rilevare i neuroni GnRH e correlarli alla espressione di neuritina, in vivo, siamo andati ad analizzare il comportamento di una altra popolazione neuronale caratterizzata da una elevata capacità migratoria, spesso utilizzata come modello di studio della migrazione neuronale: gli interneuroni della eminenza ganglionica. Queste cellule migrano tangenzialmente verso la corteccia a partire dal 15°-16° giorno di vita embrionale e il loro movimento richiede un preciso controllo spazio-temporale imposto da stimoli ambientali, per consentire la creazione di una citoarchitettura corretta e di una esatta connettività neuronale (Caviness and Rakic 1978; Hatten 1990; Hatten and Mason 1990; Rakic 1990).

Tramite real-time PCR abbiamo innanzitutto verificato che la neuritina venga espressa anche a livello dell'eminenza ganglionica e abbiamo anche rilevato che la sua espressione aumenta all'aumentare dell'età embrionale (Fig.17).

Al fine di verificare se la neuritina modula la migrazione degli interneuroni della eminenza ganglionica, abbiamo approntato delle colture di neuroni dissociati di eminenza ganglionica e le abbiamo transfettate con pIRES-Nrn1 così che la neuritina venga sovra-espressa. L'efficienza di trasfezione in queste colture è di circa il 30% (Fig.18). Mediante saggio di Boyden abbiamo poi analizzato, la capacità migratoria di questi neuroni. Come

chemoattrattore è stato utilizzato l'FBS al 10% e le colture sono state lasciate migrare per 8h. Gli esperimenti indicano che quando viene indotta l'espressione di neuritina si ha un aumento di migrazione del 20% rispetto ai controlli (Fig.19). Poiché in coltura gli interneuroni della eminenza ganglionica non mantengono la stessa capacità migratoria che hanno in vivo, non ci è stato possibile utilizzare queste colture anche per lo studio dell'effetto del silenziamento della neuritina.

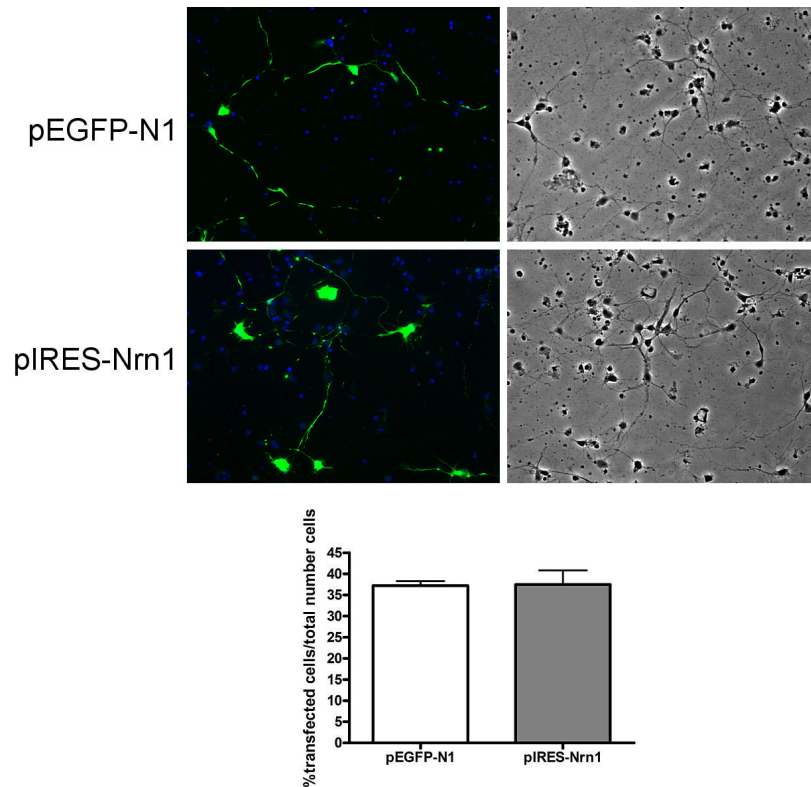


Figura 18 Efficienza di trasfezione in colture primarie di eminenza ganglionica di ratto E16.

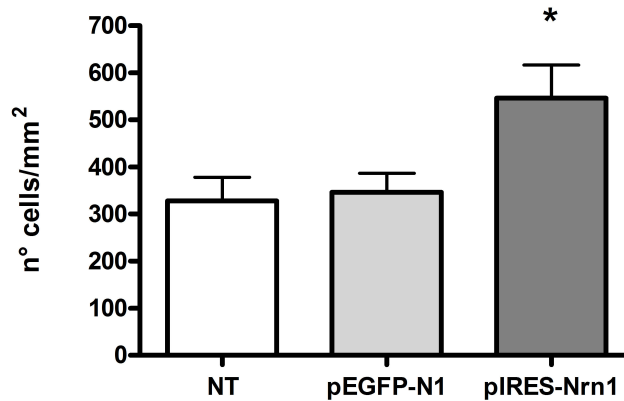


Figura 19 Attività migratoria di colture di neuroni dell'eminenza ganglionica di ratto (16 giorni di età embrionale) dopo sovra-espressione di neuritina. Boyden assay, 8h di migrazione con il 10% di FBS come chemotratto.

Evidenziato l'effetto della neuritina su colture primarie di interneuroni dell'eminenza ganglionica, abbiamo confermato i risultati con esperimenti in vivo. In particolare, mediante elettroporazione, abbiamo transfettato il plasmide esprime la neuritina, in sezioni di 300 μm di cervello di ratto E16 a livello della eminenza gangliare (Fig.20, 21, 22). Le sezioni approntate sono state mantenute in coltura per 48 h e poi fissate in paraformaldeide. I dati ottenuti, sembrano indicare che a 48 h la sovra-espressione di neuritina induce un aumento di migrazione rispetto ai controlli. I risultati ottenuti sono stati quantizzati attraverso conta cellulare. Nel grafico sono riportate le percentuali di cellule migrate, ottenute confrontando le cellule transfettate migrate rapportate al numero totale di cellule transfettate poste pari a 100%. In questo caso la neuritina è stata cotransfettata con il plasmide pCAG-DsRed (gentilmente donato da Dr. M. Hoshino, Kyoto University, Kyoto, Japan) ad un rapporto 4:1 in quanto con questa tecnica il segnale del GFP tende a indebolirsi, oltre al fatto che il microscopio confocale utilizzato risulta essere più sensibile alla fluorescenza rossa. Il conteggio conferma l'aumento di migrazione indotto dalla neuritina, quantizzato nel 20%, che concorda con il dato precedentemente ottenuto con le colture dissociate analizzate tramite saggio di Boyden (Fig.23).

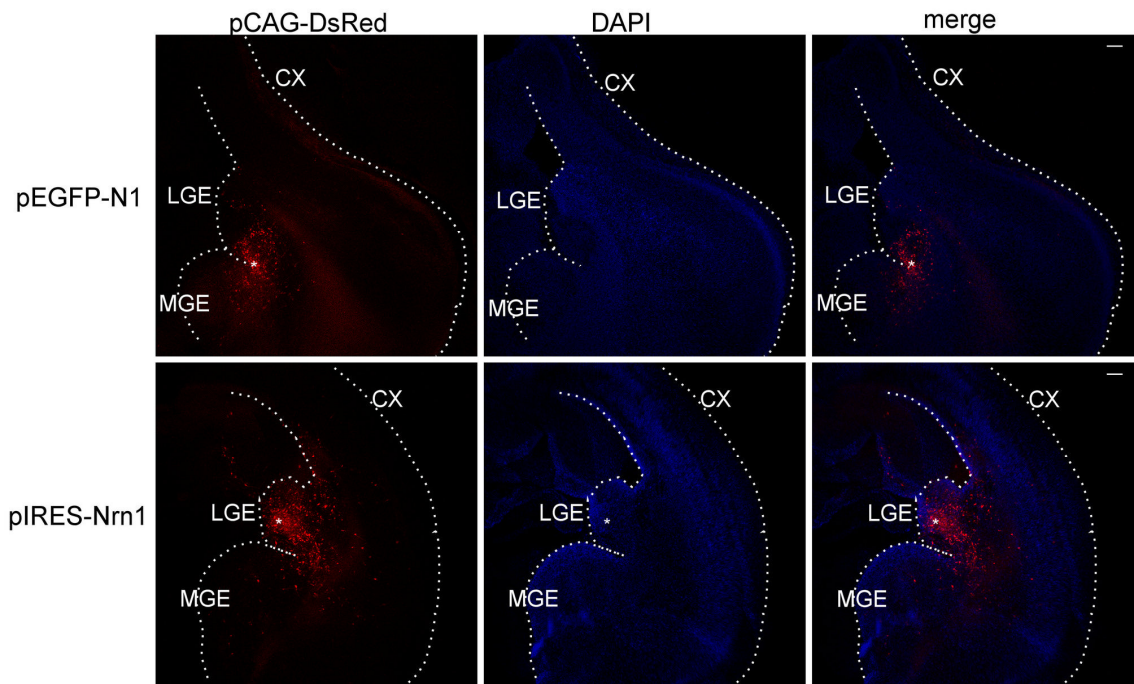


Figura 20 Elettroporazione dell'eminza ganglionica di sezioni di cervello di ratto E16. Immagini ottenute per mezzo di microscopia confocale, Ingrandimento 5x. La scale bar indica 100 μ m

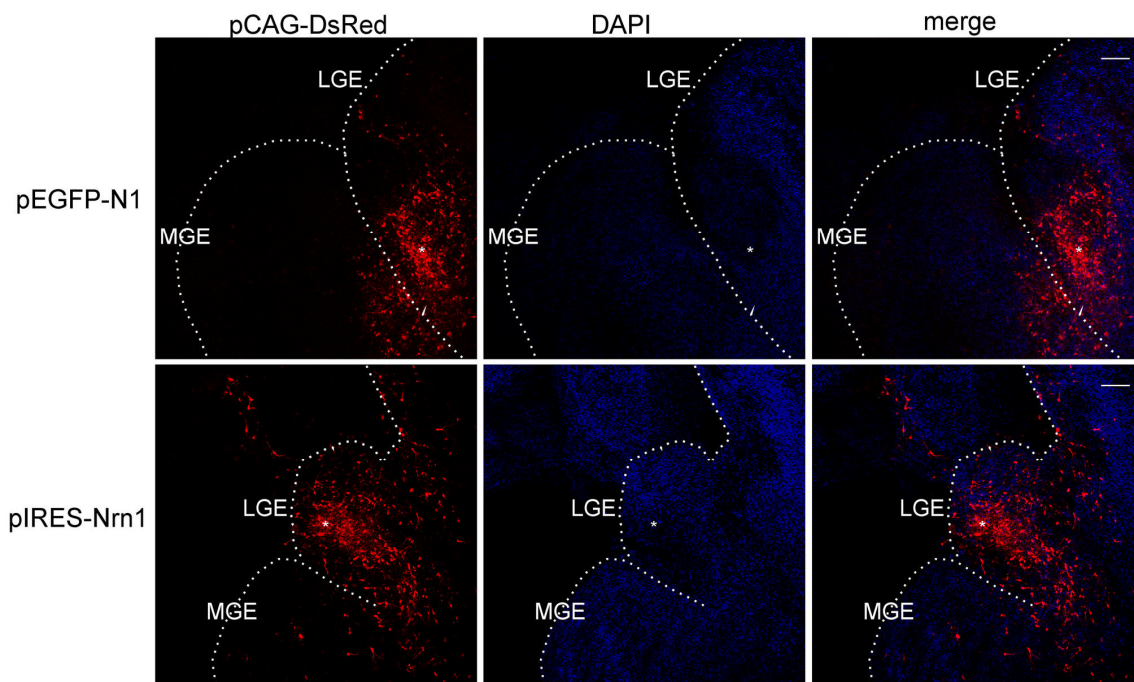


Figura 21 Ingrandimento dell'area di elettroporazione dell'eminza ganglionica, ingrandimento 10x. La scale bar indica 100 μ .m

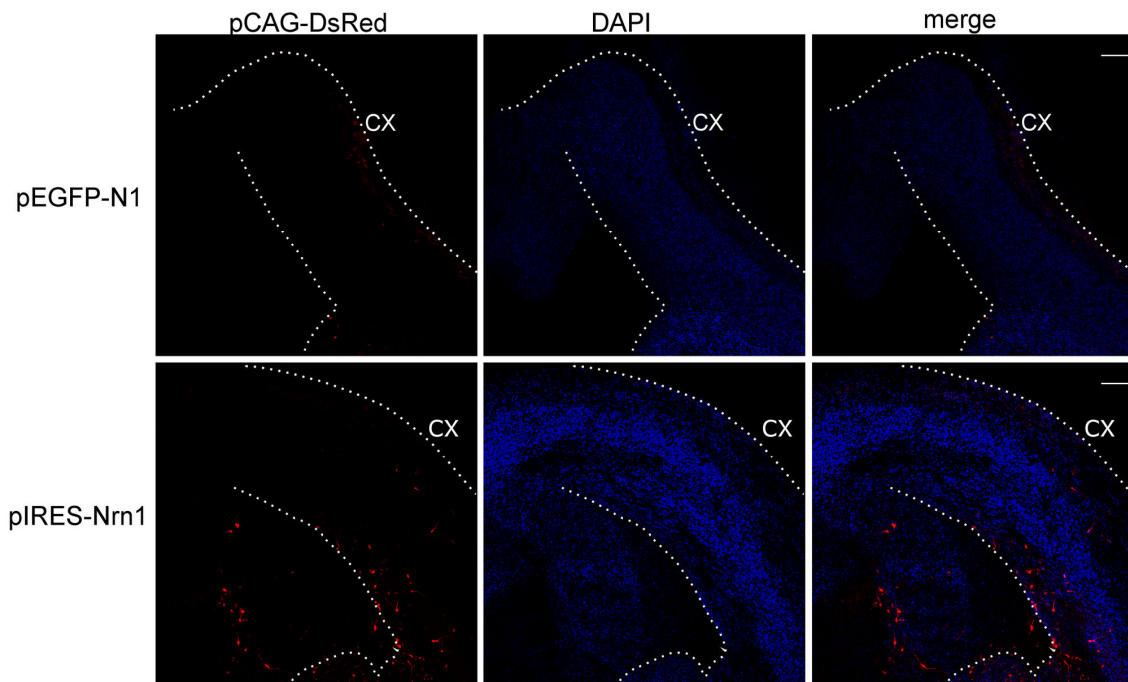


Figura 22 *Ingrandimento della corteccia, regione in cui migrano gli interneuroni. Ingrandimento 10X. La scale bar indica 100 μ m*

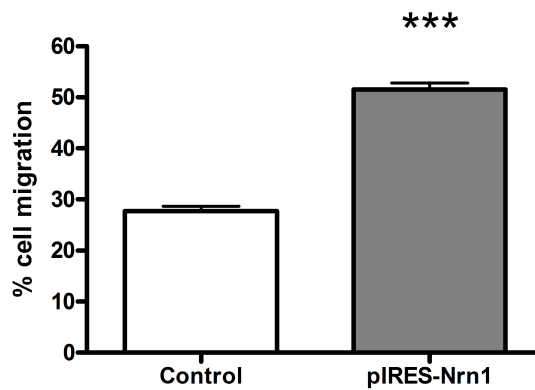


Figura 23 *Percentuale di cellule migrate dopo elettroporazione della eminenza ganglionica con neuritina. Analisi effettuata rapportando il numero di cellule transfettate migrate rispetto al numero di cellule totali transfettate, poste al 100%. *** $p < 0,001$*

Come per le colture primarie di neuroni, anche in questo caso, essendo i livelli di espressione basale della neuritina molto bassi, abbiamo deciso di non effettuare gli esperimenti di silenziamento dell'espressione di neuritina.

7) *DISCUSSIONE*

Uno degli aspetti fondamentali durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale è la migrazione cellulare dalle regioni di origine a quelle di destinazione finale, allo scopo di creare la struttura cerebrale che poi si osserva nell'adulto e di permettere il suo corretto funzionamento. In molti studi è stato osservato che modificazioni in questo processo portano ad embrioni che non sono vitali o che sviluppano gravi patologie. Ne sono un esempio, la sindrome di Kallmann e l'ipogonadismo ipogonadotropo normosomico dovuti ad un'anomala migrazione dei neuroni GnRH (Wierman, Kiseljak-Vassiliades et al. 2011) ed anche la lissencefalia causata da una alterata espressione di *Lis1* (Marin and Rubenstein 2003).

In questo lavoro di tesi abbiamo dimostrato il coinvolgimento nella migrazione neuronale della proteina neuritina.

Sino ad ora questa proteina è stata considerata coinvolta nella regolazione della crescita dei neuriti e nel processo di maturazione sinaptica (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997; Nedivi, Wu et al. 1998; Cantalops and Cline 2008) ed anche nostri precedenti studi hanno dimostrato che la neuritina è coinvolta nella modulazione della crescita neuritica durante il differenziamento neuronale indotto da NGF (Cappelletti, Galbiati et al. 2007).

Grazie ad una analisi microarray delle cellule GN-11 abbiamo evidenziato che la neuritina è uno dei geni maggiormente espressi in questa linea di neuroni GnRH secernenti. Poiché le cellule GN-11 hanno un'elevata capacità migratoria abbiamo ipotizzato che questa proteina potesse essere coinvolta nei processi di migrazione cellulare. Inoltre, va ricordato, che molti processi che si attuano nell'allungamento neuritico/assonale vengono utilizzati anche nella migrazione cellulare.

Il primo approccio è stato quello di paragonare l'espressione di neuritina delle cellule GN-11 con quella delle cellule GT1-7, neuroni GnRH-secernenti che hanno perso la capacità migratoria. Questi primi esperimenti ci hanno indicato che le cellule GN-11 hanno livelli di espressione proteica e genica di neuritina molto più alti rispetto alle cellule GT1-7, supportando la nostra ipotesi di un coinvolgimento della neuritina nei processi migratori.

A supporto della nostra ipotesi, è riportato in letteratura un lavoro di Orso e collaboratori che indica la neuritina come uno dei geni la cui espressione viene ridotta a fronte di una riduzione della motilità delle GN11 dopo silenziamento di AP2- α (un gene essenziale per la migrazione cellulare della cresta neurale).

Il passo successivo è stato quello di valutare se la modulazione dei livelli di espressione della neuritina, mediante sovra-espressione o silenziamento genico, fosse in grado di modulare la migrazione neuronale. La migrazione delle cellule GN-11 è risultata essere fortemente influenzata dai livelli di neuritina; infatti, entrambi i saggi di migrazione effettuati (camera di Boyden e wound healing test) hanno evidenziato che il silenziamento del gene della neuritina porta ad una diminuzione dell'attività migratoria delle cellule GN11, mentre la sovra-espressione del gene stimola la migrazione delle cellule. Questi esperimenti sono stati svolti nelle cellule GN-11 in quanto esse hanno un livello basale di espressione della neuritina che ci permette di valutare l'effetto del silenziamento, mentre le GT1-7 hanno livelli di espressione basale di questa proteina troppo bassi. Inoltre, con le cellule GT1-7 si ha una minore efficienza di transfezione. Poiché è noto che la neuritina espressa durante la morfogenesi del prosencefalo contribuisce al mantenimento del bilancio tra proliferazione ed apoptosi in regioni del cervello che vanno incontro a rapida proliferazione tramite una inattivazione della caspasi 3 (Putz, Harwell et al. 2005), abbiamo valutato un eventuale effetto della neuritina sulla proliferazione cellulare. Nelle nostre condizioni sperimentali ne l'aumento ne la diminuzione della espressione della neuritina porta a variazioni della proliferazione cellulare e quindi questo parametro non influenza i risultati da noi ottenuti sulla migrazione cellulare.

Le cellule della linea GN-11 possono presentare varie morfologie. Infatti, in coltura sono presenti sia cellule bipolari sia cellule multipolari con differenti grandezze e ramificazioni. In genere, viene attribuita una maggiore capacità migratoria alle cellule che hanno una forma bipolare e che presentano un prolungamento guida (Giacobini, Giampietro et al. 2002). Nonostante ciò, negli esperimenti di video microscopia time-lapse noi abbiamo osservato variazioni nella capacità migratoria generale delle cellule. Infatti, accanto alle cellule bipolari anche le cellule multipolari, aumentano la loro motilità dopo sovra-espressione della neuritina, così come la diminuiscono dopo silenziamento. In questo esperimento però possiamo solo parlare di motilità cellulare in quanto non era presente uno stimolo di tipo chemotattico o comunque attrattivo verso le

cellule, ma è stata fatta solo una registrazione della motilità spontanea di queste cellule. L'analisi morfologica delle GN-11 ci ha indicato un aumento del numero di cellule che presenta forma bipolare dopo sovra-espressione della neuritina. A supporto della maggiore propensione a migrare in presenza di più alti livelli di neuritina, abbiamo rilevato anche una netta diminuzione del diametro minimo delle cellule; infatti, le cellule in fase di migrazione presentano in genere un corpo più affusolato, con un diametro minimo ridotto rispetto alle cellule in condizioni basali.

Alla base della migrazione cellulare vi è un attivo sistema di riarrangiamento del citoscheletro; in particolar modo un ruolo fondamentale è svolto dalle tubuline. Infatti, passaggio fondamentale per lo spostamento della cellula è la nucleocinesi, un processo in cui il centrosoma si sposta nel prolungamento guida attirando verso di sé il nucleo grazie ai microtubuli e alle dineine ad esso associate (Marin and Rubenstein 2003). Affinché ciò avvenga è necessario che vari la stabilità dei microtubuli. Molte molecole note per essere coinvolte nella regolazione della migrazione neuronale, agiscono attraverso la variazione della stabilità dei microtubuli, quali: LIS1 (Sapir, Elbaum et al. 1997), Nde1 (Guo, Yang et al. 2006), DCX (Francis, Koulakoff et al. 1999; Gleeson, Lin et al. 1999; Horesh, Sapir et al. 1999). Inoltre, in molti studi è stato dimostrato che la regolazione della stabilità dei microtubuli è indispensabile anche per la morfologia del cono di crescita e per la formazione del processo guida (Dent and Gertler 2003; Etienne-Manneville 2010). La stabilità dei microtubuli (in termini di emivita) può essere messa in rapporto con differenti modificazioni post-traduzionali della α -tubulina quali ad esempio la tirosinazione, la detirosinazione e la acetilazione (Westermann and Weber 2003). In genere, la tubulina tirosinata risulta essere più dinamica, mentre la tubulina detirosinata o acetilata risulta essere maggiormente stabile (Etienne-Manneville 2010). Tuttora è ancora molto dibattuto se le modificazioni post-traduzionali dei microtubuli siano coinvolte nella motilità cellulare (Etienne-Manneville 2010). E' noto che modificazioni degli enzimi SIRT2 e HDAC6, che sono responsabili della acetilazione della α -tubulina, inducono un conseguente cambiamento della adesione e della migrazione cellulare (Tran, Marmo et al. 2007; Pandithage, Lilischkis et al. 2008). La correlazione tra forme della α -tubulina modificate post-traduzionalmente e capacità migratoria è supportata anche dai dati riportati in questa tesi. Infatti, abbiamo dimostrato che nelle cellule GN-11, caratterizzate da una alta motilità, vi sono livelli più bassi di tubulina acetilata e de-tirosinata se confrontati con quelli delle cellule GT1-7,

caratterizzate dal non essere in grado di migrare, neppure in risposta ad un forte chemoattrattore quale l'FBS. In relazione alla neuritina, i risultati indicano un aumento delle forme acetilate e de-tirosinate della α -tubulina nelle cellule che hanno ridotto la loro capacità migratoria dopo silenziamento genico della neuritina. Al contrario si osservano livelli più elevati della forma tirosinata nelle cellule in cui è stata sovra-espressa la neuritina con conseguente aumento della motilità. Questi risultati, nel loro insieme, ci indicano una correlazione tra livelli di neuritina e forme post-traduzionali modificate della tubulina al fine di regolare la migrazione cellulare. Purtroppo non conosciamo ancora i meccanismi molecolari attraverso i quali la neuritina riesce a modificare la tubulina e neppure se è un effetto diretto o mediato da altri fattori; nei prossimi studi ci siamo proposti di indagare queste vie di segnale.

Gli studi fino ad ora discussi sono stati condotti in vitro ed indicano un ruolo della neuritina nella migrazione neuronale con un possibile coinvolgimento del rimodellamento dei microtubuli. Tuttavia sarebbe interessante indagare se anche in vivo si osserva una modulazione della migrazione neuronale da parte della neuritina. Durante l'embriogenesi, come precedentemente detto, si osserva una massiccia migrazione neuronale, per questo motivo abbiamo condotto gli studi in vivo su cervelli embrionali. Inizialmente si era pensato di osservare come varia l'espressione della neuritina a livello dei neuroni GnRH anche in base alle loro diverse fasi di migrazione, tuttavia il numero esiguo di questi neuroni e l'assenza di un anticorpo funzionante in modo specifico per la neuritina non ci hanno permesso di realizzare questo progetto.

In letteratura sono presenti solamente due studi di localizzazione della neuritina, condotti attraverso la tecnica d'ibridazione in situ su sezioni di cervello embrionale di ratto E14, E17 ed E18. Questi studi sembrano escludere la localizzazione della neuritina da due diverse aree di migrazione neuronale, quali: l'eminenza ganglionica (la regione da cui partono gli interneuroni GABAergici per arrivare alla corteccia) e l'epitelio olfattorio (area da cui inizia la migrazione dei neuroni GnRH per arrivare all'ipotalamo) (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997; Putz, Harwell et al. 2005); i dati sono stati da noi confermati con la stessa tecnica in ratti ad E18 ma non sono stati mostrati in questo elaborato. Tuttavia, attraverso analisi real-time PCR condotte su diverse aree cerebrali a diverse età embrionali abbiamo dimostrato che all'età di E16 a livello dei bulbi olfattori (regione in cui dovrebbero essere presenti i neuroni GnRH migranti a questa età embrionale) si hanno livelli d'espressione genica della neuritina decisamente più elevati

rispetto a quelli ipotalamici (regione di destinazione dei neuroni GnRH). Inoltre, anche se con l'ibridazione in situ l'eminenza ganglionica (area di partenza degli interneuroni che successivamente raggiungono diverse aree cerebrali tra cui la corteccia) sembra non esprimere la neuritina, l'analisi real time PCR ha rivelato che, già all'età embrionale di 16 giorni, la neuritina viene espressa. Secondo quanto riportato in letteratura (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997; Putz, Harwell et al. 2005) e coerentemente alla sua funzione di sinaptogenesi e formazione dell'albero dendritico (Cantalops, Haas et al. 2000; Cantalops and Cline 2008), i livelli d'espressione della neuritina in corteccia aumentano all'aumentare dell'età embrionale; questa tendenza sembra essere rispettata anche nell'eminenza ganglionica.

Stabilito che nella eminenza ganglionica si ha una espressione basale di neuritina, abbiamo verificato che la sovra-espressione della neuritina fosse in grado di stimolare la migrazione neuronale anche in vivo. Gli esperimenti sono stati condotti secondo due approcci sperimentali: a) utilizzo di colture primarie di eminenza ganglionica; b) elettroporazione della eminenza ganglionica di sezioni di cervello di embrioni di ratto. L'analisi della attività migratoria delle colture dissociate dopo transfezione per sovra-esprimere la neuritina è stata effettuata mediante saggio di Boyden ed ha riconfermato i dati ottenuti con le colture di cellule GN-11. Anche i risultati della elettroporazione in vivo indicano un aumento della capacità migratoria degli interneuroni della eminenza ganglionica dopo sovra-espressione della neuritina. Quindi, nel loro insieme, i dati ottenuti in vivo ci hanno confermato i risultati precedentemente ottenuti in vitro, indicandoci un possibile ruolo della neuritina nella migrazione neuronale.

I meccanismi che stanno alla base dell'azione della neuritina negli interneuroni della eminenza ganglionica non sono ancora stati chiariti. Un possibile meccanismo d'azione vede coinvolto il BDNF, un fattore di crescita con azione neurotrofica, che come è noto controlla i livelli di neuritina (Naeve, Ramakrishnan et al. 1997; Cantalops, Haas et al. 2000). Il BDNF è stato recentemente correlato alla migrazione degli interneuroni. Infatti, secondo uno studio condotto in vitro (Petridis and El Maarouf 2011), sembrerebbe che questo fattore di crescita possa agire in modo duplice: come chemoattrattore, inducendo la migrazione cellulare se espresso a livelli "fisiologici" (1ng/ml) o come agente che induce il differenziamento se presente ad elevati livelli (10ng/ml). Lo studio di questi autori ci suggerisce che esso possa svolgere la funzione chemoattrattrice sempre regolando i livelli di espressione della neuritina.

Sempre in relazione all'individuazione di un meccanismo d'azione che spieghi in che modo i livelli di neuritina sono correlati alla migrazione neuronale, sarebbe interessante indagare una possibile interazione tra l'espressione della neuritina e il sistema che vede coinvolte le semaforine e slit-robo. Infatti, attraverso differenti segnali attrattivi e repulsivi, queste proteine agiscono indirizzando gli interneuroni GABAergici dell'eminenza ganglionica verso la corteccia permettendogli di seguire un preciso percorso e, ad esempio, impedendogli di attraversare il nucleo striato.

Tutti questi risultati indicano chiaramente un ruolo della neuritina nella migrazione cellulare, fenomeno che può essere origine di molte patologie se soggetto a disfunzioni. Infatti, è stato riportato che uno dei geni correlati al manifestarsi della schizofrenia è quello della pericentrina (Numata, Nakataki et al. 2010), una proteina necessaria per il corretto funzionamento dei centrosomi e le cui mutazioni si manifestano con difetti nella migrazione degli interneuroni (Endoh-Yamagami, Karkar et al. 2010). Inoltre, è interessante notare che polimorfismi del gene che codifica per la neuritina potrebbero essere coinvolti nelle disfunzioni cognitive alla base della schizofrenia (Chandler, Dragovic et al. 2010).

I tumori sono un altro gruppo di patologie per le quali le modificazioni della migrazione cellulare sono di basilare importanza. A questo riguardo, è stato osservato che l'espressione della neuritina risulta essere aumentata solo in alcuni tipi tumorali ed in particolare nelle aree perinecrotiche che circondano i tumori (Le Jan, Le Meur et al. 2006). Essa sembra essere coinvolta nella tumorigenesi promuovendo cambiamenti morfologici e crescita ancoraggio-indipendente (Raggio, Ruhl et al. 2005). Tuttavia il coinvolgimento della neuritina nell'insorgenza di tumori è molto dibattuto in quanto non tutti i tumori presentano un aumento d'espressione di questa proteina. Di particolare interesse è l'azione angiogenetica della neuritina. L'angiogenesi è una fase fondamentale per la formazione e sviluppo di un tumore, e prevede la migrazione delle cellule endoteliali, che danno luogo alla formazione di nuovi vasi. Molto recentemente è stato pubblicato un lavoro che supporta i nostri dati in cui si dimostra che la neuritina aumenta in modo dose-dipendente la migrazione delle cellule endoteliali HUVEC e la formazione di nuovi vasi (Han, Qin et al. 2011). Nello stesso lavoro viene anche riportato che la neuritina, nonostante abbia un ruolo angiogenetico, agisce come fattore sfavorente la tumorigenesi in quanto induce la formazione di vasi di calibro eccessivo e troppo ramificati.

Con il coinvolgimento in un processo quale la migrazione cellulare, la neuritina potrebbe diventare un promettente target terapeutico di condizioni patologiche in cui i processi di migrazione sono alla base delle alterazioni patologiche e quindi disturbi dello sviluppo embrionale, ma anche disordini mentali quali ritardo mentale, autismo, schizofrenia, forme severe di epilessia, ed anche alcune patologie tumorali.

8) BIBLIOGRAFIA

- Adachi, S., S. Yamada, et al. (2007). "Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats." *J Reprod Dev* **53**(2): 367-378.
- Adams, N. C., T. Tomoda, et al. (2002). "Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration." *Development* **129**(4): 965-972.
- Aizawa, H., S. C. Hu, et al. (2004). "Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator." *Science* **303**(5655): 197-202.
- Akten, B., M. J. Kye, et al. (2011). "Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cpg15 rescues motor neuron axonal deficits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(25): 10337-10342.
- Albuisson, J., C. Pecheux, et al. (2005). "Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2)." *Hum Mutat* **25**(1): 98-99.
- Alifragis, P., A. Liapi, et al. (2004). "Lhx6 regulates the migration of cortical interneurons from the ventral telencephalon but does not specify their GABA phenotype." *J Neurosci* **24**(24): 5643-5648.
- Amoss, M., R. Burgus, et al. (1971). "Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin." *Biochem Biophys Res Commun* **44**(1): 205-210.
- Andrews, W., M. Barber, et al. (2008). "The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and morphological differentiation of cortical interneurons." *Dev Biol* **313**(2): 648-658.
- Ang, E. S., Jr., T. F. Haydar, et al. (2003). "Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex." *J Neurosci* **23**(13): 5805-5815.
- Anton, E. S., J. A. Kreidberg, et al. (1999). "Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex." *Neuron* **22**(2): 277-289.
- Anton, E. S., M. A. Marchionni, et al. (1997). "Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex." *Development* **124**(18): 3501-3510.
- Arai, Y., S. Murakami, et al. (1994). "Removal of olfactory placode prevents the development of LHRH neurons in the forebrain of the chick embryo: possible interaction between migrating LHRH neurons and highly polysialylated form of neural cell adhesion molecule (NCAM-H)." *Acta Biol Hung* **45**(2-4): 155-168.
- Arnaud, L., B. A. Ballif, et al. (2003). "Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development." *Curr Biol* **13**(1): 9-17.
- Aumais, J. P., J. R. Tunstead, et al. (2001). "NudC associates with Lis1 and the dynein motor at the leading pole of neurons." *J Neurosci* **21**(24): RC187.
- Ballabio, A. and G. Camerino (1992). "The gene for X-linked Kallmann syndrome: a human neuronal migration defect." *Curr Opin Genet Dev* **2**(3): 417-421.
- Barres, B. A. (1991). "New roles for glia." *J Neurosci* **11**(12): 3685-3694.

- Beffert, U., E. J. Weeber, et al. (2004). "Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission." J Neurosci **24**(8): 1897-1906.
- Bellion, A., J. P. Baudoin, et al. (2005). "Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear." J Neurosci **25**(24): 5691-5699.
- Belsham, D. D., A. Evangelou, et al. (1998). "Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression by 5 α -dihydrotestosterone in GnRH-secreting GT1-7 hypothalamic neurons." Endocrinology **139**(3): 1108-1114.
- Bilban, M., N. Ghaffari-Tabrizi, et al. (2004). "Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1319-1328.
- Blaschke, A. J., K. Staley, et al. (1996). "Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex." Development **122**(4): 1165-1174.
- Bless, E., D. Raitcheva, et al. (2006). "Lactosamine modulates the rate of migration of GnRH neurons during mouse development." Eur J Neurosci **24**(3): 654-660.
- Bless, E. P., H. J. Walker, et al. (2005). "Live view of gonadotropin-releasing hormone containing neuron migration." Endocrinology **146**(1): 463-468.
- Bless, E. P., W. A. Westaway, et al. (2000). "Effects of gamma-aminobutyric acid(A) receptor manipulation on migrating gonadotropin-releasing hormone neurons through the entire migratory route in vivo and in vitro." Endocrinology **141**(3): 1254-1262.
- Bock, H. H. and J. Herz (2003). "Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons." Curr Biol **13**(1): 18-26.
- Borrell, V. and O. Marin (2006). "Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling." Nat Neurosci **9**(10): 1284-1293.
- Brailoiu, G. C., S. L. Dun, et al. (2005). "KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain." J Comp Neurol **481**(3): 314-329.
- Brothers, S. P., J. A. Janovick, et al. (2003). "Unexpected effects of epitope and chimeric tags on gonadotropin-releasing hormone receptors: implications for understanding the molecular etiology of hypogonadotropic hypogonadism." J Clin Endocrinol Metab **88**(12): 6107-6112.
- Buonanno, A. and G. D. Fischbach (2001). "Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 287-296.
- Butler, J. A., M. Sjöberg, et al. (1999). "Evidence for oestrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones." J Neuroendocrinol **11**(5): 331-335.
- Campbell, K. and M. Gotz (2002). "Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development." Trends Neurosci **25**(5): 235-238.
- Cantalops, I. and H. T. Cline (2008). "Rapid activity-dependent delivery of the neurotrophic protein CPG15 to the axon surface of neurons in intact *Xenopus* tadpoles." Dev Neurobiol **68**(6): 744-759.
- Cantalops, I., K. Haas, et al. (2000). "Postsynaptic CPG15 promotes synaptic maturation and presynaptic axon arbor elaboration in vivo." Nat Neurosci **3**(10): 1004-1011.

- Cappelletti, G., M. Galbiati, et al. (2007). "Neuritin (cpgl5) enhances the differentiating effect of NGF on neuronal PC12 cells." J Neurosci Res **85**(12): 2702-2713.
- Caraty, A., A. Locatelli, et al. (1989). "Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol." J Endocrinol **123**(3): 375-382.
- Cariboni, A., R. Maggi, et al. (2007). "From nose to fertility: the long migratory journey of gonadotropin-releasing hormone neurons." Trends Neurosci **30**(12): 638-644.
- Cariboni, A., F. Pimpinelli, et al. (2004). "The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons." Hum Mol Genet **13**(22): 2781-2791.
- Cariboni, A., S. Rakic, et al. (2005). "Reelin provides an inhibitory signal in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons." Development **132**(21): 4709-4718.
- Castellani, V., J. Falk, et al. (2004). "Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM." Mol Cell Neurosci **26**(1): 89-100.
- Catalano, P. N., M. M. Bonaventura, et al. (2005). "GABA(B1) knockout mice reveal alterations in prolactin levels, gonadotropic axis, and reproductive function." Neuroendocrinology **82**(5-6): 294-305.
- Catalano, P. N., N. Di Giorgio, et al. (2010). "Lack of functional GABA(B) receptors alters GnRH physiology and sexual dimorphic expression of GnRH and GAD-67 in the brain." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(3): E683-696.
- Caviness, V. S., Jr. and P. Rakic (1978). "Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice." Annu Rev Neurosci **1**: 297-326.
- Caviness, V. S., Jr., D. K. So, et al. (1972). "The hybrid reeler mouse." J Hered **63**(5): 241-246.
- Chandler, D., M. Dragovic, et al. (2010). "Impact of Neuritin 1 (NRN1) polymorphisms on fluid intelligence in schizophrenia." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **153B**(2): 428-437.
- Charest, P. G., S. Terrillon, et al. (2005). "Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET." EMBO Rep **6**(4): 334-340.
- Chawla, S., G. E. Hardingham, et al. (1998). "CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV." Science **281**(5382): 1505-1509.
- Chen, K. S., M. C. Nishimura, et al. (1997). "Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits." J Neurosci **17**(19): 7288-7296.
- Chen, M., T. J. Lu, et al. (2008). "Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance." Stroke **39**(11): 3042-3048.
- Chen, W. G., A. E. West, et al. (2003). "Upstream stimulatory factors are mediators of Ca²⁺-responsive transcription in neurons." J Neurosci **23**(7): 2572-2581.
- Cheng, G., L. M. Coolen, et al. (2010). "The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep." Endocrinology **151**(1): 301-311.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.

- Chongthammakun, S. and E. Terasawa (1993). "Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized female rhesus monkeys." Endocrinology **132**(2): 735-743.
- Cina, C., K. Maass, et al. (2009). "Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration." J Neurosci **29**(7): 2009-2021.
- Clarkson, J., X. d'Anglemont de Tassigny, et al. (2008). "Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge." J Neurosci **28**(35): 8691-8697.
- Cobos, I., U. Borello, et al. (2007). "Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth." Neuron **54**(6): 873-888.
- Corbin, J. G., S. Nery, et al. (2001). "Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain." Nat Neurosci **4 Suppl**: 1177-1182.
- Corriveau, R. A., C. J. Shatz, et al. (1999). "Dynamic regulation of cpgl5 during activity-dependent synaptic development in the mammalian visual system." J Neurosci **19**(18): 7999-8008.
- Crair, M. C., D. C. Gillespie, et al. (1998). "The role of visual experience in the development of columns in cat visual cortex." Science **279**(5350): 566-570.
- d'Anglemont de Tassigny, X., L. A. Fagg, et al. (2008). "Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals." Endocrinology **149**(8): 3926-3932.
- D'Arcangelo, G., R. Homayouni, et al. (1999). "Reelin is a ligand for lipoprotein receptors." Neuron **24**(2): 471-479.
- Dawe, A. L., K. A. Caldwell, et al. (2001). "Evolutionarily conserved nuclear migration genes required for early embryonic development in *Caenorhabditis elegans*." Dev Genes Evol **211**(8-9): 434-441.
- de la Iglesia, H. O. and W. J. Schwartz (2006). "Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis." Endocrinology **147**(3): 1148-1153.
- de Roux, N., J. Young, et al. (1997). "A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor." N Engl J Med **337**(22): 1597-1602.
- Deisseroth, K., H. Bitto, et al. (1996). "Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity." Neuron **16**(1): 89-101.
- Dent, E. W. and F. B. Gertler (2003). "Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance." Neuron **40**(2): 209-227.
- Dhavan, R. and L. H. Tsai (2001). "A decade of CDK5." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 749-759.
- Di Giovanni, S., A. I. Faden, et al. (2005). "Neuronal plasticity after spinal cord injury: identification of a gene cluster driving neurite outgrowth." FASEB J **19**(1): 153-154.
- Dode, C. and J. P. Hardelin (2004). "Kallmann syndrome: fibroblast growth factor signaling insufficiency?" J Mol Med (Berl) **82**(11): 725-734.
- Dolmetsch, R. E., U. Pajvani, et al. (2001). "Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway." Science **294**(5541): 333-339.
- Dulabon, L., E. C. Olson, et al. (2000). "Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration." Neuron **27**(1): 33-44.

- Edmondson, J. C., R. K. Liem, et al. (1988). "Astrotactin: a novel neuronal cell surface antigen that mediates neuron-astroglial interactions in cerebellar microcultures." J Cell Biol **106**(2): 505-517.
- El-Etr, M., Y. Akwa, et al. (2006). "The neuroactive steroid pregnenolone sulfate stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone from GT1-7 hypothalamic neurons, through N-methyl-D-aspartate receptors." Endocrinology **147**(6): 2737-2743.
- El-Etr, M., Y. Akwa, et al. (1995). "A progesterone metabolite stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone from GT1-1 hypothalamic neurons via the gamma-aminobutyric acid type A receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3769-3773.
- Elias, L. A., D. D. Wang, et al. (2007). "Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex." Nature **448**(7156): 901-907.
- Emanuele, N. V., J. Jurgens, et al. (1996). "The effect of castration on steady state levels of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) mRNA and proLHRH processing: time course study utilizing semi-quantitative reverse transcription/polymerase chain reaction." J Endocrinol **148**(3): 509-515.
- Endoh-Yamagami, S., K. M. Karkar, et al. (2010). "A mutation in the pericentrin gene causes abnormal interneuron migration to the olfactory bulb in mice." Dev Biol **340**(1): 41-53.
- Etienne-Manneville, S. (2010). "From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players." Curr Opin Cell Biol **22**(1): 104-111.
- Faivre-Sarrailh, C. and G. Rougon (1997). "Axonal molecules of the immunoglobulin superfamily bearing a GPI anchor: their role in controlling neurite outgrowth." Mol Cell Neurosci **9**(2): 109-115.
- Fernandez-Galaz, M. C., F. Naftolin, et al. (1999). "Phasic synaptic remodeling of the rat arcuate nucleus during the estrous cycle depends on insulin-like growth factor-I receptor activation." J Neurosci Res **55**(3): 286-292.
- Fishell, G. and M. E. Hatten (1991). "Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration." Development **113**(3): 755-765.
- Flames, N., J. E. Long, et al. (2004). "Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1." Neuron **44**(2): 251-261.
- Foulkes, N. S., E. Borrelli, et al. (1991). "CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription." Cell **64**(4): 739-749.
- Francis, F., A. Koulakoff, et al. (1999). "Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons." Neuron **23**(2): 247-256.
- Franco, B., S. Guioli, et al. (1991). "A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules." Nature **353**(6344): 529-536.
- Froes, M. M., A. H. Correia, et al. (1999). "Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7541-7546.
- Fueshko, S. M., S. Key, et al. (1998). "GABA inhibits migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in embryonic olfactory explants." J Neurosci **18**(7): 2560-2569.
- Fujino, T., W. C. Lee, et al. (2003). "Regulation of cp15 by signaling pathways that mediate synaptic plasticity." Mol Cell Neurosci **24**(3): 538-554.

- Fujino, T., Z. Wu, et al. (2008). "cpg15 and cpg15-2 constitute a family of activity-regulated ligands expressed differentially in the nervous system to promote neurite growth and neuronal survival." J Comp Neurol **507**(5): 1831-1845.
- Fuxe, K., A. Cintra, et al. (1987). "Studies on the cellular localization and distribution of glucocorticoid receptor and estrogen receptor immunoreactivity in the central nervous system of the rat and their relationship to the monoaminergic and peptidergic neurons of the brain." J Steroid Biochem **27**(1-3): 159-170.
- Gadient, R. A., K. C. Cron, et al. (1990). "Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes." Neurosci Lett **117**(3): 335-340.
- Galbiati, M., S. Saredi, et al. (2005). "Smad proteins are targets of transforming growth factor beta1 in immortalised gonadotrophin-releasing hormone releasing neurones." J Neuroendocrinol **17**(11): 753-760.
- Gamble, J. A., D. K. Karunadasa, et al. (2005). "Disruption of ephrin signaling associates with disordered axophilic migration of the gonadotropin-releasing hormone neurons." J Neurosci **25**(12): 3142-3150.
- Gaudilliere, B., Y. Konishi, et al. (2004). "A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis." Neuron **41**(2): 229-241.
- Georges-Labouesse, E., M. Mark, et al. (1998). "Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination." Curr Biol **8**(17): 983-986.
- Giacobini, P., C. Giampietro, et al. (2002). "Hepatocyte growth factor/scatter factor facilitates migration of GN-11 immortalized LHRH neurons." Endocrinology **143**(9): 3306-3315.
- Giacobini, P., A. S. Kopin, et al. (2004). "Cholecystokinin modulates migration of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons." J Neurosci **24**(20): 4737-4748.
- Giacobini, P., A. Messina, et al. (2008). "Semaphorin 4D regulates gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration through PlexinB1-Met complex." J Cell Biol **183**(3): 555-566.
- Giacobini, P. and S. Wray (2007). "Cholecystokinin directly inhibits neuronal activity of primary gonadotropin-releasing hormone cells through cholecystokinin-1 receptor." Endocrinology **148**(1): 63-71.
- Gleeson, J. G., P. T. Lin, et al. (1999). "Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons." Neuron **23**(2): 257-271.
- Gonzalez-Billault, C., J. A. Del Rio, et al. (2005). "A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration." Cereb Cortex **15**(8): 1134-1145.
- Good, D. J., F. D. Porter, et al. (1997). "Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the Nhlh2 gene." Nat Genet **15**(4): 397-401.
- Goodman, R. L., L. M. Coolen, et al. (2004). "Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep." Endocrinology **145**(6): 2959-2967.
- Gore, A. C., T. Oung, et al. (2002). "Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and N-methyl-D-aspartate receptor gene expression, and their regulation by oestrogen, in the female rat." J Neuroendocrinol **14**(4): 300-309.
- Gore, A. C. and J. L. Roberts (1995). "Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge." Endocrinology **136**(3): 889-896.
- Gore, A. C. and J. L. Roberts (1997). "Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro." Front Neuroendocrinol **18**(2): 209-245.

- Gottsch, M. L., M. J. Cunningham, et al. (2004). "A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse." Endocrinology **145**(9): 4073-4077.
- Guo, J., Z. Yang, et al. (2006). "Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly." Mol Biol Cell **17**(2): 680-689.
- Gupta, A., K. Sanada, et al. (2003). "Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glia interaction in radial migration." Nat Neurosci **6**(12): 1284-1291.
- Hallmayer, J. F., L. Kalaydjieva, et al. (2005). "Genetic evidence for a distinct subtype of schizophrenia characterized by pervasive cognitive deficit." Am J Hum Genet **77**(3): 468-476.
- Han, D., B. Qin, et al. (2011). "Characterization of neuritin as a novel angiogenic factor." Biochem Biophys Res Commun.
- Han, Y., X. Chen, et al. (2007). "CPG15, a new factor upregulated after ischemic brain injury, contributes to neuronal network re-establishment after glutamate-induced injury." J Neurotrauma **24**(4): 722-731.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-364.
- Hatten, M. E. (1990). "Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain." Trends Neurosci **13**(5): 179-184.
- Hatten, M. E. and C. A. Mason (1990). "Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo." Experientia **46**(9): 907-916.
- Hatton, G. I., L. S. Perlmutter, et al. (1984). "Dynamic neuronal-glia interactions in hypothalamus and pituitary: implications for control of hormone synthesis and release." Peptides **5 Suppl 1**: 121-138.
- Heger, S., M. Seney, et al. (2003). "Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in gonadotropin-releasing hormone neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice." Endocrinology **144**(6): 2566-2579.
- Helmlinger, G., P. A. Netti, et al. (1997). "Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids." Nat Biotechnol **15**(8): 778-783.
- Herbison, A. E. (1998). "Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons." Endocr Rev **19**(3): 302-330.
- Herbison, A. E., J. R. Pape, et al. (2001). "Molecular and cellular properties of GnRH neurons revealed through transgenics in the mouse." Mol Cell Endocrinol **185**(1-2): 185-194.
- Herbison, A. E., R. Porteous, et al. (2008). "Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility." Endocrinology **149**(2): 597-604.
- Herbison, A. E., D. C. Skinner, et al. (1996). "Androgen receptor-immunoreactive cells in ram hypothalamus: distribution and co-localization patterns with gonadotropin-releasing hormone, somatostatin and tyrosine hydroxylase." Neuroendocrinology **63**(2): 120-131.
- Hevroni, D., A. Rattner, et al. (1998). "Hippocampal plasticity involves extensive gene induction and multiple cellular mechanisms." J Mol Neurosci **10**(2): 75-98.
- Hiesberger, T., M. Trommsdorff, et al. (1999). "Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation." Neuron **24**(2): 481-489.

- Ho, N., J. A. Liauw, et al. (2000). "Impaired synaptic plasticity and cAMP response element-binding protein activation in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV/Gr-deficient mice." J Neurosci **20**(17): 6459-6472.
- Hook, S. S. and A. R. Means (2001). "Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 471-505.
- Horesh, D., T. Sapir, et al. (1999). "Doublecortin, a stabilizer of microtubules." Hum Mol Genet **8**(9): 1599-1610.
- Howell, B. W., T. M. Herrick, et al. (1999). "Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning." Genes Dev **13**(6): 643-648.
- Howell, B. W., T. M. Herrick, et al. (2000). "Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development." Curr Biol **10**(15): 877-885.
- Hrabovszky, E., P. J. Shughrue, et al. (2000). "Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain." Endocrinology **141**(9): 3506-3509.
- Huang, X. and R. E. Harlan (1993). "Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons." Brain Res **624**(1-2): 309-311.
- Husi, H., M. A. Ward, et al. (2000). "Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes." Nat Neurosci **3**(7): 661-669.
- Ieraci, A., P. E. Forni, et al. (2002). "Viable hypomorphic signaling mutant of the Met receptor reveals a role for hepatocyte growth factor in postnatal cerebellar development." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 15200-15205.
- Impey, S., A. L. Fong, et al. (2002). "Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV." Neuron **34**(2): 235-244.
- Impey, S., K. Obrietan, et al. (1998). "Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation." Neuron **21**(4): 869-883.
- Jarry, H., S. Leonhardt, et al. (1991). "Gamma-aminobutyric acid neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats." Neuroendocrinology **53**(3): 261-267.
- Javaherian, A. and H. T. Cline (2005). "Coordinated motor neuron axon growth and neuromuscular synaptogenesis are promoted by CPG15 in vivo." Neuron **45**(4): 505-512.
- Jimenez-Linan, M. and B. S. Rubin (2001). "Dynamic changes in luteinizing hormone releasing hormone transcriptional activity are associated with the steroid-induced LH surge." Brain Res **922**(1): 71-79.
- Kallo, I., J. A. Butler, et al. (2001). "Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen." J Neuroendocrinol **13**(9): 741-748.
- Kalra, S. P. and P. S. Kalra (1989). "Do testosterone and estradiol-17 beta enforce inhibition or stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion?" Biol Reprod **41**(4): 559-570.
- Kappeler, C., Y. Saillour, et al. (2006). "Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice." Hum Mol Genet **15**(9): 1387-1400.

- Karamoysoyli, E., R. C. Burnand, et al. (2008). "Neuritin mediates nerve growth factor-induced axonal regeneration and is deficient in experimental diabetic neuropathy." *Diabetes* **57**(1): 181-189.
- Karges, B., W. Karges, et al. (2003). "Mutation Ala(171)Thr stabilizes the gonadotropin-releasing hormone receptor in its inactive conformation, causing familial hypogonadotropic hypogonadism." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(4): 1873-1879.
- Kaur, G., P. K. Heera, et al. (2002). "Neuroendocrine plasticity in GnRH release during rat estrous cycle: correlation with molecular markers of synaptic remodeling." *Brain Res* **954**(1): 21-31.
- Kawauchi, T., K. Chihama, et al. (2006). "Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration." *Nat Cell Biol* **8**(1): 17-26.
- Kawauchi, T., K. Chihama, et al. (2005). "MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK." *Biochem Biophys Res Commun* **331**(1): 50-55.
- Keen, K. L., F. H. Wegner, et al. (2008). "An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo." *Endocrinology* **149**(8): 4151-4157.
- Kelly, M. J., J. Garrett, et al. (1989). "Effects of ovariectomy on GnRH mRNA, proGnRH and GnRH levels in the preoptic hypothalamus of the female rat." *Neuroendocrinology* **49**(1): 88-97.
- Kennedy, M. J. and M. D. Ehlers (2006). "Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* **29**: 325-362.
- Khadra, A. and Y. X. Li (2006). "A model for the pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone from synchronized hypothalamic neurons." *Biophys J* **91**(1): 74-83.
- Kim, K., B. J. Lee, et al. (1989). "Progesterone increases messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) level in the hypothalamus of ovariectomized estradiol-primed prepubertal rats." *Brain Res Mol Brain Res* **6**(2-3): 151-158.
- King, J. C. and R. J. Letourneau (1994). "Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis." *Endocrinology* **134**(3): 1340-1351.
- King, J. C. and B. S. Rubin (1995). "Dynamic alterations in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal cell bodies and terminals of adult rats." *Cell Mol Neurobiol* **15**(1): 89-106.
- Kojima, N., N. Shiojiri, et al. (2005). "Expression of neuritin during liver maturation and regeneration." *FEBS Lett* **579**(21): 4562-4566.
- Kramer, P. R. and S. Wray (2000). "Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons." *Genes Dev* **14**(14): 1824-1834.
- Kriegstein, A. R. and S. C. Noctor (2004). "Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex." *Trends Neurosci* **27**(7): 392-399.
- Krsmanovic, L. Z., N. Mores, et al. (2003). "An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2969-2974.

- Kuan, C. Y., R. A. Flavell, et al. (2000). "Programmed cell death in mouse brain development." Results Probl Cell Differ **30**: 145-162.
- Kuida, K., T. S. Zheng, et al. (1996). "Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice." Nature **384**(6607): 368-372.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, et al. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-5930.
- Lamb, D. J., N. L. Weigel, et al. (2001). "Androgen receptors and their biology." Vitam Horm **62**: 199-230.
- Lavdas, A. A., M. Grigoriou, et al. (1999). "The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex." J Neurosci **19**(18): 7881-7888.
- Le Jan, S., N. Le Meur, et al. (2006). "Characterization of the expression of the hypoxia-induced genes neuritin, TXNIP and IGFBP3 in cancer." FEBS Lett **580**(14): 3395-3400.
- Lee, J. H., M. E. Miele, et al. (1996). "KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene." J Natl Cancer Inst **88**(23): 1731-1737.
- Lee, J. H. and D. R. Welch (1997). "Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1." Cancer Res **57**(12): 2384-2387.
- Lee, J. M., J. Tiong, et al. (2008). "Temporal migration of gonadotrophin-releasing hormone-1 neurones is modified in GAD67 knockout mice." J Neuroendocrinol **20**(1): 93-103.
- Lee, W. C. and E. Nedivi (2002). "Extended plasticity of visual cortex in dark-reared animals may result from prolonged expression of cpq15-like genes." J Neurosci **22**(5): 1807-1815.
- Leranth, C., N. J. MacLusky, et al. (1992). "Transmitter content and afferent connections of estrogen-sensitive progesterin receptor-containing neurons in the primate hypothalamus." Neuroendocrinology **55**(6): 667-682.
- Lewis, C. M., D. F. Levinson, et al. (2003). "Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia." Am J Hum Genet **73**(1): 34-48.
- Li, B. S., L. Zhang, et al. (2000). "Integrin alpha(1) beta(1)-mediated activation of cyclin-dependent kinase 5 activity is involved in neurite outgrowth and human neurofilament protein H Lys-Ser-Pro tail domain phosphorylation." J Neurosci **20**(16): 6055-6062.
- Li, G., H. Adesnik, et al. (2008). "Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling." J Neurosci **28**(5): 1085-1098.
- Lin, A. C. and C. E. Holt (2007). "Local translation and directional steering in axons." EMBO J **26**(16): 3729-3736.
- Lin, R. C. and R. H. Scheller (2000). "Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 19-49.
- Liu, J., K. Solway, et al. (1998). "Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils." J Neurosci **18**(19): 7768-7778.
- Long, K. E., H. Asou, et al. (2001). "The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion." J Biol Chem **276**(2): 1285-1290.
- Loo, D. T., S. B. Kanner, et al. (1998). "Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction." J Biol Chem **273**(36): 23304-23312.

- LoPachin, R. M., Jr. and M. Aschner (1993). "Glial-neuronal interactions: relevance to neurotoxic mechanisms." Toxicol Appl Pharmacol **118**(2): 141-158.
- Lopez-Bendito, G., A. Cautinat, et al. (2006). "Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation." Cell **125**(1): 127-142.
- Maggi, R., F. Pimpinelli, et al. (2000). "Immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons show a different migratory activity in vitro." Endocrinology **141**(6): 2105-2112.
- Mahesh, V. B. and D. W. Brann (1998). "Neuroendocrine mechanisms underlying the control of gonadotropin secretion by steroids." Steroids **63**(5-6): 252-256.
- Malik, K. F., A. J. Silverman, et al. (1991). "Gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat: distribution and neuronal content over the estrous cycle and after castration of males." Anat Rec **231**(4): 457-466.
- Malyala, A., M. J. Kelly, et al. (2005). "Estrogen modulation of hypothalamic neurons: Activation of multiple signaling pathways and gene expression changes." Steroids **70**(5-7): 397-406.
- Marin, O., A. S. Plump, et al. (2003). "Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction." Development **130**(9): 1889-1901.
- Marin, O. and J. L. Rubenstein (2001). "A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon." Nat Rev Neurosci **2**(11): 780-790.
- Marin, O. and J. L. Rubenstein (2003). "Cell migration in the forebrain." Annu Rev Neurosci **26**: 441-483.
- Marin, O., M. Valiente, et al. (2010). "Guiding neuronal cell migrations." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(2): a001834.
- Marks, D. L., K. L. Lent, et al. (1994). "Activation-dependent regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat." Endocrinology **134**(5): 1991-1998.
- Marron, T. U., V. Guerini, et al. (2005). "Androgen-induced neurite outgrowth is mediated by neuritin in motor neurones." J Neurochem **92**(1): 10-20.
- Martin, D. L. (1992). "Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells." Glia **5**(2): 81-94.
- Martini, F. J., M. Valiente, et al. (2009). "Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration." Development **136**(1): 41-50.
- Matsumoto, S., C. Yamazaki, et al. (2006). "Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4140-4145.
- Matsuo, H., Y. Baba, et al. (1971). "Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence." Biochem Biophys Res Commun **43**(6): 1334-1339.
- McCann, S. M. and H. M. Friedman (1960). "The effect of hypothalamic lesions on the secretion of luteotrophin." Endocrinology **67**: 597-608.
- Melcangi, R. C., L. Martini, et al. (2002). "Growth factors and steroid hormones: a complex interplay in the hypothalamic control of reproductive functions." Prog Neurobiol **67**(6): 421-449.
- Mellon, P. L., J. J. Windle, et al. (1990). "Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis." Neuron **5**(1): 1-10.

- Mesngon, M. T., C. Tarricone, et al. (2006). "Regulation of cytoplasmic dynein ATPase by Lis1." J Neurosci **26**(7): 2132-2139.
- Messenger, S., E. E. Chatzidaki, et al. (2005). "Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1761-1766.
- Metin, C., J. P. Baudoin, et al. (2006). "Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons." Eur J Neurosci **23**(4): 894-900.
- Metz, H. and S. Wray (2010). "Use of mutant mouse lines to investigate origin of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons: lineage independent of the adenohypophysis." Endocrinology **151**(2): 766-773.
- Miller, N. L., R. Wevrick, et al. (2009). "Necdin, a Prader-Willi syndrome candidate gene, regulates gonadotropin-releasing hormone neurons during development." Hum Mol Genet **18**(2): 248-260.
- Miyata, T., A. Kawaguchi, et al. (2001). "Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons." Neuron **31**(5): 727-741.
- Miyata, T. and M. Ogawa (2007). "Twisting of neocortical progenitor cells underlies a spring-like mechanism for daughter-cell migration." Curr Biol **17**(2): 146-151.
- Monnier, C., C. Dode, et al. (2009). "PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity." Hum Mol Genet **18**(1): 75-81.
- Mosselman, S., J. Polman, et al. (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." FEBS Lett **392**(1): 49-53.
- Muir, A. I., L. Chamberlain, et al. (2001). "AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1." J Biol Chem **276**(31): 28969-28975.
- Murakami, S. and Y. Arai (2002). "Migration of LHRH neurons into the spinal cord: evidence for axon-dependent migration from the transplanted chick olfactory placode." Eur J Neurosci **16**(4): 684-692.
- Murphy, T. H., P. F. Worley, et al. (1991). "L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes." Neuron **7**(4): 625-635.
- Nadarajah, B. and J. G. Parnavelas (2002). "Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex." Nat Rev Neurosci **3**(6): 423-432.
- Naeve, G. S., M. Ramakrishnan, et al. (1997). "Neuritin: a gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neuritogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2648-2653.
- Nasrallah, I. M., M. F. McManus, et al. (2006). "Analysis of non-radial interneuron migration dynamics and its disruption in Lis1^{+/-} mice." J Comp Neurol **496**(6): 847-858.
- Neddens, J. and A. Buonanno (2010). "Selective populations of hippocampal interneurons express ErbB4 and their number and distribution is altered in ErbB4 knockout mice." Hippocampus **20**(6): 724-744.
- Nedergaard, M. (1994). "Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells." Science **263**(5154): 1768-1771.
- Nedivi, E., S. Fieldust, et al. (1996). "A set of genes expressed in response to light in the adult cerebral cortex and regulated during development." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 2048-2053.
- Nedivi, E., D. Hevroni, et al. (1993). "Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning." Nature **363**(6431): 718-722.
- Nedivi, E., A. Javaherian, et al. (2001). "Developmental regulation of CPG15 expression in Xenopus." J Comp Neurol **435**(4): 464-473.

- Nedivi, E., G. Y. Wu, et al. (1998). "Promotion of dendritic growth by CPG15, an activity-induced signaling molecule." *Science* **281**(5384): 1863-1866.
- Ng, K. L., J. D. Li, et al. (2005). "Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling." *Science* **308**(5730): 1923-1927.
- Nikolic, M., M. M. Chou, et al. (1998). "The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity." *Nature* **395**(6698): 194-198.
- Nobrega-Pereira, S., N. Kessaris, et al. (2008). "Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors." *Neuron* **59**(5): 733-745.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, et al. (2001). "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex." *Nature* **409**(6821): 714-720.
- Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, et al. (2004). "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases." *Nat Neurosci* **7**(2): 136-144.
- Numata, S., M. Nakataki, et al. (2010). "Association study between the pericentrin (PCNT) gene and schizophrenia." *Neuromolecular Med* **12**(3): 243-247.
- Ojeda, S. R. and Y. J. Ma (1999). "Glial-neuronal interactions in the neuroendocrine control of mammalian puberty: facilitatory effects of gonadal steroids." *J Neurobiol* **40**(4): 528-540.
- Okada, T., K. Keino-Masu, et al. (2007). "Migration and nucleogenesis of mouse precerebellar neurons visualized by in utero electroporation of a green fluorescent protein gene." *Neurosci Res* **57**(1): 40-49.
- Pandithage, R., R. Lilischkis, et al. (2008). "The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility." *J Cell Biol* **180**(5): 915-929.
- Pandya, N. M., N. S. Dhalla, et al. (2006). "Angiogenesis--a new target for future therapy." *Vascul Pharmacol* **44**(5): 265-274.
- Park, O. K. and V. D. Ramirez (1989). "Spontaneous changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measured with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in the same female rats." *Neuroendocrinology* **50**(1): 66-72.
- Park, Y., S. D. Park, et al. (1988). "Testosterone stimulates LH-RH-like mRNA level in the rat hypothalamus." *Brain Res* **451**(1-2): 255-260.
- Petersen, S. L., S. McCrone, et al. (1995). "Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels: consideration of temporal and neuroanatomical variables." *Endocrinology* **136**(8): 3604-3610.
- Peterson, B. Z., C. D. DeMaria, et al. (1999). "Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels." *Neuron* **22**(3): 549-558.
- Petridis, A. K. and A. El Maarouf (2011). "Brain-derived neurotrophic factor levels influence the balance of migration and differentiation of subventricular zone cells, but not guidance to the olfactory bulb." *J Clin Neurosci* **18**(2): 265-270.
- Pfaff, D. and M. Keiner (1973). "Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat." *J Comp Neurol* **151**(2): 121-158.
- Pierce, A., B. Bliesner, et al. (2008). "Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration." *Mol Endocrinol* **22**(11): 2481-2495.
- Pimpinelli, F., E. Redaelli, et al. (2003). "Depolarization differentially affects the secretory and migratory properties of two cell lines of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons." *Eur J Neurosci* **18**(6): 1410-1418.

- Ping, L., V. B. Mahesh, et al. (1994). "Release of glutamate and aspartate from the preoptic area during the progesterone-induced LH surge: in vivo microdialysis studies." Neuroendocrinology **59**(4): 318-324.
- Piper, M., S. Salih, et al. (2005). "Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation." Nat Neurosci **8**(2): 179-186.
- Pitteloud, N., P. A. Boepple, et al. (2001). "The fertile eunuch variant of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: spontaneous reversal associated with a homozygous mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor." J Clin Endocrinol Metab **86**(6): 2470-2475.
- Pitteloud, N., R. Quinton, et al. (2007). "Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism." J Clin Invest **117**(2): 457-463.
- Poletti, A. (2004). "The poly glutamine tract of androgen receptor: from functions to dysfunctions in motor neurons." Front Neuroendocrinol **25**(1): 1-26.
- Poletti, A., R. C. Melcangi, et al. (1994). "Steroid binding and metabolism in the luteinizing hormone-releasing hormone-producing neuronal cell line GT1-1." Endocrinology **135**(6): 2623-2628.
- Polleux, F., K. L. Whitford, et al. (2002). "Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling." Development **129**(13): 3147-3160.
- Porkka-Heiskanen, T., J. H. Urban, et al. (1994). "Gene expression in a subpopulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons prior to the preovulatory gonadotropin surge." J Neurosci **14**(9): 5548-5558.
- Pozas, E. and C. F. Ibanez (2005). "GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons." Neuron **45**(5): 701-713.
- Pralong, F. P., F. Gomez, et al. (1999). "Complete hypogonadotropic hypogonadism associated with a novel inactivating mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor." J Clin Endocrinol Metab **84**(10): 3811-3816.
- Prevot, V., D. Croix, et al. (1999). "Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release." Neuroscience **94**(3): 809-819.
- Putz, U., C. Harwell, et al. (2005). "Soluble CPG15 expressed during early development rescues cortical progenitors from apoptosis." Nat Neurosci **8**(3): 322-331.
- Quaynor, S., L. Hu, et al. (2007). "Expression of a functional G protein-coupled receptor 54-kisspeptin autoregulatory system in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons." Mol Endocrinol **21**(12): 3062-3070.
- Radovick, S., S. Wray, et al. (1991). "Migratory arrest of gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3402-3406.
- Radovick, S., S. Wray, et al. (1994). "Steroid hormone regulation and tissue-specific expression of the human GnRH gene in cell culture and transgenic animals." Horm Behav **28**(4): 520-529.
- Raggio, C., R. Ruhl, et al. (2005). "Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." Cancer Res **65**(12): 5084-5095.
- Rajadhyaksha, A., A. Barczak, et al. (1999). "L-Type Ca(2+) channels are essential for glutamate-mediated CREB phosphorylation and c-fos gene expression in striatal neurons." J Neurosci **19**(15): 6348-6359.

- Rakic, P. (1972). "Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex." J Comp Neurol **145**(1): 61-83.
- Rakic, P. (1990). "Principles of neural cell migration." Experientia **46**(9): 882-891.
- Rakic, P. (1995). "A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution." Trends Neurosci **18**(9): 383-388.
- Rakic, P. (2007). "The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering." Brain Res Rev **55**(2): 204-219.
- Ramaswamy, S., K. A. Guerriero, et al. (2008). "Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy." Endocrinology **149**(9): 4387-4395.
- Ramirez, V. D., D. Dluzen, et al. (1980). "Progesterone administration in vivo stimulates release of luteinizing hormone-releasing hormone in vitro." Science **208**(4447): 1037-1039.
- Rivas, R. J. and M. E. Hatten (1995). "Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons." J Neurosci **15**(2): 981-989.
- Roberts, J. L., C. M. Dutlow, et al. (1989). "Estradiol stimulates preoptic area-anterior hypothalamic proGnRH-GAP gene expression in ovariectomized rats." Brain Res Mol Brain Res **6**(2-3): 127-134.
- Rocheville, M., D. C. Lange, et al. (2000). "Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity." Science **288**(5463): 154-157.
- Roth, K. A., C. Kuan, et al. (2000). "Epistatic and independent functions of caspase-3 and Bcl-X(L) in developmental programmed cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 466-471.
- Rugarli, E. I., E. Di Schiavi, et al. (2002). "The Kallmann syndrome gene homolog in *C. elegans* is involved in epidermal morphogenesis and neurite branching." Development **129**(5): 1283-1294.
- Saffen, D. W., A. J. Cole, et al. (1988). "Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(20): 7795-7799.
- Sagrillo, C. A., D. R. Grattan, et al. (1996). "Hormonal and neurotransmitter regulation of GnRH gene expression and related reproductive behaviors." Behav Genet **26**(3): 241-277.
- Sapir, T., M. Elbaum, et al. (1997). "Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit." EMBO J **16**(23): 6977-6984.
- Sapir, T., A. Shmueli, et al. (2008). "Antagonistic effects of doublecortin and MARK2/Par-1 in the developing cerebral cortex." J Neurosci **28**(48): 13008-13013.
- Sasaki, S., A. Shionoya, et al. (2000). "A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system." Neuron **28**(3): 681-696.
- Sawada, M., N. Kondo, et al. (1989). "Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture." Brain Res **491**(2): 394-397.
- Schaar, B. T. and S. K. McConnell (2005). "Cytoskeletal coordination during neuronal migration." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(38): 13652-13657.
- Schmid, R. S., R. Jo, et al. (2005). "Reelin, integrin and DAB1 interactions during embryonic cerebral cortical development." Cereb Cortex **15**(10): 1632-1636.

- Schmid, R. S., S. Shelton, et al. (2004). "alpha3beta1 integrin modulates neuronal migration and placement during early stages of cerebral cortical development." Development **131**(24): 6023-6031.
- Schwanzel-Fukuda, M. and D. W. Pfaff (1989). "Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons." Nature **338**(6211): 161-164.
- Schwartz, M. L., P. Rakic, et al. (1991). "Early phenotype expression of cortical neurons: evidence that a subclass of migrating neurons have callosal axons." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(4): 1354-1358.
- Seeburg, P. H. and J. P. Adelman (1984). "Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone." Nature **311**(5987): 666-668.
- Segarra, J., L. Balenci, et al. (2006). "Combined signaling through ERK, PI3K/AKT, and RAC1/p38 is required for met-triggered cortical neuron migration." J Biol Chem **281**(8): 4771-4778.
- Semenza, G. L. (1998). "Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis." Curr Opin Genet Dev **8**(5): 588-594.
- Seminara, S. B., F. J. Hayes, et al. (1998). "Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations." Endocr Rev **19**(5): 521-539.
- Seminara, S. B., S. Messenger, et al. (2003). "The GPR54 gene as a regulator of puberty." N Engl J Med **349**(17): 1614-1627.
- Seong, J. Y., Y. K. Lee, et al. (1993). "NMDA receptor antagonist decreases the progesterone-induced increase in GnRH gene expression in the rat hypothalamus." Neuroendocrinology **58**(2): 234-239.
- Sheng, M. and M. E. Greenberg (1990). "The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system." Neuron **4**(4): 477-485.
- Shieh, P. B., S. C. Hu, et al. (1998). "Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression." Neuron **20**(4): 727-740.
- Shivers, B. D., R. E. Harlan, et al. (1983). "Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones." Nature **304**(5924): 345-347.
- Shu, T., R. Ayala, et al. (2004). "Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning." Neuron **44**(2): 263-277.
- Silverman, A. J. and J. W. Witkin (1994). "Biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle: a cellular analysis." Neuroendocrinology **59**(6): 545-551.
- Sim, J. A., M. J. Skynner, et al. (2001). "Direct regulation of postnatal GnRH neurons by the progesterone derivative allopregnanolone in the mouse." Endocrinology **142**(10): 4448-4453.
- Skynner, M. J., J. A. Sim, et al. (1999). "Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons." Endocrinology **140**(11): 5195-5201.
- Sliwowska, J. H., H. J. Billings, et al. (2006). "Immunocytochemical colocalization of GABA-B receptor subunits in gonadotropin-releasing hormone neurons of the sheep." Neuroscience **141**(1): 311-319.
- Smith, D. S., M. Niethammer, et al. (2000). "Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1." Nat Cell Biol **2**(11): 767-775.

- Smith, J. T., D. K. Clifton, et al. (2006). "Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling." Reproduction **131**(4): 623-630.
- Smith, J. T., M. J. Cunningham, et al. (2005). "Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse." Endocrinology **146**(9): 3686-3692.
- Smith, J. T., H. M. Dungan, et al. (2005). "Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse." Endocrinology **146**(7): 2976-2984.
- Smith, J. T., Q. Li, et al. (2009). "Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge." Endocrinology **150**(12): 5530-5538.
- Smith, J. T., S. M. Popa, et al. (2006). "Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge." J Neurosci **26**(25): 6687-6694.
- Smith, J. T., A. Rao, et al. (2008). "Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo." Endocrinology **149**(4): 1951-1959.
- Soderling, T. R., B. Chang, et al. (2001). "Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." J Biol Chem **276**(6): 3719-3722.
- Soderlund, D., P. Canto, et al. (2001). "A novel homozygous mutation in the second transmembrane domain of the gonadotrophin releasing hormone receptor gene." Clin Endocrinol (Oxf) **54**(4): 493-498.
- Solecki, D. J., L. Model, et al. (2004). "Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration." Nat Neurosci **7**(11): 1195-1203.
- Spratt, D. P. and A. E. Herbison (1997). "Regulation of preoptic area gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) mRNA expression by gonadal steroids in the long-term gonadectomized male rat." Brain Res Mol Brain Res **47**(1-2): 125-133.
- Stafford, L. J., C. Xia, et al. (2002). "Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor." Cancer Res **62**(19): 5399-5404.
- Stitt, T. N. and M. E. Hatten (1990). "Antibodies that recognize astrotactin block granule neuron binding to astroglia." Neuron **5**(5): 639-649.
- Sukhatme, V. P., X. M. Cao, et al. (1988). "A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization." Cell **53**(1): 37-43.
- Tabata, H. and K. Nakajima (2003). "Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex." J Neurosci **23**(31): 9996-10001.
- Tanaka, T., F. F. Serneo, et al. (2004). "Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration." J Cell Biol **165**(5): 709-721.
- Tao, X., S. Finkbeiner, et al. (1998). "Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism." Neuron **20**(4): 709-726.
- Tao, X., A. E. West, et al. (2002). "A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF." Neuron **33**(3): 383-395.

- Temple, J. L., R. P. Millar, et al. (2003). "An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior." Endocrinology **144**(1): 13-19.
- Thomaidou, D., M. C. Mione, et al. (1997). "Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex." J Neurosci **17**(3): 1075-1085.
- Tiveron, M. C., M. Rossel, et al. (2006). "Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone." J Neurosci **26**(51): 13273-13278.
- Tobet, S. A., T. W. Chickering, et al. (1996). "Expression of gamma-aminobutyric acid and gonadotropin-releasing hormone during neuronal migration through the olfactory system." Endocrinology **137**(12): 5415-5420.
- Todman, M. G., S. K. Han, et al. (2005). "Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays." Neuroscience **132**(3): 703-712.
- Toranzo, D., E. Dupont, et al. (1989). "Regulation of pro-gonadotropin-releasing hormone gene expression by sex steroids in the brain of male and female rats." Mol Endocrinol **3**(11): 1748-1756.
- Tran, A. D., T. P. Marmo, et al. (2007). "HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions." J Cell Sci **120**(Pt 8): 1469-1479.
- Tsai, L. H. and J. G. Gleeson (2005). "Nucleokinesis in neuronal migration." Neuron **46**(3): 383-388.
- Tsui-Pierchala, B. A., M. Encinas, et al. (2002). "Lipid rafts in neuronal signaling and function." Trends Neurosci **25**(8): 412-417.
- Ulloa-Aguirre, A., J. A. Janovick, et al. (2003). "Misrouted cell surface receptors as a novel disease aetiology and potential therapeutic target: the case of hypogonadotropic hypogonadism due to gonadotropin-releasing hormone resistance." Expert Opin Ther Targets **7**(2): 175-185.
- Vijayan, E., W. K. Samson, et al. (1979). "In vivo and in vitro effects of cholecystokinin on gonadotropin, prolactin, growth hormone and thyrotropin release in the rat." Brain Res **172**(2): 295-302.
- Wada, K., L. Hu, et al. (2006). "Serotonin (5-HT) receptor subtypes mediate specific modes of 5-HT-induced signaling and regulation of neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons." Mol Endocrinol **20**(1): 125-135.
- Wang, X., P. Mercier, et al. (2005). "Effects of Phe-to-Trp mutation and fluorotryptophan incorporation on the solution structure of cardiac troponin C, and analysis of its suitability as a potential probe for in situ NMR studies." Protein Sci **14**(9): 2447-2460.
- Ward, M. E., H. Jiang, et al. (2005). "Regulated formation and selection of neuronal processes underlie directional guidance of neuronal migration." Mol Cell Neurosci **30**(3): 378-387.
- Watson, R. E., Jr., M. C. Langub, Jr., et al. (1995). "Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region." Brain Res **689**(2): 254-264.
- Westermann, S. and K. Weber (2003). "Post-translational modifications regulate microtubule function." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 938-947.
- White, R. B., J. A. Eisen, et al. (1998). "Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 305-309.

- Wichterle, H., M. Alvarez-Dolado, et al. (2003). "Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(2): 727-732.
- Wichterle, H., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1997). "Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration." Neuron **18**(5): 779-791.
- Wiegand, S. J. and J. L. Price (1980). "Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat." J Comp Neurol **192**(1): 1-19.
- Wiegand, S. J. and E. Terasawa (1982). "Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat." Neuroendocrinology **34**(6): 395-404.
- Wierman, M. E., K. Kiseljak-Vassiliades, et al. (2011). "Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function." Front Neuroendocrinol **32**(1): 43-52.
- Wilson, J. D., J. E. Griffin, et al. (1993). "Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency." Endocr Rev **14**(5): 577-593.
- Wintermantel, T. M., R. E. Campbell, et al. (2006). "Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility." Neuron **52**(2): 271-280.
- Witkin, J. W. (1996). "Effects of ovariectomy on GnRH neuronal morphology in rhesus monkey (*Macaca mulatta*)." J Neuroendocrinol **8**(8): 601-604.
- Witkin, J. W., M. Ferin, et al. (1991). "Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition." Endocrinology **129**(2): 1083-1092.
- Worley, P. F., B. A. Christy, et al. (1991). "Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(12): 5106-5110.
- Worley, P. F., A. J. Cole, et al. (1990). "Regulation of immediate early genes in brain: role of NMDA receptor activation." Prog Brain Res **86**: 277-285.
- Wray, S. (2002). "Molecular mechanisms for migration of placodally derived GnRH neurons." Chem Senses **27**(6): 569-572.
- Wray, S. (2010). "From nose to brain: development of gonadotrophin-releasing hormone-1 neurones." J Neuroendocrinol **22**(7): 743-753.
- Wray, S. and H. Gainer (1987). "Effect of neonatal gonadectomy on the postnatal development of LHRH cell subtypes in male and female rats." Neuroendocrinology **45**(5): 413-419.
- Wray, S., P. Grant, et al. (1989). "Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(20): 8132-8136.
- Xia, L., D. Van Vugt, et al. (1992). "A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey." Endocrinology **131**(6): 2812-2820.
- Xie, Z., K. Sanada, et al. (2003). "Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration." Cell **114**(4): 469-482.
- Xu, N., B. Bhagavath, et al. (2010). "NELF is a nuclear protein involved in hypothalamic GnRH neuronal migration." Mol Cell Endocrinol **319**(1-2): 47-55.

- Yau, L., B. Litchie, et al. (2003). "Endogenous mono-ADP-ribosylation mediates smooth muscle cell proliferation and migration via protein kinase N-dependent induction of c-fos expression." Eur J Biochem **270**(1): 101-110.
- Yee, K. T., H. H. Simon, et al. (1999). "Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1." Neuron **24**(3): 607-622.
- Yeh, S. and C. Chang (1996). "Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5517-5521.
- Yokota, Y., H. T. Gashghaei, et al. (2007). "Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex." PLoS One **2**(8): e794.
- Yoshida, K., U. Rutishauser, et al. (1999). "Polysialic acid facilitates migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons on vomeronasal axons." J Neurosci **19**(2): 794-801.
- Yoshida, K., S. A. Tobet, et al. (1995). "The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve." J Neurosci **15**(12): 7769-7777.
- Zanaria, E., F. Muscatelli, et al. (1994). "An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita." Nature **372**(6507): 635-641.
- Zanisi, M., M. Galbiati, et al. (1994). "The anterior pituitary gland as a possible site of action of kainic acid." Proc Soc Exp Biol Med **206**(4): 431-437.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, et al. (1999). "Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels." Nature **399**(6732): 159-162.