



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN:

"SCIENZE BIOMEDICHE ENDOCRINOLOGICHE E
NEUROFISIOLOGICHE"

CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Alessandro Martini

**ANALISI DEL DIFFERENZIAMENTO NEURONALE
INDOTTO DALL'ACIDO RETINOICO IN CELLULE DI
TERATOCARCINOMA EMBRIONALE MURINO.**

Settore Scientifico Disciplinare MED/32

Dottorando

Dott. Beggiato Sarah

Tutore

Prof. Martini Alessandro

Anni 2006/2008

1. INTRODUZIONE

La sordità rappresenta un serio problema medico e sociale che colpisce oltre il 10% della popolazione, causando danni e cambiamenti nello sviluppo del linguaggio e della comunicazione anche nell'età infantile ed in quella giovanile.

Le più frequenti perdite dell'udito (85%) sono causate da danni alle cellule della coclea nell'orecchio interno, si parla in questi casi di danno di tipo neurosensoriale. La perdita di cellule ciliate dell'organo del Corti o delle fibre nervose ad esso associate o della stria vascolare provocano un danno irreversibile, in quanto nei mammiferi tali cellule non presentano capacità rigenerativa.

L'uso delle cellule staminali (Stem Cells, SCs) nel trattamento delle malattie cronico-degenerative e quindi per la cura delle sordità neurosensoriali ha acceso grande interesse nella ricerca biomedica.

Il presente studio prevede l'utilizzo di cellule di teratocarcinoma di topo con lo scopo di analizzare *in vitro* il differenziamento in senso neuronale in vista di possibili applicazioni biomediche.

1.1 CELLULE STAMINALI

L'etimologia di "staminale" ha più versioni, secondo alcuni deriva dal latino "stamen", il filo dell'ordito che compone i tessuti, o in senso botanico lo stame dei fiori. Oppure dal greco "stamines", i travicelli destinati a costruire la base di una murata. In inglese "stem" sta per germoglio, perciò il vocabolo è stato utilizzato per esprimere le caratteristiche di una cellula progenitrice di tutte le altre.

Le SCs sono cellule non specializzate capaci di dividersi indefinitamente; ad ogni suddivisione producono due cellule figlie, delle quali una è staminale e l'altra è capostipite di una popolazione di cellule che, a loro volta, danno luogo a cellule mature e differenziate, ovvero a

tessuti distinti. Le SCs assicurano la formazione e il rinnovamento dei tessuti, ovvero la sostituzione delle cellule che hanno terminato il proprio ciclo vitale e di quelle lesionate (“Cellula Staminali” Microsoft Encarta Enciclopedia online, 2008).

Per differenziamento s’intende il processo per cui le cellule di un organismo divengono diverse tra loro per aspetto e funzioni (Coleman *et al.*, 2007). Il differenziamento comporta un cambiamento stabile nell’attività dei geni, per dare origine a cellule con caratteristiche specifiche, come ad esempio la contrattilità per quelle cardiache o l’attività elettrica per quelle nervose (Keller *et al.*, 2005).

La possibile maggior applicazione delle SCs è quella di sostituire cellule o tessuti danneggiati o non funzionanti, il che potrebbe condurre a nuovi ed efficaci trattamenti nelle patologie degenerative.

Le SCs possono essere classificate in base alla loro “potenza”, intesa come la capacità di specializzarsi, in quattro diversi gruppi (Fig. 1):

- ❖ SCs totipotenti: sono in grado di generare tutte le cellule dell’organismo animale, comprese le cellule che non fanno parte dell’embrione, come quelle della placenta e del cordone ombelicale. Solo lo zigote (uovo fecondato allo stadio di 4-8 cellule dopo 4-5 giorni dalla fecondazione) è totipotente;
- ❖ SCs pluripotenti: sono in grado di generare tutte le cellule che fanno parte dell’organismo animale, ma non le cellule “extra-embrione”. Queste staminali si trovano nell’embrione allo stato di blastocisti con 20-30 cellule, dopo 5-7 giorni dalla fecondazione, hanno la potenzialità di differenziarsi in ogni tipo di cellula, ma non hanno la potenzialità di dare origine ad un embrione;
- ❖ SCs multipotenti: hanno la proprietà di moltiplicarsi e mantenersi in coltura; sono state identificate nei feti e anche nell’uomo adulto, ma in numero limitato. Le SCs multipotenti sono già specifiche di un determinato tessuto, ma possono produrre tutte le cellule presenti in quel tessuto;

❖ SCs unipotenti: possono dar luogo ad un unico tipo di cellula.

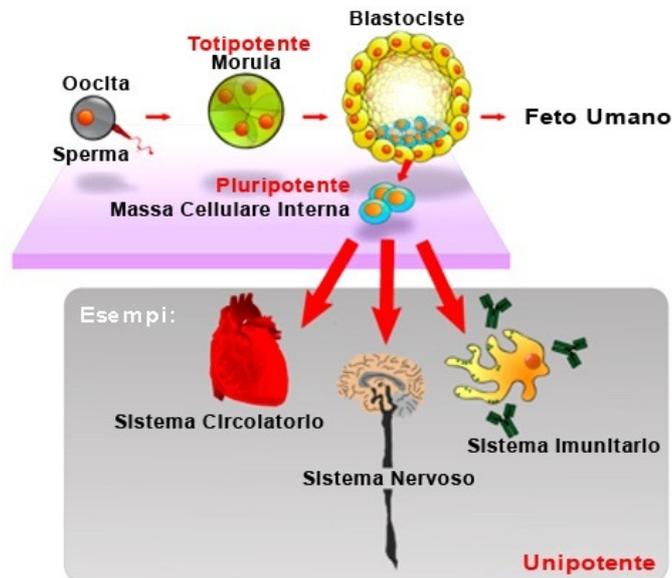


Figura 1 Classificazione delle SCs sulla base della loro capacità differenziativa (www.iabp.it).

Le SCs si possono anche classificare in base alla provenienza, come adulte (Adult Stem Cells, ASCs) o embrionali (Embryonal Stem Cells, ESCs) (Wobus and Boheler, 2005).

Le ASCs sono cellule non specializzate che si riproducono generalmente per fornire alcune specifiche cellule: ad esempio 200 miliardi di globuli rossi sono generati ogni giorno nel corpo da cellule staminali emopoietiche. Il ruolo delle ASCs all'interno dell'organismo, è di mantenere e riparare tessuti ed organi. A differenza delle ESCs, l'origine delle ASCs in tessuti ed organi di organismi già completamente sviluppati non è ancora nota.

Fino a poco tempo fa si pensava che ognuna di queste cellule potesse produrre unicamente un tipo particolare di cellula: questo processo è chiamato differenziazione. Tuttavia negli ultimi anni si sono avute prove che le cellule staminali possono acquisire molte forme differenti: è noto che le cellule staminali nello stroma del midollo osseo possono

trasformarsi in cellule epatiche, neurali, muscolari, renali e follicolari; questo processo si chiama transdifferenziamento.

Utili fonti di ASCs sono in realtà localizzabili in tutti gli organi del corpo, anche se in numero molto piccolo. Si pensa che tali cellule risiedano in un'area specifica per ciascun tessuto dove rimangono indifferenziate. Vengono attivate in seguito ad una malattia o per qualche danno subito dal tessuto

Alcuni studi hanno dimostrato che si possono ricavare cellule staminali dalla pelle, capaci di specializzarsi in molti tipi di tessuto, compresi neuroni, cellule muscolari lisce e cellule adipose. Esse sono state trovate nel derma, lo strato più profondo della pelle: queste cellule staminali giocano un ruolo centrale nella rimarginazione dei piccoli tagli. Si ritiene che anche i vasi sanguigni, la polpa dentaria, l'epitelio digestivo, la retina, il fegato ed anche il cervello contengano cellule staminali, utili per la rigenerazione dello stesso sistema nervoso centrale, cervello e midollo spinale (NIH Report, 2001; 2006).

Le cellule staminali embrionali (ESCs) possono anche essere classificate in base alla loro origine in: cellule staminali embrionali propriamente dette (ESCs), cellule staminali germinali (EGCs) e cellule staminali di carcinoma (ECCs) (Fig.2):

- ❖ ESCs: sono derivate dalla massa cellulare interna della blastocisti prima dell'impianto sulla superficie uterina. Sono in grado di autoriprodursi senza limiti e di dare origine a tutti i tipi cellulari che compongono un organismo. La prima linea di ESCs di origine umana è stata ottenuta solo nel 1998 (Thomson *et al.*, 1998);
- ❖ EGCs: sono derivate dalle cellule germinali primordiali, situate in una specifica parte dell'embrione chiamata cresta gonadica. Le EGCs più studiate sono le cellule germinali primordiali (PGCs, Primordial Germ Cells), anch'esse in grado di differenziarsi in tutti i tipi cellulari presenti nell'individuo adulto. La loro difficile

reperibilità ne ostacola l'impiego terapeutico (Zuccotti *et al.*, 2000).

- ❖ ECCs: derivano da teratocarcinomi, tumori solidi maligni che insorgono più comunemente nelle gonadi embrionali, anche se occasionalmente si possono trovare in siti extragonadici.

L'etimologia di "teratocarcinoma" proviene dal greco "teratos", che significa "mostro" e descrive l'aspetto di questi tumori, in quanto composti da una miscela di tessuti adulti e organi deformati.

Diversi studi istologici sui teratocarcinomi hanno dimostrato che questi tumori sono composti da un'ampia varietà di tessuti adulti.

Inoltre altri esperimenti hanno constatato che una singola cellula di origine tumorale, iniettata intraperitonealmente può produrre tutti i tipi di cellule che si ritrovano in un teratocarcinoma.

Questa importante scoperta dimostra che i teratocarcinomi possiedono un unico tipo di cellula staminale, che ha la capacità di crescere indefinitamente, assicurando la natura maligna del tumore ma allo stesso tempo in grado di differenziare in molteplici tipi cellulari adulti, compresi gli epitelii intestinale e respiratorio, i muscoli, i nervi, la cartilagine e l'osso.

L'esistenza di tali cellule staminali pluripotenti e l'osservazione di specifiche strutture chiamate corpi embrioidi, per la loro similitudine agli embrioni precoci, indica l'origine embrionica e la natura dei teratocarcinomi (Solter, 2006).

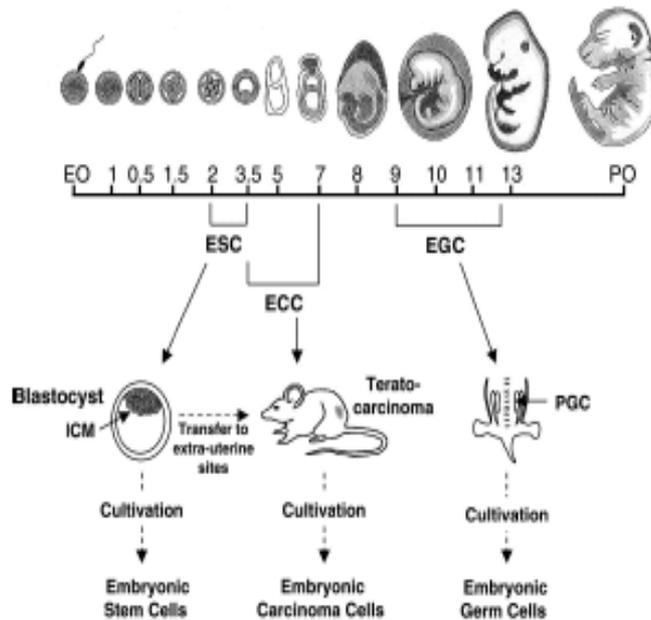


Fig 2 Classificazione delle ESCs murine sulla base della loro origine (Wobus and Boheler, 2005).

Le ESCs sono alla base dell'albero del differenziamento e mantengono la potenzialità embrionale di dare origine a molti, se non a tutti, i tipi cellulari. Il vantaggio potenziale delle cellule staminali riguarda la loro capacità di essere isolate, di duplicarsi un numero elevato di volte e di essere in grado di differenziare in altri tipi cellulari del corpo (Wagers *et al.*, 2006).

1.1.1 Differenziamento.

Il processo di differenziamento è l'insieme degli eventi che accompagnano la modificazione morfologica e funzionale di una cellula verso un grado di specializzazione delle sue funzioni. Il differenziamento comporta un cambiamento stabile nell'attività dei geni, per dare origine a cellule con caratteristiche specifiche, come la contrattilità per quelle cardiache o l'attività elettrica per quelle nervose. Le cellule pluripotenti si possono differenziare seguendo diverse vie. Una delle questioni aperte

per i ricercatori che studiano le cellule staminali è infatti capire come si possa controllare il differenziamento (Keller, 2005).

Una cellula non è mai completamente “indifferenziata” poiché anche nell’embrione precoce (pro-embrione, stadio della vita prenatale che va dalla fecondazione alla comparsa della linea primitiva, cioè fino al 14° giorno) i gruppi di cellule differiscono gli uni dagli altri per le proprietà e il “pattern” dell’attività genica. L’espressione “cellule indifferenziate” si riferisce quasi sempre a precursori sprovvisti di caratteristiche strutturali inequivocabili, che facciano presagire quale sia il loro successivo sviluppo. Ad esempio, i precursori mesenchimatici delle cellule muscolari non mostrano alcun segno della complessa organizzazione delle fibre contrattili che svilupperanno all’interno.

Come negli altri processi più precoci dello sviluppo, un cambiamento dell’espressione genica è la caratteristica principale anche nel differenziamento cellulare. Questo alla fine porta alla produzione delle cosiddette “proteine di lusso” (“luxury proteins”), ovvero di proteine cellula-specifiche che contraddistinguono una cellula pienamente differenziata: per esempio, l’emoglobina nei globuli rossi, la cheratina nelle cellule epidermiche della pelle, ecc... Ovviamente i geni che sono espressi in una cellula differenziata non sono solamente quelli che codificano per “proteine di lusso” cellula-specifiche, ma anche quelli codificanti per una vasta gamma di proteine essenziali per la vita della cellula (proteine “housekeeping”), come ad esempio gli enzimi glicolitici coinvolti nel metabolismo energetico. Una cellula differenziata è caratterizzata dalle proteine che essa contiene. La presenza di differenti proteine può essere responsabile di rilevanti cambiamenti strutturali.

Una cellula pienamente differenziata è in genere in una condizione di stabilità che è essenziale allo svolgimento di una sua particolare funzione nell’organismo adulto.

In particolari condizioni, tuttavia, le cellule differenziate non sono stabili e ciò mostra una potenziale reversibilità del “pattern” di attività genica.

Può succedere infatti che una cellula vada incontro ad un processo di transdifferenziamento. In questo caso la cellula avvia un processo di regressione e si de-differenzia per poi riassumere altre funzioni biologiche. Diversi tipi cellulari sono in grado di effettuare questo tipo di cambiamento in coltura, in particolare quando il mezzo di coltura viene modificato dall'aggiunta di determinati agenti chimici.

Un aspetto fondamentale dello sviluppo in generale, e del differenziamento cellulare in particolare, consiste nel fatto che alcuni geni sono mantenuti attivi, altri vengono repressi e sono quindi inattivi. Il fatto che un gene sia attivato o meno dipende perciò da diversi meccanismi come la presenza di precise combinazioni di fattori regolatori e dai loro livelli, cambiamenti nel grado di avvolgimento della cromatina e modificazioni chimiche del DNA.

Una fase cruciale del differenziamento cellulare è il controllo della trascrizione, poiché determina quali geni siano trascritti e quali proteine vengano dunque sintetizzate in una cellula.

Il "pattern" di espressione genica può essere influenzato da segnali esterni alle cellule. Alcuni segnali, come quelli rappresentati dagli ormoni steroidei, sono in grado di entrare nella cellula mentre altri, come quelli trasmessi dai fattori di crescita proteici, non fanno ingresso nella cellula ma interagiscono con recettori localizzati nella membrana cellulare. Il segnale viene quindi trasmesso al nucleo grazie ad un processo detto trasduzione del segnale, con la conseguente modificazione dell'espressione genica (Fig.3) (Wolpert, 1998).

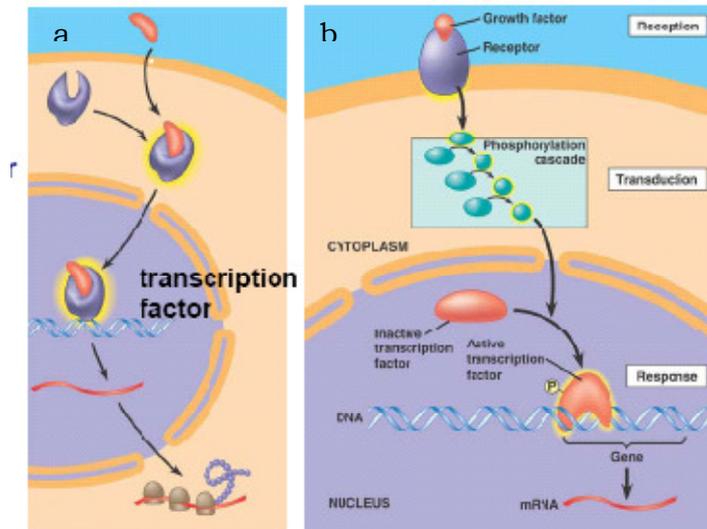


Fig.3: Controllo dell'espressione genica tessuto-specifica; nella fig.(a) è schematizzata l'attivazione di un recettore intracellulare che agisce da fattore di trascrizione (es. ormoni steroidei). La fig.(b) invece, mostra una via intracellulare di trasduzione del segnale attraverso cui segnali alla membrana giungono a modificare l'espressione genica. (users.unimi.it/deho/Microbiologia/MG_17-Trascrizione_Regolazione.pdf).

Negli ultimi anni l'attenzione della ricerca è stata focalizzata sulle cellule staminali e sul potenziale che offrono nel trattamento di un numero di malattie attualmente intrattabili. In particolare i numerosi studi sono interessati a studiare i meccanismi che regolano il differenziamento delle ESCs applicato su modello murino (Evans and Kaufman, 1981).

Uno dei metodi per indurre le ESCs a differenziare *in vitro* è coltivarle come aggregati cellulari, detti corpi embrioidi (Embryoid Bodies, EBs) in assenza delle classiche condizioni di mantenimento. Ad esempio si può inibire il LIF (Leukemia Inhibitory Factor) che influisce sulla crescita e sul differenziamento, oppure si possono aggiungere fattori di crescita al mezzo di coltura. Una volta che è iniziato il differenziamento, le cellule degli strati germinali primari spontaneamente si sviluppano *in vitro*.

Inizialmente nel corpo embrioido si forma uno strato esterno paragonabile alle cellule dell'endoderma e dopo pochi giorni si formano anche lo strato ectodermico e mesodermico.

Questo avviene all'interno del corpo embrionale che quindi è paragonabile allo stadio di blastula *in vivo*, poiché contiene tutte e tre le linee di sviluppo embrionale.

Sia il pattern che l'efficienza di differenziamento sono funzioni di diversi parametri come la densità delle ESCs, la concentrazione dei componenti del mezzo di coltura, i fattori di crescita, le proteine della matrice extracellulare, il pH, l'osmolarità e la qualità del siero. Inoltre differenti linee di ESCs mostrano proprietà uniche di sviluppo *in vitro* (Wobus and Boheler, 2005).

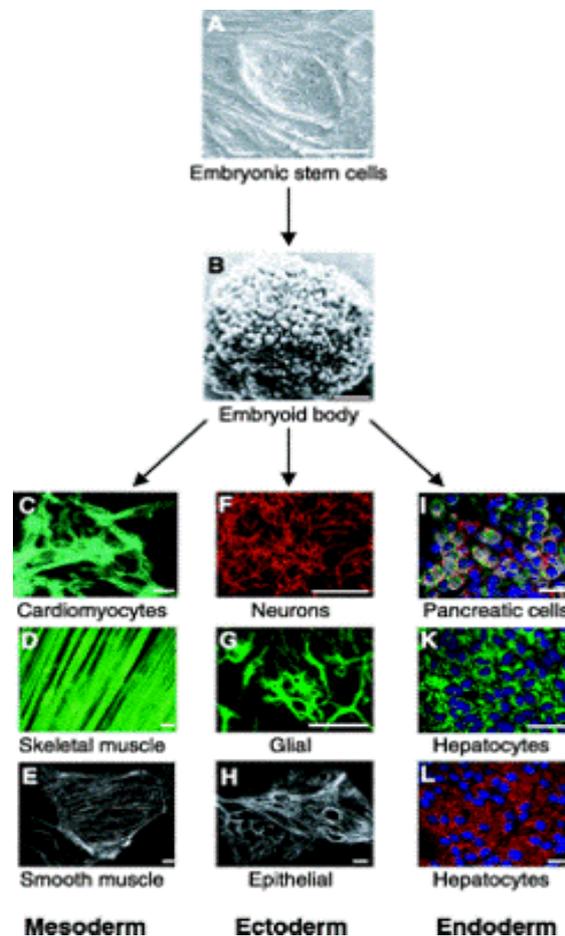


Fig.4: Formazione di EBs e sviluppo di diversi tessuti entro le tre linee embrionali (Wobus and Boheler., 2005).

Un tipo di cellule embrionali di carcinoma molto utilizzato nella ricerca per studi del differenziamento neuronale sono le P19, cellule di teratocarcinoma di topo.

1.2 COLTURE CELLULARI DI P19.

Le P19 e le F19 sono linee cellulari pluripotenti che possiedono la tipica morfologia delle ECCs. Rappresentano un modello di sistema per lo studio del differenziamento e dello sviluppo precoce dei mammiferi. In particolare le P19 e le F19 sono tra le ECCs più comunemente usate per studiare i meccanismi di differenziamento indotto da acido retinoico (Retinoic Acid, RA) (Fig 5) (Soprano *et al.*, 2007).

La linea cellulare di P19 è stata ottenuta da teratocarcinoma di topi C3H/HE, prodotto mediante innesto di un embrione a 7 giorni di gestazione nei testicoli di un topo maschio adulto (Mc Burney and Rogers, 1982).

Le P19 sono mantenute in coltura allo stato indifferenziato in un opportuno terreno di crescita. La rapidità con cui queste cellule proliferano *in vitro* permette di ottenere facilmente subculture aderenti in monostrato con caratteristica morfologia simil-epitelioide. Quando vengono lasciate indisturbate ad una densità cellulare elevata, tendono a differenziare, in piccole quantità, in vari tipi cellulari, tra i quali cellule epiteliali, muscolari, neuroni, cartilagine (Martin and Evans, 1975; Nicolas *et al.*, 1975; Jones-Villeneuve and Mc Burney, 1983).

La caratteristica delle P19 di auto-differenziare con il passare dei cicli cellulari e in determinate condizioni di crescita, è stata inizialmente osservata rimuovendo dal mezzo di coltura il siero. In queste condizioni le cellule vanno incontro ad un differenziamento spontaneo con morfologia simil-neuronale (Mac Pherson and Mc Burney, 1995).

Si è inoltre visto che anche inibendo il LIF (Leukemia Inhibitory Factor), una citochina necessaria per mantenere le cellule embrionali in uno

stadio indifferenziato, le P19 auto-differenziano assumendo un fenotipo neuronale (Pachernik *et al.*, 2005).

Numerosi studi hanno messo in evidenza la versatilità delle ECCs di differenziare in più linee cellulari quando sottoposte ad opportune concentrazioni di specifici agenti differenzianti. Il trattamento di aggregati cellulari (Embryoid Bodies, EBs) di P19 con dimetilsolfossido (DMSO) produce cellule con molte delle caratteristiche del muscolo scheletrico e cardiaco (Mc Burney *et al.*, 1982). Diversamente trattando gli EBs con RA, si ottengono cellule con caratteristiche neuronali, gliali e fibroblastiche (Villeneuve *et al.*, 1982). Inoltre cellule di P19 che crescono in monostrato in presenza di RA mostrano la formazione di derivati endodermici e mesodermici (Mummery *et al.*, 1986).

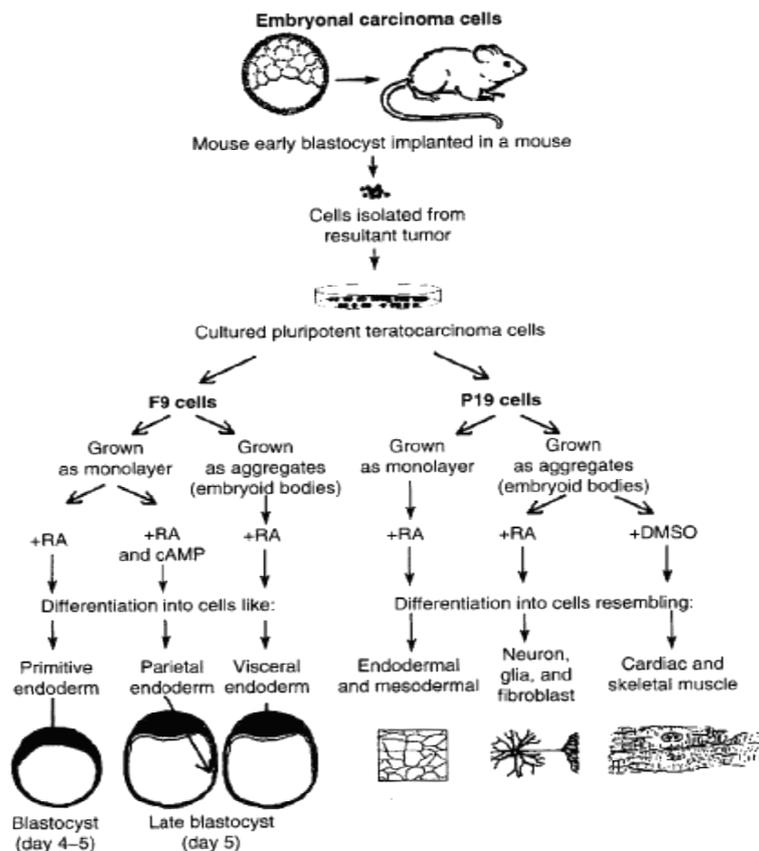


Figura 5 Pathways terminali di differenziamenti di cellule P19 ed F9 (Soprano *et al.*, 2007).

1.2.1 Differenziamento neuronale di P19 trattate con RA.

RA può indurre la differenziazione di cellule di teratocarcinoma (Strickland and Mahdavi, 1978; Villeneuve *et al.*, 1982). I tipi cellulari che si possono differenziare dopo trattamento con RA, sono dipendenti dalla concentrazione di RA utilizzato: colture esposte a basse concentrazioni (10^{-9} M) di RA sono caratterizzate da abbondanza di cellule muscolari cardiache; concentrazioni di 10^{-8} M di RA, evidenziano la presenza di cellule muscolari scheletriche; aumentando la concentrazione tra 10^{-7} M e 10^{-5} M, la popolazione cellulare risulta arricchita di neuroni e astroglia (Edwards and Mc Burney, 1983).

Nello specifico, la popolazione neuronale risulta eterogenea comprendente un range di morfologie distinte e una varietà di neurotrasmettitori che ricordano quelli trovati in alcune regioni del sistema nervoso centrale dei mammiferi. Approssimativamente il 60% dei neuroni contiene GABA, un 20% produce somatostatina, un altro 20% produce neuropeptide Y (NPY) e meno dell'1% contiene catecolamine (Morassutti *et al.*, 1994).

I neuroni derivati da colture di P19 esprimono una varietà di markers neuronali come le proteine del neurofilamento, NF-68 ed NF-160, siti di legame per la tossina tetanica, sinaptosina e siti di legame per l'antigene HNK-1. Questi neuroni appaiono maturi in coltura, tanto che i loro processi neuritici sviluppano le caratteristiche ultrastrutturali di assoni e dendriti, formando sinapsi tra di loro (Staines *et al.*, 1994).

Uno schema che riassume quali sono i passaggi chiave per ottenere una popolazione neuronale da P19 indifferenziate, è rappresentato in Fig. 6:

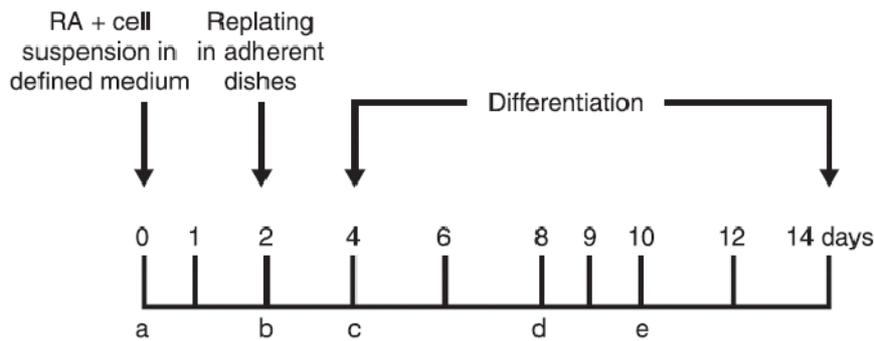


Fig.6 Steps di differenziamento neuronale di P19: a) P19 indifferenziate; b) formazione corpi embrionali e trattamento con RA; c) differenziazione di P19, formazione di progenitori neuronali; d) neuroni maturi; e) neuroni e glia (Ulrich and Majumder, 2006).

Al loro stato indifferenziato rappresentato al tempo zero (Fig.6 day 0), le P19 sono caratterizzate da un'elevata proliferazione, dove le cellule possiedono i patterns di espressione genica tipici delle cellule staminali. La differenziazione di cellule pluripotenti a neuroni è stimolata dall'aggiunta di RA alla coltura cellulare, dopo aver indotto la formazione dei corpi embrionali (EBs), aggregati cellulari sferici di dimensioni irregolari, paragonabili allo stadio della blastula in vivo (Fig.6, day 2).

Successivamente avviene la disgregazione degli EBs e la semina in piastre delle P19 trattate con RA. Da questo passaggio, che avviene intorno al quarto giorno (Fig.5, day 4), le cellule inizieranno a differenziare, diventando inizialmente progenitori neurali e infine neuroni maturi (Fig. 6, 7-8 days).

Il termine del processo di differenziamento neuronale in queste colture cellulari, è confermato mediante identificazione dell'espressione di specifici markers neuronali come i neurofilamenti ad alto peso molecolare, β -3 tubulina, proteine neuritiche quali MAP2, tau, neurocan, enolasi neurone-specifica e sinaptosina. Le cellule gliali appaiono in quantità elevata durante la differenziazione tardiva, all'inizio del decimo giorno (Fig.6 , day 10), esprimendo GFAP (Glial

Fibrillary Acidic Protein), un neurofilamento intermedio (Santiago *et al.*, 2005).

Questi risultati suggeriscono che durante la normale embriogenesi la prerogativa delle cellule pluripotenti di dare origine a diverse linee cellulari può essere determinata in parte da gradienti di concentrazione di sostanze come ad esempio i retinoidi (Edwards and Mc Burney, 1983).

1.3 RETINOIDI.

I retinoidi sono un gruppo di composti naturali e sintetici che sono strutturalmente correlati al retinolo (vitamina A; Fig. 7), una sostanza richiesta nella dieta dei vertebrati. La vitamina A si presenta in diverse forme tra cui quella di RA, uno dei derivati biologicamente più attivi. RA può esistere in due forme isomeriche attive, All-Trans RA e 9-Cis-RA. Sono considerate la forma attiva della vitamina A poiché regolano l'espressione di specifici geni mediante l'interazione con recettori nucleari (Kurie *et al.*, 1993).

Numerosi studi hanno dimostrato che i retinoidi possono inibire o invertire il processo di trasformazione maligna in alcuni tipi cellulari.

Sono stati individuati due tipi di recettori nucleari RARs (Retinoic Acid Receptors) e RXRs (Retinoic X Receptors) attraverso cui i retinoidi esplicano la loro azione, modulata anche dalla presenza di piccole proteine di legame ad elevata affinità citoplasmatica (Gudas, 1994).

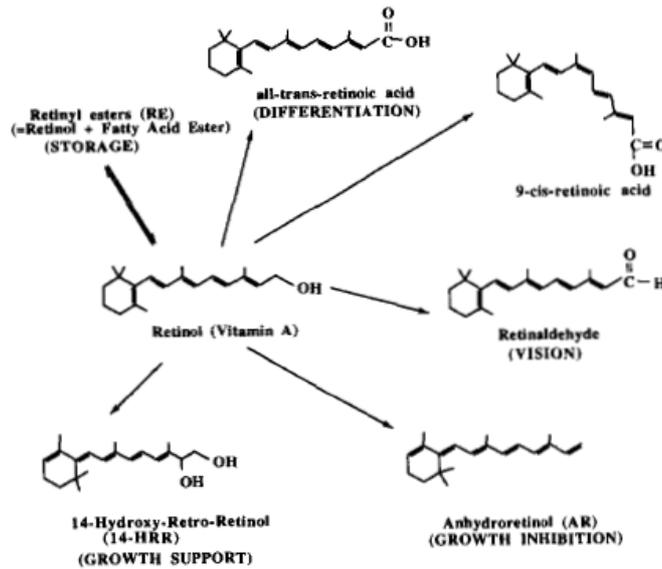


Fig.7 Strutture della vitamina A e alcuni dei suoi derivati. (Gudas, 1994).

1.3.1 Recettori per i retinoidi.

RARs e RXRs appartengono alla stessa famiglia dei recettori ormonali steroidei e tiroidei (Chambon and Giguère, 1994). Questi recettori agiscono come fattori di trascrizione ligando-inducibile che possono aumentare la trascrizione di geni bersaglio mediante legame cis a RAREs (Retinoic Acid Responsive Elements), nel nucleo (Fig.7).

Sia per RARs che RXRs sono stati identificati tre sottotipi (α, β, γ) e la loro espressione varia considerevolmente da un tipo cellulare ad un altro e viene influenzata dal periodo in cui viene considerato lo sviluppo del tessuto o della cellula (Bidyut *et al.*, 1995).

RXRs si legano solo con l'isomero 9-cis RA, mentre RARs hanno affinità di legame sia per All-Trans RA che 9-cis RA. A loro volta gli stessi recettori riconoscono e attivano geni specifici mediante la formazione di eterodimeri del tipo RXRs-RXRs, RXRs-RARs, o RXRs associato ad altri recettori. Eterodimeri RARs e RXRs si legano cooperativamente a RAREs.

Ogni gene target di RA può essere regolato da un tipo di dimero, ma la risposta e l'effetto finale sulla trascrizione del gene dipende dalla

disponibilità di RA e dalla presenza di proteine intracellulari CRABPs (Cellular Retinoic Acid Binding Proteins), (Glass, 1994).

1.3.2 Meccanismo d'azione molecolare di RA.

La funzione di RAR e RXR, sottoforma di eterodimeri (RAR-RXR) o omodimeri (RXR-RXR), è quella di regolare la trascrizione legandosi alle sequenze di DNA di geni bersaglio chiamati elementi responsivi all'acido retinoico (RAREs, Retinoic Acid Response Elements) all'interno del promotore. RARE consiste di ripetizioni dirette della sequenza consenso half-site AGGTCA separata generalmente da 5 nucleotidi (DR-5). L'eterodimero RAR-RXR si lega a RARE con RXR che occupa il sito half-site 5' a monte e RAR, invece, si lega a valle in 3' di half-site. In assenza di RA, l'eterodimero RAR-RXR, si lega a RARE nel promotore di geni bersaglio e RAR recluta i co-repressori.

Questi co-repressori mediano i loro effetti trascrizionali negativi reclutando i complessi istone deacetilasi (HDACs, Histone Deacetylase Complexes). Gli HDACs rimuovono i gruppi acetilici dalle proteine istoniche inducendo un cambiamento nella struttura della cromatina, rendendo il DNA inaccessibile alla trascrizione.

Dall'altra parte, sul legame di RA (a livelli fisiologici), c'è un cambiamento conformazionale nella struttura del dominio di legame per il ligando, che risulta nel rilascio del co-repressore e nel reclutamento dei co-attivatori nella regione AF2 del recettore. Alcuni co-attivatori interagiscono direttamente con il meccanismo di trascrizione basilare, per aumentare la trascrizione, mentre altri mostrano attività per l'istone acetiltrasferasi (HAT) che acetila le proteine causando l'attivazione di trascrizione di geni associati (Fig. 8) (Hart, 2002; Jepsen and Rosenfeld, 2002; Hu *et al.*, 2003; Westin *et al.*, 2000).

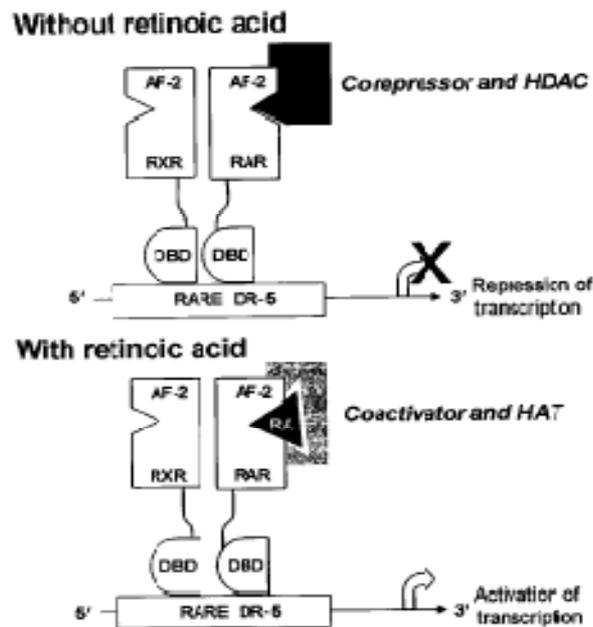


Fig.8 Meccanismo di trascrizione genetica indotto da RA. Nel promotore inattivato, RAR e RXR sono sottoforma di eterodimeri legati attraverso il loro DNA-binding domain (DBD) a RARE DR-5. Il co-repressore si lega a RAR e recluta HDAC causando il blocco della trascrizione. Quando viene aggiunto RA, la trascrizione viene attivata dal legame di RA a RAR. Il legame di RAR a RA recluta i co-attivatori e HAT (Soprano *et al.*, 2007).

1.3.3 Geni regolati da RA.

E' noto che il trattamento con RA provoca cambiamenti nell'espressione di un'ampia varietà di geni con diverse funzioni che vanno da fattori di trascrizione a proteine di trasporto e del metabolismo per RA, proteine della matrice extracellulare, protooncogeni, proteine del citoscheletro, proteine coinvolte nel metabolismo cellulare, proteine apoptotiche o coinvolte nel ciclo cellulare e proteine che mediano i segnali intracellulari ed extracellulari.

Inoltre il pattern temporale di espressione genica durante il differenziamento indotto da RA, ha diverse fasi. L'espressione di una parte di geni viene espressa rapidamente (entro le prime 12-16 ore) in seguito a trattamento con RA.

Un numero maggiore di geni mostra un'alterata espressione a tempi più tardivi (1 o più giorni) in seguito all'esposizione a RA e questi cambiamenti nell'espressione richiedono nuove proteine di sintesi. Perciò questi geni sono indirettamente regolati da RA. Inoltre molti di loro sono associati a specifici pathways di differenziamento.

La linea cellulare di P19 indotta a differenziare in senso neuronale mostra tre fasi in cui varia il profilo genico. Si può distinguere una prima fase di risposta (0-16 ore in seguito a trattamento con RA), una fase di differenziamento neurale (dalle 16 ore ai 2 giorni dopo trattamento con RA) e infine una fase di differenziamento terminale che avviene 5-6 giorni dopo esposizione a RA.

Un altro fattore di cui bisogna tenere conto è che spesso il processo di differenziamento coinvolge non solo il trattamento con RA, ma anche l'aggiunta di altri fattori come ad esempio la formazione di aggregati cellulari o corpi embrioidi e perciò l'espressione dei geni dipende non solamente da RA (Teramoto *et al.*, 2005).

1.3.4 Ruolo di geni specifici regolati da RA in colture cellulari di P19 indotte a differenziare in senso neuronale.

Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo di specifici geni durante il processo di differenziamento su cellule di P19 trattate con RA.

Possono essere così elencati:

- ❖ Hoxa-1 e Hoxab-2: l'espressione di questi due geni di dominio homeobox, aumenta rapidamente in seguito a trattamento di ECCs con RA in assenza di nuove proteine di sintesi. La sovraespressione di Hoxa-1 provoca un'alterazione nella morfologia di cellule P19 indifferenziate. Tuttavia, in queste condizioni sperimentali, le P19 non differenziano in assenza di RA e questo significa che Hoxa-1 non è sufficiente per il processo di differenziamento;

- ❖ Proteine Pbx: il livello delle proteine PBX1, PBX2 e PBX3 in cellule di P19 trattate con RA, risulta elevato. In particolare gli aumenti dei livelli di PBX1 e PBX3 sono risposte secondarie al trattamento con RA, mentre l'aumento di PBX2 sembra essere una risposta primaria. Studi focalizzati a stabilire il ruolo delle proteine PBX durante la differenziazione di P19 hanno mostrato che esse sono necessarie per lo step di differenziamento neuronale ed endodermico (Qin *et al.*, 2004b);
- ❖ Cyp26a1: è un citocromo P450 che riveste un ruolo importante nel catabolismo di RA, portando alla produzione di prodotti idrossilati. Colture di cellule P19 che esprimono stabilmente Cyp26a1 vanno rapidamente incontro a differenziamento neuronale in monostrato a basse concentrazioni di RA. Questo suggerisce che i prodotti idrossilati di RA possono essere critici nel mediare il processo di differenziamento neuronale (Pozzi *et al.*, 2006; Sonneveld *et al.*, 1999);
- ❖ Sox6: i geni Sox sono espressi in diverse fasi dello sviluppo embrionale e del differenziamento cellulare, in maniera cellula-specifica. Sox1, Sox2, Sox3, Sox6 e Sox9 sono espressi nel sistema nervoso centrale durante l'embriogenesi (Connor *et al.*, 1995; Takamatsu *et al.*, 1995). E' stato dimostrato che cellule P19 aggregate in corpi embrioidi e trattate con RA, esprimono Sox6 durante la fase di differenziamento neurale. Una sovraespressione costitutiva di Sox6 provoca una marcata aggregazione cellulare e le cellule differenziano in cellule neuronali esprimenti le proteine associate ai microtubuli (MAP-2) in assenza di RA (Kanazawa *et al.*, 2004a). Inoltre, una soppressione dell'espressione di Sox6 porta ad un quasi totale blocco del processo di differenziamento neuronale e provoca apoptosi in seguito a trattamento con RA in colture cellulari di P19 (Hamada-Kanazawa *et al.*, 2004b). Dall'altra parte una sovraespressione di Sox6 porta ad un aumento delle N-caderine, Mash-1 e Wnt-1 suggerendo che Sox6

è coinvolto a monte nel pathway di Wnt-1 nello stadio precoce del differenziamento neuronale (Hamada-Kanazawa *et al.*, 2004a). Questi studi dimostrano che Sox6 è importante sia nel regolare la formazione dei corpi embrioidi che il differenziamento neuronale;

- ❖ Wnt-1: è espresso durante l'embriogenesi dei vertebrati e del SNC (McMahon *et al.*, 1992; Nusse and Varmus, 1982). E' un fattore secreto che si trova a bassi livelli nelle P19 indifferenziate, mentre aumenta rapidamente durante la fase di differenziamento neurale (da 16 ore a 2 giorni dopo il trattamento con RA) e infine diminuisce durante la fase terminale del differenziamento (Papkoff, 1994; Schuurin *et al.*, 1989; St-Arnaud *et al.*, 1989). E' interessante lo studio di Wnt-1 perché anche se non è sufficiente per il differenziamento neuronale, sembra essere importante nel determinare il destino cellulare in quanto negli aggregati di cellule P19 induce la soppressione della glicogenesi. Mash-1 e ngn-1 sono iper-regolati durante la fase di differenziamento neuronale in cui anche Wnt-1 è iper-espresso negli aggregati cellulari di colture cellulari di P19. Questo dimostra che Wnt-1 promuove il destino neuronale e inibisce la glia in cellule P19 , attraverso l'attivazione di proteine neuronali basiche elica-ansa-elica (bHLH) (Tange *et al.*, 2002);
- ❖ Neurogenina-1 (ngn-1) e Neuro-D: ngn-1 è un fattore di trascrizione dei vertebrati che attiva la cascata a valle dei geni bHLH compreso Neuro-D durante la neurogenesi (Ma *et al.*, 1996).

Il trattamento con RA induce l'espressione di molti geni bHLH compreso Mash-1 (Johnson *et al.*, 1992) e NeuroD2 (Farah *et al.*, 2000; Oda *et al.*, 2000). In colture cellulari di P19 trattate con RA, ngn-1 viene espressa nella fase di differenziamento neurale, mentre NeuroD viene espresso durante la fase terminale del processo di differenziamento di queste cellule. Alcuni studi dimostrano che ngn-1 è in grado di indurre differenziamento

neuronale di P19, quando queste sono cresciute come aggregati, in assenza di RA. Tuttavia RA è richiesto per ottenere il massimo numero di cellule differenziate (Kim *et al.*, 2004);

- ❖ N-caderina: è una molecola di adesione cellulare che riveste un ruolo importante nello sviluppo del SNC (Geiger and Ayalon, 1992; Takeichi, 1995). *In vitro*, numerosi studi riportano che l' N-caderina è essenziale per la crescita dei neuriti (Bixby and Zhuang, 1990). N-caderina è uno dei geni inducibili in seguito al trattamento con RA e viene espressa durante la fase di differenziamento neurale in colture cellulari di P19. Una sovraespressione di N-caderina in cellule P19 è sufficiente per iniziare il differenziamento neuronale (Gao *et al.*, 2001).
- ❖ CypA: la ciclofilina A è stata caratterizzata come gene housekeeping appartenente alla famiglia delle immunofiline (Steele *et al.*, 2002; Thellin *et al.*, 1999; Zhong and Simons, 1999). CypA è espressa in numerosi tessuti, ma soprattutto nelle cellule neuronali, e in particolar modo nei nuclei dei neuroni ganglio sensoriali (Chen *et al.*, 2003). Il ruolo di CypA nel differenziamento neuronale di cellule P19 sembra essere quello di regolatore della trascrizione di geni responsivi a RA.

1.3.5 Effetto di RA sullo sviluppo dell'orecchio interno.

L'organo del Corti dei mammiferi è, tra i sistemi cellulari degli epiteli sensoriali di tutti i vertebrati, uno dei più altamente ordinati. E' costituito da una singola fila di cellule ciliate interne e 3-4 file di cellule ciliate esterne.

L'aggiunta *in vitro* di RA esogeno a coclee embrionali di 15 giorni provoca un aumento sensibile di cellule che si sviluppano come cellule ciliate o di supporto, che arrivano a formare 2 file di cellule ciliate interne e fino a 11 file di cellule ciliate esterne. Le cellule dell'epitelio sensoriale sono deputate all'amplificazione del segnale acustico.

I retinoidi hanno quindi anche un'importante funzione nello sviluppo della coclea e potrebbero essere coinvolti nell'induzione del differenziamento delle cellule presensoriali a cellule ciliate di supporto. Inoltre, alcuni studi hanno evidenziato che RA può stimolare la rigenerazione *in vitro* di cellule ciliate in coclee di mammifero che sono state espianate in seguito a trattamento con un'ototossina che distrugge le cellule ciliate (Lefebvre *et al.*, 1993).

Lo studio dei retinoidi e dei loro recettori potrebbe quindi fornire nuove significative informazioni sui meccanismi di regolazione che controllano il differenziamento e lo sviluppo.

Inoltre i retinoidi sono stati ampiamente studiati perché esibiscono un'attività chemioprotettiva, sono in grado di mediare una risposta differenziativa in tessuti tumorali e pretumorali (Rifking *et al.*, 1996). Una terapia antitumorale così concepita sembrerebbe una valida alternativa, in quanto non tossica, alle terapie attualmente in uso che sono citotossiche (Spinella *et al.*, 2003).

Questo concetto sembra ormai essere consolidato e approvato da diversi risultati sperimentali che hanno fatto uso di diversi agenti chemio preventivi sia in colture cellulari che, in alcuni casi, di modelli animali (Spinella *et al.*, 2003).

Tuttavia fino ad ora solo l'isomero All-Trans RA ha dimostrato la sua capacità *in vivo* di indurre differenziazione e quindi è l'unico ad essere utilizzato nei regimi anticancro. Ad esempio, nel trattamento della leucemia promielocitica acuta, nel caso in cui vi sia una completa remissione della malattia, RA gioca un ruolo importante nella conversione dei blasti pro-mieloidi in granulociti maturi. E' stato visto che RA a dosi farmacologiche è in grado di rendere reversibili gli eventi iniziali che determinano il processo di cancerogenesi (Guzey *et al.*, 1998).

Cellule di carcinoma embrionale umane (hECCs), sottoposte a trattamento con RA, hanno mostrato la capacità di differenziare da cellule pluripotenti simil-staminali a cellule post-mitotiche (differenziazione terminale), confermando l'attività chemioprotettiva di questo agente.

Uno degli aspetti che caratterizzano RA è quello di avere capacità differenziative. Alla base di tale processo vi sono numerosi meccanismi molecolari che vengono attivati da diverse vie di segnale intracellulare, propri della regolazione degli eventi di proliferazione e apoptotici (Du *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004).

L'attivazione di alcune vie di segnale intracellulare e dei fattori di trascrizione, giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi differenziativi (Li *et al.*, 2006).

1.4. GENI IMPLICATI NEL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE.

1.4.1 Protein chinasi (PKC).

Le PKC sono una famiglia di serine/treonine chinasi a localizzazione sia citosolica che di membrana, coinvolte nella trasduzione del segnale in risposta a stimoli specifici. Sono enzimi ubiquitari presenti soprattutto a livello del sistema nervoso centrale in cui sembrano svolgere un ruolo importante nella trasmissione sinaptica. Regolano anche alcune delle funzioni cellulari fondamentali come la proliferazione, la differenziazione, la tumorigenesi e l'apoptosi (Casabona, 1997).

In base a differenze strutturali e di substrato richiesto sono state suddivise in tre gruppi (Fig. 8) (Casabona, 1997):

- ❖ PKC convenzionali (cPKC) a cui appartengono gli isozimi α , $\beta 1$, $\beta 2$ e γ ; $\beta 1$ e $\beta 2$ derivano dallo “*splicing*” alternativo dello stesso gene. Queste isoforme sono calcio-dipendenti e sono attivate da fosfatidilserina (PS), DAG o esteri del forbolo;

- ❖ PKC nuove (nPKC) che comprendono le isoforme δ , ϵ , η , θ . Sono calcio-indipendenti e regolate da PS, DAG ed esteri del forbolo;
- ❖ PKC atipiche (aPKC) con le isoforme ζ , ι , λ . Sono calcio-indipendenti e la loro attivazione è regolata dal PS;
- ❖ Protein chinasi μ umana ed il suo omologo murino, protein chinasi D. Questi enzimi costituiscono una classe distinta poiché hanno un nucleo chinamico molto simile a quello delle chinasi calmodulina-dipendenti e non contengono il motivo pseudo strato. Possiedono inoltre una lunga sequenza N-terminale.

Le diverse isoforme di PKC sono espresse in maniera specifica nei diversi tessuti e la loro presenza e concentrazione dipende dallo stato di sviluppo degli stessi (Gutcher *et al.*, 2003).

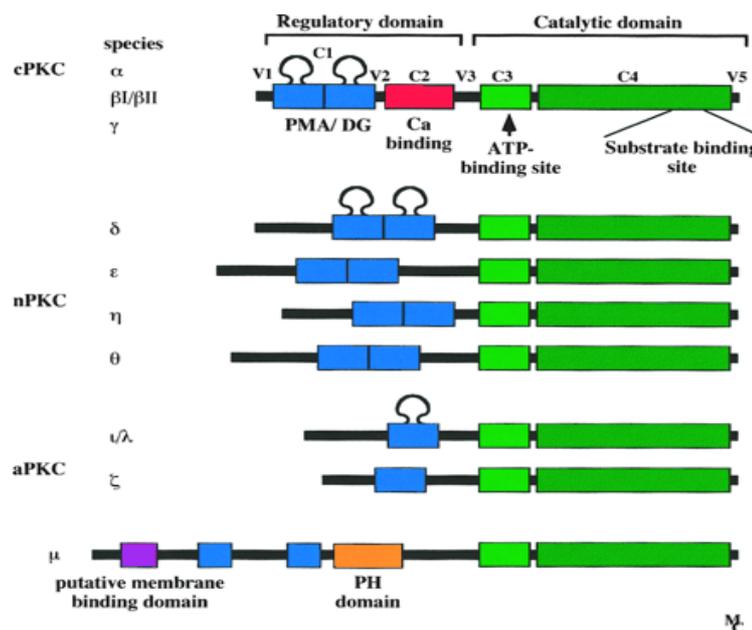


Fig.9 Rappresentazione schematica della struttura primaria degli isoenzimi della PKC (Alberts, 2004, Biologia molecolare della cellula).

La PKC è formata da un'unica catena polipeptidica con una regione regolatoria nella porzione N-terminale di 20-70 KDa e con una regione catalitica nel tratto C-terminale di 45 KDa (Casabona, 1997).

La struttura del polipeptide comprende quattro regioni conservate (C1-C4) e cinque regioni variabili (V1-V5) e riveste notevole interesse nella traduzione del segnale e nella regolazione di alcuni fattori di trascrizione.

Inizialmente la PKC è sintetizzata sottoforma di precursore inattivo non fosforilato di circa 76 KDa, poi viene fosforilata in una forma transitoria di 78 KDa e infine una forma nativa di 80 KDa.

La regolazione della PKC può avvenire mediante interazione con cofattori come ad esempio DAG e fosfatidilserina che formano un legame altamente specifico ai due domini C1 e C2 che hanno come bersaglio la membrana, mediante fosforilazione o ancora mediante localizzazione con proteine "target". Ad esempio, la PKC attivata è in grado di fosforilare ed attivare "target" secondari come le chinasi c-Raf e le MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases).

Attraverso analisi immunochimiche si è potuto stabilire che le diverse isoforme di PKC si possano localizzare in vari compartimenti subcellulari, grazie all'interazione con proteine specifiche. Questo posizionamento in loci specifici della cellula è di fondamentale importanza affinché l'enzima risponda efficacemente ai secondi messaggeri e possa avere accesso immediato ai substrati coinvolti nell'espressione genica o nei processi metabolici.

Circa un decennio fa è stato suggerito un possibile coinvolgimento delle PKC nel differenziamento cellulare indotto da All-Trans RA in cellule HL-60 (Bertolaso *et al.*, 1998). Gli autori hanno osservato che l'enzima trasloca al nucleo dopo una stimolazione da parte di All-Trans RA. La funzione della PKC a livello nucleare sembra essere svolta da una porzione di tale chinasi, che intera non è in grado di legare il DNA. In particolare, la sola subunità regolatoria liberata dalla porzione catalitica tramite "clivaggio" con calpaine sembra possedere questa proprietà (Eldar *et al.*, 1992; James *and* Olson, 1992).

1.4.2 ERK1/2.

Come accade durante lo sviluppo *in vivo*, anche durante il differenziamento *in vitro* vengono attivate diverse vie di segnale ed i relativi fattori di trascrizione. Una via di trasduzione del segnale attivata è quella che coinvolge le MAPK.

Questa classe di proteine è coinvolta in numerosi processi cellulari (sopravvivenza, differenziamento, crescita e sviluppo neuronale). La famiglia delle MAPK è a sua volta divisa in quattro gruppi: ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (cJun N terminal kinase), SAPK (stress-activated protein kinase) e p38 (Kato *et al.*, 2005).

Tra queste, le proteine ERK1/2 svolgono varie funzioni nello sviluppo del sistema nervoso. E' stato ad esempio dimostrato che esse mediano i segnali di differenziamento neuronale nelle colture di cellule embrionali e staminali (Li *et al.*, 2006).

L'attivazione di ERK1/2 mediante fosforilazione ad opera di una MAPK specifica (MEK), ne determina la traslocazione a livello nucleare. Una volta fosforilata, ERK1/2 agisce fosforilando a sua volta varie molecole "target", tra cui diversi fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione di geni della crescita, dell'apoptosi e altri ancora specifici per le proteine sinaptiche associate al citoscheletro (Lewis *et al.*, 1998; Vaudry *et al.*, 2002). In particolare, è da notare che durante il differenziamento neuronale di cellule embrionali staminali, è stato osservato, tramite analisi di western blot, la presenza del fattore di trascrizione nucleare STAT3. Tale proteina è molto interessante perché promuove il processo di sopravvivenza cellulare. A dimostrazione del fatto che vi è una sinergia tra questo fattore di trascrizione e le ERK1/2 è stato verificato che l'attivazione a valle del fattore STAT3 è mediata dalla fosforilazione di ERK1/2 (pERK1/2) (Fig.9). Si è visto da alcuni studi che bloccando l'attività con un inibitore specifico per MEK (U0126), si ha inibizione di pERK1/2 ma anche assenza di espressione di STAT3. In seguito a questi risultati si è potuto provare l'importante ruolo che le proteine MAPK, ERK, STAT3 svolgono nella via di sopravvivenza e nel

differenziamento di cellule simil neuronali derivate da ESCs (Li *et al.*, 2006).

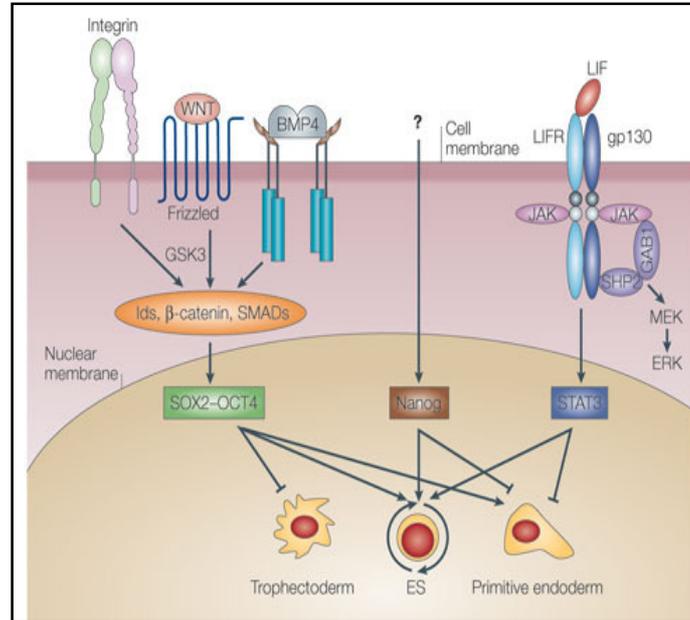


Fig.10 Pathway della via differenziativa in cui intervengono le proteine STAT3 e ERK1 (www.euchromatin.com).

Anche se le ERK sono generalmente considerate come segnali di sopravvivenza, chiare evidenze sperimentali suggeriscono che le ERK possono mediare anche apoptosi indotta da differenti stimoli in diversi tessuti. Le ERK1/2 potrebbero agire a monte del rilascio del citocromo-c e dell'attivazione della caspasi-3 attraverso up-regolazione di Bax e p53 e attraverso soppressione di segnali di sopravvivenza mediati da Akt (Fig.10). I meccanismi mediante i quali le ERK1/2 mediano l'apoptosi rimangono tuttavia poco conosciuti (Zhuang and Schnellmann, 2006).

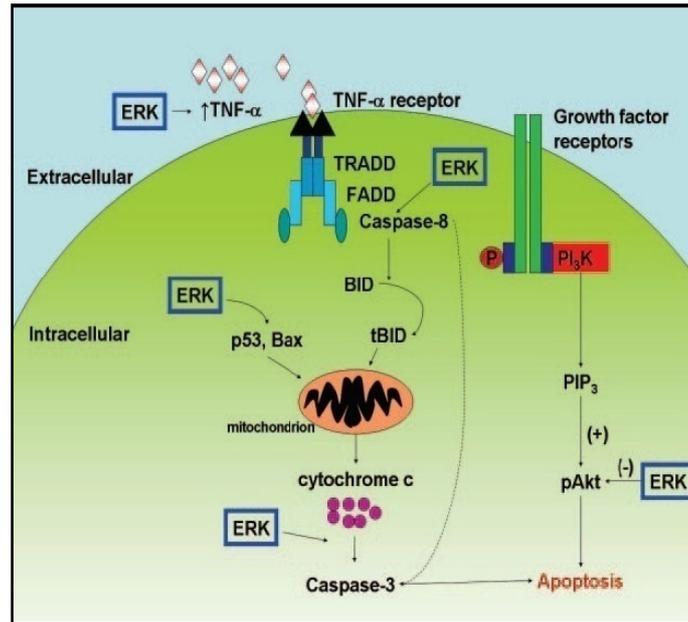


Fig.11 Meccanismo di apoptosi mediata da ERK (Zhuang and Schnellmann, 2006).

1.4.3 Caspasi-3.

L'apoptosi è un processo regolato di morte cellulare responsabile della rimozione di cellule indesiderate o in soprannumero durante il normale sviluppo e l'omeostasi negli adulti, ma è attivata anche da diverse sostanze citotossiche. La morte per apoptosi è caratterizzata da cambiamenti morfologici e biochimici, quali la contrazione della cellula, condensazione della cromatina e processi regolati di degradazione intracellulare che coinvolgono la scissione delle proteine e del DNA in specifici siti. All'ultimo stadio, la cellula si divide in piccoli corpi apoptotici che possono essere eliminati tramite fagocitosi. L'integrità della membrana plasmatica è mantenuta per tutta la durata del processo, evitando lo spargimento del contenuto cellulare che potrebbe dare luogo ad infiammazione. Esistono due modalità di apoptosi, morte mediata da recettori e morte mediata da mitocondri (Gupta, 2001). Nell'apoptosi mediata da recettori il processo inizia dal legame di ligandi ai "Death Receptors" (come Fas e TNF-alfa) localizzati nella membrana cellulare. I "Death Receptors" sono caratterizzati da un motivo

citoplasmatico conservato “death domain” capace di legare molecole adattatrici citoplasmatiche. Il reclutamento di queste molecole dà luogo all’attivazione della caspasi-8, una caspasi iniziatrice che può direttamente attaccare ed attivare caspasi effettrici, quali la caspasi-3. Nelle cellule nervose che differiscono tra loro in base alle caratteristiche dei loro prolungamenti, questa modalità si verifica prevalentemente nelle cellule di tipo I, ad assone lungo. Queste cellule pur emanando un gran numero di fibrille, mantengono una loro individualità e hanno una funzione motoria o psicomotoria. In altre cellule (cellule di tipo II, ad assone corto, che si suddividono indefinitamente in uno spazio indeterminato ed hanno una funzione sensoriale o psicosensoriale) la caspasi-8, invece, attacca la proteina citoplasmatica Bid generando un frammento che attiva una via mitocondriale.

L’attivazione dell’apoptosi via mitocondri causa il rilascio di fattori mitocondriali. Questi fattori possono dare il via alla morte cellulare tramite attivazione delle caspasi o simulazione di eventi di degradazione caspasi-indipendenti (Gupta, 2001). A causa del danno mitocondriale, il citocromo-c, che fa parte della catene trasportatrice di elettroni, può staccarsi dalla membrana mitocondriale e traslocare nel citoplasma, dove interagisce con “Apoptotic protease activating factor-1” (Apaf-1). Il legame del citocromo-c ad Apaf-1 genera un cambiamento conformazionale che permette ad Apaf-1 di oligomerizzare in un complesso multimerico chiamato apoptosoma. Pro-caspasi-9 è reclutata dall’apoptosoma, diviene attiva tramite autocatalisi e attiva in modo proteolitico caspasi-3, che è la principale “caspasi esecutrice” (Gupta, 2001). Alcune proteine possono facilitare o inibire l’apoptosi. La famiglia Bcl-2 comprende proteine con omologia strutturale che possono mutualmente interagire formando eterodimeri. Mentre alcuni membri della famiglia, ad esempio Bcl-2, prevengono l’apoptosi, altri, come ad esempio Bax, inducono morte cellulare, il livello di espressione di queste proteine gioca un ruolo importante nella determinazione del destino delle cellule durante un insulto di tipo tossico. La funzione chiave dei

membri della famiglia Bcl-2 sembra essere la regolazione del rilascio di fattori pro-apoptotici dai mitocondri.

La capacità di determinate caspasi di attaccare altri membri della famiglia crea l'opportunità per un'attivazione sequenziale di questi enzimi, che dà origine ad una cascata di eventi proteolitici. Inoltre l'attivazione delle caspasi provoca una degradazione del citoscheletro e delle proteine nucleari critica per il mantenimento della struttura cellulare, distruzione di altri enzimi necessari per la sopravvivenza della cellula e frammentazione del DNA (Gupta, 2001).

Diversi studi hanno dimostrato che un'induzione di stress del reticolo endoplasmatico induce attivazione della caspasi-8 stimolando il rilascio del citocromo-c e l'attivazione della caspasi-9. In particolare si è visto che colture cellulari di P19 indifferenziate, mostrano un'elevata sensibilità a stress del reticolo endoplasmatico, con attivazione del pathway sopra descritto (Jimbo *et al.*, 2003).

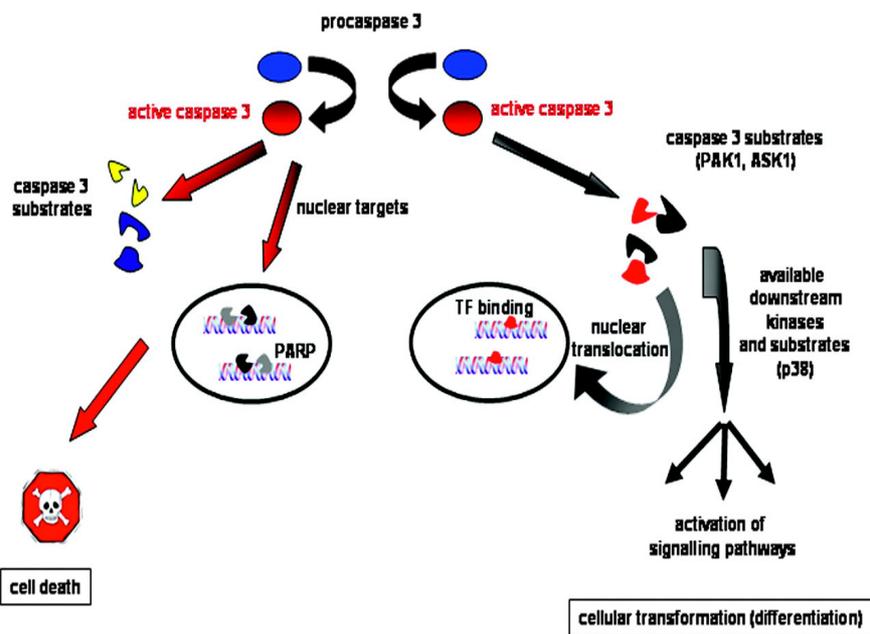


Fig.12 L'attivazione di caspasi-3 non è esclusivamente apoptotica (Fernando et al., 2005).

Alcuni recenti studi hanno messo in evidenza che la caspasi-3 può avere anche un ruolo non apoptotico. Questo comportamento è stato

notato durante il differenziamento neuronale di cellule staminali ottenute dal corpo striato di embrioni di topo. Allo stadio di corpo embrioide, durante il differenziamento si è vista un'elevata attività della caspasi-3, in un contesto non apoptotico. D'altra parte un'inibizione dell'attività della caspasi-3 porta ad un'attenuazione dell'estensione dei neuriti durante il rimodellamento cellulare che accompagna il processo di differenziamento (Fernando *et al.*, 2005).

2. SCOPO

Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha compiuto straordinari progressi nella comprensione dei meccanismi alla base dello sviluppo embrionale degli organismi viventi. In particolare, l'interesse di numerosi gruppi di ricerca è stato rivolto allo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nel differenziamento neuronale, non solo allo scopo di acquisire conoscenze di base sullo sviluppo del sistema nervoso centrale, ma anche per poter indirizzare alcuni tipi di cellule verso la linea neuronale per poterle poi utilizzare nella cura delle malattie neurodegenerative croniche (Morbo di Alzheimer, Morbo di Parkinson, Corea di Huntington, ecc...). Le cellule staminali rappresentano indubbiamente un'opportunità senza pari per un possibile intervento di "medicina rigenerativa" nelle patologie neurodegenerative. Nonostante l'elevato numero di studi fino ad ora condotti, i dati presenti in letteratura su questo argomento sono tuttavia ancora controversi. La sfida principale per lo sviluppo di qualsiasi terapia basata sull'uso di cellule staminali è il controllo del differenziamento cellulare. E' infatti necessario essere sicuri di ottenere il tipo cellulare desiderato, piuttosto che altri tipi di cellule, non solo per ottenere l'effetto clinico desiderato, ma anche per evitare lo sviluppo di cellule ad elevato ritmo proliferativo e la formazione di tumori. Risulta perciò evidente la necessità di individuare stimoli in grado di dirigere le cellule staminali verso un corretto differenziamento neuronale e di ottenere informazioni sui possibili meccanismi molecolari alla base di questo processo di differenziamento.

Allo scopo di offrire un utile apporto allo sviluppo del sapere scientifico su tale argomento ed in base a quanto riportato in letteratura, il lavoro presentato in questa tesi ha avuto l'obiettivo di identificare le condizioni migliori per indurre il differenziamento neuronale di cellule P19 dopo trattamento con RA. In base a quanto riportato in studi precedenti,

sono state scelte come basi di partenza per indurre il differenziamento, condizioni note. In seguito, l'eventuale differenziamento neuronale delle cellule P19, dopo trattamento con RA, è stato verificato analizzando le variazioni morfologiche, l'attività e l'espressione di eventuali marcatori tipici delle cellule nervose. Sulla base dei risultati ottenuti, in una fase successiva lo studio è stato indirizzato verso l'identificazione di un possibile *pathway* alla base del differenziamento neuronale indotto su cellule di P19 trattate con RA.

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

Le cellule P19 indifferenziate sono state fatte crescere in terreno RPMI (RPMI, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), addizionato di 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 5% HS (Horse Serum), 1% penicillina-streptomicina (PS), in presenza di L-Glutamina (L-gluta) alla concentrazione finale di 2mM. Sono state coltivate in presenza di 5% CO₂ alla temperatura di 37°C. Una volta che le cellule hanno aderito alla fiasca, vengono staccate mediante trattamento con tripsina, e vengono coltivate in un terreno composto da Neurobasal medium (NBM, Gibco, 21103) addizionato di 2% B27, 1% penicillina-streptomicina in presenza di L-Glutamina alla concentrazione finale di 2mM. In queste condizioni, le cellule non aderiscono al fondo della fiasca, ma rimangono in sospensione formando dei corpi embrioidi; si impedisce così anche la formazione di substrato di astroglia, che si avrebbe con le cellule in adesione. Ottenuti i corpi si può procedere al trattamento con acido retinoico (All-Trans RA) per il differenziamento. Al terreno di coltura viene aggiunto l'acido retinoico alla concentrazione di 10⁻⁶ M, per 48h. Si procede a rimuovere il trattamento e le cellule vengono fatte differenziare in un terreno di crescita impoverito di siero. Questo terreno è DMEM-F12 addizionato di 1% BSA (Bovine Serum Albumin), 1% FBS, 1% PS, e L-gluta.

3.2 PREPARAZIONE DELL'ACIDO RETINOICO.

L'acido retinoico (SIGMA) viene preparato 10⁻²M in etanolo assoluto. Si conserva a -80°C.

3.3 ANALISI DELLA VITALITA' CELLULARE AL CITOFUORIMETRO

Per verificare la tossicità dell'all trans RA si utilizza il citofluorimetro di flusso (FACS Calibur Becton Dickinson), in quanto questo strumento permette di esaminare un numero più elevato di cellule per ogni campione (10.000 eventi).

I campioni si preparano seminando le cellule P19 in piastre da 6 pozzetti alla concentrazione di 90.000 cellule/pozzetto.

Dopo 24h le cellule sono trattate con All-Trans RA alle concentrazioni di $10^{-4}M$, $10^{-5}M$, $10^{-6}M$, $10^{-7}M$ e $10^{-8}M$ per 24h e 48h. ogni campione si prepara in doppio, inoltre, per ogni tempo sono seminati 4 pozzetti con cellule di controllo di cui due utili a tarare lo strumento come spiegato di seguito.

Trascorse le 24h e le 48h di trattamento le P19 di tutti i campioni sono staccate con Tripsina EDTA (30 secondi a $37^{\circ}C$) che in seguito si blocca con il terreno prelevato precedentemente dai corrispettivi pozzetti, in modo da non eliminare le eventuali cellule che sono finite in sospensione a causa del trattamento.

Le cellule così staccate sono raccolte e posizionate negli appositi tubi per l'analisi citofluorimetrica, l'importante è mescolare bene la sospensione per favorire la separazione delle cellule che normalmente tendono a formare degli aggregati. Da questo momento in poi i campioni sono mantenuti in ghiaccio.

Per l'indagine al FACS viene mantenuto un non trattato tale e quale che funge da controllo negativo, chiamato BIANCO, ad un secondo non trattato si aggiunge NP40 0,1% e Ioduro di Propidio (PI) $2\mu g/ml$, questo campione costituisce un controllo positivo per la fluorescenza, in quanto NP40 uccide tutte le cellule.

Ai restanti campioni si aggiunge PI $2\mu g/ml$, per circa 10' al buio, poi si esegue l'analisi al FACS valutando come parametri la SSC/FSC e la fluorescenza emessa dalle cellule marcate con il PI (FL2-H).

Per ogni campione con il programma Cell Quest Pro si calcolano due parametri, la percentuale di cellule vive e quella di cellule morte.

3.3.1 Analisi statistica

Al fine di valutare la significatività dell'effetto tossico tempo dose dipendente dell'All-Trans RA, ogni esperimento è stato ripetuto per almeno 3 volte. Dal calcolo della media dei dati ottenuti da ogni replica si valuta l'errore standard per analizzare l'attendibilità dei risultati. In seguito con il programma Graph Pad si procede ad un'analisi statistica dei dati ottenuti allo scopo di verificarne la significatività. Si è scelto di analizzare i dati con un intervallo di confidenza del 95% e si è operata un'analisi della varianza univariata (ANOVA). Una probabilità d'errore d'analisi (p value), inferiore allo 0,05% è ritenuta significativa.

3.4 IMMUNOCITOCHIMICA

Le cellule sono state fatte crescere e aderire su vetrino precedentemente rivestito con un substrato di fibrinogeno e trombina (BERIPLAST 0,5mL/1mL, AVENTIS), nei pozzetti all'interno delle piastre. Abbiamo mantenuto in coltura le cellule a tempi differenti in modo da poter effettuare uno screening valutando le possibili fasi del differenziamento. Le cellule sono state bloccate (private del loro terreno e conservate in camera fredda a -80°C) a diversi giorni dopo il trattamento con acido retinoico, ottenendo così un pattern comprendente tempi brevi e tempi lunghi di differenziamento.

Per i tempi brevi abbiamo considerato : 30';1';5';15';30';1h.;2h.;3h.;18h.;24h. Per i tempi lunghi abbiamo considerato: 3d;4d, 5d, 6d.

Le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% in PBS 1X (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) per 15' a temperatura ambiente

e lavate con lo stesso tampone fosfato. Si procede con la permeabilizzazione in PBS 1X addizionato con Tween₂₀ detergente , per 10' a temperatura ambiente, che rimuove le membrane plasmatiche rendendo accessibili le proteine agli anticorpi. Dopo lavaggi con tampone fosfato, si effettua un trattamento con tampone di blocco (Blocking Buffer) composto dal siero dell'animale in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario, diluito al 5% in PBS 1X. Questa incubazione avviene per 30' alla temperatura di 37°C, ed è fondamentale perché assicura la specificità della reazione anticorpale, mascherando i siti cosiddetti aspecifici.

Il passaggio successivo consiste nell'incubazione con l'anticorpo primario diluito in PBS 1X all'1% di siero, a 4°C overnight. Si effettuano lavaggi con PBS 1X e si procede con l'incubazione dell'anticorpo secondario FITC diluito in tampone fosfato a temperatura ambiente per 45' al buio.

Per verificare l'effettiva attività specifica dell'anticorpo secondario abbiamo incubato tale anticorpo in un non-trattato in cui non era stato messo l'anticorpo primario.

Dopo diversi lavaggi con tampone fosfato abbiamo effettuato la colorazione dei microfilamenti di actina con falloidina per un'ora a temperatura ambiente al buio.

Successivamente per rilevare la morfologia del nucleo dopo aver effettuato un lavaggio con PBS 1X, abbiamo incubato le cellule con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dilattato), un intercalante del DNA, per 10 minuti al buio, a temperatura ambiente.

Dopo un paio di lavaggi con PBS 1X, i vetrini sono stati montati con glicerolo (DABCO) su vetrino portaoggetto, osservati e fotografati con un microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioplan Microscope). La lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione erano rispettivamente: FITC 488/490 (blu) – 525/520 (verde); TRITC 550 (verde) – 620/580 (rosso); DAPI 340 (UV) – 480/488 (blu).

Trattamenti anticorpali su colture cellulari:

| Anticorpo primario (Ab I°) | [Ab I°] | Anticorpo secondario (Ab II°) | [Ab II°] |
|---------------------------------------|----------------|--------------------------------------|-----------------|
| Caspasi-3 (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti-Rabbit (Sigma) | 1:1000 |
| Caspasi-8 (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti-Rabbit (Sigma) | 1:1000 |
| Cyt-c (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti-Mouse (Sigma) | 1:1000 |
| ERK1/2 (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti-Rabbit (Sigma) | 1:1000 |
| Fas (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti-Rabbit (Sigma) | 1:1000 |
| NF-68 (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti-Mouse (Sigma) | 1:1000 |
| NF-160 (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti-Mouse (Sigma) | 1:1000 |
| PKCζ (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti-Rabbit (Sigma) | 1:1000 |
| PKCα (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti-Rabbit (Sigma) | 1:1000 |
| TrkB | | Anti-Mouse (Sigma) | 1:1000 |

3.5 SAGGIO DELL' UPTAKE DEL GABA.

Dopo la rimozione del terreno di coltura, sono stati eseguiti 2-3 lavaggi con 1 ml di soluzione fisiologica di Krebs (composizione in mM: NaCl 118; KCl 4,4; CaCl₂ 1,2; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; Glucosio 10) scaldata a 36°C. Successivamente le cellule sono state incubate con [³H]GABA (40 nM; 15 min) in Krebs contenente acido amminoossiacetico, quest'ultimo aggiunto per prevenire la degradazione del GABA. Terminato il periodo di incubazione, l'uptake e' stato interrotto dalla rimozione della soluzione di incubazione e dal lavaggio delle cellule con Krebs freddo (4°C). La radioattività accumulata nelle cellule e' stata quindi estratta mediante un periodo di incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti con 0,5 ml di etanolo acido (95% di etanolo/5% di HCl 0.1M) e quantificata con spettrofotometria di scintillazione liquida. L'uptake aspecifico e' stato valutato in cellule incubate a 0°C ed è stato sottratto dai valori ottenuti. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in duplicato.

3.6 WESTERN BLOT.

3.6.1 Lisati cellulari.

Le cellule sono state fatte crescere e aderire su fiasca (t25) . Abbiamo mantenuto in coltura le cellule a tempi differenti in modo da poter effettuare uno screening valutando le possibili fasi del differenziamento. Le cellule sono state bloccate (private del loro terreno e conservate in camera fredda a -80°C) a diversi giorni dopo il trattamento con acido retinoico, ottenendo così un pattern comprendente tempi brevi e tempi lunghi di differenziamento. Il protocollo sperimentale e i tempi di esposizione prevedevano due gruppi:

- Tempi brevi: NT_{RPMI}, NT_{DMEM-F12}, 30"Veicolo 30"RA, 5'V 5'RA, 30'V 30'RA, 1hV 1hRA, 2hV 2hRA, 3hV 3hRA, 18hV 18hRA, 24hV 24hRA;
- Tempi lunghi: NT_{RPMI}, 7dRA, 8dRA, 10dRA, 14dRA, 17dRA, 21dRA.

Per ottenere gli omogenati le cellule sono state lavate due volte con PBS 1X freddo (4°C), risospese in tampone di lisi (Lysis Buffer: 1% NP 40 , 25mM HEPES pH 8, 0,4M KCl, 5mM EDTA pH8) con inibitori delle proteasi e delle fosfatasi:

| Inibitori | [] | |
|-------------------|-------------|--------|
| EGTA | Cf 8mM pH8 | SIGMA |
| EDTA | Cf 1mM pH8 | SIGMA |
| NaF | Cf 250mM | SIGMA |
| Trypsin inhibitor | Cf 50 µg/ml | SIGMA |
| Benzamidine | Cf 5mM | SIGMA |
| PMSF | Cf 2mM | SIGMA |
| DTT | Cf 1M | BIORAD |
| Aprotinina | Cf 5µg/ml | SIGMA |

Si incuba in ghiaccio a 4°C per 15'.

Si centrifuga a 13500 rpm per 15' a 4°C. Viene conservato il supernatante contenente le proteine.

3.6.2 Determinazione delle proteine con kit Bio-Rad.

La concentrazione delle proteine nei lisati cellulari è stata determinata utilizzando il colorante triarilmetano (Comassie Blu), che in soluzione acida si lega alle proteine sviluppando una colorazione blu; l'intensità della colorazione determinata a 595nm è direttamente proporzionale alla concentrazione delle proteine.

La curva standard è stata preparata realizzando soluzioni di albumina serica bovina (BSA, Sigma Chemicals, St.Louis, Mo., USA) aventi diversa concentrazione, addizionata con soluzione Bio-Rad (Comassie Blu).

A 5µl di ciascun campione sono stati aggiunti 200µl di soluzione Bio-Rad e 800µl di acqua distillata . Ogni campione è stato agitato tramite vortex in modo da omogeneizzare la soluzione. Successivamente si procedeva alla lettura colorimetrica dei campioni alla lunghezza d'onda di 595 nm. I livelli di proteine nei campioni erano misurati sulla base di una curva di taratura costruita utilizzando soluzioni standard di BSA.

3.6.3 Elettroforesi (SDS-PAGE).

I lisati cellulari contenenti quantità equivalenti di proteine (100µg), sono stati portati allo stesso volume con tampone di lisi completo degli inibitori delle proteasi.

Successivamente è stato aggiunto a ciascun campione 1/3 di Laemmli Buffer 4X rispetto al volume totale.

I campioni sono stati poi sottoposti a SDS-PAGE utilizzando gel avente porosità del 10%-12%.

Le proteine sono state trasferite su filtri di nitrocellulosa che sono stati poi incubati in una soluzione di saturazione in tampone fosfato (PBS 1X, Gibco BRL, Grand Island, NY,USA) completato con 5% _{w/v} di latte in polvere e 5%_{w/v} di albumina serica bovina (BSA, Sigma Chemicals, St.Louis, Mo., USA) per 30' in agitazione a temperatura ambiente.

Successivamente sono stati incubati per 2 ore in agitazione a temperatura ambiente i seguenti anticorpi primari:

| Ab I | [] | Ab II | [] |
|--|------------|----------------------------|------------|
| Caspasi-3 (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti- Rabbit (Sigma) | 1:1000 |
| ERK1/2 (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti- Rabbit (Sigma) | 1:1000 |
| PKC ζ (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti- Rabbit (Sigma) | 1:1000 |
| PKC α (SantaCruzBiotechnology) | 1:1000 | Anti- Rabbit (Sigma) | 1:1000 |

Trascorse le due ore si sono effettuati tre lavaggi con PBS 1X addizionato con 0,1% di Tween₂₀ , per ciascuna nitrocellulosa incubata col rispettivo anticorpo primario.

Successivamente i fogli di nitrocellulosa sono stati incubati con l'anticorpo secondario corrispondente al suo primario coniugato con perossidasi, per un'ora in agitazione a temperatura ambiente. Il legame dell'anticorpo è stato rivelato mediante chemiluminescenza seguita da autoradiografia utilizzando reagenti e pellicole ECL (Hyperfilm-ECL luminescence detection film e ECL-Western blotting detection reagents, Amersham Corp., Arlington Heights, Ill, USA).

4. RISULTATI

4.1 EFFETTO DEL TRATTAMENTO PER 24 E 48 ORE CON ACIDO RETINOICO SULLA VITALITA' CELLULARE IN COLTURE DI P19.

In una prima fase della ricerca, allo scopo di valutare l'eventuale tossicità dell'All-Trans RA sulla vitalità delle cellule P19 in coltura, sono state aggiunte concentrazioni crescenti (10^{-8} - 10^{-4} M) del composto in esame al mezzo di coltura e, 24 e 48 ore dopo il trattamento, la sopravvivenza cellulare è stata saggiata mediante analisi citofluorimetrica.

Come riportato in Fig. 14A, dopo 24 ore dal trattamento con All-Trans RA 10^{-4} M, si evidenziava una significativa riduzione della sopravvivenza cellulare, pari a circa il 20% rispetto alla cellule di controllo (non trattate). Al contrario, le altre concentrazioni saggiate non inducevano alcuna variazione significativa della sopravvivenza cellulare (Fig. 14A).

Analizzando la sopravvivenza cellulare dopo 48 ore, nelle colture di controllo si riscontrava una certa percentuale di mortalità, probabilmente dovuta all'elevata confluenza delle cellule. Nelle stesse condizioni sperimentali, il trattamento con All-Trans RA induceva una moderata tossicità sia alla concentrazione di 10^{-4} M che a quella di 10^{-5} M (Fig. 14B). E' interessante notare che l'effetto della concentrazione di 10^{-4} M risulta paragonabile a quello osservato dopo 24 ore.

Le cellule sopravvissute continuavano a proliferare in modo paragonabile alle colture di controllo. Sulla base di tali risultati, si è deciso di utilizzare All-Trans RA ad una concentrazione di 10^{-6} M per indurre e studiare il differenziamento neuronale delle cellule P19.

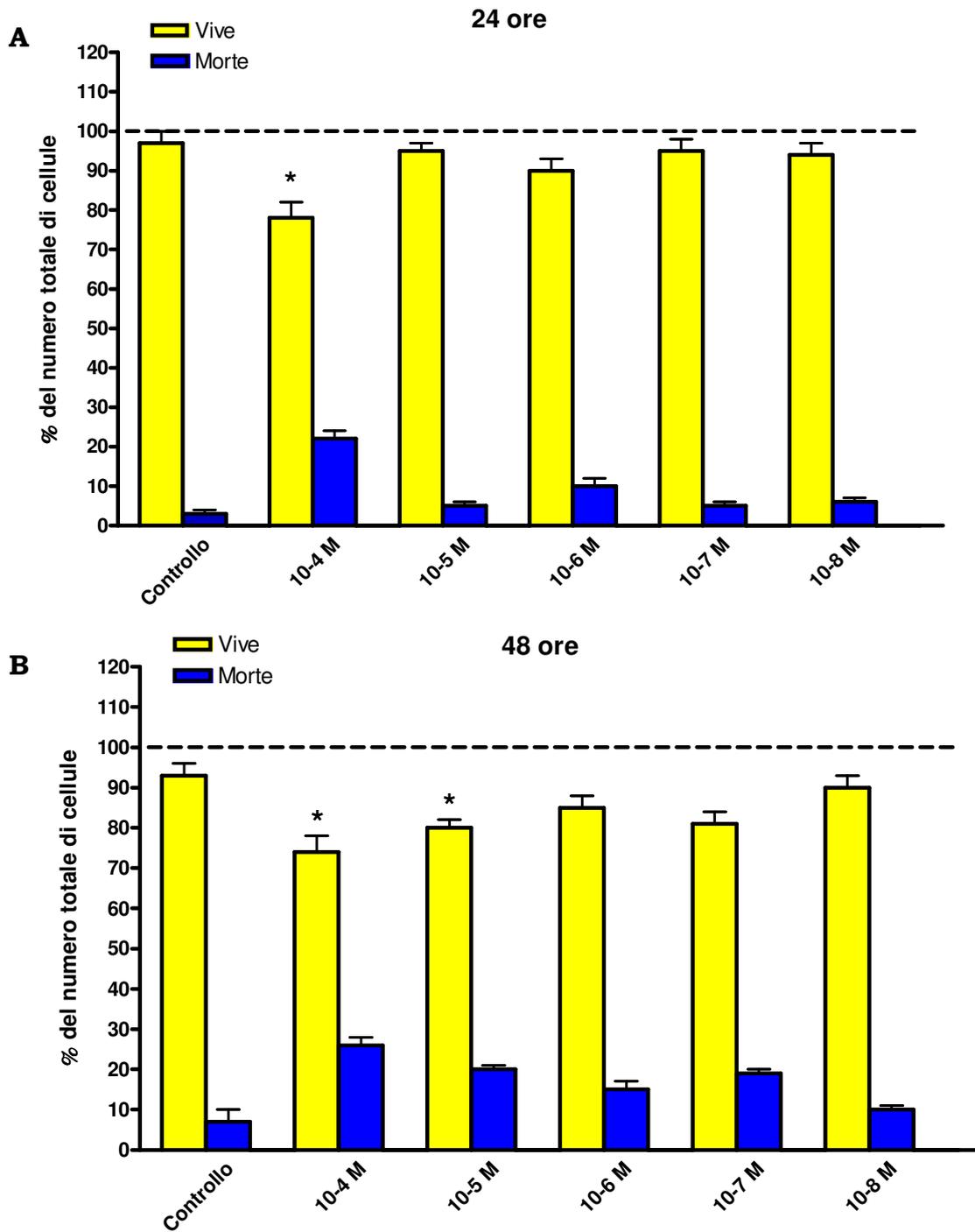


Fig.14: *Determinazione della vitalità cellulare* in cellule P19 in seguito a 24 ore (A) e 48 ore (B) di trattamento con All-Trans RA a concentrazioni crescenti. I dati sono riportati come media \pm SEM (n=4) ** p<0.05, significativamente diverso dal controllo.

4.2 VALUTAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO NEURONALE DI CELLULE P19 IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON ALL-TRANS RA

Lo studio del differenziamento neuronale indotto da All-Trans RA in cellule P19 e' stato eseguito sia valutando parametri morfologici che analizzando l'espressione di proteine coinvolte nei processi di neurogenesi.

4.2.1 Aspetti morfologici delle cellule p19 indifferenziate.

Osservando al microscopio a contrasto di fase le cellule P19 allo stato indifferenziato, si evidenziava una popolazione cellulare mista, caratterizzata da aspetti morfologici simil-epitelioidi e simil-fibroblastoidi (Fig. 15A). Utilizzando un filtro DAPI era possibile visualizzare i nuclei di tali cellule, che risultavano essere numerosi e ben visibili (Fig. 15B).

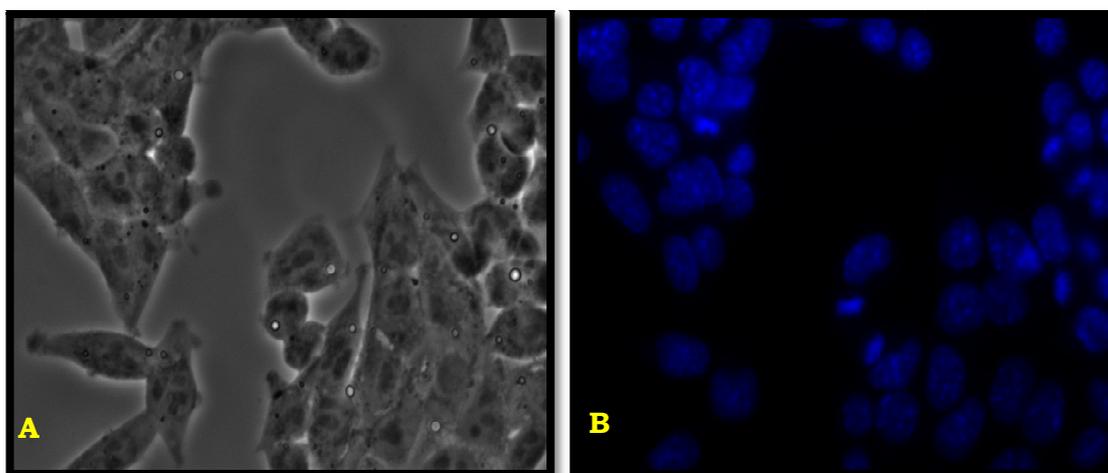


Figura 15 Cellule P19 indifferenziate; l'immagine A mette in evidenza la caratteristica morfologia di questa linea cellulare, visualizzata con microscopio a contrasto di fase, 40X. Nell'immagine B su fondo nero, sono visibili i nuclei in blu (DAPI).

4.2.2 Formazione di corpi embrioidi.

E' noto che le cellule P19 possono essere indotte a differenziare in neuroni e glia quando aggregano spontaneamente formando aggregati cellulari, detti corpi embrioidi, che contengono cellule dei tre foglietti embrionali, e in presenza di All-Trans RA. Nel tentativo di migliorare questo processo, prima di trattare le cellule con All-Trans RA abbiamo sostituito il mezzo di coltura delle cellule P19 indifferenziate con NBM. Come evidenziato in Fig.16, dopo due giorni dalla sostituzione del mezzo di coltura con NBM, si osservava la formazione dei corpi embrioidi nei quali era gia' evidenziabile la presenza di strutture simili alle estroflessioni delle cellule neuronali. Questi aggregati venivano lasciati crescere per altre 48 ore, prima di effettuare il trattamento con All-Trans RA.

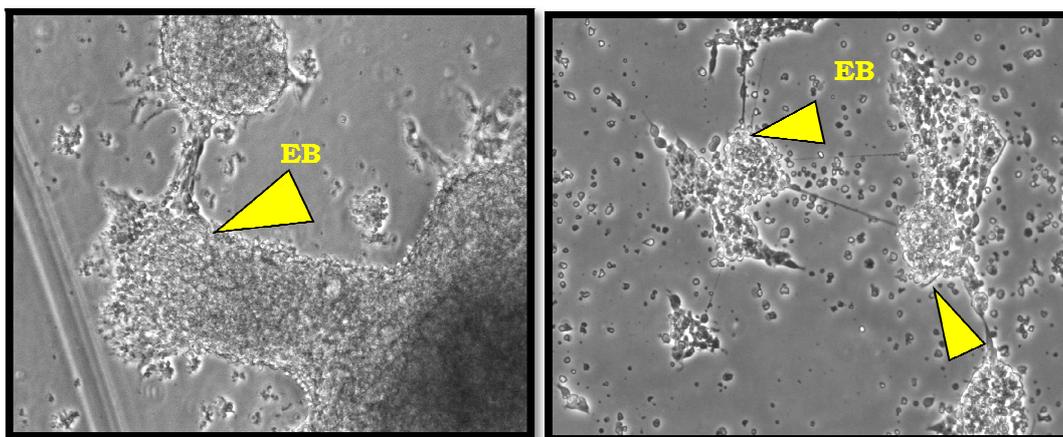


Figura 16 Corpi embrioidi (Embryoid Body, EB) di cellule P19. In corrispondenza delle frecce sono mostrate le tipiche estroflessioni che formano questi aggregati cellulari.

4.2.3 Trattamento con All-Trans RA.

Sulla base dei risultati ottenuti (*vedi sopra*), il differenziamento neuronale e' stato indotto trattando per 48 ore le cellule P19 con All-Trans RA 10^{-6} M, dopo 2 giorni dalla sostituzione del mezzo di coltura

con NBM. Uno schema del protocollo sperimentale e' riportato in Fig. 17.

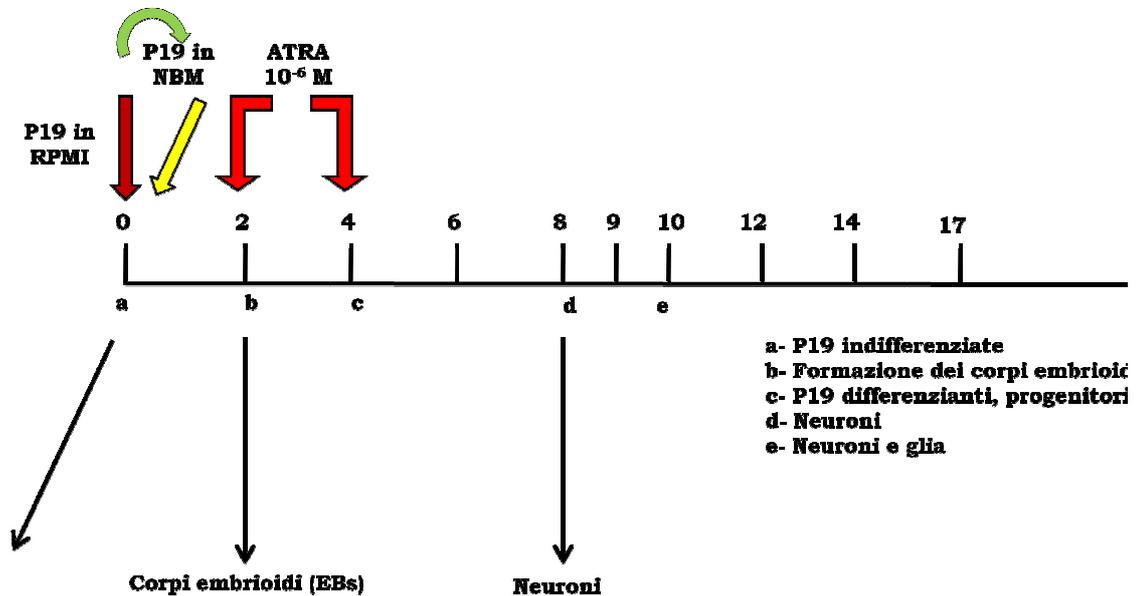


Figura 17. Rappresentazione schematica del protocollo sperimentale utilizzato. Cellule di carcinoma embrionale (P19) indifferenziate formavano corpi embrioidi (EBs) in terreno NBM. Successivamente veniva effettuato il trattamento con All-Trans RA per indurre il differenziamento delle cellule P19 in senso neuronale.

Utilizzando queste condizioni sperimentali ed osservando le colture dopo diversi giorni dall'aggiunta di All-Trans RA, era possibile evidenziare una popolazione cellulare visivamente eterogenea, composta ancora da alcune cellule epiteliodi e fibroblastoidi ma anche da molte cellule neuronali gia' differenziate o in corso di differenziamento (Fig. 18).

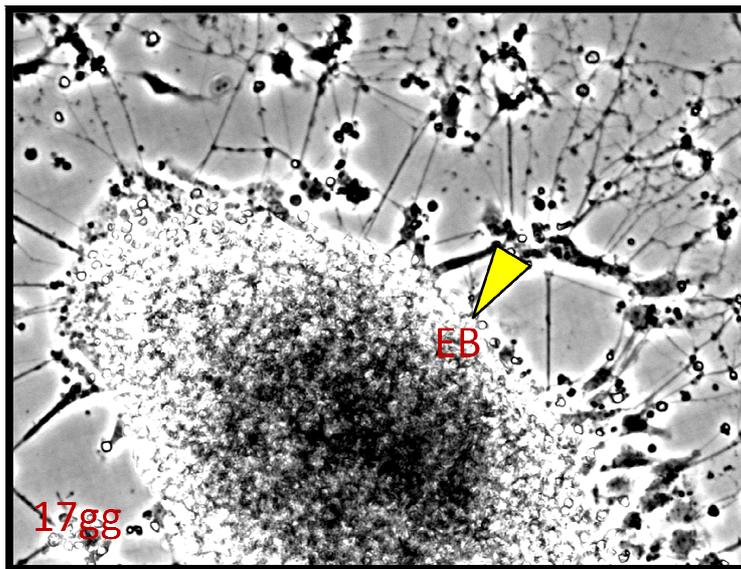
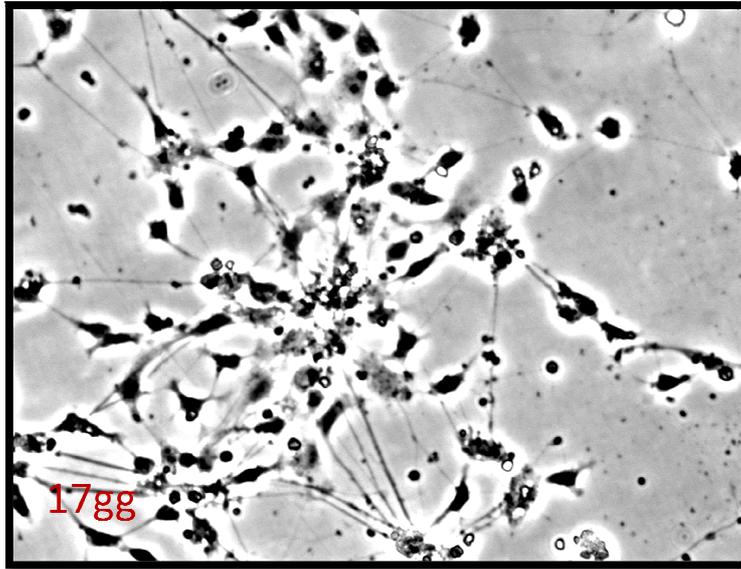


Figura 18 Neuronii ottenuti da cellule di P19 trattate con All-Trans RA mantenuti in coltura a 17 giorni dal trattamento.

Analizzando colture di P19 dopo 4 giorni dall'aggiunta di All-Trans RA, si poteva osservare una popolazione cellulare visivamente mista, costituita sia da cellule P19 indifferenziate tipicamente fibroblastoidi, sia da cellule P19 in corso di differenziamento (Fig. 19A).

Tramite microscopio a fluorescenza risultavano visibili i numerosi nuclei, indice di un'attività proliferativa ancora intensa (Fig.19B) così come la presenza di immunoreattività per il neurofilamento intermedio NF160, caratteristico delle cellule nervose (Fig.19C). Inoltre, incubando il preparato con falloidina coniugata al fluorocromo rosso TRIC, era possibile visualizzare l'organizzazione del citoscheletro in cui si riconosce specificatamente la forma polimerizzata dell'actina che consente una chiara visualizzazione della morfologia cellulare (Fig.19D). Risultava così evidente una fitta rete di filamenti intermedi di cellule simil fibroblastoidi, che fungono da sostegno per la crescita e lo sviluppo neuronale.

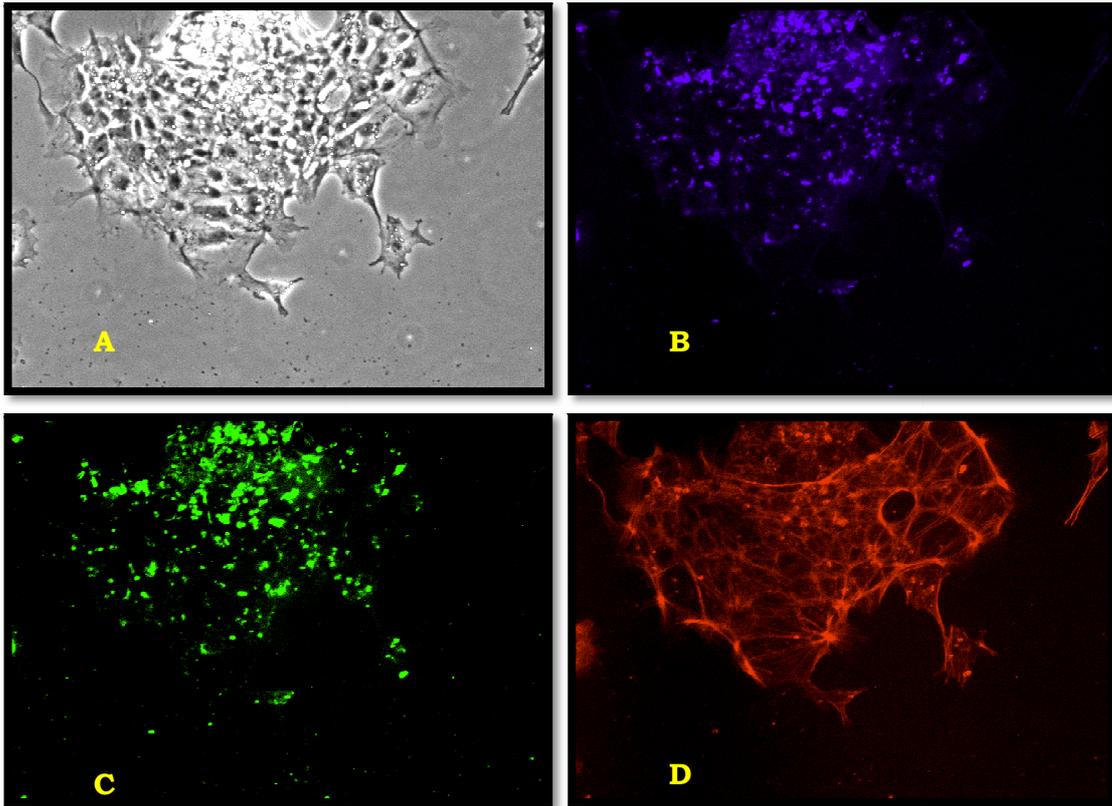


Figura 19: *Visualizzazione immunocitochimica* di cellule P19 differenziate in senso neuronale con All-Trans RA a 4 giorni dal trattamento. L'immagine in contrasto di fase mette in evidenza la morfologia delle cellule (A). L'immunofluorescenza mostra nello stesso campo la presenza degli immunocomplessi colorati su fondo nero; sono visibili i nuclei in blu (DAPI), i neurofilamenti verdi (NF160-FITC) e il citoscheletro rosso (falloidina-TRIC B,C,D).

Un piu' marcato differenziamento neuronale delle cellule P19 e' stato riscontrato dopo 7 giorni dal trattamento con All-Trans RA. Infatti, dopo tale periodo era possibile evidenziare nel preparato un fenotipo neuronale quasi del tutto maturo (Fig. 20A). In particolare, come evidenziato in Fig. 20C, era riscontrabile una marcata immunoreattivita' all'anticorpo per il neurofilamento NF160 che rivelava la formazione di una struttura chiara e ben definita in grado di mettere in collegamento i filamenti intermedi delle cellule adiacenti.

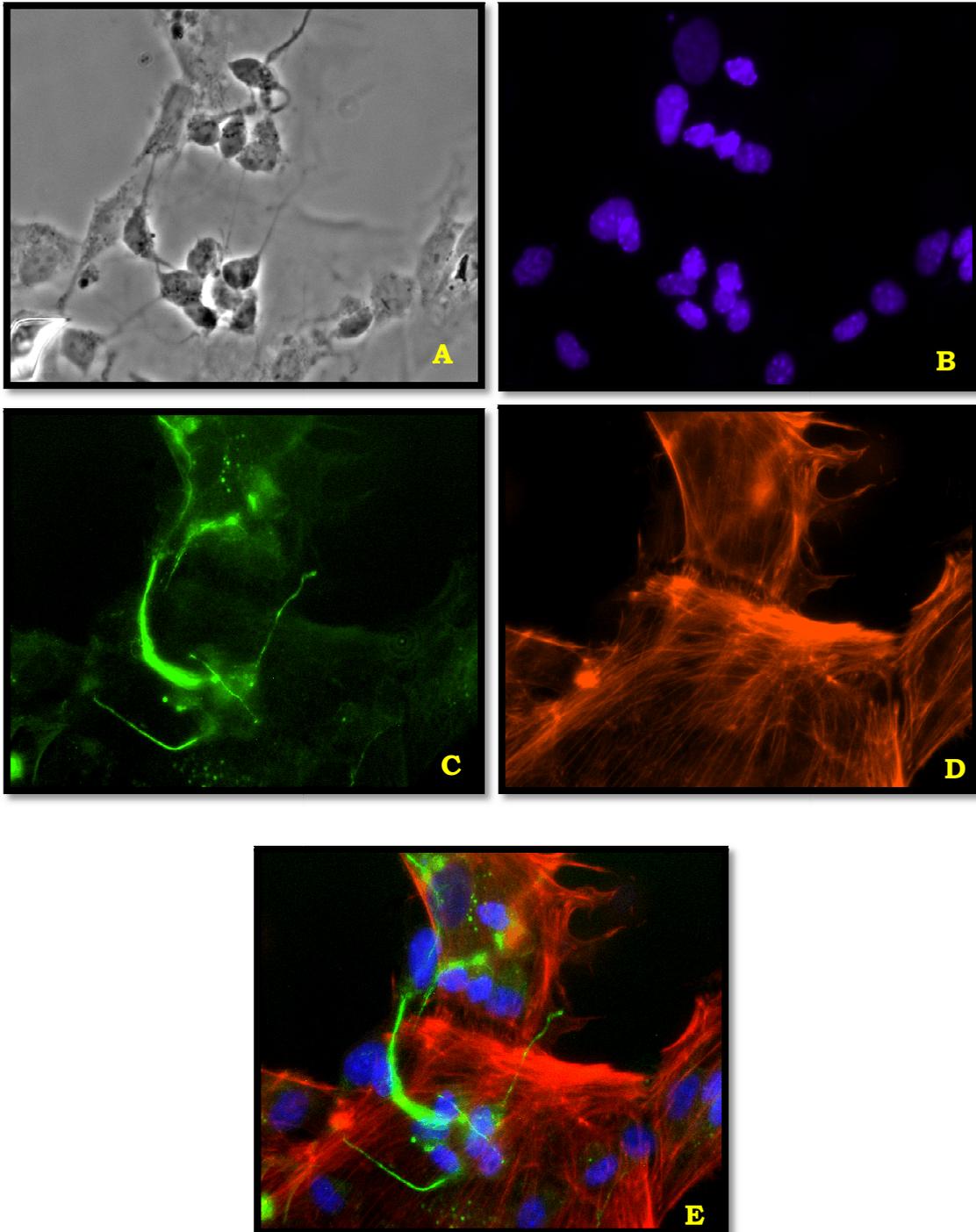


Figura 20: *Visualizzazione immunocitochimica* di cellule P19 differenziate in senso neuronale con All-Trans RA a 7 giorni dal trattamento. L'immagine (C) mette in evidenza la presenza dei neurofilamenti.

E' inoltre noto che le P19 esprimono le proteine per il neurofilamento, NF68, NF160, abbastanza precocemente, già a 3 giorni dal trattamento con All-Trans RA. NF68 ed NF160 sono sintetizzati in maniera coordinata nei neuroni in fase di sviluppo.

Analizzando colture di P19 dopo 3 giorni dal trattamento con All-Trans RA tramite microscopio a fluorescenza, risultava evidente la presenza di immunoreattività anche per il neurofilamento intermedio NF68 (Fig 21).

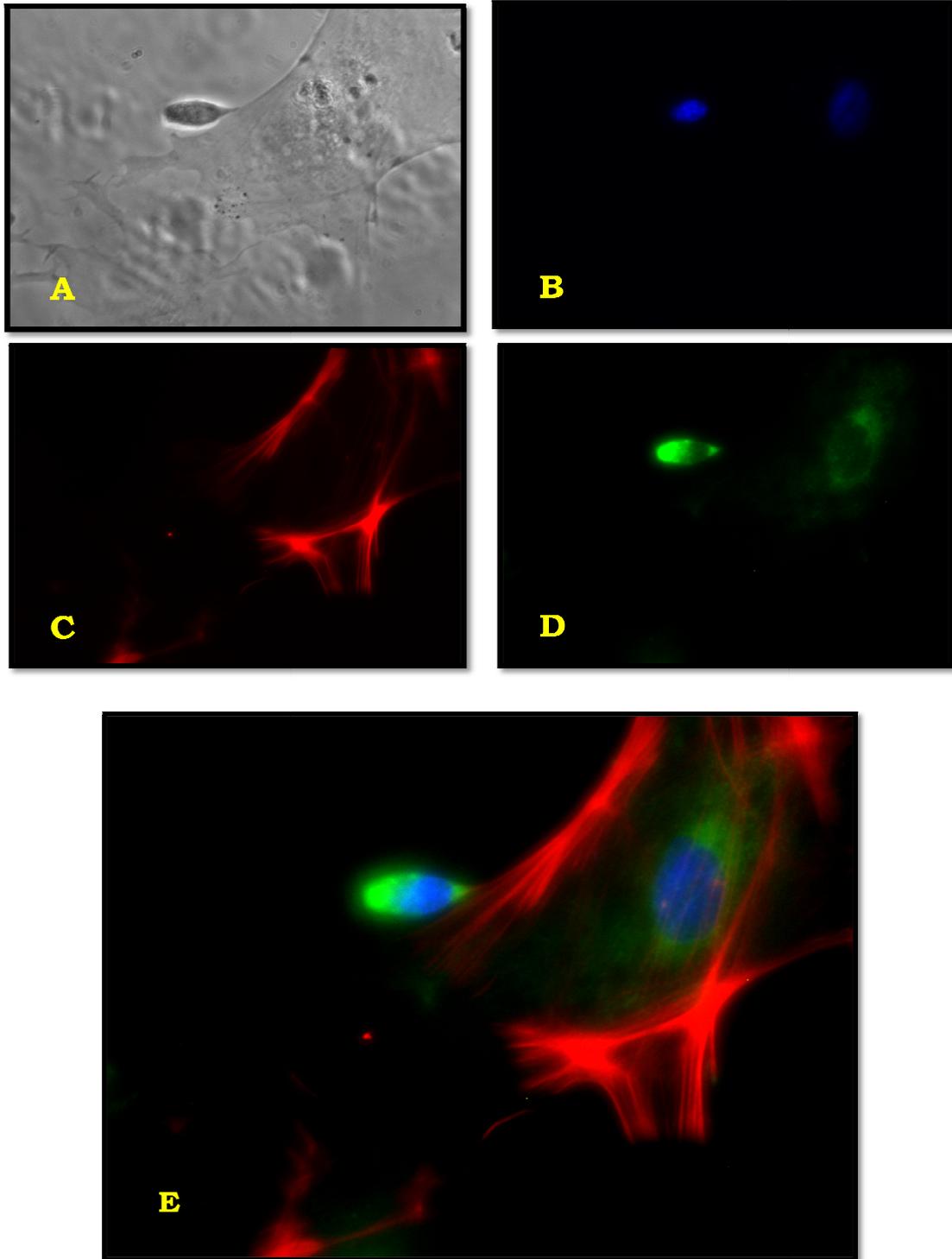


Figura 21. *Visualizzazione immunocitochimica* di cellule P19 differenziate in senso neuronale con All-Trans RA a 3 giorni dal trattamento. L'immagine (C) mette in evidenza la presenza del neurofilamento NF68.

4.3 VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' NEURONALE IN CELLULE P19 TRATTATE CON ALL-TRANS RA: MISURA DELL'UPTAKE DI [³H]GABA.

Studi precedentemente pubblicati in letteratura indicano che cellule P19 indotte a differenziare in senso neuronale tramite All-Trans RA, sono in grado di captare GABA in modo specifico (McBurney et al., 1988). Sulla base di tali evidenze ed allo scopo di valutare la possibile funzionalità dei neuroni derivati dalle cellule P19 nelle nostre condizioni sperimentali, sono stati eseguiti esperimenti atti a valutare la loro capacità di captare [³H]GABA. Tali esperimenti sono stati eseguiti 10 giorni dopo il trattamento con All-Trans RA. Come riportato in Fig. 22, l'uptake di [³H]GABA era significativamente più alto nelle cellule trattate con All-Trans RA rispetto a colture di controllo (non trattate) o esposte al solo veicolo (etanolo 0,01%).

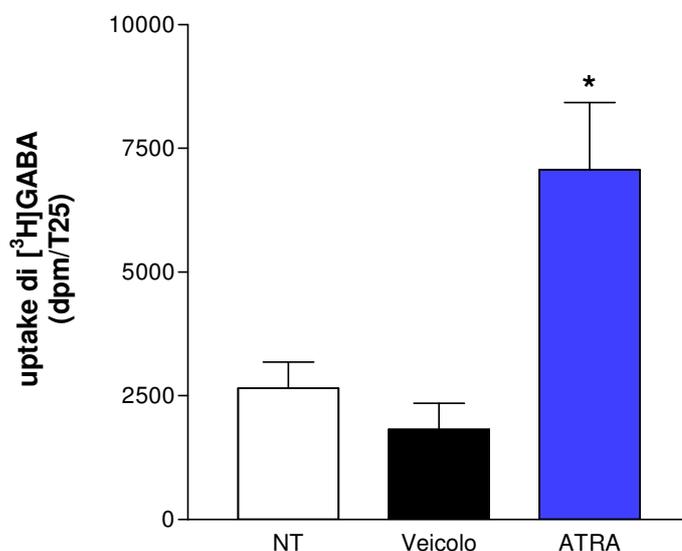


Fig. 22. Uptake di [³H]GABA in cellule P19 trattate con acido retinoico (All-Trans RA) 10⁻⁶M per 48 ore. Gli esperimenti sono stati condotti 10 giorni dopo il trattamento. NT = non trattato (controllo); il gruppo veicolo è stato trattato con il solvente utilizzato per poi preparare la soluzione di All-Trans RA (etanolo 0,01%). Ogni istogramma rappresenta la media ± S.E.M di 3-4 esperimenti condotti in duplicato. *P<0,05 significativamente diverso dagli altri gruppi (ANOVA seguita da Newman-Keuls test per comparazioni multiple).

4.4 ANALISI DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DI ALCUNE PROTEINE POSSIBILMENTE COINVOLTE NEL DIFFERENZIAMENTO NEURONALE DI CELLULE P19 TRATTATE CON ALL-TRANS RA.

Una volta appurato che nelle condizioni sperimentali utilizzate il trattamento con All-Trans RA era in grado di indurre effettivamente il differenziamento neuronale delle cellule P19, sono state eseguite una serie di analisi, combinando metodiche di western blot ed immunocitochimica, atte a valutare il profilo di espressione di alcune proteine. In particolare, sono state studiate proteine per le quali e' stato riportato un possibile coinvolgimento nel differenziamento neuronale di cellule staminali. Questo allo scopo di contribuire alla comprensione dei possibili eventi molecolari alla base dell'effetto differenziante dell'All-Trans RA.

4.4.1 PKC ζ .

Sulla base di dati riportati in letteratura, in questa serie di esperimenti e' stata presa in considerazione l'isoforma ζ delle PKC che, come riportato nell'Introduzione, appartiene al gruppo delle PKC atipiche (aPKC) e dalla letteratura sembra essere coinvolta in meccanismi di proliferazione e differenziamento. In particolare, e' stata valutata l'espressione di questa proteina nelle cellule P19 trattate con All-Trans RA e lasciate differenziare. L'analisi e' stata effettuata sia a tempi brevi che a tempi lunghi.

4.4.1.1 Tempi brevi.

Come mostrato in Fig. 23, mediante un'analisi di western blot e' stato possibile evidenziare l'espressione di PKC ζ in cellule P19 non trattate. La sostituzione del terreno di coltura con DMEM induceva un aumento (circa 50%) dell'espressione di tale proteina. In seguito all'esposizione per 30", 5', 30', 2 ore, 3 ore e 24 ore ad All-Trans RA o al veicolo in cui

esso era disciolto, i livelli di espressione di PKC ζ non variavano rispetto a quelli riscontrati in cellule P19 non trattate e lasciate in DMEM. Al contrario, l'esposizione per 1 ora e per 18 ore ad All-Trans RA o al veicolo induceva un aumento dell'espressione di PKC ζ come si evince dalla maggiore intensita' delle bande e dalla Fig. 23A. In seguito ad esposizione ad All-Trans RA per 1 ora, l'aumento dell'espressione di PKC ζ sembra essere superiore a quello osservato, nelle stesse condizioni sperimentali, in cellule P19 esposte al veicolo. E' possibile ipotizzare che la mobilitazione di PKC ζ osservata in queste condizioni sperimentali possa essere riconducibile all'attivazione di segnali intracellulari e conseguenti modificazioni indotte dal trattamento con All-Trans RA (risposta veloce).

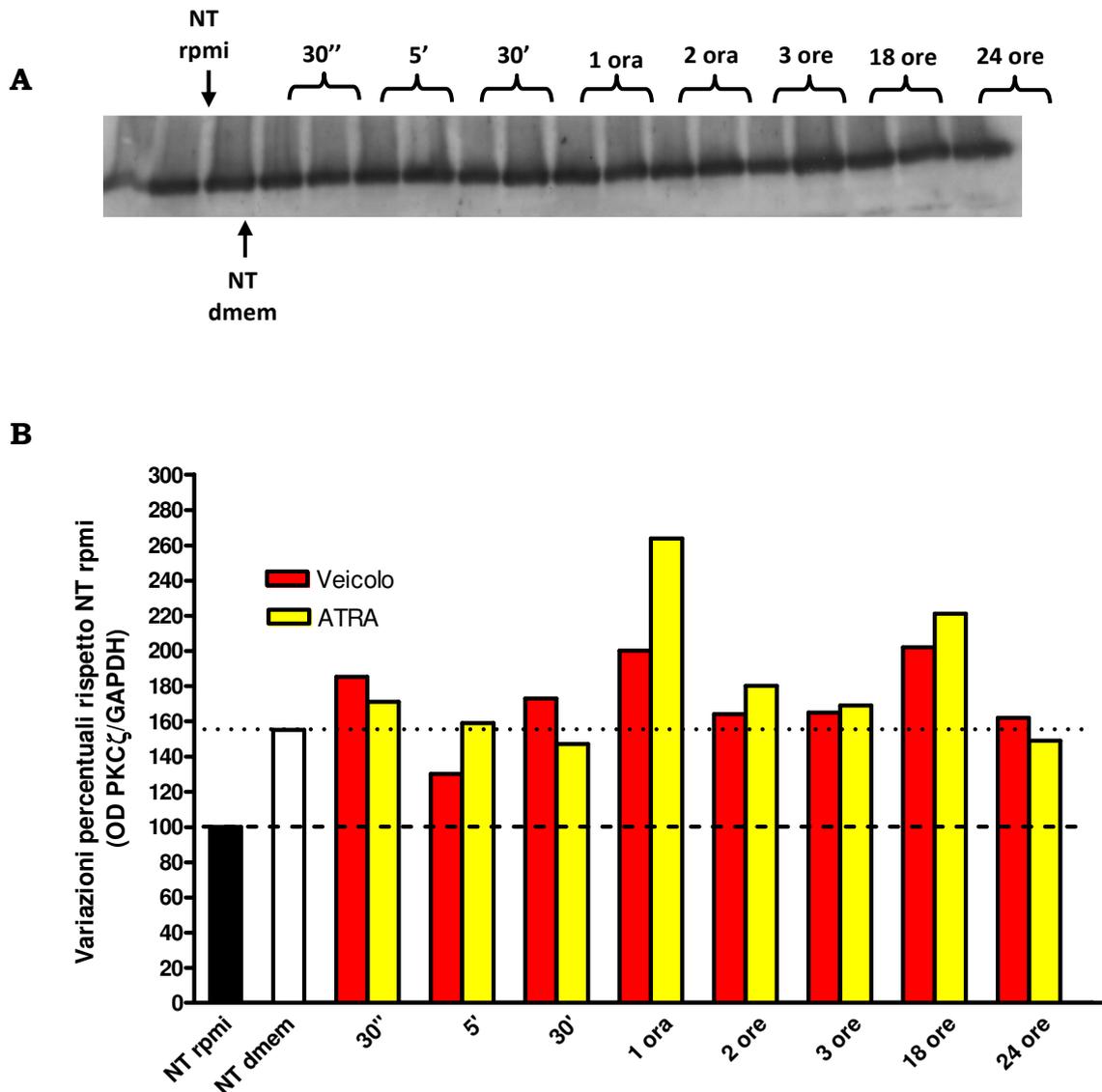


Figura 23: Pannello A: *Immunoblot* rappresentativo dell'espressione della PKC ζ misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati cellulari di cellule P19 non trattate o esposte per tempi diversi ad All-Trans RA o al veicolo in cui esso e' disciolto. Nei gruppi trattati, la banda a sinistra rappresenta il trattamento con il veicolo, mentre la banda a destra rappresenta il gruppo esposto ad All-Trans RA. Pannello B: Risultati dell'analisi densitometrica delle bande riportate nel pannello A. I dati sono stati normalizzati per i valori di GAPDH, utilizzata come proteina "house-keeping".

Questo profilo di espressione della PKC ζ e' stato in parte confermato dagli studi di immunocitochimica, utilizzando un anticorpo anti-PKC ζ

coniugato con il fluorocromo FITC ed acquisendo successivamente le immagini al microscopio a fluorescenza (Fig. 24).

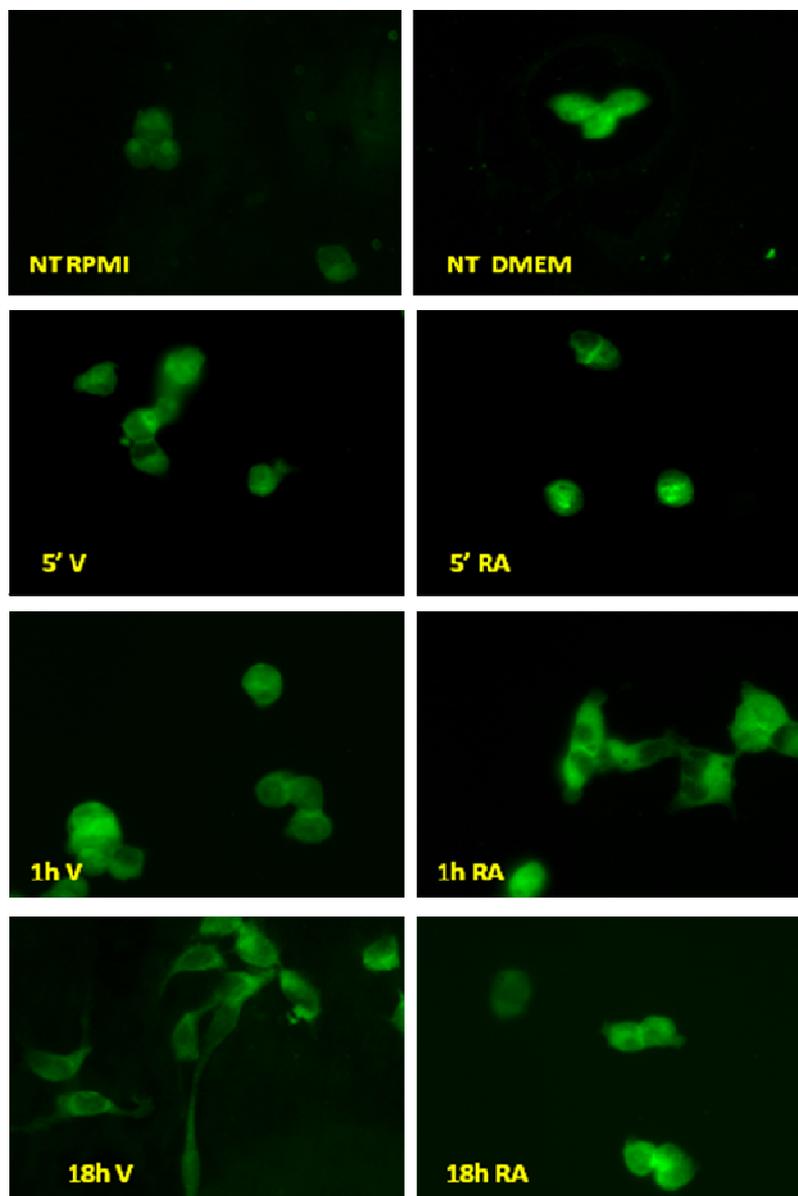


Figura 24: *Visualizzazione immunocitochimica* dell'espressione della PKC ζ in cellule P19 non trattate o esposte per tempi diversi ad All-Trans RA (RA) o al veicolo (V) in cui esso e' disciolto.

Dalle immagini ottenute è possibile notare una fluorescenza più intensa nelle cellule incubate in terreno DMEM rispetto a quelle cresciute in

terreno RPMI. Inoltre, in cellule esposte ad All-Trans RA per 1 ora la localizzazione della proteina sembra essere più circoscritta in prossimità delle membrane cellulari, rispetto ai campioni fissati a tempi più brevi in cui la mobilizzazione è maggiormente diffusa e localizzata per lo più a livello citosolico. In linea con i dati di western blot, la fluorescenza ad 1 ora appare più intensa, portando ad ipotizzare una possibile maggiore espressione della proteina in corrispondenza di tale periodo.

4.4.1.2 Tempi lunghi.

In una successiva serie di analisi è stata valutata l'espressione proteica della PKC ζ a tempi più lunghi, in relazione al differenziamento neuronale indotto dal trattamento con All-Trans RA per 48 ore.

Come riportato in Fig. 25, l'analisi tramite western blot indica che sia a 10 che a 15 giorni dal trattamento con All-Trans RA i livelli di PKC ζ risultavano leggermente aumentati rispetto ai valori di controllo. Al contrario, l'espressione della proteina era notevolmente ridotta dopo 17 e 21 giorni dal trattamento.

Questi dati suggeriscono perciò che l'andamento nell'espressione di PKC ζ nelle cellule differenziate sembra essere bifasico: si evidenzia infatti una moderata attivazione intorno alle due settimane dal trattamento con All-Trans RA, dovuta probabilmente all'effetto di All-Trans RA sulla neosintesi della proteina (risposta lenta). A periodi più lunghi si osserva, al contrario, una riduzione dell'espressione della PKC ζ .

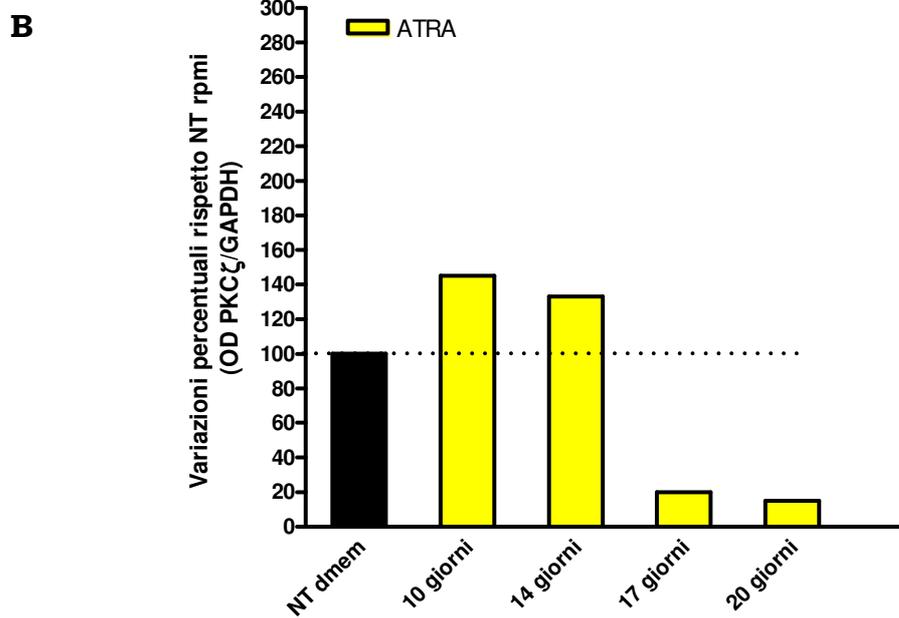
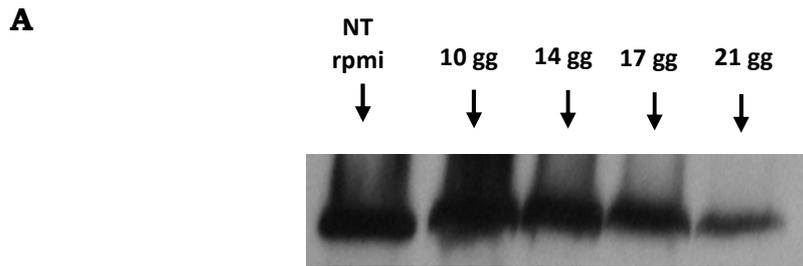


Figura 25: Pannello A: Immunoblot rappresentativo dell'espressione della PKC ζ misurata mediante analisi western blot eseguita a tempi diverse su lisati cellulari di cellule P19 non trattate o esposte (per 48 ore) ad All-Trans RA. Pannello B: Risultati dell'analisi densitometrica delle bande riportate nel pannello A. I dati sono stati normalizzati per i valori di GAPDH, utilizzata come proteina "house-keeping".

4.4.2 PKC α .

La PKC α appartiene alla famiglia delle PKC convenzionali e dati riportati in letteratura suggeriscono che essa possa essere implicata in fenomeni anti-apoptotici in molti tipi di cellule tumorali (Gutcher et al., 2003). Oltre che essere direttamente coinvolta nel differenziamento neuronale indotto con All Trans RA (Tahayato *et al.*, 1993). Come per la PKC ζ , l'analisi e' stata effettuata sia a tempi brevi che a tempi lunghi.

4.4.2.1 Tempi brevi.

Come mostrato in Fig. 26, l'analisi di western blot evidenzia l'espressione di PKC α in cellule P19 non trattate. La sostituzione del terreno di coltura con DMEM induceva circa un raddoppio dell'espressione di tale proteina. In seguito all'esposizione ad All-Trans RA per periodi superiori ad 1 ora, i livelli di espressione di PKC α aumentavano rispetto a quelli riscontrati in cellule P19 non trattate e lasciate in DMEM o trattate con veicolo. Questo profilo di espressione era confermato anche dalle analisi di immunocitochimica Fig.27.

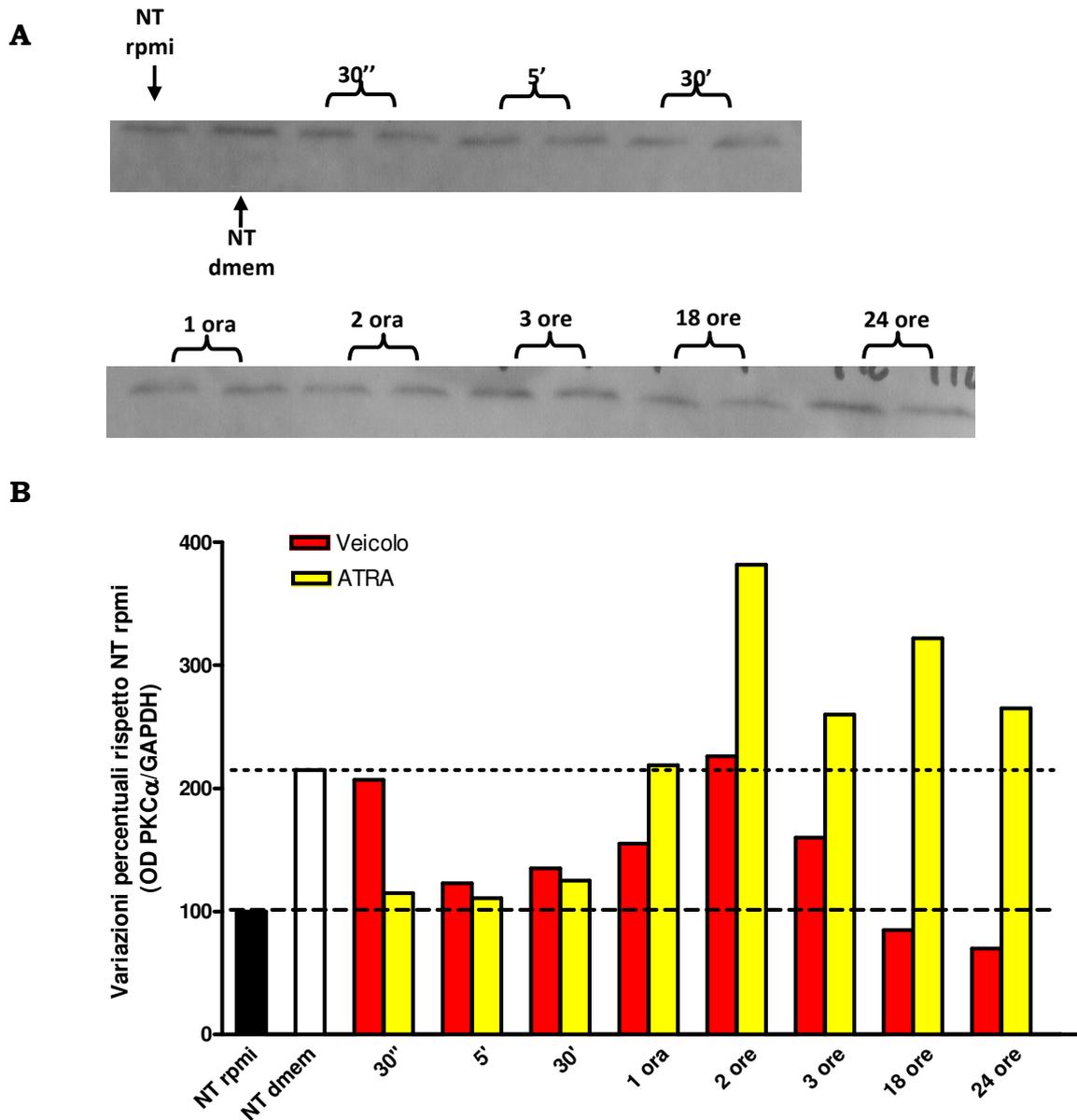


Figura 26: Pannello A: *Immunoblot* rappresentativo dell'espressione della PKC α misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati cellulari di cellule P19 non trattate o esposte per tempi diversi ad All-Trans RA o al veicolo in cui esso e' disciolto. Nei gruppi trattati, la banda a sinistra rappresenta il trattamento con il veicolo, mentre la banda a destra rappresenta il gruppo esposto ad All-Trans RA. Pannello B: Risultati dell'analisi densitometrica delle bande riportate nel pannello A. I dati sono stati normalizzati per i valori di GAPDH, utilizzata come proteina "house-keeping".

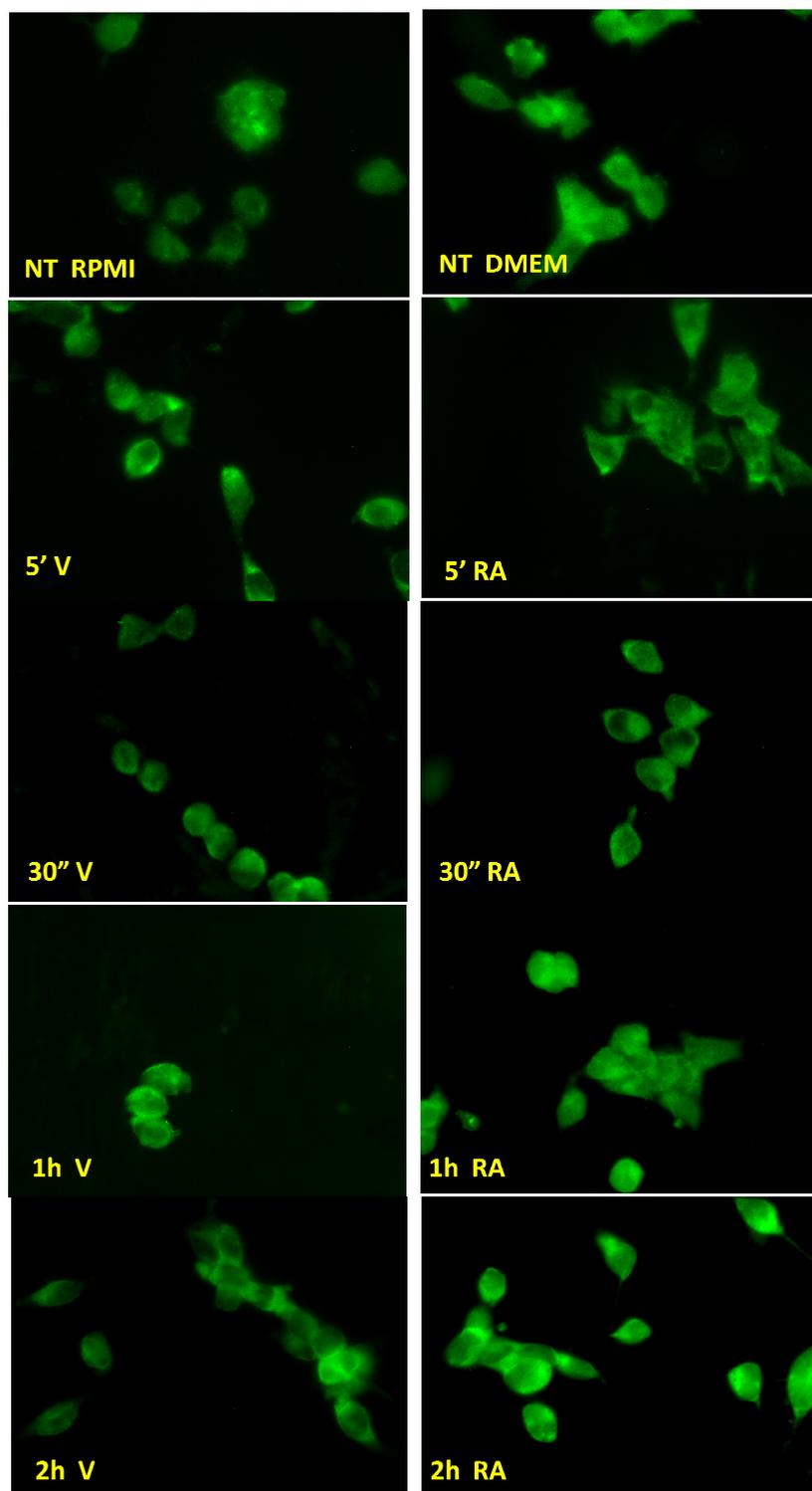


Figura 27: *Visualizzazione immunocitochimica dell'espressione della PKCα in cellule P19 non trattate o esposte per tempi diversi ad All-Trans RA (RA) o al veicolo (V) in cui esso e' disciolto.*

4.4.2.2 Tempi lunghi.

In una successiva serie di analisi e' stata valutata l'espressione proteica della PKC α a tempi piú lunghi, in relazione al differenziamento neuronale indotto dal trattamento con All-Trans RA per 48 ore.

Come riportato in Fig. 28, l'analisi tramite western blot indica che 10, 15, 17 e 20 giorni dal trattamento con All-Trans RA i livelli di PKC α risultavano confrontabili ai valori di controllo.

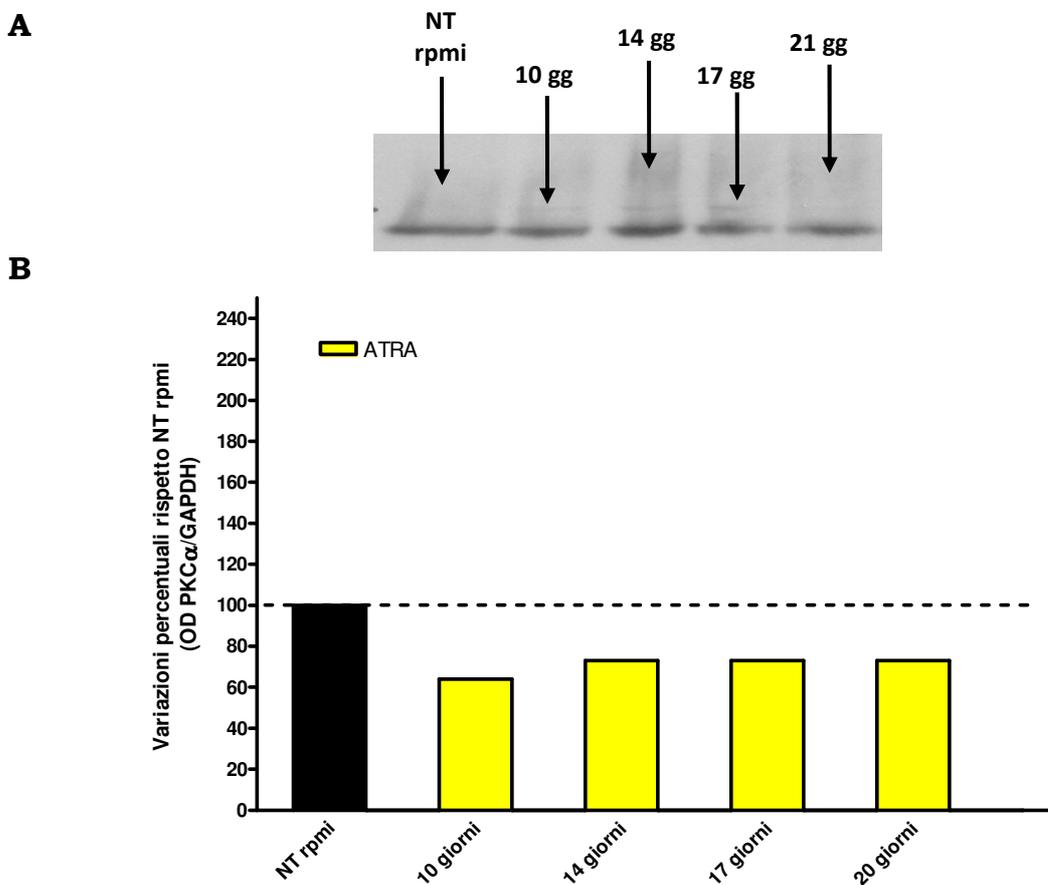


Figura 28: Pannello A: *Immunoblot* rappresentativo dell'espressione della PKC α misurata mediante analisi western blot eseguita a tempi diverse su lisati cellulari di cellule P19 non trattate o esposte (per 48 ore) ad All-Trans RA. Pannello B: Risultati dell'analisi densitometrica delle bande riportate nel pannello A. I dati sono stati normalizzati per i valori di GAPDH, utilizzata come proteina "house-keeping".

4.4.3 ERK1/2.

E' noto che nelle cellule staminali embrionali la proteina ERK1/2 svolge un ruolo rilevante nei processi che riguardano lo sviluppo ed il differenziamento in senso neuronale. Per tale motivo, il profilo dell'espressione di questa proteina in cellule P19 trattate con All-Trans RA e' stato valutato mediante esperimenti di western blot ed immunocitochimica.

4.4.3.1 Tempi brevi.

Analogamente a quanto osservato nell'analisi della PKC ζ e PKC α , e' stato possibile evidenziare l'espressione di ERK1/2 nelle cellule non sottoposte al trattamento con All-Trans RA e cresciute in RPMI. La sostituzione del medium con DMEM non alterava in modo significativo l'espressione della proteina (Fig. 29). I livelli di ERK1/2 restavano confrontabili ai valori di controllo dopo 30", 5' e 30' di trattamento con All-Trans RA. Al contrario, il trattamento con All-Trans RA per 1 ora induceva un marcato aumento dei livelli di ERK1/2. In seguito al trattamento con All-Trans RA per 2, 3, 18 e 24 ore si evidenziava invece una forte riduzione dei livelli della proteina. E' comunque da sottolineare che tale riduzione era riscontrata anche nelle cellule P19 trattate con il solo veicolo.

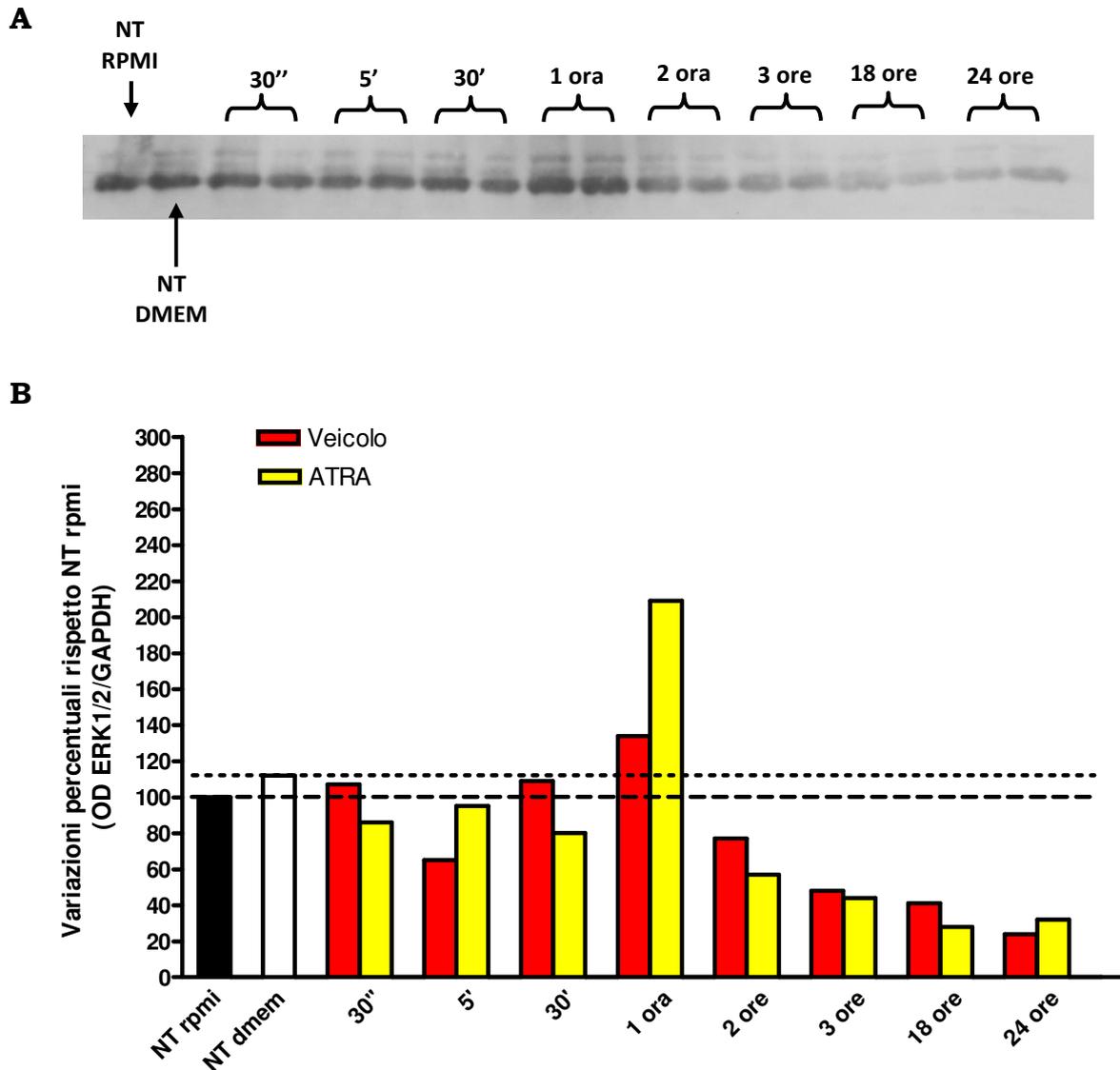
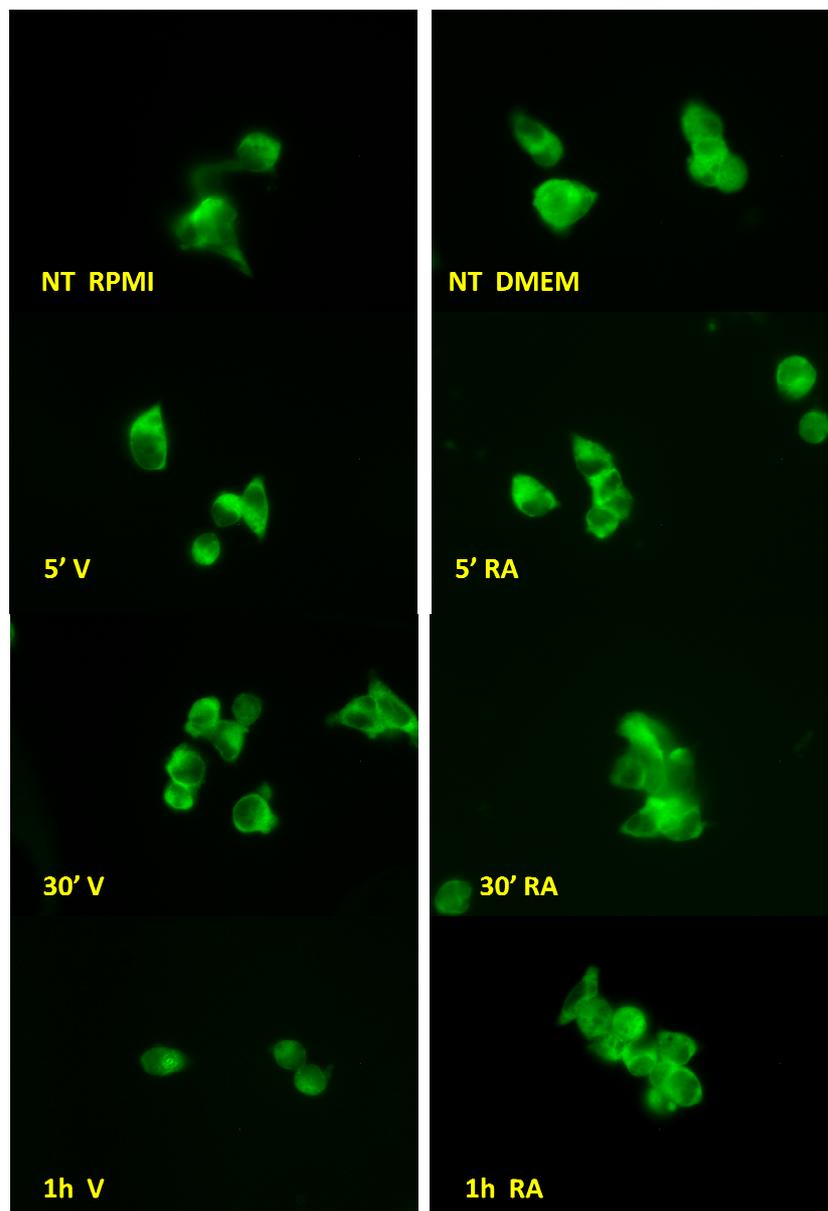


Figura 29: Pannello A: *Immunoblot* rappresentativo dell'espressione delle ERK1/2 misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati cellulari di cellule P19 non trattate o esposte per tempi diversi ad All-Trans RA o al veicolo in cui esso e' disciolto. Nei gruppi trattati, la banda a sinistra rappresenta il trattamento con il veicolo, mentre la banda a destra rappresenta il gruppo esposto ad All-Trans RA. Pannello B: Risultati dell'analisi densitometrica delle bande riportate nel pannello A. I dati sono stati normalizzati per i valori di GAPDH, utilizzata come proteina "house-keeping".

I dati ottenuti con l'immunocitochimica confermano la riduzione marcata dei livelli di ERK1/2 nelle cellule P19 trattate con All-Trans RA (Fig.30).



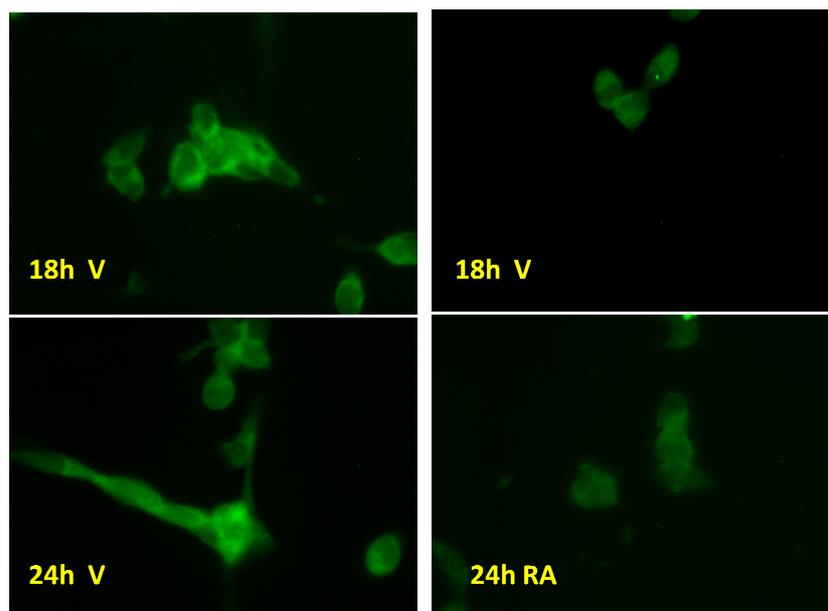


Figura 30: *Visualizzazione immunocitochimica* dell'espressione delle ERK1/2 in cellule P19 non trattate o esposte per tempi diversi ad All-Trans RA (RA) o al veicolo (V) in cui esso e' disciolto.

4.4.3.2 Tempi lunghi.

Analogamente a quanto effettuato per le altre proteine in esame, e' stata anche valutata l'espressione proteica della ERK1/2 a tempi lunghi, in relazione al differenziamento neuronale indotto dal trattamento con All-Trans RA per 48 ore.

Come riportato in Fig. 31, l'analisi tramite western blot indica che sia a 10 che a 15 giorni dal trattamento con All-Trans RA i livelli di ERK1/2 risultavano analoghi ai valori di controllo. Al contrario, l'espressione della proteina era notevolmente ridotta dopo 17 e 21 giorni dal trattamento.

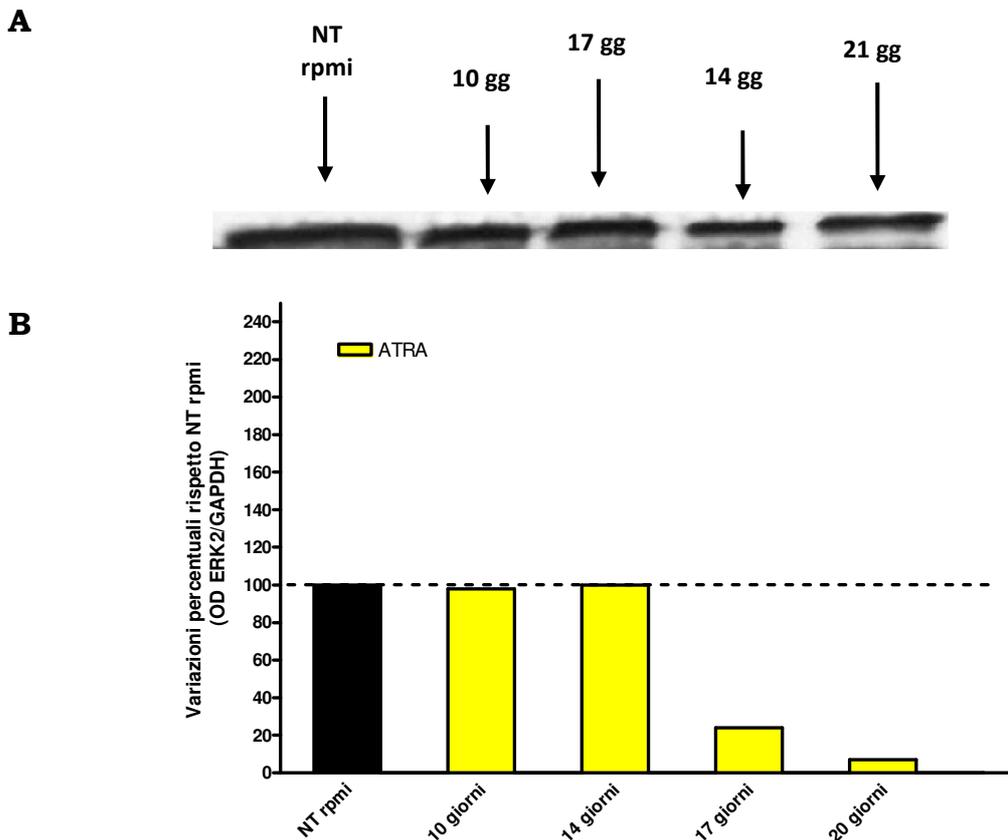


Figura 31: Pannello A: *Immunoblot* rappresentativo dell'espressione delle ERK $\frac{1}{2}$ misurata mediante analisi western blot eseguita a tempi diverse su lisati cellulari di cellule P19 non trattate o esposte (per 48 ore) ad All Trans RA. Pannello B: Risultati dell'analisi densitometrica delle bande riportate nel pannello A. I dati sono stati normalizzati per i valori di GAPDH, utilizzata come proteina "house-keeping".

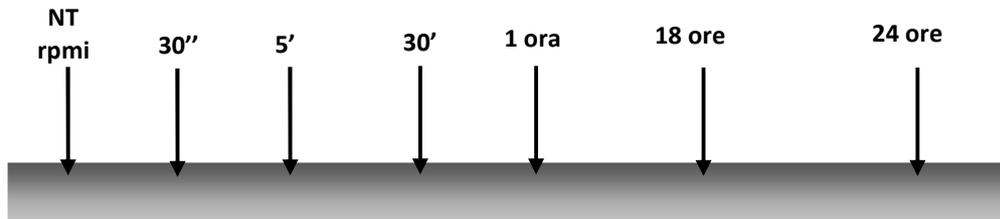
4.4.4 Caspasi-3.

In un'ultima serie di analisi, e' stata valutato il profilo dell'espressione della caspasi-3 in cellule P19 trattate con All-Trans RA. Questi esperimenti sono stati effettuati alla luce dei risultati ottenuti analizzando l'espressione della PKC α che evidenziavano un'elevata espressione della proteina nelle prime 24 ore di trattamento. Si è reso quindi necessario verificare l'eventuale attivazione di processi apoptotici.

4.4.4.1 Tempi brevi.

Contrariamente a quanto osservato nell'analisi della PKC ζ , PKC α ed ERK1/2 non si evidenziava l'espressione di Caspasi-3 nelle cellule non sottoposte al trattamento con All-Trans RA e cresciute in RPMI. Anche in seguito a trattamento con All-Trans RA per 30", 5', 30' e 1 ora non erano rivelabili livelli significativi della proteina. In seguito al trattamento con All-Trans RA per 18 e 24 ore si evidenziava invece un aumento dei livelli della proteina, specialmente nelle 24 ore (Fig.32). Questo profilo era evidenziabile anche dall'analisi immunocitochimica (Fig.33).

A



B

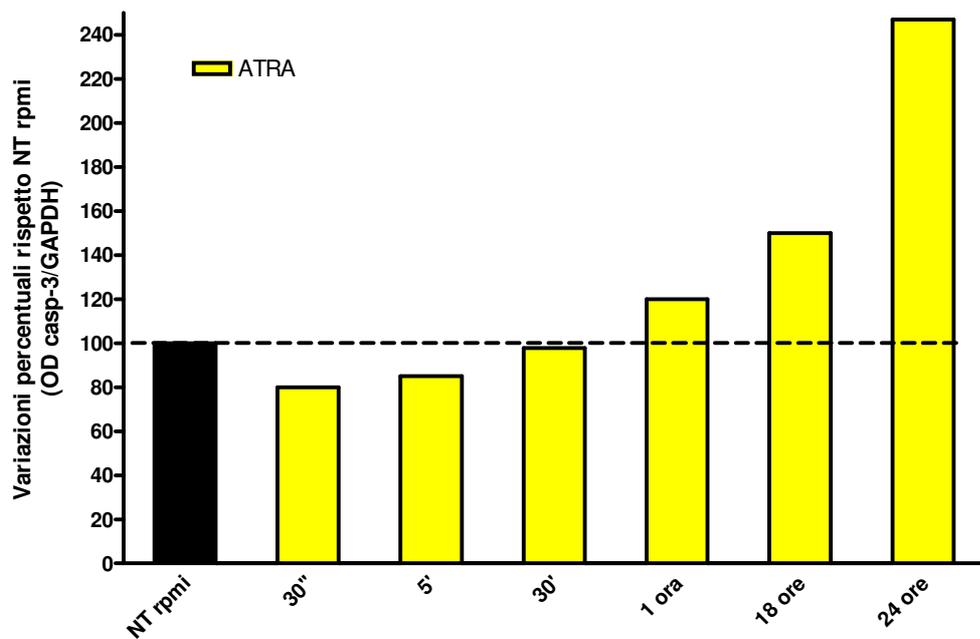


Figura 32: Pannello A: *Immunoblot* rappresentativo dell'espressione della Caspasi-3 misurata mediante analisi western blot eseguita su lisati cellulari di cellule P19 non trattate o esposte per tempi diversi ad All-Trans RA. Pannello B: Risultati dell'analisi densitometrica delle bande riportate nel pannello A. I dati sono stati normalizzati per i valori di GAPDH, utilizzata come proteina "house-keeping".

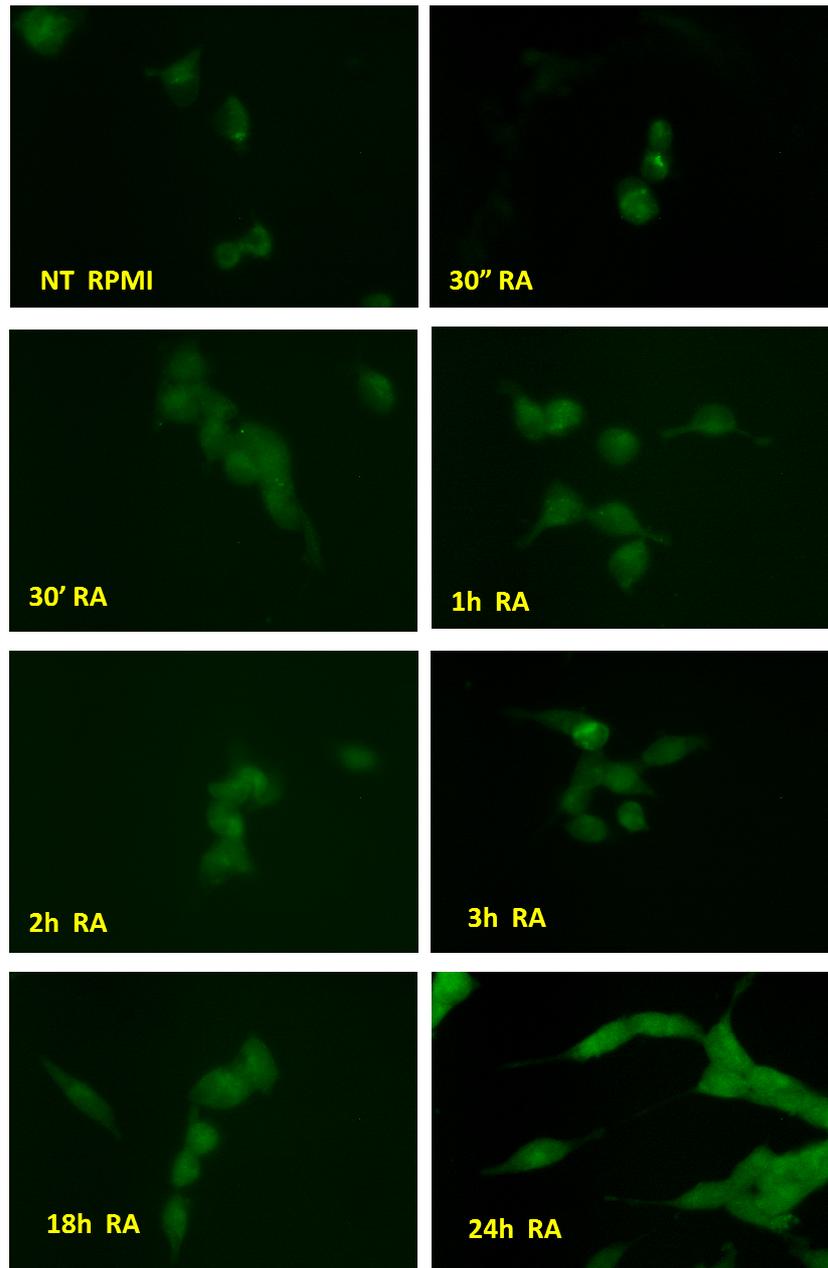
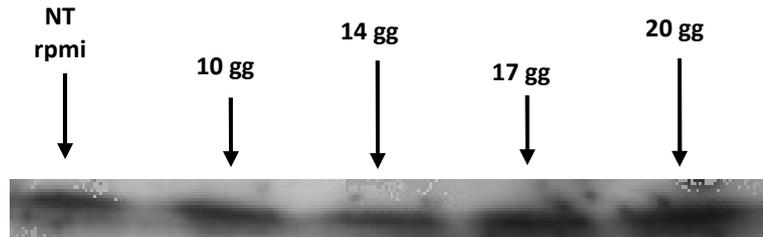


Figura 33: *Visualizzazione immunocitochimica* dell'espressione di caspasi-3 in cellule P19 non trattate o esposte per tempi diversi ad All-Trans RA (RA).

4.4.4.2 Tempi lunghi.

Come riportato in Figura 34, l'espressione di caspasi-3 era evidenziabile in cellule P19 non trattate e cresciute in RPMI. I livelli di proteina erano piu' elevati nelle colture trattate con All-Trans RA a tutti i tempi esaminati ed in particolare a 17 e 20 giorni.

A



B

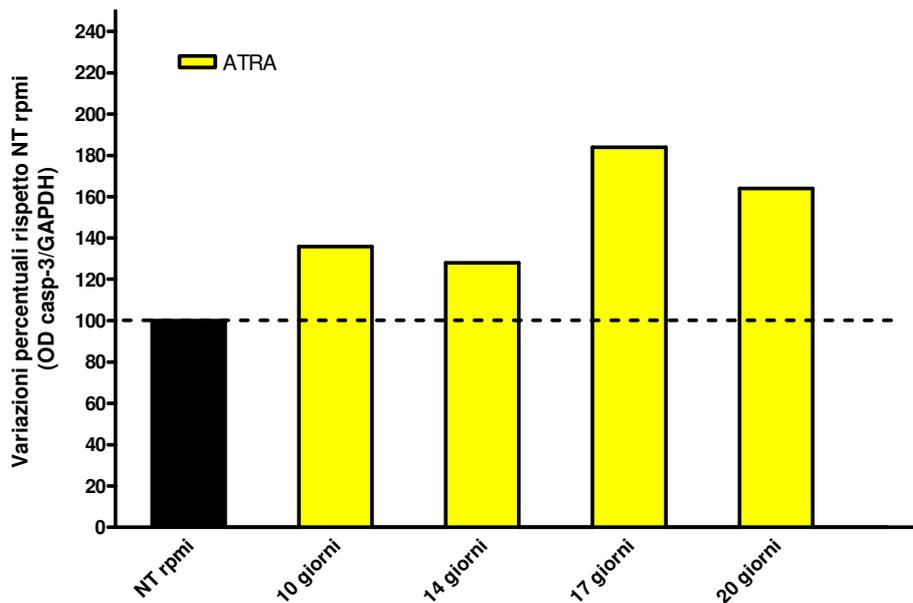


Figura 34: Pannello A: *Immunoblot* rappresentativo dell'espressione della caspasi-3 misurata mediante analisi western blot eseguita a tempi diverse su lisati cellulari di cellule P19 non trattate o esposte (per 48 ore) ad All-Trans RA. Pannello B: Risultati dell'analisi densitometrica delle bande riportate nel pannello A. I dati sono stati normalizzati per i valori di GAPDH, utilizzata come proteina "house-keeping".

5. DISCUSSIONE

Le cellule P19 sono una linea cellulare pluripotente con morfologia simil-epitelioide tipica delle cellule di carcinoma embrionale che derivano da teratocarcinoma murino indotto in topi C3H/He (McBurney and Rogers, 1982). In base al trattamento e alle condizioni di crescita, le cellule P19 possono essere indotte a differenziare nei derivati di tutti e tre gli strati germinali (endoderma, mesoderma ed ectoderma). Ad esempio, il trattamento di aggregati di cellule P19 con dimetilsolfossido (DMSO) induce il differenziamento verso cellule con caratteristiche tipiche delle cellule muscolo-scheletriche e cardiache (McBurney et al., 1982). Al contrario, il trattamento di aggregati di P19 con RA indirizza le cellule verso il differenziamento in un fenotipo neuronale (neuroni e glia) e fibroblasti (Jones Villeneuve *et al.*, 1982). Le cellule P19 rappresentano un modello cellulare largamente utilizzato *in vitro* per lo studio dei meccanismi molecolari alla base del differenziamento neuronale indotto da RA. In particolare, e' stato dimostrato in cellule P19 induce una rapida modulazione di diversi proto-oncogeni, come c-myc, Wnt-1, Rb-1 e src, analogamente a quanto avviene nel neuroectoderma durante la neurogenesi (MacPherson and Mc Burney, 1995). Sulla base di tutte queste evidenze, una prima parte della ricerca descritta in questa tesi e' stata focalizzata verso l'individuazione di condizioni sperimentali ottimali per indurre il differenziamento neuronale in cellule P19, in seguito a trattamento con RA. A tale scopo, si e' cercato inizialmente di identificare una concentrazione ottimale di RA in grado di indurre il differenziamento neuronale e possibilmente priva di effetti tossici rilevanti. I dati ottenuti indicano che RA induce una riduzione della vitalita' cellulare nelle cellule P19 a concentrazioni pari o superiori a 10^{-5} M. Dati confermati da quanto riportato in letteratura, indicano che concentrazioni di RA comprese tra 10^{-5} e 10^{-7} M rendono possibile indirizzare cellule staminali verso il differenziamento in neuroni e/o astroglia (Edwards and McBurney, 1983). Inoltre, nella maggior parte degli ricerche rivolte allo studio del differenziamento neuronale indotto da RA e' stata utilizzata una concentrazione di 5×10^{-7} M. Sulla base di queste evidenze e dei risultati ottenuti dai test di vitalita' cellulare, nel presente studio si e' deciso di utilizzare una concentrazione di RA pari a 10^{-6} M. Tale

concentrazione non induceva infatti tossicità evidente in seguito a trattamento sia per 24 che per 48 ore ed, essendo doppia rispetto a quella comunemente utilizzata, risultava promettente nel permettere una maggior resa in termini di numero di neuroni ottenuti. Sono state perciò valutate sia le possibili variazioni morfologiche che l'eventuale espressione di tipici marcatori neuronali nelle cellule trattate. Gli studi morfologici hanno dimostrato che le P19 indifferenziate presentano una tipica morfologia fibroblastoide, caratterizzata da una forma poligonale irregolare e dall'espressione sulla membrana cellulare di antigeni di tipo embrionale. Per ottenere un differenziamento neuronale in seguito a trattamento con RA, le cellule sono state portate in sospensione ad ottenere degli aggregati cellulari tipici, definiti corpi embrionali. È noto dalla letteratura che tali aggregati sono paragonabili allo stadio della blastula in vivo perché presentano tutte e tre le linee di sviluppo embrionale (endoderma, mesoderma ed ectoderma). La formazione dei corpi embrionali è essenziale per il differenziamento neuronale di queste cellule poiché permette loro di interagire l'un l'altra favorendo così una differenziazione globale ed omogenea (Packernich *et al.*, 2005). Per ottenere i corpi embrionali sono state inizialmente utilizzate le condizioni sperimentali riportate nella maggior parte della letteratura scientifica, basate sull'utilizzo, come terreno di coltura, di DMEM completo di siero. Tali condizioni sperimentali non hanno tuttavia portato a risultati soddisfacenti (dati non riportati) e, per tale motivo, si è deciso di utilizzare un diverso terreno di coltura. In particolare, una buona resa di corpi embrionali è stata ottenuta mantenendo come terreno per le cellule indifferenziate RPMI o DMEM ed utilizzando NBM come terreno di coltura per ottenere i corpi embrionali. Per le cellule in differenziamento è stato invece utilizzato DMEM-F12 in assenza di siero poiché queste condizioni favoriscono lo sviluppo in senso neuronale. Utilizzando queste condizioni sperimentali è stato possibile evidenziare un differenziamento *in vitro* verso un fenotipo neuronale già dopo 4 giorni dal trattamento con RA. Infatti, le immagini ottenute al microscopio a fluorescenza evidenziavano l'esistenza di una popolazione eterogenea di cellule caratterizzata sia da cellule apparentemente indifferenziate di natura epitelioidi e fibroblastoide che da cellule che mostrano l'aspetto tipico dei neuroni o segni di un principio di differenziamento neuronale. È ormai ben noto dalla letteratura che le cellule P19 perdono gli antigeni embrionali di

superficie già dai primi giorni del differenziamento neuronale, periodo in cui iniziano ad esprimere le glicoproteine che caratterizzano i neuroni. In particolare, filamenti intermedi, ad esempio la vimentina, non vengono più espressi mentre inizia l'espressione dei neuro filamenti (Villeneuve *et al.*, 1983). Nelle condizioni sperimentali utilizzate in questa ricerca, è stato possibile evidenziare la presenza (in cellule P19 indotte al differenziamento con RA 10^{-6} M per 48 ore) di NF160, un neurofilamento intermedio tipico delle cellule nervose, 7 giorni dopo l'inizio del trattamento. Dalla visualizzazione dell'organizzazione del citoscheletro ottenuta mediante la colorazione con falloidina coniugata al fluorocromo rosso TRIC, è stato possibile dimostrare la formazione di lunghi prolungamenti che fungono da sostegno per la crescita e lo sviluppo neuronale. Inoltre, segni di immunoreattività per NF160 sono già evidenti nelle cellule P19 dopo 4 giorni dall'inizio del trattamento con RA. Questi risultati sono in accordo con dati presenti in letteratura che dimostrano che le cellule P19, in seguito a trattamento con RA, differenziano a neuroni in 5-7 giorni (Mc Burney *et al.*, 1983; Villeneuve *et al.*, 1983) e dimostrano che le condizioni sperimentali utilizzate in questa ricerca sono idonee per ottenere cellule neuronali da colture di P19. Dati presenti in letteratura indicano che il trattamento con RA induce nelle cellule P19 il differenziamento neuronale e che in tali condizioni sperimentali, dopo circa 10 giorni dal trattamento, circa il 60-70% dei neuroni ottenuti esprimono glutammato decarbossilasi, cioè l'enzima deputato alla sintesi del GABA. È stato perciò riportato che il trattamento con RA induce nelle cellule P19 la formazione, in percentuale abbastanza rilevante, di neuroni GABAergici (Staines *et al.*, 1994). I risultati ottenuti nella presente ricerca, valutando la funzionalità neuronale ed in particolare la capacità di captare [3 H]GABA da parte delle cellule P19 differenziate, 10 giorni dopo il trattamento con RA, sembrano confermare questa ipotesi. Infatti, tali risultati indicano che l'uptake di [3 H]GABA era significativamente più alto nelle cellule trattate con RA rispetto a colture di controllo (non trattate) o esposte al solo veicolo. Poiché il GABA è captato dai neuroni mediante un selettivo sistema di trasporto presente sui neuroni GABAergici, questo dato potrebbe dimostrare non solo l'esistenza all'interno della popolazione cellulare in esame di neuroni GABAergici ma anche che dopo 10 giorni dal trattamento con RA questi neuroni sono funzionali ed in grado di immagazzinare i neurotrasmettitori. In

questo contesto, e' comunque importante ricordare che meccanismi di trasporto selettivo per il GABA sono stati localizzati nel sistema nervoso dei mammiferi anche sulle cellule gliali. Poiche' nel preparato in esame possono essere presenti anche cellule gliali o simil-gliali, non puo' essere per ora escluso che tali cellule possano contribuire alla maggiore captazione di [³H]GABA riscontrato in questa ricerca. Saranno percio' necessari ulteriori esperimenti che, mediante l'uso di selettivi inibitori dell'uptake neuronale o gliale di GABA, potranno chiarire l'eventuale coinvolgimento di cellule gliali in questo evento. Alla luce dei risultati sino ad ora discussi è possibile affermare che le condizioni sperimentali individuate in questa prima fase della ricerca, permettono di indirizzare le cellule P19 verso il differenziamento in senso neuronale e che i neuroni così ottenuti appaiono vitali e funzionali. Queste condizioni sperimentali sono state percio' utilizzate in una seconda fase della ricerca per valutare il possibile coinvolgimento di alcune proteine di segnalazione intracellulare nella serie di eventi che caratterizzano il differenziamento neuronale indotto da RA. Sebbene i risultati ottenuti debbano essere considerati ancora preliminari e non permettono di determinare con certezza i meccanismi molecolari alla base del differenziamento neuronale indotto da RA, e' possibile proporre alcune ipotesi.

Dati presenti in letteratura indicano che in cellule HL-60, F9 o P19, la PKC α è necessaria per conferire al complesso RA/RAR la capacità di riconoscere sul DNA il "retinoic acid responsive element" e quindi è necessaria per l'effetto differenziante di RA (Tahayato *et al.*, 1993). Per tale motivo in questa ricerca è stata valutata, a tempi brevi e lunghi, l'espressione di questa proteina in seguito a trattamento con RA. I risultati ottenuti dimostrano un aumento dei livelli di PKC α in seguito a trattamento con RA nel periodo compreso tra 1 e 24 ore. Sulla base di quanto detto, l'aumento dei livelli di espressione di PKC α osservato a 18 e 24 ore potrebbe rappresentare un segnale permissivo per gli effetti di RA sulla trascrizione genica. Tale aumento non è piu' evidente nei tempi lunghi, probabilmente perché il differenziamento cellulare è giunto a completamento. Inoltre, poiche', come riportato precedentemente (Risultati), la PKC α svolge un ruolo anti-apoptotico (Gutcher *et al.*, 2003), e' possibile ipotizzare che l'aumento dei livelli della proteina possa essere alla base dell'assenza di fenomeni apoptotici rilevanti, come si evince dai dati di vitalità

cellulare. Questa osservazione è ulteriormente supportata dalla dimostrazione che l'esposizione a RA a tempi brevi non induce un aumento dei livelli di caspasi-3, se non in seguito a trattamento per 24 ore. In questo contesto l'aumento dell'espressione di caspasi-3 riscontrato nelle cellule differenziate di 17 e 20 giorni potrebbe rappresentare un primo segnale di sofferenza neuronale *in vitro*. E' infatti noto che cellule neuronali sopravvivono *in vitro* per periodi relativamente brevi.

Come accade durante lo sviluppo neuronale *in vivo*, anche durante il differenziamento *in vitro* vengono attivate diverse vie di segnale e i relativi fattori di trascrizione. Una delle vie di segnalazione attivate è noto essere quella che coinvolge le "mitogen-activated protein kinases (MAPK)," proteine coinvolte in numerosi processi cellulari quali sopravvivenza, differenziamento, crescita e sviluppo neuronale (Zegui *et al.*, 2006). Questa famiglia di proteine è costituita da tre gruppi principali, le "extracellular signal-regulated kinase (ERK)", "c-Jun N-terminal kinase (JNK)/stress/activate protein kinase (SAPK)" e p38. Tra queste le ERK svolgono diverse funzioni nello sviluppo del sistema neuronale (Zagui *et al.*, 2006). Per questo motivo nella presente ricerca sono stati anche valutati gli effetti del trattamento a tempi brevi e lunghi con RA sull'espressione delle ERK1/2. I risultati ottenuti indicano che l'espressione delle ERK1/2, tende a ridursi in seguito a trattamento per periodi superiori alle due ore. Questo evento potrebbe essere ricondotto alla fosforilazione di queste proteine. Questa ipotesi sembra essere avvalorata dall'evidenza che il trattamento con RA per 1 ora induce un aumento dei livelli di PKC ζ ed una sua mobilizzazione citosolica. E' infatti stato dimostrato che le PKC ζ sono associate direttamente o indirettamente alle MAPK (Le Good and Brindley, 2004). Sulla base di quanto riscontrato e' possibile ipotizzare che l'aggiunta di RA induca, attraverso meccanismi da delucidare, l'attivazione dell'espressione di PKC ζ , proteina coinvolta nel differenziamento e nella proliferazione di fibroblasti. A sua volta, la PKC ζ andrebbe ad indurre la fosforilazione delle ERK favorendo quindi segnali intracellulari rivolti verso la stimolazione del processo di differenziamento in senso neuronale. Questa ipotesi dovrà comunque essere convalidata tramite esperimenti futuri, condotti utilizzando altre metodiche sperimentali.

6. CONCLUSIONI

Il lavoro descritto in questa tesi ha permesso di identificare condizioni ottimali per ottenere un differenziamento in senso neuronale di cellule P19 trattate con RA. I neuroni ottenuti appaiono numerosi, vitali e, almeno in parte, in grado di accumulare GABA e quindi funzionali. Inoltre, i risultati ottenuti hanno anche permesso di ipotizzare alcune delle possibili vie di segnale intracellulari coinvolte nell'azione differenziante indotta da RA. Questo approccio sperimentale, potrebbe perciò rappresentare un buon modello di colture neuronali *in vitro* da utilizzare per studiare sia i meccanismi alla base del differenziamento neuronale che le proprietà funzionali dei neuroni differenziati. E' ovvio che questo approccio potrebbe essere utilizzato allo scopo di acquisire conoscenze di base sullo sviluppo del sistema nervoso centrale e di riuscire ad indirizzare alcuni tipi di cellule verso la linea neuronale per poterle poi utilizzare, in un approccio di "medicina rigenerativa" nella cura di malattie neurodegenerative. La possibile rilevanza di questo lavoro va anche ricercata nell'enorme interesse della comunità scientifica, e non solo, verso il possibile uso delle cellule staminali nel trattamento delle malattie cronico-degenerative, come ad esempio le sordità neurosensoriali.

7. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Alberts, 2004, “Biologia molecolare della cellula.”

Bertolaso L, Gibellini D, Secchiero P, Previati M, Falgione D, Visani G, Rizzoli R, Capitani S, Zauli G., (1998) “Accumulation of catalytically active PKC-zeta into the nucleus of HL-60 cell line plays a key role in the induction of granulocytic differentiation mediated by all-trans retinoic acid.”, *Br J Haematol.* 100(3):541-9.

Bidyut R., Reshma T., and Chambon P., (1995) “Synergistic activation of Retinoic Acid (RA)-responsive genes and Induction of Embryonal Carcinoma cell Differentiation by RA Receptor α (RAR α)- RAR β , or RAR γ selective ligand in combination with a Retinoid X Receptor-specific ligand.”, *Molecular and Cellular Biology.*, (6481-6487).

Bixby J. L., Zhang R., (1990) “Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth.”, *J Cell Biol.* 110(4):1253-60.

Black I. B. and Woodbury D., (2001) “Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons”. 2001, Blood cells, molecules and diseases, *Blood Cells Mol Dis.* 27(3):632-6.

Bryony Coleman Michelle G. De Silva Robert K. Shepherd, (2007) “Concise Review: The Potential of Stem Cells for Auditory Neuron Generation and Replacement”, *Stem Cells.* 25(11):2685-94.

- Boudjelal M., Taneja R., Matsubara S., Bouillet P., Dolle P., Chambon P.,** (1997) "Overexpression of Stral 3, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells", *Gene Dev.* (2052-2065).
- Casabona G.,** 1997 "Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 21(3):407-25.
- Chambon P.,** (1994) "The Retinoid signaling pathway:molecular and genetic analyses", *Semin Cell Biol.* 5(2):115-25.
- Chen J. C., Ng C. J., Chiu TF, Chen H. M.,** (2003) "Altered neutrophil apoptosis activity is reversed by melatonin in liver ischemia-reperfusion.", *J Pineal Res.* 34(4):260-4.
- Connor F, Wright E, Denny P, Koopman P, Ashworth A.,** (1995) "The Sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse.", *Nucleic Acids Res. Sep* 23(17):3365-72.
- Curtin J.C., Dragnev K.H., Sekulla D., Christie A.J., Dmitrovsky E. and Spinella M. J.,** (2001) "Retinoic acid activates p53 in human embryonal carcinoma through retinoid receptor-dependent stimulation of p53 transactivation function",2001, *Oncogene.* 20(20):2559-69.
- de Thè H., M. del Mar Vivanco-Ruiz, Tiollais P. ,Stunnenberg H. and Dejean A.,** (1990) " Identification of a retinoic acid responsive

element in the retinoic acid receptor β gene.”, , *Nature*. 343(6254):177-80.

Diaz-Meco M. T., Dominguez I., Sanz L., Dent P., Lozano J., Municio M. M., Berra E., Hay R. T., Sturgill T. W., Moscat J., 1994 “zeta PKC induces phosphorylation and inactivation of I kappa B-alpha in vitro.” *EMBO J.* 13(12):2842-8.

Du Z. W., Tsung H. C., Yao Z., (1998) “Expression of retinoic acid receptor gamma gene in ES cells and its effect on their differentiation and apoptosis”, *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*. 31(2):155-69

Eldar H, Ben-Chaim J, Livneh E., (1992) “Deletions in the regulatory or kinase domains of protein kinase C-alpha cause association with the cell nucleus.”, *Exp Cell Res.* 202(2):259-66.

Evans M. J. and Kaufman M. H., (1981) “Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos”, *Nature* (154-156).

Farah M. H, Olson J. M., Sucic H. B., Hume R. I., Tapscott S. J., Turner D. L., (2000) “Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells.”, *Development.* 127(4):693-702.

Fernando P., Brunette S., Megeney L. A., (2005) “Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity.”, *FASEB J.* 19(12):1671-3.

- Gao X., Bian W., Yang J., Tang K., Kitani H., Atsumi T., Jing N.,** (2001) "A role of N-cadherin in neuronal differentiation of embryonic carcinoma P19 cells.", *Biochem Biophys Res Commun.*284(5):1098-103.
- Geiger B., Ayalon O.,** (1992) "Cadherins.", *Annu Rev Cell Biol.* 8:307-32.
- Giguère V.,** (1994), "Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling." *Endocr.Rev.* (6179).
- Glass C. K.,** (1994) "Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers", *Endocr.Rev.* (391-407).
- Le Good J. A., Brindley D. N.,** 2004 "Molecular mechanisms regulating protein kinase C ζ turnover and cellular transformation." *Biochem J.* 378(Pt 1):83-92.
- Gutcher I., Webb P. R., Anderson N. G.,** 2003 "The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C." *Cell Mol Life Sci.* 60(6):1061-70.
- Guzey M., Demirpence E., Wayne C. and H. F. De Luca,** (1998) "Effects of Retinoic Acid (all-trans and 9-cis) on Tumor", , *Biochemical and Biophysical Research communication,* (369-375).
- Hamada-Kanazawa M., Ishikawa K., Ogawa D., Kanai M., Kawai Y., Narahara M., Miyake M.,** (2004) "Suppression of Sox6 in P19 cells leads to failure of neuronal differentiation by retinoic acid

and induces retinoic acid-dependent apoptosis”., *FEBS Lett.* 577(1-2):60-6.

Hamada-Kanazawa M., Ishikawa K., Nomoto K., Uozumi T., Kawai Y., Narahara M., Miyake M., (2004) “Sox6 overexpression causes cellular aggregation and the neuronal differentiation of P19 embryonic carcinoma cells in the absence of retinoic acid.”, *FEBS Lett.* 560(1-3):192-8.

Hart S. M., (2002) “Modulation of nuclear receptor dependent transcription.” , *Biol Res.* 35(2):295-303.

Hong W. K. and M. Sporn, “Recent advances in chemoprevention of cancer”, novembre 1997, Science.

http://it.wikipedia.org/wiki/Cellule_staminali.

Hu X., Chen Y., Farooqui M., Thomas M. C, Chiang C. M., Wei L. N., (2004) “Suppressive effect of receptor-interacting protein 140 on coregulator binding to retinoic acid receptor complexes, histone-modifying enzyme activity, and gene activation.”, *J Biol Chem.* 279(1):319-25.

James G., Olson E., (1992) “Deletion of the regulatory domain of protein kinase C alpha exposes regions in the hinge and catalytic domains that mediate nuclear targeting.”, *J Cell Biol.* 116(4):863-74.

Jepsen K., Rosenfeld M. G., (2002) “Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes.”, *J Cell Sci.* 115(Pt 4):689-98.

Jimbo A., Fujita E., Kouroku Y., Ohnishi J., Inohara N., Kuida K., Sakamaki K., Yonehara S., Momoi T., (2003) “ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation.”, *Exp Cell Res.* 283(2):156-66.

Johnson J. E., Zimmerman K., Saito T., Anderson D. J., (1992) “Induction and repression of mammalian achaete-scute homologue (MASH) gene expression during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells.”, *Development.* 114(1):75-87.

Jones-Villeneuve E. M., Mc Burney M. W., Rogers K. A., Kalnins V. I., (1982) “Retinoic Acid induces Embryonal Carcinoma cells to differentiate into Neurons and Glial cells.”, *Journal of Cell Biology.* Vol. 94 (253-262).

Kastner P., Leid M. and Chambon P., (1994) “The role of nuclear retinoic acid receptors in the regulation of gene expression”, , in R.Blomhoff (ed.), *Vitamin A in health and disease.* Marcel Dekker, Ink.,New York.

Kato T., Ohtani-Kaneko R., Ono K., Okado N., Shiga T., (2005) “Developmental regulation of activated ERK expression in the spinal cord and dorsal root ganglion of the chick embryo.”, *Neurosci Res.* 52(1):11-9.

Keller G. and Snodgrass H. R., (1999) “Human Embryonic Stem cells: the future is now.” *Nature Medicine* (151-155).

Keller M. B., (2005) “Issues in treatment-resistant depression.” *J Clin Psychiatry.* 66 Suppl 8:5-12.

- Kiley S. C., Parker P. J.**, 1995 “Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation.” *J Cell Sci.* 108 (Pt 3):1003-16.
- Kim S., Yoon Y. S., Kim J. W., Jung M., Kim S. U., Lee Y. D., Suh-Kim H.**, (2004) “Neurogenin1 is sufficient to induce neuronal differentiation of embryonal carcinoma P19 cells in the absence of retinoic acid.”, *Cell Mol Neurobiol.* 24(3):343-56.
- Kurie J. M., Buck J., Eppinger T. M., Moy D. and Dmitrovsky E.**, (1993) “9-cis and all-trans retinoic acid induce a similar phenotype in human teratocarcinoma cells.” *Differentiation* 54(123-129).
- Lefebvre P. P., Malgrange B., Staecker H., Moonen G., Van de Water T. R.**, (1993) “Retinoic acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cells.”, *Science.* 260(5108):692-5.
- Lewis T. S., Shapiro P. S., Ahn N. G.**, (1998) “Signal transduction through MAP kinase cascades.”, *Adv Cancer Res.* 74:49-139.
- Li M., Pevny L., Lovell-Badge R., Smith A.**, (1998) “Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection.”, *Curr Biol.* 8(17):971-4.
- Li W., Chang L., Rong Z., Zhang Q., Wang H., Wang H., Liu C., Liu W.**, (2006) “Mechanism of retinoic acid and mitogen-activated

protein kinases regulating hyperoxia lung injury.”, *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 26(2):178-81.

Li Zegui, Hedrick M. and Wei L., (2006) “Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells.” *Develop. Growth Differ.* (513-523).

L. J. Gudas, (1994) “Retinoids and vertebrate development”, *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, Issue 22, 15399-15402.

MacPherson P. A. and Mc Burney M. W., (1995) “P19 Embryonal Carcinoma Cells: A source of cultured Neurons amenable to genetic manipulation”, *Methods in Enzymology* 7 (238-252), Academic Press.

MacPherson P. A. and McBurney M. W., (1996) “Retinoic acid treated P19 embryonal carcinoma cells differentiate into oligodendrocytes capable of myelination.”, *Neuroscience* Volume 71, Issue 3, Pages 845-853.

Mangelsdorf D. J., Umesono K. And Evans R. M., (1994) “ The Retinoid receptors”, *Raven Press*, New York (319-350).

Ma Q., Kintner C., Anderson D. J., (1996) “Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene.”, *Cell.* 87(1):43-52.

Martin G. R. and Evans M. J., (1974) ”The Morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture.”, *Cell.* (163-172).

McBurney M. W., Reuhl K. R., Ally A. I., Nasipuri S., Bell J. C. and Craig J., (1995) “Differentiation and maturation of embryonal

carcinoma-derived neurons in cell culture.”, *Journal of Neuroscience* Vol 8, 1063-1073.

McMahon A. P., Joyner A. L., Bradley A., McMahon J. A., (1992) “The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum”. *Cell*. 69(4):581-95.

Microsoft Encarta Enciclopedia online, (2008) “Cellula Staminalis”.

Morassutti D. J., Staines W. A., Magnuson D. S., Marshall K. C., McBurney M. W., (1994) “Murine embryonal carcinoma-derived neurons survive and mature following transplantation into adult rat striatum.”, *Neuroscience*. 58(4):753-63.

National Institute of Health., 2001 “Scientific progress and future research directions.”

Nusse R., Varmus H. E., (1982) “Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome.”, *Cell*. 31(1):99-109.

Oda H., Iwata I., Yasunami M., Ohkubo H., (2000) “Structure of the mouse NDRF gene and its regulation during neuronal differentiation of P19 cells.”, *Brain Res Mol Brain Res*. 14;77(1):37-46.

Pachernik J., Bryja V., Esner M., Kubala L., Dvorak, Hampl., (2005) “Neural differentiation of pluripotent mouse embryonal carcinoma

cells by Retinoic Acid: inhibitory effect of serum”, *Physiological Research, Academy of Sciences of the Czech Republic*.

Papkoff J., (1994) “Identification and biochemical characterization of secreted Wnt-1 protein from P19 embryonal carcinoma cells induced to differentiate along the neuroectodermal lineage.”, *Oncogene*. 9(1):313-7”.

Pessina A., (2003) “Le Cellule staminali, Ricerca, Problemi, Applicazioni” *L’Avventura scientifica*.

Pozzi S., Rossetti S., Bistulfi G., Sacchi N., (2006) “RAR-mediated epigenetic control of the cytochrome P450 Cyp26a1 in embryocarcinoma cells.”, *Oncogene*. 25(9):1400-7.

Qin P., Haberbush J. M., Zhang Z., Soprano K. J., Soprano D. R., (2004) “Pre-B cell leukemia transcription factor (PBX) proteins are important mediators for retinoic acid-dependent endodermal and neuronal differentiation of mouse embryonal carcinoma P19 cells.”, *J Biol Chem*. 279(16):16263-71.

Regenerative Medicine., 2006.

Rifkind R. A., Richon V. M. and Marks P. A., (1996) “Induced differentiation, the cell cycle, and the treatment of cancer.” *Pharmacol.Ther.* (97-102).

Rosewicz S., Brembeck F., Kaiser A., Marschall Z. V., Riecken E. O., 1996 “Differential growth regulation by all-trans retinoic acid is determined by protein kinase C alpha in human pancreatic carcinoma cells.” *Endocrinology*. 137(8):3340-7.

- Rudniki M. A. and McBurey M. W.**, (1987) "Teratocarcinomas and Embryonic stem cells, a practical approach.", *Robertson E.J.Ed.*, (19-49).
- Santiago M. F., Liour S. S., Mendez-Otero R., Yu R. K.**, (2005) "Glial-guided neuronal migration in P19 embryonal carcinoma stem cell aggregates.", *J Neurosci Res.* 81(1):9-20.
- Schuuring E., van Deemter L., Roelink H., Nusse R.**, (1989) "Transient expression of the proto-oncogene int-1 during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells.", *Mol Cell Biol.* 9(3):1357-61.
- Shamblott M. J., Axelman J., Wang S. P., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Huggins G. R. and Blumenthal P. D.**, (1998) "Derivation of pluripotent Stem Cells from cultured human primordial germ cells", *Proc.Nat.Acad.Scie.USA* (13726-13731).
- Sölter M., Locker M., Boy S., Taelman V., Bellefroid E. J., Perron M., Pieler T.**, (2006) "Characterization and function of the bHLH-O protein XHes2: insight into the mechanisms controlling retinal cell fate decision." *Development.* 133(20):4097-108.
- Sonneveld E., van den Brink C. E., Tertoolen L. G., van der Burg B., van der Saag P. T.**, (1999) "Retinoic acid hydroxylase (CYP26) is a key enzyme in neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells.", *Dev Biol.* 213(2):390-404.
- Soprano D. R., Teets B. W., Soprano K. J.**, (2007) "Role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells." *Vitam Horm.*75:69-95.

Spinella M. J., Kerley J. S., Kristina A., White and Joshua C. Curtin, (2003) "Retinoid target gene activation during induced Tumor Cell Differentiation: Human Embryonal Carcinoma as a model.", *The Journal of Nutrition.* (273s-276s).

Spinella M. J., Kitareewan S., Mellado B., Sekula D., Kooh K. S. and Dmitrovsky E., (1998) "Specific retinoid receptors cooperate to signal growth suppression and maturation of human embryonal carcinoma cells.", *Oncogene* 16(3471-3480).

Sporn M. B., Roberts A. B and Goodman D. S., (1994) "The retinoids: biology, chemistry and medicine.", *Raven Press, New York.*

Sporn M. B., Dunlop N. M., Newton D. L. and Smith J. M., (1976) "Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids).", *Fed.Proc.* (1332-1338).

Staines W. A., Morassutti D. J., Reuhl K. R., Ally A. I., McBurney M. W., (1994) "Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells have varied morphologies and neurotransmitters.", *Neuroscience.* 58(4):735-51.

Steele B. K., Meyers C., Ozbun M. A., (2002) "Variable expression of some "housekeeping" genes during human keratinocyte differentiation.", *Anal Biochem.* 307(2):341-7.

Strickland S., Mahdavi V., (1978) "The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid.", *Cell.* 15(2):393-403.

- Svedsen C. N., Caldwell M. A., Ostenfeld T.,** (1999) “Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation”, *Brain Pathology* 9, (499-513).
- Tahayato A., Lefebvre P., Formstecher P., Dautrevaux M.,** 1993 “A protein kinase C-dependent activity modulates retinoic acid-induced transcription.” *Mol Endocrinol.* 7(12):1642-53.
- Takamatsu N., Kanda H., Tsuchiya I., Yamada S., Ito M., Kabeno S., Shiba T., Yamashita S.,** (1995) “A gene that is related to SRY and is expressed in the testes encodes a leucine zipper-containing protein.”, *Mol Cell Biol.* 15(7):3759-66.
- Takeichi M.,** (1995) “Morphogenetic roles of classic cadherins.”, *Curr Opin Cell Biol.* 7(5):619-27.
- Tan Lai-Seng and Parker P. J.,** (2003) “Emerging and diverse role of Protein Kinase C in immune cell signalling”, *Biochem. J.* 545-552.
- Teramoto S., Kihara-Negishi F., Sakurai T., Yamada T., Hashimoto-Tamaoki T., Tamura S., Kohno S., Oikawa T.,** (2005) “Classification of neural differentiation-associated genes in P19 embryonal carcinoma cells by their expression patterns induced after cell aggregation and/or retinoic acid treatment.”, *Oncol Rep.* 14(5):1231-8.
- The National Institute of Health (NIH),** “Resource for Stem Cell Research “.
- Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E.,** (1999) “Housekeeping genes as internal standards: use and limits.”, *J Biotechnol.* 75(2-3):291-5.

- Thomson J. A., Odorico J. S.,** (2000) "Human Embryonic stem cell and embryonic germ cell lines.", *Trends in Biotechnology.* (53-57).
- Urbach J. and Rando R. R.,** (1994) "Isomerization of all-trans-retinoic acid to 9-cis-retinoic acid.", *Biochem, J.* (459-465).
- Ulrich H. and Majumder P.,** (2006) "Neurontransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical application.", *Cell Proliferation.* (281-300).
- Vaudry D., Chen Y., Ravni A., Hamelink C., Elkahloun A. G., Eiden L. E.,** (2002) "Analysis of the PC12 cell transcriptome after differentiation with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP).", *J Neurochem.* 83(6):1272-84.
- Wagers A. J., Weissman I. L.,** (2006) "Differential expression of alpha2 integrin separates long-term and short-term reconstituting Lin-/loThy1.1(lo)c-kit+ Sca-1+ hematopoietic stem cells." *Stem Cells.* 24(4):1087-94.
- Westin S., Rosenfeld M. G., Glass C. K.,** ".Nuclear receptor coactivators.", *Adv Pharmacol.* 2000;47:89-112. Review.
- Wobus Anna M. and Boheler K. R. ,** (2005) "Embryonic Stem Cells: Prospects for developmental Biology and Cell Therapy", *the American Physiological Society.* (635-678).
- Wolbach S. B. and Howe P. R.,** (1925) "Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin.", *J.Exp.Med.* (753-777).

Wolpert L. (1997) "Genomes.", *Genes Funct.* 1(1):3-4.

www.iabp.it

Zhang H., Rosdahl I., (2004) "Expression of p27 and MAPK proteins involved in all-trans retinoic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in matched primary and metastatic melanoma cells.", *Int J Oncol.* 25(5):1241-8.

Zhong H., Simons JW., (1999) "Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia.", *Biochem Biophys Res Commun.* 259(3):523-6.

Zhuang S., Schnellmann R. G., (2006) "A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase.", *J Pharmacol Exp Ther.* 319(3):991-7.

Zuccotti M., Garagna S., Redi C. A., (2000) "Nuclear transfer, genome reprogramming and novel opportunities in cell therapy." *J Endocrinol Invest.* 23(9):623-9.

INDICE

| | |
|--|----------------|
| 1. INTRODUZIONE | pag. 2 |
| 1.1. CELLULE STAMINALI | pag. 2 |
| 1.1.1. <i>Differenziamento</i> | pag. 7 |
| 1.2 COLTURE CELLULARI DI P19 | pag. 12 |
| 1.2.1 <i>Differenziamento neuronale di P19 trattate con RA</i> | pag. 14 |
| 1.3 RETINOIDI | pag. 16 |
| 1.3.1 <i>Recettori per i retinoidi</i> | pag. 17 |
| 1.3.2 <i>Meccanismo d'azione molecolare di RA</i> | pag. 18 |
| 1.3.3 <i>Geni regolati da RA</i> | pag. 19 |
| 1.3.4 <i>Ruolo di geni specifici regolati da RA in colture cellulari di P19 indotte a differenziare in senso neuronale</i> | pag. 20 |
| 1.3.5 <i>Effetto di RA sullo sviluppo dell'orecchio interno</i> | pag. 23 |
| 1.4. GENI IMPLICATI NEL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE. | pag. 25 |
| 1.4.1 <i>Protein chinasi (PKC)</i> | pag. 25 |
| 1.4.2 <i>ERK1/2</i> | pag. 28 |
| 1.4.3 <i>Caspasi-3</i> | pag. 30 |
| 2. SCOPO | pag. 34 |
| 3. MATERIALI E METODI | pag. 36 |
| 3.1 COLTURE CELLULARI | pag. 36 |
| 3.2 PREPARAZIONE DELL'ACIDO RETINOICO | pag. 36 |
| 3.3 ANALISI DELLA VITALITA' CELLULARE AL CITOFLUORIMETRO | pag. 37 |
| 3.3.1 <i>Analisi statistica</i> | pag. 38 |
| 3.4 IMMUNOCITOCHIMICA | pag. 38 |
| 3.5 SAGGIO DELL' UPTAKE DEL GABA | pag. 41 |
| 3.6 WESTERN BLOT | pag. 41 |
| 3.6.1 <i>Lisati cellulari</i> | pag. 41 |
| 3.6.2 <i>Determinazione delle proteine con kit Bio-Rad</i> | pag. 43 |
| 3.6.3 <i>Elettroforesi (SDS-PAGE)</i> | pag. 43 |
| 4. RISULTATI | pag. 45 |

| | |
|--|----------------|
| 4.1 EFFETTO DEL TRATTAMENTO PER 24 E 48 ORE CON ACIDO RETINOICO SULLA VITALITA' CELLULARE IN COLTURE DI P19 | pag. 45 |
| 4.2 VALUTAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO NEURO- NALE DI CELLULE P19 IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON ALL-TRANS RA | pag. 47 |
| 4.2.1 <i>Aspetti morfologici delle cellule p19 indifferenziate</i> | pag. 47 |
| 4.2.2 <i>Formazione di corpi embrioidi</i> | pag. 48 |
| 4.2.3 <i>Trattamento con All-Trans RA</i> | pag. 48 |
| 4.3 VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' NEURO- NALE IN CELLULE P19 TRATTATE CON ALL-TRANS RA: MISURA DELL'UPTAKE DI [³ H]GABA | pag. 56 |
| 4.4 ANALISI DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DI ALCUNE PROTEINE POSSIBILMENTE COINVOLTE NEL DIFFERENZIAMENTO NEURONALE DI CELLULE P19 TRATTATE CON ALL-TRANS RA | pag. 57 |
| 4.4.1 <i>PKC ζ</i> | pag. 57 |
| 4.4.1.1 <i>Tempi brevi</i> | pag. 57 |
| 4.4.1.2 <i>Tempi lunghi</i> | pag. 61 |
| 4.4.2 <i>PKCa</i> | pag. 63 |
| 4.4.2.1 <i>Tempi brevi</i> | pag. 63 |
| 4.4.2.2 <i>Tempi lunghi</i> | pag. 66 |
| 4.4.3 <i>ERK1/2</i> | pag. 67 |
| 4.4.3.1 <i>Tempi brevi</i> | pag. 67 |
| 4.4.3.2 <i>Tempi lunghi</i> | pag. 71 |
| 4.4.4 <i>Caspasi-3</i> | pag. 72 |
| 4.4.4.1 <i>Tempi brevi</i> | pag. 72 |
| 4.4.4.2 <i>Tempi lunghi</i> | pag. 75 |
| 5. DISCUSSIONE | pag. 76 |
| 6. CONCLUSIONI | pag. 80 |
| 7. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI | pag. 82 |