



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di: Biomedicina Comparata e Alimentazione

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Veterinarie

INDIRIZZO: Scienze Veterinarie Biomediche e Comparate

CICLO: XXV°

**EFFETTI DEGLI ORMONI STEROIDEI NELL'OMEOSTASI INTRACELLULARE
DEL CALCIO E NELLA REGOLAZIONE DELLA CRESCITA CELLULARE
IN CELLULE DERIVATE DA CERVELLETTO DI FETO BOVINO**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Supervisore: Ch.ma Prof. Cristina Ballarin

Dottorando: Matteo Suman

SOMMARIO

Gli ormoni steroidei possono influenzare numerosi processi fisiologici attraverso meccanismi genomici e non genomici, sia in cellule eccitabili che in cellule non eccitabili. I neurosteroidi regolano numerosi processi cellulari (come la crescita e il differenziamento cellulare, e l'apoptosi) ed esercitano il loro effetto in svariati modi, ad esempio promuovendo o inibendo un particolare evento, a seconda della regione dell'encefalo in cui stanno agendo. In questo elaborato sono state approfondite due diverse tematiche: 1) lo studio dell'effetto genomico esercitato dall'estradiolo (E2) e dal testosterone (T) nella regolazione dell'omeostasi intracellulare dello ione calcio (Ca^{2+}) in una linea cellulare non eccitabile; 2) la caratterizzazione dell'effetto trofico dell'E2 in cellule neuronali e nelle loro arborizzazioni dendritiche. Numerose evidenze sperimentali dimostrano che estrogeni ed androgeni regolano l'omeostasi intracellulare dello ione Ca^{2+} . Gli effetti dei neurosteroidi nelle cellule eccitabili sono ben noti; tuttavia, questi ormoni influenzano in maniera significativa anche la fisiologia di cellule non eccitabili, come i fibroblasti e le cellule dell'endotelio vascolare. Per questo primo argomento di studio ho utilizzato una linea cellulare stabilizzata derivata da cellule endoteliali isolate da cervelletto di feto bovino. Per caratterizzare gli effetti genomici prodotti da E2 (10nM) e T (10nM) sull'omeostasi intracellulare di Ca^{2+} , le cellule sono state incubate con gli ormoni a diversi intervalli di tempo (8, 24, 48 ore). Quindi sono state usate sonde fluorescenti per il Ca^{2+} (Cameleon) indirizzate ai principali organelli intracellulari deputati al controllo dell'omeostasi di questo ione (citoplasma, reticolo endoplasmatico, mitocondri). I risultati dimostrano che il trattamento con T non produce alcun effetto. Nelle cellule incubate con E2, non sono state riscontrate variazioni né in citoplasma né in reticolo; al contrario, l'E2 incubato per 48 ore ha prodotto una diminuzione significativa nella quantità totale di Ca^{2+} misurata nei mitocondri. Questo effetto è stato annullato dall'aggiunta di ICI 182,780 (10nM), un antagonista non selettivo dei recettori degli estrogeni, suggerendo che l'azione dell'E2 è mediata dai propri recettori. In seguito sono state testate altre due concentrazioni di E2 (1nM e 100nM): anch'esse hanno causato una analoga diminuzione della quantità di Ca^{2+} nei mitocondri, suggerendo che la saturazione del recettore può avvenire già alla concentrazione 1nM. Per verificare se le alterazioni nei flussi di Ca^{2+} dovute all'E2 comportassero alterazioni nel potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi\text{m}$), le cellule sono state monitorate in presenza del *tetra-methyl-rhodamine-methylester* (TMRM) ma non è stata riscontrata alcuna differenza

tra le cellule trattate e quelle di controllo. Infine, per verificare un possibile ruolo svolto dal poro di transizione di permeabilità (PTP), un canale della membrana interna mitocondriale, le cellule sono state trattate con ciclosporina-A (CsA) ($0.8\mu\text{M}$), uno specifico inibitore del PTP che si lega alla molecola *chaperone* di matrice ciclofilina-D. La CsA è stata in grado di invertire l'effetto dell'E2, riportando i valori dei trattati a quelli dei controlli e suggerendo che l'ormone possa svolgere un ruolo chiave nel processo di transizione di permeabilità mitocondriale (PTPM). Riassumendo, questi dati indicano che, in questa linea stabilizzata con caratteristiche endoteliali, l'effetto genomico prodotto dall'E2 può influenzare l'apertura del PTP senza causare una perdita del potenziale di membrana. Terminata questa prima fase del lavoro, mi sono dedicato allo studio dell'effetto trofico che l'E2 produce in cellule neuronali e nelle loro arborizzazioni dendritiche. I dendriti integrano e trasportano gli stimoli nervosi dalla periferia della cellula verso il soma ed è ampiamente riconosciuto che, nelle fasi precoci dello sviluppo embrionale, l'E2 modella la morfologia delle cellule neuronali attraverso una regolazione dello sviluppo delle arborizzazioni dendritiche. Gli estrogeni regolano la plasticità neuronale, la sinaptogenesi e la crescita cellulare in diverse regioni del SNC, come ad esempio la corteccia e l'ipotalamo. Pochi lavori hanno considerato gli effetti dell'E2 nella morfologia dei neuroni del cervelletto, una regione deputata al controllo dell'equilibrio, della coordinazione motoria e di svariati altri processi cognitivi. Per questo tipo di analisi ho utilizzato colture cellulari primarie di neuroni derivate da cervelletto di feti di bovino di entrambi i sessi. Per mettere in evidenza le alterazioni morfologiche nei neuroni ho effettuato esperimenti di immunocitochimica in fluorescenza usando uno specifico anticorpo per neuroni immaturi, la $\beta\text{III-tubulina}$, confrontando gli effetti dell'E2 (100nM) in cellule trattate rispetto a neuroni di controllo. Come parametri morfometrici ho scelto: area e perimetro del soma, numero, lunghezza e diametro dei prolungamenti dendritici. I risultati indicano che nelle cellule da femmina, l'E2 aumenta tutti i parametri misurati, mentre nei maschi l'effetto trofico è limitato solo ad alcuni valori. Inoltre, le femmine mostrano valori maggiori rispetto ai maschi nelle dimensioni del soma, nel numero e nella lunghezza dei prolungamenti. Al contrario nei maschi si osserva un valore superiore nel diametro dei prolungamenti. Questi dati preliminari suggeriscono che l'E2 (100nM) produce un effetto trofico sia nelle cellule di maschio che in quelle di femmina; inoltre è possibile ipotizzare che, in questo stadio dello sviluppo embrionale, i neuroni di cervelletto abbiano caratteristiche dimorfiche.

ABSTRACT

Steroid hormones differently affect various physiological processes by genomic or non-genomic mechanisms, in both excitable and non-excitable cells. Neurosteroids play a key role in the regulation of many cellular processes, such as cell growth, cell differentiation and apoptosis, exerting their effect in different ways (i.e. promoting or inhibiting a particular event) depending on the brain region of action. In this work two different themes were investigated: 1) the slow genomic effects exerted by estradiol (E2) and testosterone (T) in the regulation of intracellular calcium (Ca^{2+}) homeostasis in a non-excitable cellular model; 2) the trophic effects promoted by estrogens in neuronal cells and in their dendritic branches. Recent experimental evidences highlight the involvement of estrogens and androgens in the regulation of intracellular homeostasis of calcium ion (Ca^{2+}), one of the most important second messengers mediating steroid hormones action. The effects of neurosteroids on excitable cells are well documented; however, these steroids also influence numerous physiological events in non-excitable cells, such as fibroblasts or vascular endothelial cells. In the first part of this work I have focused my attention on an immortalized endothelial-like cell line derived from fetal bovine cerebellum. E2 (10nM) and T (10nM) effects on intracellular Ca^{2+} homeostasis were tested by varying the exposure time to the hormones (8, 24, 48 h). Ca^{2+} measurements were performed with genetically encoded Ca^{2+} probes (Cameleons) targeted to the main subcellular compartments involved in intracellular Ca^{2+} homeostasis (cytosol, endoplasmic reticulum, mitochondria). While T treatment had not any effect on intracellular Ca^{2+} fluxes, mitochondrial Ca^{2+} uptake significantly decreased after 48-h exposure to E2, whereas cytosolic and endoplasmic reticulum responses were unaffected. The effect of E2 on mitochondrial Ca^{2+} handling was blocked by ICI 182,780 (10nM), a pure estrogen receptor antagonist, suggesting that the effect was estrogen-receptor-mediated. To investigate further the effect of E2 on mitochondria, we tested two other concentrations of E2 (1 nM and 100 nM) and we observed a similar effect on the Ca^{2+} peak decrease indicating that saturation was possibly reached at 1 nM. To evaluate whether the decrease of Ca^{2+} affected mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$), cells were monitored in the presence of tetramethyl-rhodamine-methylester (TMRM): no significant changes were seen between cells treated with E2 and controls. To investigate a mechanism of action, we assessed the possible involvement of the permeability transition pore (PTP), an inner mitochondrial membrane

channel influencing energy metabolism and cell viability. We treated cells with CyclosporinA (CsA) (0.8 μ M), which binds to the matrix chaperone cyclophilin-D and regulates PTP opening. CsA reversed the effects of a 48-h treatment with E2, suggesting a possible transcriptional modulation of proteins involved in the mitochondrial permeability transition process. Taken together, these data reveal that, in this immortalized endothelial-like cell line, the genomic effect exerted by E2 can affect PTP opening without causing a collapse in $\Delta\Psi_m$.

In the second part of this study I examined the effects of estradiol in the regulation of the growth of neuronal cells and of their dendritic branches. Dendrites are the principal cellular sites where neurons receive, process, and integrate inputs from their multiple pre-synaptic partners. It is widely known that, in early developmental stages, estrogens modulate neuronal morphology through a regulation of dendritic development. Estrogens regulate neuronal plasticity, synaptogenesis and cellular growth in many brain regions, such as cortex and hypothalamus. Few papers focused on what estrogens cause in the morphology of cerebellum, a region of the brain with a crucial role in controlling balance, posture, motor coordination as well as many other cognitive processes. To characterize the trophic effects of E2, primary neuronal cells from bovine cerebellum of both male and female fetuses were analyzed. To highlight differences in the morphological organization of neuronal cells we performed fluorescent-immunocytochemical analysis using a specific marker of immature neurons (β III-tubulin). The whole area and the whole perimeter of neuronal cells, the number, the length and the diameter of dendritic branches were estimated and comparisons between E100nM samples and control cells were performed; differences intra sex were also considered. Results indicate that E100nM increases all the parameters in cells from females, while in males the trophic effect is restricted only to some values. Moreover, females have greater values than males in the soma dimensions, in the total number of branches and in the length of dendritic branches. On the contrary, males show superior values in the diameter of dendrites. Taken together, these preliminary data suggest that E100nM produces a trophic effect in both male and female samples; since several differences between males and females emerged, it could be supposed that neurons of the cerebellum in this embryonic stage exhibit dimorphic properties.

INDICE

INTRODUZIONE	pg.: 1
1. ORMONI STEROIDEI	pg.: 1
2. RECETTORI DEGLI ORMONI STEROIDEI	pg.: 5
3. OMEOSTASI INTRACELLULARE DEL CALCIO	pg.: 8
3.1 Depositi intracellulari di calcio	pg.: 10
3.1.1 Reticolo endoplasmatico	pg.: 10
3.1.1.a Recettore dell' IP_3 (IP_3 -R)	pg.: 12
3.1.1.b Recettore rianodinico (RyR)	pg.: 12
3.1.2 Mitocondri	pg.: 13
3.1.3 Proteine Tampone	pg.: 15
3.2 Le vie di estrusione del calcio	pg.: 16
3.2.1 PMCA	pg.: 16
3.2.2 Scambiatore Na^+/Ca^{2+}	pg.: 16
3.3 Le vie di influsso del calcio	pg.: 17
3.3.1 VOCCs (<i>Voltage-Operated Ca^{2+} Channels</i>)	pg.: 17
3.3.2 Canali attivati da agonisti	pg.: 18
3.3.2.a Canali regolati da recettore	pg.: 18
3.3.2.b Canali attivati da proteine-G	pg.: 19
3.3.2.c Canali attivati da secondi messaggeri	pg.: 19
3.3.3 Canali attivati dallo svuotamento dei depositi intracellulari	pg.: 20
3.4 Metodi per misurare le concentrazioni intracellulari di calcio	pg.: 22
3.4.1 GFP	pg.: 22
3.4.2 Mutanti delle GFP	pg.: 23
3.4.3 le sonde Cameleon	pg.: 25
4. RUOLO DEGLI ORMONI STEROIDEI NELLA REGOLAZIONE DELL' OMEOSTASI INTRACELLULARE DEL CALCIO	pg.: 28
5. LE ARBORIZZAZIONI DENDRITICHE	pg.: 30

6. RUOLO DEGLI ESTROGENI NELLO SVILUPPO DELLE ARBORIZZAZIONI NEURONALI EMBRIONALI	pg.: 32
7. IL CERVELLETTO E GLI ORMONI STEROIDEI	pg.: 34
8. IL BOVINO COME ANIMALE MODELLO	pg.: 37
SCOPO DELLA TESI	pg.: 39
MATERIALI e METODI	pg.: 41
1. COLTURE CELLULARI PRIMARIE	pg.: 41
1.1 Immortalizzazione, caratterizzazione e mantenimento della linea endoteliale	pg.: 42
2. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI DEGLI ESTROGENI E DEI GENI DI IMMORTALIZZAZIONE NELLA LINEA CELLULARE CR10	pg.: 43
2.1 Estrazione dell'RNA e retro trascrizione	pg.: 44
2.2 PCR ed elettroforesi su gel d'agarosio	pg.: 45
3. MISURE DEI FLUSSI INTRACELLULARI DI CALCIO	pg.: 45
3.1 Plasmidi utilizzati	pg.: 45
3.2 Trasformazione e colture batteriche	pg.: 46
3.3 Isolamento su vasta scala di DNA plasmidico (<i>Maxi-Prep</i>)	pg.: 47
3.4 Trasfezione	pg.: 48
3.5 Esperimenti di " <i>live-imaging</i> "	pg.: 48
4. ANALISI MORFOLOGICA DELLE COLTURE NEURONALI	pg.: 50
5. TRATTAMENTO CON ESTRADIOLO E TESTOSTERONE	pg.: 52
6. ANALISI STATISTICA	pg.: 53
RISULTATI	pg.: 54
1. CARATTERIZZAZIONE DELLA LINEA IMMORTALIZZATA	pg.: 54
2. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI DEGLI ESTROGENI E DEI GENI DI IMMORTALIZZAZIONE NELLA LINEA CELLULARE	

CR10	pg.: 55
3. EFFETTI DELL'ESTRADIOLO E DEL TESTOSTERONE SULL' OMEOSTASI INTRACELLULARE DEL CALCIO	pg.: 55
3.1 Sonda citosolica D3cpv	pg.: 56
3.2 Sonda del reticolo endoplasmatico D1ER	pg.: 58
3.3 Sonda mitocondriale 4mtD3cpv	pg.: 59
4. EFFETTI DELL'ESTRADIOLO SULLA MORFOLOGIA DI CELLULE NEURONALI	pg.: 63
4.1 Confronto tra cellule neuronali di controllo e cellule trattate	pg.: 65
4.2 Confronto tra cellule neuronali di controllo e cellule trattate nei due sessi	pg.: 67
DISCUSSIONE	pg.: 72
BIBLIOGRAFIA	pg.: 84

INTRODUZIONE

1. ORMONI STEROIDEI

Gli ormoni steroidei (androgeni ed estrogeni) rivestono un ruolo di fondamentale importanza in molteplici processi cellulari che complessivamente regolano il benessere fisiologico di un organismo. Oltre a governare lo sviluppo sessuale e riproduttivo di un individuo, questi ormoni possono influenzare il sistema cardiovascolare, il sistema immunitario e l'organizzazione del sistema nervoso centrale (SNC) in via di sviluppo; gli effetti di questi neurosteroidi infatti si esplicano sia a livello dell'organogenesi, sia sulla crescita e la differenziazione delle cellule neuronali (Prossnitz *et al.*, 2008; Vasudevan *et al.*, 2008; McCarthy *et al.*, 2008).

Nel sistema nervoso centrale gli ormoni steroidei controllano un'ampia gamma di funzioni neurocognitive, comportamentali e neuroendocrine, tanto quanto la formazione dei circuiti neurali dimorfici. Sono responsabili della regolazione di numerosi processi intracellulari ed esercitano il loro effetto in svariati modi, ad esempio promuovendo o inibendo un particolare evento, a seconda della regione dell'encefalo in cui stanno agendo. E' noto che possono agire come neurotrofine, influenzando la differenziazione e la crescita cellulari, la neurogenesi, l'apoptosi, l'espressione dei composti neurochimici e la plasticità dei neurotrasmettitori, oltre che regolare l'ontogenesi tramite un controllo sulla morfologia cellulare, sulla migrazione delle cellule nervose e sulla sinaptogenesi (Schwarz *and* McCarthy, 2008).

Tra gli ormoni steroidei, l'estradiolo (E2) e il testosterone (T) (figura 2) risultano di particolare interesse in quanto la loro azione combinata a livello del SNC determina il normale sviluppo morfo-funzionale in senso maschile o femminile, ciascuno caratterizzato da quadri neuroendocrini, cognitivi e comportamentali specifici. Il SNC in via di sviluppo è ricettivo all'azione degli ormoni neuro-attivi soltanto durante una ristretta finestra temporale di differenziamento specie-specifica, durante la quale il fenotipo sessuale dell'encefalo in via di sviluppo è determinato dall'azione di specifici neurosteroidi (Peruffo *et al.*, 2008). Alcuni studiosi ritengono infatti che l'encefalo rimanga indifferenziato nelle prime fasi della gravidanza e che, fino a un determinato stadio di sviluppo, sia potenzialmente in grado di differenziarsi in senso femminile o in

senso maschile, indipendentemente dal corredo genetico (Beyer *et al.*, 1994; Hutchison *et al.*, 1994).

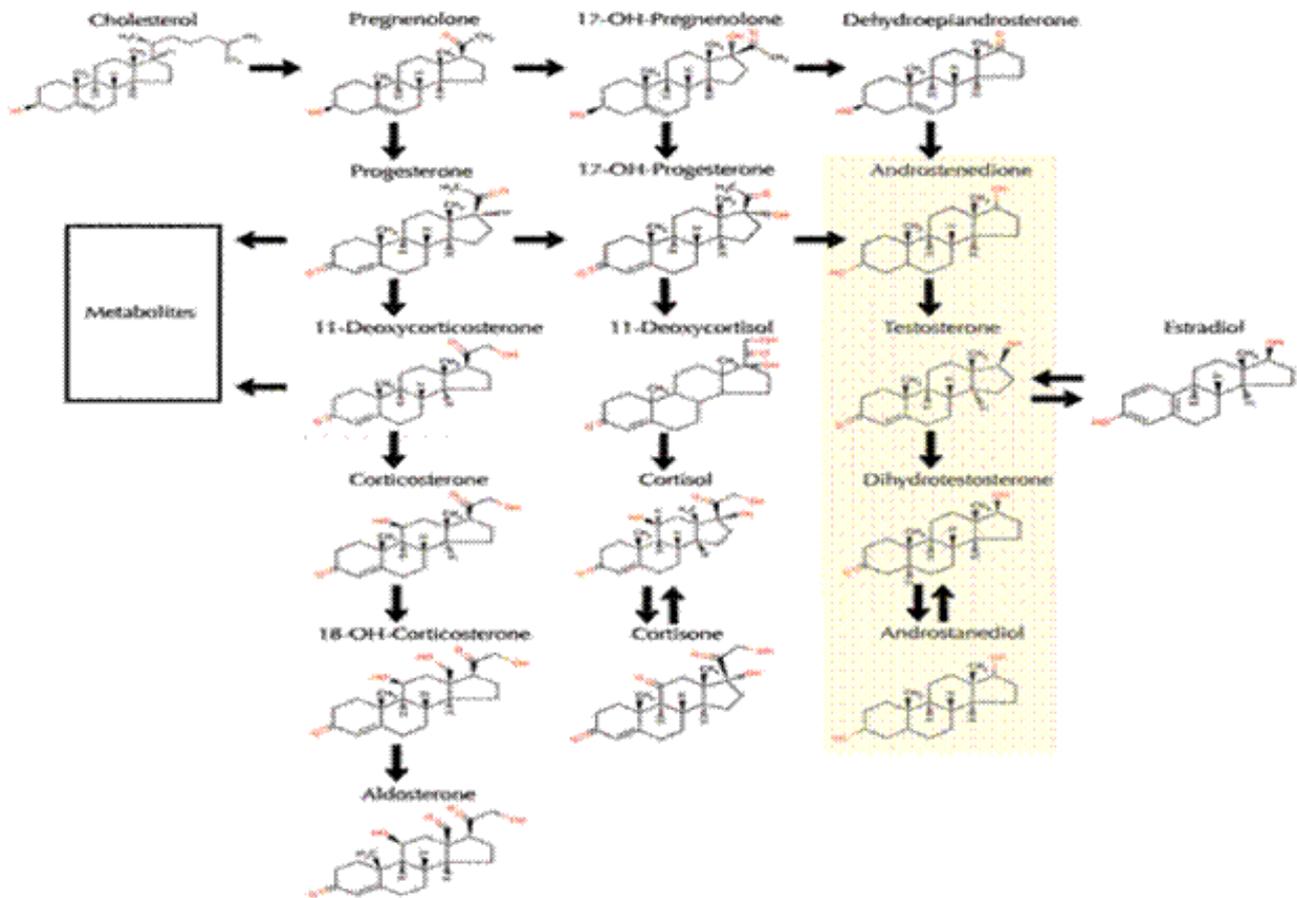


Figura 1: sintesi degli ormoni steroidei a partire dal precursore comune: il colesterolo (dal sito hormone.tulane.edu/learning/androgens)

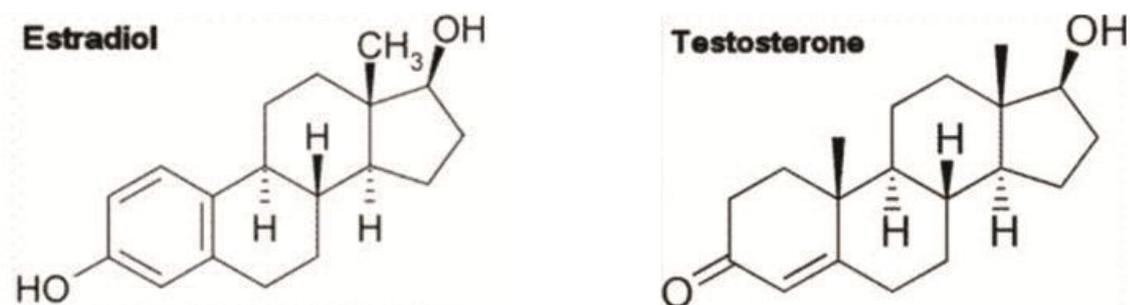


Figura 2: strutture chimiche dell'E2 e del T (dal sito officialfitnessandhealth.com)

Nei mammiferi, l'encefalo maschile è diverso da quello femminile: esistono infatti differenze nel volume di specifiche aree, nella densità delle cellule neuronali, nel grado di complessità delle arborizzazioni dendritiche e persino nell'espressione dei

neuropeptidi (de Lacalle, 2006). Numerose ricerche sono state incentrate proprio sullo studio di due particolari differenze del SNC in via di sviluppo indotte dall'azione degli ormoni steroidei e legate al differenziamento sessuale: differenze volumetriche macroscopiche di interesse strutture o di interesse regioni del SNC oppure differenze microscopiche osservabili nella morfometria di singole cellule. Nella specie umana (sia nel maschio che nella femmina) la sintesi e la secrezione degli ormoni steroidei (androgeni, estrogeni, progesterone) viene promossa nelle gonadi dall'ormone follicolo stimolante (FSH) e dall'ormone luteinizzante (LH). Queste gonadotropine vengono rilasciate dall'ipofisi anteriore in risposta all'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH) prodotto da cellule neurosecretrici localizzate nell'uomo e nei primati a livello dell'ipotalamo basale mediale e del nucleo arcuato, mentre negli altri vertebrati sono localizzate nell'ipotalamo anteriore e nell'area preottica. Gli stessi ormoni sessuali steroidei esercitano un feedback negativo sui neuroni ipotalamici che secernono il GnRH e sulle cellule endocrine dell'ipofisi anteriore che producono FSH ed LH. Oltre alla produzione di ormoni steroidei a livello delle gonadi e della corticale del surrene, anche la produzione cerebrale di estrogeni contribuisce al corretto sviluppo delle strutture neurali che regolano il differenziamento e il comportamento sessuale. Tale sintesi ormonale avviene attraverso una reazione di aromatizzazione degli androgeni in estrogeni, catalizzata da un complesso enzimatico microsomiale costituito da due proteine: l'enzima citocromo P450_{arom} e l'enzima NADPH-citocromo P450 riduttasi (Conley *et al.*, 2001; Beyer *et al.*, 1999).

Gli effetti degli ormoni steroidei si possono suddividere in due categorie: effetti a livello genomico, che coinvolgono meccanismi di regolazione genica (detti anche "effetti lenti") ed effetti non genomici (noti anche come "effetti veloci"), che iniziano tramite l'interazione degli ormoni con recettori presenti sulla membrana plasmatica (Vasudevan *et al.*, 2008). Mentre l'azione genomica presenta un decorso della durata di molti minuti, se non addirittura ore, gli effetti veloci si realizzano in intervalli di tempo della durata di pochi minuti o addirittura pochi secondi. Benché le molecole di ormone entrino in contatto con vari tessuti di un organismo, solo le cellule che possiedono recettori specifici sono in grado di captare il segnale. Solitamente, al legame dell'ormone con il proprio recettore segue una cascata di eventi intracellulari, mediata da secondi messaggeri, che termina con una risposta tessuto-specifica. La natura del

segnale indotto dallo steroide, sia esso di tipo genomico o non genomico, dipende non solo dal tipo di tessuto, ma anche dal tipo di recettore presente in ciascuna cellula e ovviamente dal tipo di ligando stesso (Michels *et al.*, 2008).

Gli ormoni steroidei (che sono derivati di idrocarburi ciclici) sono ormoni idrofobici lipofili; in altre parole sono in grado di attraversare le membrane cellulari e successivamente legarsi a recettori intracellulari, citosolici o nucleari, i quali a loro volta interagiscono con altre proteine nucleari (attivatori o repressori trascrizionali), regolando l'espressione di geni bersaglio (figura 3).

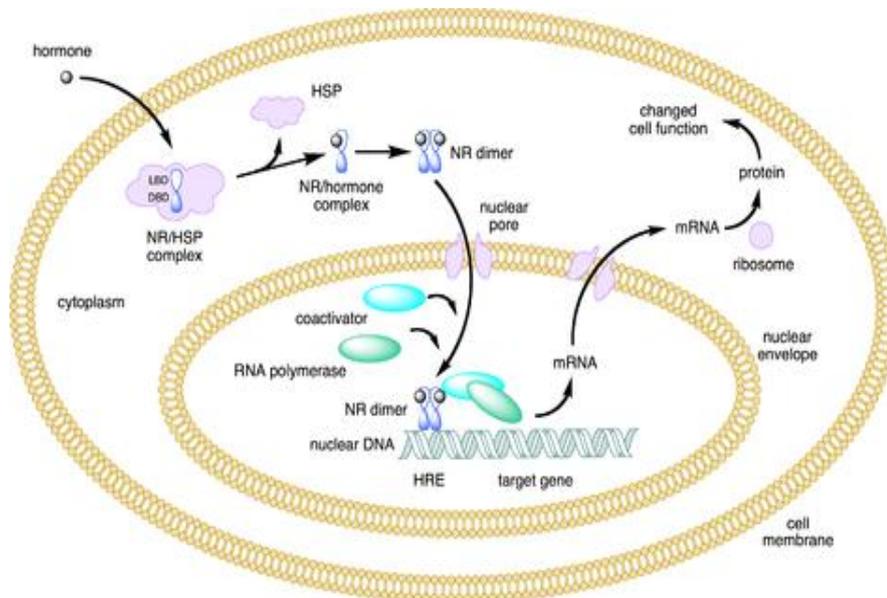


Figura 3: meccanismo d'azione dei recettori nucleari. La figura illustra il meccanismo d'azione della classe I dei recettori nucleari (NR) i quali, in assenza di un ligando, sono localizzati nel citoplasma. Il legame ormone-recettore innesca il distacco delle HSP, la dimerizzazione e la traslocazione nel nucleo, dove i NR si legano alle specifiche sequenze di DNA denominate elementi di risposta dell'ormone (HRE). Il complesso DNA-recettore quindi recluta ulteriori proteine responsabili della trascrizione dell'mRNA, che può essere quindi tradotta in proteine che regolano le funzioni cellulari.

Grazie alla loro liposolubilità sono in grado di attraversare anche la barriera ematoencefalica del SNC ed agire sui tessuti nervosi per regolare diverse funzioni che persisteranno durante la vita adulta di un individuo (Tsutsui, 2008). I circuiti neurali che vengono così a formarsi nelle fasi dello sviluppo embrionale, tanto quanto le differenze delle diverse aree sessualmente dimorfiche sono considerate le fondamenta biologiche dello sviluppo cognitivo di un individuo che si rifletteranno nel comportamento della fase adulta (de Lacalle, 2006). Negli ultimi anni il ruolo degli ormoni steroidei (ed in

particolare degli estrogeni) nell'encefalo in via di sviluppo dei mammiferi è stato accuratamente approfondito. Gli effetti degli estrogeni sono mediati dai recettori *alpha* e *beta* (ER α , ER β) e dall'enzima P450 aromatasi (P450Arom), che catalizza la conversione del T in E2. Nei mammiferi, durante l'ontogenesi, ER α , ER β e P450Arom sono espressi in diverse regioni dell'encefalo; nel corso di precise e limitate finestre temporali specie-specifiche ER α , ER β e P450Arom sono i principali responsabili nel plasmare la morfologia dei neuroni, le reti neurali ed i nuclei dimorfici che differenziano il fenotipo dell'encefalo in senso maschile o femminile (Peruffo *et al.*, 2008; Schwarz *and* McCarthy, 2008; Sanchez *and* Simoncini, 2010; Giretti *and* Simoncini, 2008). L'azione non genomica degli androgeni è implicata nella regolazione di numerosi processi fisiologici cellulari, come la stimolazione di diverse proteine chinasi, la comunicazione tramite "gap-junction", la plasticità neurale e lo sviluppo degli assoni, fino alla regolazione dell'omeostasi del Ca²⁺ (in quanto inducono variazioni nell'attività di proteine canale coinvolte nella modulazione dei livelli di Ca²⁺ intracellulare) (Michels *et al.*, 2008). Si ritiene che l'azione rapida degli androgeni possa essere mediata da diversi tipi di proteine, come ad esempio recettori intracellulari per androgeni e recettori transmembrana accoppiati o meno a proteine G. In ogni caso, gli effetti "veloci" sono mediati da secondi messaggeri (tra questi lo ione Ca²⁺ in particolar modo) e da eventi di fosforilazione (incluse le vie attivate dalla PKA, MAPK, PI-3K) che regolano indirettamente l'attivazione/inattivazione di canali ionici e di trasportatori o la stimolazione di diverse proteine-chinasi. Per quanto riguarda gli estrogeni il meccanismo d'azione appare assai simile: il legame tra il recettore ed il proprio ligando comporta l'attivazione di una via di trasduzione del segnale che include modifiche nelle concentrazioni intracellulari di Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) e l'attivazione di alcune chinasi; si ritiene inoltre che numerose proteine legate all'ormone (come l'albumina serica, troppo grande per attraversare la membrana) siano coinvolte nel modulare il legame al recettore presente sulla membrana plasmatica (Vasudevan *et al.*, 2008).

2. RECETTORI DEGLI ORMONI STEROIDEI

Come già detto, l'effetto degli ormoni steroidei è mediato da specifici recettori che possono agire sia come fattori di trascrizione, in grado di regolare l'espressione genica,

tanto quanto come modulatori di risposte veloci attivate a livello della membrana plasmatica ed in grado di attivare vie di trasduzione del segnale nel citoplasma (McCarthy, 2008).

I recettori nucleari degli ormoni steroidei contengono, nella loro struttura, diversi domini conservati (figura 4):

- la porzione N-terminale, nella quale si trovano i domini “A” e “B”, responsabili dell’attivazione della trascrizione genica e che contengono anche una regione denominata AF1 (*activation function 1*), la quale presenta siti di fosforilazione a cui è associata la funzione di attivazione trascrizionale ligando-indipendente;
- il dominio “C” detto anche *DNA binding domain* (DBD) in quanto media il legame con il DNA grazie a due strutture *zinc-finger* che permettono l’interazione con specifiche sequenze esanucleotidiche e palindromiche nel DNA, dette RE (*response element*);
- il dominio “D”, coinvolto, assieme al dominio “E”, nella dimerizzazione del recettore e in grado di legare anche le *heat shock proteins*;
- la porzione C-terminale, che a sua volta comprende il dominio “E”, caratterizzato dalla presenza del sito di legame per il ligando (LBD, *ligand binding domain*) e il dominio “F”, che modula l’attività trascrizionale della proteina stessa con modalità ligando dipendente (regione AF2) (Acconcia and Kumar, 2005).

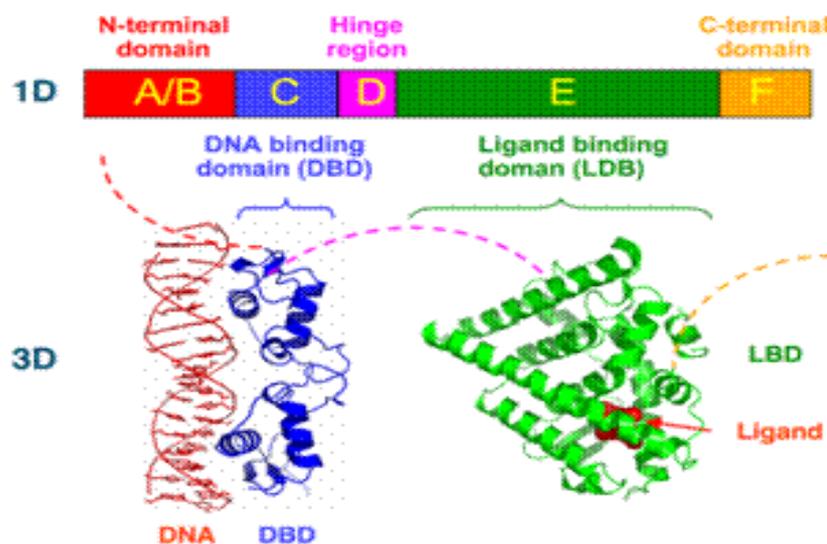


Figura 4: domini dei recettori nucleari: sono evidenziati i domini conservati nei recettori nucleari per gli androgeni (AR) e per gli estrogeni (ER), i siti Dna Binding Domain (DBD) e Ligand Binding Domain (LBD).

Per quanto riguarda i recettori degli estrogeni, esistono due isoforme di recettori nucleari: ER α ed ER β , ciascuna codificata da geni separati (ESR1 ed ESR2 rispettivamente). Queste due isoforme vengono co-esprese in numerosi tipi cellulari, perciò è possibile trovare recettori per gli estrogeni associati tra loro in omodimeri $\beta\beta$ o $\alpha\alpha$, oppure in eterodimeri $\alpha\beta$. ER α e ER β presentano un'elevata omologia di sequenza; in particolare, sono caratterizzati da un'omologia di circa il 90% per i domini DBD, e del 59% per il dominio LBD. Pur condividendo un'organizzazione strutturale simile all'interno dei vari domini, le due isoforme di ER mostrano differenze nell'affinità per i diversi ligandi (Beyer *et al.*, 2003).

Anche per i recettori degli androgeni sono state individuate due isoforme di recettori nucleari: AR-A ed AR-B. I recettori per gli androgeni sono noti anche come NR3C4 (*nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4*) e possono legare sia il T che il diidrotestosterone. Il gene che codifica per AR è localizzato sul cromosoma X: la trascrizione e la traduzione del gene originano l'isoforma AR-B, che, una volta processata da una specifica proteasi in grado di tagliare 187 aminoacidi all'estremità N-terminale, origina l'isoforma AR-A (Trapman *et al.*, 1988). I recettori nucleari sia degli estrogeni che degli androgeni, in assenza dell'ormone, sono presenti nel citoplasma in uno stato inattivo, in quanto legati ad un complesso multiproteico composto da proteine "chaperons", tra cui le Hsp90.

Il legame tra l'ormone e il proprio recettore induce una serie di modifiche conformazionali che portano al distacco delle molecole recettore dal complesso multiproteico, seguito dalla loro dimerizzazione, dal reclutamento di ulteriori proteine ausiliarie ed infine dalla loro traslocazione al nucleo. Tutti i geni attivati dagli steroidi hanno in comune una sequenza di DNA alla quale si lega il complesso recettore-steroidale, nota come *steroid response element* (SRE). In seguito alla traslocazione nel nucleo, i recettori possono perdere eventuali co-repressori o interagire con co-attivatori: possono perciò modulare la trascrizione sia in modo diretto, legandosi ai promotori bersaglio, sia indirettamente, interagendo con regolatori di altri fattori di trascrizione.

Poiché il meccanismo di funzionamento dei recettori nucleari non spiega come gli ormoni steroidei siano in grado di attivare vie rapide di trasduzione del segnale, come ad esempio la regolazione dell'attività elettrofisiologica della membrana, negli ultimi

anni hanno acquisito molta importanza gli studi condotti sui recettori degli ormoni steroidei localizzati sulla membrana plasmatica (Sichak *et al.*, 2012).

E' stato dimostrato ad esempio che i classici recettori nucleari (ER α ed ER β) possono venire letteralmente trasportati dal citoplasma verso la membrana plasmatica dove vengono associati ai recettori metabotropici per il glutammato (Sichak *et al.*, 2012; Kelly *et al.*, 2012) mentre altre evidenze sperimentali hanno messo in luce il coinvolgimento della proteina GPR30 nelle risposte non-genomiche dell'estradiolo. Il complesso GPR30 è un recettore di membrana accoppiato a proteine G che innesca una via di trasduzione del segnale attraverso un'adenilato ciclasi ed attraverso lo ione calcio (Ca²⁺): si ritiene che questo complesso possa anch'esso mediare processi chiave come la crescita, la proliferazione cellulare e l'apoptosi (Prossnitz *et al.*, 2008). Altri autori hanno individuato la presenza di GPR30 anche sulla membrana del Golgi, in neuroni contenenti ossitocina (Kawata *et al.*, 2008) e sulla membrana del reticolo endoplasmatico, dove pare essere coinvolta in meccanismi che modulano, anche in questo caso, il rilascio di Ca²⁺ da questo organello (Kawata *et al.*, 2008; McCarthy *et al.*, 2008). Altri esperimenti ancora, riportati in un lavoro di Toran-Allerand del 2004, dimostrano l'esistenza di un recettore di membrana noto come ER-X i cui effetti a livello cellulare non sono influenzati da inibitori della trascrizione o da antagonisti dei recettori nucleari (come l'ICI 182,780).

3. OMEOSTASI INTRACELLULARE DEL CALCIO

Il legame tra una molecola segnale ed il proprio recettore, presente sulla superficie della membrana plasmatica, porta all'attivazione di una serie di vie di *signalling* intracellulare. La trasmissione dei segnali all'interno della cellula è mediata da variazioni nelle concentrazioni di determinati ioni o molecole, noti come "secondi messaggeri" (Pozzan *et al.*, 2003). Tra questi, lo ione Ca²⁺ svolge un ruolo di primaria importanza mediando processi biologici a breve termine, quali la neurotrasmissione o la contrazione muscolare, sia quelli a lungo termine, come la proliferazione cellulare.

Lo ione Ca²⁺ determina il controllo sia di processi fisiologici e metabolici (per citarne alcuni: apoptosi, coagulazione, contrazione della muscolatura liscia, scheletrica e cardiaca, funzionamento dell'ormone paratiroideo, metabolismo della vitamina D) come

anche di diversi processi patologici (è coinvolto, ad esempio, nell'insorgenza della patologia di Alzheimer e in una serie di patologie note come "malattie ossee metaboliche", come ad esempio l'osteoporosi e il rachitismo, legate proprio ad un alterato metabolismo del Ca^{2+}). L'utilizzo del Ca^{2+} nel processo di trasduzione del segnale è reso possibile grazie alla presenza di numerosi canali ed organelli citoplasmatici che ne modulano finemente i livelli di concentrazione (Rizzuto *et al.*, 2009; Santo Domingo *et al.*, 2010). Nella condizione di riposo la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è 10^{-7}M , circa diecimila volte inferiore rispetto a quella del mezzo esterno (10^{-3}M). In seguito a stimoli di varia natura, grazie alle numerose proteine ed ai complessi sistemi di pompe, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ può aumentare o diminuire molto rapidamente, attivando così le diverse vie di trasduzione del segnale (figura 5).

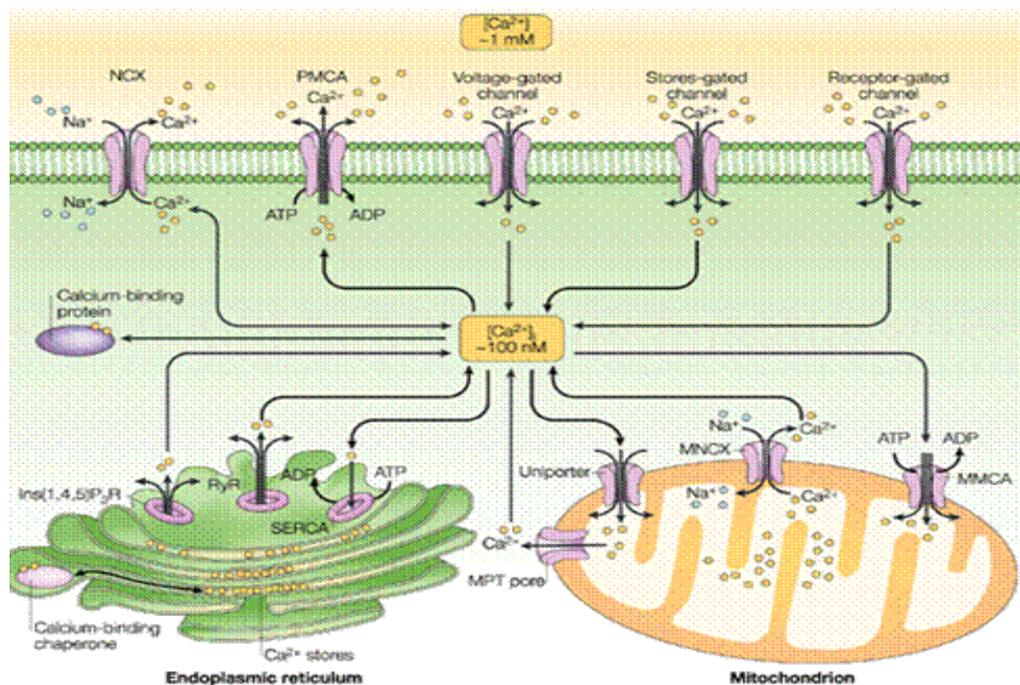


Figura 5: vie di regolazione dell'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} . Sono riportati in figura: i due organelli intracellulari maggiormente responsabili dell'accumulo di Ca^{2+} (mitocondri e reticolo endoplasmatico) con i rispettivi canali e recettori di membrana (per il reticolo endoplasmatico: recettori per l' IP_3 , recettori rianodinici, pompa SERCA; per i mitocondri: MPT = pori di transizione, MNCX = scambiatori sodio Ca^{2+} mitocondriali, MMCA = Ca^{2+} -ATPasi di membrana mitocondriale); proteine leganti il Ca^{2+} ; alcuni tra i principali sistemi di influsso (NCX = scambiatore sodio Ca^{2+} , PMCA = pompa Ca^{2+} -ATPasi di membrana) e di estrusione (canali VOCCs, canali ROCCs, canali SOCCs) del Ca^{2+} dalla cellula (Syntichaki *et al.*, 2003).

In qualsiasi momento, all'interno di una cellula i livelli di Ca^{2+} sono regolati con estrema accuratezza da un precisissimo apparato molecolare di canali, pompe e depositi,

che equilibrano i livelli di Ca^{2+} in entrata con quelli in uscita. Proprio l'azione concertata e coordinata di questi sistemi costituisce il meccanismo fondamentale per modulare le variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]$ intracellulare che controllano le varie vie di trasduzione del segnale (Berridge *et al.*, 2003); alterazioni nella regolazione della cascata di trasduzione del segnale del Ca^{2+} possono essere deleterie per la fisiologia ed il metabolismo di una cellula. Gli organelli citoplasmatici contribuiscono alla regolazione dell'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} accumulando lo ione al loro interno. Il reticolo endoplasmatico è il principale sito di deposito, ma un ruolo chiave è svolto anche dai mitocondri. Oltre a questi due principali attori si annoverano l'apparato di Golgi, gli endosomi e il nucleo (Pozzan *et al.*, 1994). Per ripristinare la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basale (100nM), la cellula si avvale di diversi sistemi: la pompa Ca^{2+} -ATPasica della membrana plasmatica (PMCA) e lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), i quali estrudono il Ca^{2+} dal citoplasma verso il mezzo extracellulare, e la pompa SERCA (*sarco-endoplasmic-reticulum- Ca^{2+} ATPase*) che accumula Ca^{2+} nel reticolo endoplasmatico. L'influsso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare è invece regolato da canali ionici ubiquitari che permettono l'entrata di Ca^{2+} secondo gradiente elettrochimico. Questi canali possono trovarsi principalmente in due stati conformazionali: aperto e chiuso. A riposo, i canali del Ca^{2+} si trovano prevalentemente nella conformazione chiusa per evitare aumenti eccessivi della $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La loro apertura viene perciò regolata da fattori sia di natura elettrica (come variazioni nel potenziale di membrana) che di tipo chimico (come il legame di un ligando al proprio recettore) (Pietrobon *et al.*, 1990). I canali del Ca^{2+} si possono classificare in due principali categorie in base al meccanismo che ne determina l'apertura. Distinguiamo dunque canali in cui l'apertura dipende dal potenziale della membrana (VOCCs, *Voltage-Operated- Ca^{2+} -Channels*), e canali che vengono attivati da agonisti (Pietrobon *et al.*, 1990; Fasolato *et al.*, 1994).

3.1 Depositi intracellulari di calcio

3.1.1 Reticolo endoplasmatico

Il reticolo endoplasmatico (RE) è costituito da endomembrane interconnesse tra loro (figura 6). Esso si differenzia in reticolo endoplasmatico "rugoso", la cui superficie è

coperta da ribosomi coinvolti nella sintesi proteica e nella traslocazione delle proteine, e in reticolo endoplasmatico “liscio”, privo di ribosomi, sede della sintesi lipidica. Quest’ultimo costituisce il principale deposito intracellulare di Ca^{2+} . Associate alle membrane del reticolo si trovano sia le proteine che attivamente regolano il trasporto di molecole all’interno della cellula, sia le proteine deputate alla regolazione del Ca^{2+} . Come già accennato il Ca^{2+} viene accumulato attivamente all’interno del RE mediante le proteine transmembrana SERCA: questi enzimi con peso molecolare di 110kDa trasportano Ca^{2+} contro gradiente di concentrazione all’interno dell’organello sfruttando l’energia liberata dall’idrolisi di una molecola di ATP (Pozzan *et al.*,1994). Esistono numerose molecole in grado di interagire con le pompe SERCA, utilizzate assai spesso negli studi volti a caratterizzare le variazioni dell’omeostasi intracellulare del Ca^{2+} : tra queste, le più utilizzate sono la Tapsigargina (Tg), che si lega alle pompe in modo irreversibile, e l’acido ciclopiazonico (CPA), più idrosolubile, che forma legami reversibili.

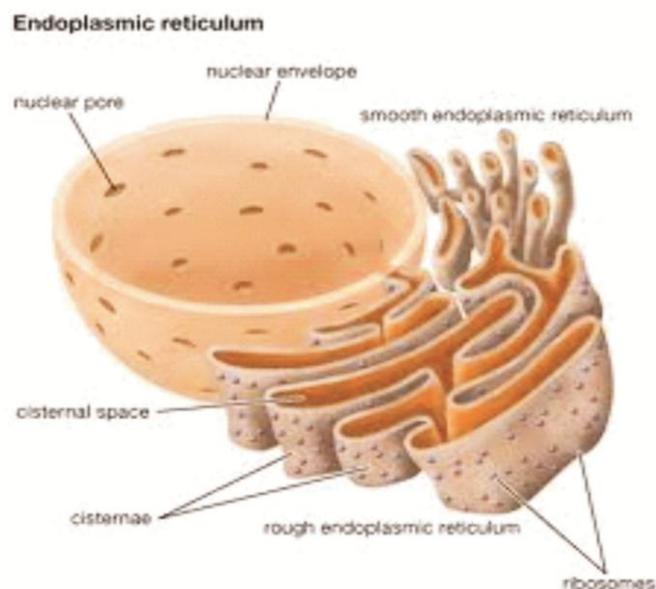


Figura 6: il reticolo endoplasmatico (da Enciclopedia Britannica, Inc. britannica.com)

All’interno del RE, il Ca^{2+} viene legato da particolari proteine tampone, come ad esempio la calreticulina (espressa in tutte le cellule eucariotiche), e la calsequestrina (presente solo nelle cellule muscolari e nei neuroni di Purkinje) (Pozzan *et al.*, 1994). Il rilascio di Ca^{2+} dal RE viene modulato da numerose molecole: tra queste si annoverano l’ IP_3 , l’ADP-ribosio-ciclico, il NAADP e lo stesso ione Ca^{2+} . L’uscita di

Ca²⁺ avviene grazie alla presenza sulla membrana di questo organello proprio di un canale-recettore per l'IP₃; un altro meccanismo che porta al rilascio di Ca²⁺ dal RE (o meglio, dal reticolo sarcoplasmatico, RS) è invece l'accoppiamento elettro-meccanico in cui canali voltaggio dipendenti presenti nel sarcolemma portano, in seguito ad una variazione del potenziale di membrana, all'attivazione del canale-recettore della rianodina (RyR) tipico delle cellule muscolari (Berridge *et al.*, 2003; Pozzan *et al.*, 1994).

3.1.1.a Recettore dell'IP₃ (IP₃-R)

La stimolazione di un recettore presente sulla superficie della membrana plasmatica ed accoppiato ad una proteina G (pG_q) porta al rilascio della subunità *alpha* della pG_q, la quale è in grado di attivare l'enzima fosfolipasi C (PLC). A sua volta questo enzima promuove l'idrolisi di un fosfolipide presente nel lato interno della membrana plasmatica, il fosfatidil-inositolo-4,5-bifosfato (PIP₂), rilasciando i secondi messaggeri inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃) e 1,2-diacilglicerolo (DAG). Mentre il DAG rimane nelle vicinanze della membrana plasmatica, l'IP₃, essendo una molecola idrofila, è libero di muoversi nel citoplasma e di legarsi al suo recettore, inducendo il rilascio di Ca²⁺ dal lume del RE (Pozzan *et al.*, 1994).

Il recettore dell' IP₃ (IP₃-R) è una proteina composta da sei domini transmembrana e da quattro subunità ciascuna contenente un sito di legame per l'IP₃ all'estremità N-terminale in grado di mediare la risposta cellulare di questa molecola. L'attività dell'IP₃-R può venire modulata in vario modo, attraverso la fosforilazione da parte della proteina chinasi A (PKA), dipendente da cAMP, o tramite interazione diretta col complesso Ca²⁺-Calmodulina (Da Silva *and* Guse, 2000).

3.1.1.b Recettore rianodinico (RyR)

Il recettore per la rianodina (RyR) è localizzato sulla superficie del reticolo sarcoplasmatico nelle cellule muscolari; è costituito da quattro subunità associate a varie proteine che ne modulano l'apertura. Esistono tre diverse isoforme di questa proteina, con espressione tessuto-specifica: il recettore di tipo 1 (Ry-R₁) è localizzato sulla

membrana del RS del muscolo scheletrico e viene attivato dall'interazione con canali VOOCs L-type (vedi paragrafo 3.3); l'isoforma Ry-R₂ è presente invece nel muscolo cardiaco ed è anch'esso attivato dall'entrata di Ca²⁺ sempre attraverso canali VOOCs; l'ultima isoforma, Ry-R₃ è invece caratteristica cellule non muscolari e mostra una distribuzione ubiquitaria. Il maggiore attivatore di questi canali è il Ca²⁺ stesso che produce un fenomeno noto come “*calcium-induced-calcium-release*” (CICR): questo meccanismo prevede che un aumento di Ca²⁺ nell'ambiente citosolico (causato da un'entrata di Ca²⁺ dai canali presenti sulla membrana plasmatica o da un rilascio di Ca²⁺ dai compartimenti) determini un effetto di feedback positivo aumentando la propagazione del segnale attivato.

3.1.2 Mitocondri

Grazie allo sviluppo di specifiche sonde indirizzate ai mitocondri, negli ultimi anni è stato dimostrato che questi organelli plasmano e decodificano i segnali del Ca²⁺ cellulare direttamente prelevando e rilasciando gli ioni dall'ambiente citoplasmatico e contemporaneamente regolando la propria attività fisiologica (Santo Domingo *et al.*, 2010; Rizzuto *et al.*, 2009). I mitocondri svolgono un ruolo di primaria importanza nella regolazione di numerosi processi cellulari, dalla produzione di ATP all'innescamento dell'apoptosi. Grazie a recenti scoperte essi sono ad oggi considerati non più delle strutture “statiche”, bensì un complesso *network* dinamico in grado di muoversi all'interno della cellula e di riorganizzare funzionalmente la propria struttura in base ad interazioni con vari compartimenti intracellulari (come il nucleo ed il RE) (Pizzo *and* Pozzan, 2007; Rizzuto *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda il ruolo svolto dai mitocondri nell'omeostasi del Ca²⁺, è stato ipotizzato che questi organelli si localizzino in zone intracellulari “strategiche” in cui sono presenti elevate concentrazioni di Ca²⁺, come ad esempio in prossimità dei canali Ca²⁺ o in prossimità degli IP₃R del reticolo (Rizzuto *et al.*, 1993). Lavori successivi hanno infatti confermato interazioni stabili nel tempo tra mitocondri e ER (Rizzuto *et al.*, 1998; Filippin *et al.*, 2003) definendo queste interazioni spaziali “*calcium-microdomains*”.

I mitocondri (figura 7) accumulano Ca^{2+} all'interno della matrice mitocondriale grazie alla presenza di proteine presenti sulle proprie membrane. Si ritiene che l'ingresso di Ca^{2+} sia mediato principalmente da canali anionici voltaggio dipendenti (VDAC) e dall'uniporto mitocondriale, una proteina canale che sfrutterebbe il gradiente elettrochimico ($\Delta\Psi_m$, di circa -180mV) generato dalle pompe H^+ -ATPasi della catena respiratoria, presenti sulla membrana mitocondriale interna (Pozzan *et al.*, 1994; Rizzuto *et al.*, 2009).

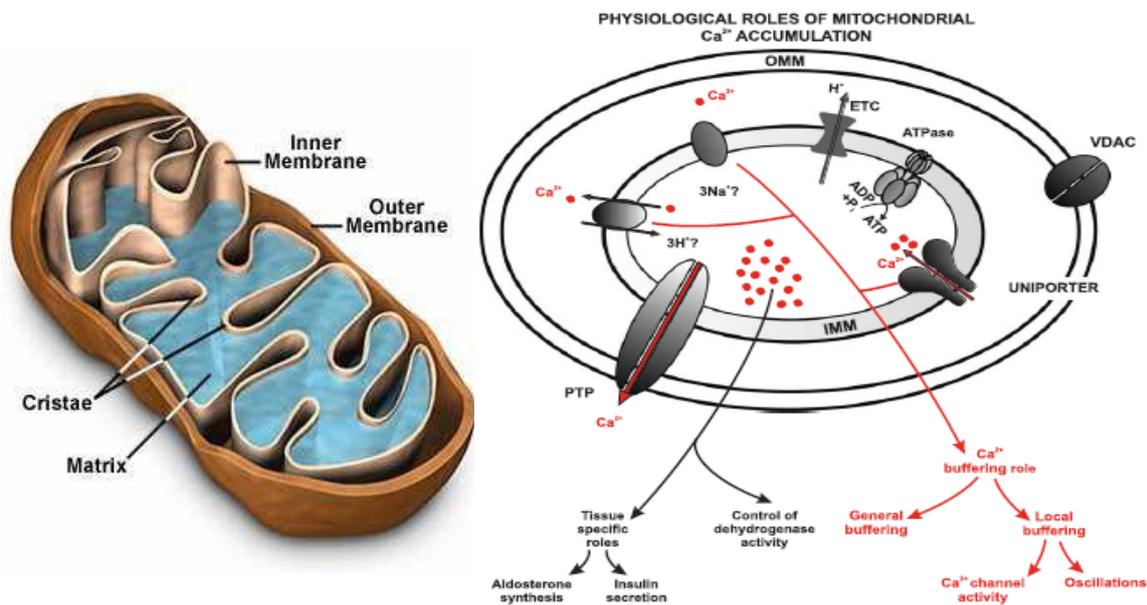


Figura 7: struttura di un mitocondrio (dal sito micro.magnet.fsu.edu); l'immagine adiacente rappresenta in maniera schematica la regolazione dei flussi di Ca^{2+} nei mitocondri. Le principali proteine coinvolte nell'accumulo mitocondriale di Ca^{2+} sono state disegnate schematicamente con la loro ipotetica localizzazione mitocondriale. ETC = catena di trasporto degli elettroni; VDAC = canale anionico voltaggio dipendente, OMM = membrana mitocondriale esterna, IMM = membrana mitocondriale interna, PTP = poro di transizione della permeabilità (da Giacomello *et al.*, 2007).

Uno stato stazionario all'interno del mitocondrio però non viene mai raggiunto in quanto l'entrata di Ca^{2+} viene controbilanciata da proteine che estrudono lo ione scambiandolo con ioni H^+ o Na^+ ; l'efflusso di Ca^{2+} dai mitocondri è infatti mediato principalmente da un antiporto elettroneutro Na^+ -dipendente, in cui vengono scambiati 2 ioni H^+ con uno ione Ca^{2+} , e dal poro di transizione della permeabilità (PTP). Quest'ultimo è un canale voltaggio e Ca^{2+} dipendente della membrana interna mitocondriale che svolge un ruolo chiave nel metabolismo energetico e nella vitalità cellulare. L'attività del PTP è regolata dal Ca^{2+} stesso, dal pH e dal potenziale della

membrana mitocondriale. Inoltre il PTP è sensibile alla ciclosporina A (CsA), uno specifico inibitore in grado di legarsi alla molecola *chaperone* di matrice *cyclophilina* D, una peptidil-prolil-isomerasi in grado anch'essa di modulare l'apertura del PTP (Rasola *et al.* 2010; Bernardi *et al.*, 1999). L'apertura di questo canale porta alla permeabilizzazione della membrana interna mitocondriale con conseguente entrata di soluti di dimensioni inferiori a 1500kDa, attraverso un fenomeno noto come processo di transizione di permeabilità mitocondriale (PTPM). Questo evento, causato da un sovraccarico di Ca^{2+} nella matrice, può determinare una successiva fuoriuscita di cationi, caduta del potenziale di mitocondriale transmembrana ed infine rilascio di fattori pro-apoptotici con conseguenze drammatiche per la cellula stessa (Rasola *et al.*, 2010).

3.1.3 Proteine tampone

All'interno del citoplasma esistono alcune proteine che fungono da “tamponi” intracellulari. Legando temporaneamente gli ioni Ca^{2+} , tali proteine sono in grado di evitare gli eventuali danni cellulari derivati da elevate $[\text{Ca}^{2+}]$. Tra queste proteine tampone, le più studiate sono la parvalbumina e la calmodulina. La prima è costituita da sei segmenti ad α -elica, connessi tra loro da sequenze aminoacidiche dette “*loops*”. I *loops* tra i segmenti C-D ed E-F presentano dei domini ad alta affinità per il Ca^{2+} (noti come domini “E-F *hand*”). Nonostante siano state cercate prove di una qualche attività enzimatica o regolatoria, l'unica funzione della parvalbumina sembra essere quella di legare e tamponare il Ca^{2+} citosolico (Pietrobon *et al.*, 1990).

La calmodulina invece è una proteina di 17kDa, nella quale si distinguono due lobi (N- e C- terminale) contenenti complessivamente quattro domini E-F *hand*, in grado di legare il Ca^{2+} ad alta affinità (μM). La calmodulina (figura 8), in seguito al legame con 4 ioni Ca^{2+} , subisce una serie di cambiamenti conformazionali che le permettono di legare numerose proteine, modulandone l'attività. La funzione di questa proteina è quindi chiaramente regolatoria: ad esempio, interagisce con numerose chinasi e fosfatasi, che vengono così attivate o inibite (Pietrobon *et al.*, 1990). Anche nel RE la maggior parte degli ioni Ca^{2+} si trovano in forma legata a proteine luminali: la più abbondante tra queste è la calreticulina. Sono state individuate altre proteine presenti nel lume del RE

(espresse in maniera ubiquitaria), come ad esempio GRP78/BiP o GRP94 in grado sia di legare il Ca^{2+} , ma anche di agire da chaperonine, permettendo alle proteine appena sintetizzate di assumere una corretta struttura terziaria e quaternaria (Meldolesi *and* Pozzan, 1998).

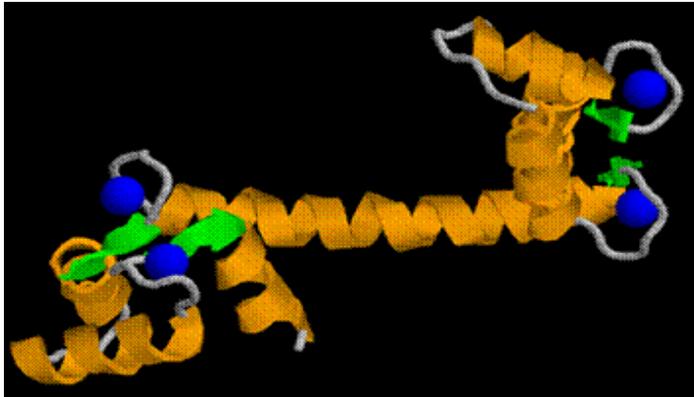


Figura 8: struttura della calmodulina. Si possono apprezzare i due lobi N- e C-terminale in grado di legare gli ioni Ca^{2+} (in arancione sono rappresentate le α eliche, in verde i foglietti β , in grigio i “loop”, in azzurro gli ioni Ca^{2+})

3.2 Le vie di estrusione del calcio

3.2.1 PMCA

La pompa Ca^{2+} -ATPasi della membrana plasmatica (PMCA, *Plasma-Membrane- Ca^{2+} -ATPase*) è una proteina ubiquitaria di 125-140kDa. Essa viene fosforilata e defosforilata ad ogni ciclo di pompaggio, mediante l'idrolisi di una molecola di ATP, determinando un continuo cambiamento conformazionale da una conformazione ad alta affinità per il Ca^{2+} (E1) ad una conformazione a bassa affinità (E2). In tal modo, avviene il trasferimento di uno ione Ca^{2+} dal citoplasma all'ambiente extracellulare, importando contemporaneamente uno ione H^+ nel citosol. La PMCA è regolata da differenti meccanismi, tra cui il legame del Ca^{2+} alla calmodulina che ne aumenta sensibilmente l'attività (Carafoli *et al.*, 1992; Berridge *et al.*, 2003).

3.2.2 Scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, la cui presenza è stata rilevata nella membrana plasmatica di molti tipi cellulari, è un antiporto elettrogenico che scambia tre ioni Na^+ e uno ione

Ca²⁺. In questo caso il trasporto attivo di Ca²⁺ è di tipo secondario, in quanto viene utilizzata l'energia proveniente dal gradiente elettrochimico mantenuto dalla cellula a spese di una molecola di ATP, generata dall'attività della pompa sodio/potassio (Na⁺/K⁺-ATPase). Lo scambiatore, attivato da un aumento della [Ca²⁺]_i, si distingue dalla PMCA poiché ha una minore affinità per il Ca²⁺ ma una maggiore V_{max}. La sua attività dipende anche dal potenziale di membrana dato che quando la membrana è depolarizzata si può avere l'inversione del trasporto; in questo modo nelle cellule eccitabili l'azione dei VOCCs (vedi paragrafo 3.3) viene favorita, mentre nella fase di ripolarizzazione lo scambiatore Na⁺/Ca²⁺ effettua un trasporto parallelo alla PMCA (Pietrobon *et al.*, 1990).

3.3 Le vie di influsso del calcio

3.3.1 VOCCs (*Voltage-Operated Ca²⁺ Channels*)

Questi canali permettono l'ingresso di Ca²⁺ nella cellula in risposta ad eventi di depolarizzazione della membrana, convertendo quindi un segnale elettrico in uno chimico. Sono caratteristici delle cellule eccitabili quali neuroni, miociti e cellule secretorie; tuttavia, sia pur in misura minore, sono stati individuati anche in tipi cellulari

SOTTOFAMIGLIA GENICA	GENE	α1 CODIFICATA	TIPO di VOCC
Cav1	Cav1.1	α1S	L-type
	Cav1.2	α1C	
	Cav1.3	α1D	
	Cav1.4	α1F	
Cav2	Cav2.1	α1A	P/Q-type
	Cav2.2	α1B	N-type
	Cav2.3	α1E	R-type
Cav3	Cav3.1	α1G	T-type
	Cav3.2	α1H	
	Cav3.3	α1I	

Tabella 1: classificazione dei canali VOCCs in base al tipo di subunità α1 ed ai geni che li codificano

non eccitabili come, ad esempio, i fibroblasti. La loro selettività per il Ca^{2+} è circa mille volte superiore rispetto a quella per il Na^+ o il K^+ (Pietrobon *et al.*, 1990). Nel sistema nervoso centrale i VOCCs controllano un'ampia gamma di funzioni, dal rilascio di neurotrasmettitori all'eccitabilità neuronale, alla differenziazione, eccetera. I VOCCs possono a loro volta venire suddivisi in canali "*High Voltage Activated*" (HVA), i quali necessitano forti depolarizzazioni per l'attivazione e sono caratterizzati da lenta inattivazione e conduttanza elevata, e canali di tipo "*Low Voltage Activated*" (LVA), che, al contrario, necessitano piccole depolarizzazioni per l'attivazione e presentano inattivazione più rapida e conduttanza minore. I canali HVA possono venire suddivisi in diversi sottotipi in base a criteri farmacologici (come ad esempio i canali L-Type sensibili alla diidropiridina o i canali N-type sensibili alla ω -conotossina-GVIA).

3.3.2 Canali attivati da agonisti

Caratteristica comune dei canali attivati da ligando è la minore selettività per il Ca^{2+} rispetto ai VOCCs. Anche in questo caso, si possono distinguere varie tipologie di canali:

- canali associati ad un recettore (ROCCs, *Receptor-Operated- Ca^{2+} -Channels*);
- canali la cui attivazione dipende dall'interazione con una proteina-G (GOCCs, *G-protein-Operated- Ca^{2+} -Channels*);
- canali attivati dal legame con un secondo messaggero (SMOCCs, *Second-Messenger-Operated- Ca^{2+} -Channels*).

3.3.2.a Canali regolati da recettore

In questi canali (noti anche come canali ionotropi) il recettore per l'agonista è localizzato nello stesso polipeptide che forma il canale: per l'attivazione non è quindi necessario l'intervento di un messaggero citosolico. Questo tipo di canale rappresenta la via più semplice attraverso la quale un segnale extracellulare, come ad esempio un neurotrasmettitore, porta al cambiamento dell'eccitabilità della cellula bersaglio.

Il recettore nicotinico dell'acetilcolina è un esempio di canale regolato da recettori: il canale nicotinico di tipo muscolare presenta una bassa permeabilità al Ca^{2+} e trasporta

soprattutto Na^+ e K^+ , mentre quello neuronale presenta una maggiore selettività per il Ca^{2+} . Altri tipi di recettori-canale sono i recettori del Glutammato, che vengono distinti in base alla risposta farmacologica ad agonisti specifici: recettori AMPA/Kainato, stimolati dall'acido α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazol-propionico (AMPA) o dal Kainato, o recettori NMDA, stimolati dall'acido N-Metil-Di-Aspartico (NMDA). Questi ultimi hanno un'attivazione più lenta dei recettori AMPA/Kainato, sono molto più permeabili al Ca^{2+} (circa 10:1 rispetto al Na^{2+}) e vengono inibiti potentemente da concentrazioni micromolari di Mg^{2+} .

3.3.2.b Canali attivati da proteine-G

Questi canali vengono attivati grazie all'azione di una proteina della famiglia delle proteine G (la cui denominazione deriva dalla capacità di legare GDP o GTP). Queste proteine vengono attivate da recettori a sette domini transmembrana e svolgono un ruolo primario in numerose vie di trasduzione del segnale. Una proteina G è un eterotrimerico composto da tre subunità chiamate α , β e γ . La catena α lega e idrolizza il GTP; le catene β e γ formano un complesso che ancora la proteina-G alla faccia citoplasmatica del doppio strato lipidico. Nella sua forma inattiva, la subunità α lega una molecola di GDP. La stimolazione dei recettori a 7TM (*7 trans membrane motive*) porta alla sostituzione di GDP con GTP; a seguito di questo legame, la subunità α si stacca e viene rilasciata nel citosol sotto forma del complesso $G\alpha$ -GTP, mentre il dimero $\beta\gamma$ resta attaccato alla membrana. Queste subunità sono in grado di attivare o inibire canali ionici ed enzimi (Hunter *et al.*, 2000), come ad esempio l'adenilato ciclasi o la fosfolipasi C, e sono coinvolte nella coordinazione degli effetti "veloci" indotti da ormoni steroidei.

3.3.2.c Canali attivati da secondi messaggeri

Questi canali sono legati e attivati da un secondo messaggero prodotto o rilasciato nel citoplasma (ad esempio cAMP, cGMP, IP_3 , DAG e Ca^{2+}) in seguito alla stimolazione di un recettore. Poiché le cinetiche di attivazione ed inattivazione del canale dipendono dalla produzione e dalla rimozione del secondo messaggero, sono generalmente lente

(secondi/ minuti) (Pietrobon *et al.*,1990, Fasolato *et al.*, 1994). In questa categoria rientrano numerosi tipi di canali: i più significativi tra questi appartengono alla famiglia delle proteine TRP (*transient-receptor-potential*, una famiglia di canali per cationi) e vengono attivati da messaggeri lipidici che includono il DAG ed il PIP₂ (Hofmann *et al.*, 1999).

3.3.3 Canali attivati dallo svuotamento dei depositi intracellulari

Nella maggior parte delle cellule non eccitabili lo svuotamento dei depositi intracellulari di Ca²⁺, causato ad esempio da uno stimolo ormonale che porta alla produzione di IP₃, comporta l'attivazione dei canali SOCCs (*store-operated-Ca²⁺-channels*), presenti sulla superficie della membrana plasmatica. Questi canali mediano l'influsso di ioni Ca²⁺ dal mezzo esterno verso il citosol, un processo noto come ingresso capacitativo di Ca²⁺ (CCE, *capacitative-calcium-entry*), in quanto attivato proprio dal rilascio di Ca²⁺ dal RE. La funzione fisiologica del CCE è il riempimento dei depositi intracellulari di Ca²⁺ per renderli nuovamente pronti a rispondere ad ulteriori stimoli. Oltre a questo ruolo primario, il CCE è coinvolto anche in altri processi fisiologici (Parekh *and* Penner, 1997; Parekh *et al.*, 2005), come ad esempio:

- modulazione delle oscillazioni della [Ca²⁺]_i in cellule comunicanti tramite “*gap-junction*”;
- mantenimento della funzione degli osteoclasti;
- attivazione dei linfociti T del sistema immunitario;
- secrezione;
- regolazione dell'attività dell'adenilato ciclasi e delle chinasi Ca²⁺-dipendenti;
- regolazione della trascrizione genica Ca²⁺-dipendente;
- regolazione della proliferazione e del ciclo cellulare.

Nonostante siano ben note le funzioni del CCE, il meccanismo che porta all'apertura dei SOCCs (*Store-Operated-Ca²⁺-Channels*) è stato a lungo oggetto di dibattito e in letteratura sono state riportate differenti ipotesi:

- ipotesi dell'accoppiamento conformazionale: è stato proposto che i recettori dell'IP₃ presenti sulla membrana del RE interagiscano direttamente con i SOCCs presenti sulla membrana plasmatica attraverso interazioni proteina-proteina, come avviene anche nel muscolo scheletrico tra i VOCCs di tipo L e i RyRs; tuttavia è stato riportato, in due distinti lavori, che il silenziamento di tutti e tre gli IP₃R non ha minimamente alterato la CCE (Sugawara *et al.*, 1997).
- ipotesi della fusione di vescicole citoplasmatiche con la membrana plasmatica: secondo questo modello i SOCCs contatterebbero la membrana plasmatica attraverso un meccanismo di esocitosi che permetterebbe ai canali responsabili del CCE di inserirsi nella membrana stessa
- ipotesi della produzione di un fattore diffusibile: questa ipotesi prevede che il RE, una volta svuotato, rilasci un qualche fattore (denominato *calcium-influx-factor*, CIF) in grado di modulare l'apertura dei SOCCs, attivandoli; per questa funzione sono state proposte numerose molecole citosoliche (quali cGMP o piccole proteine G).

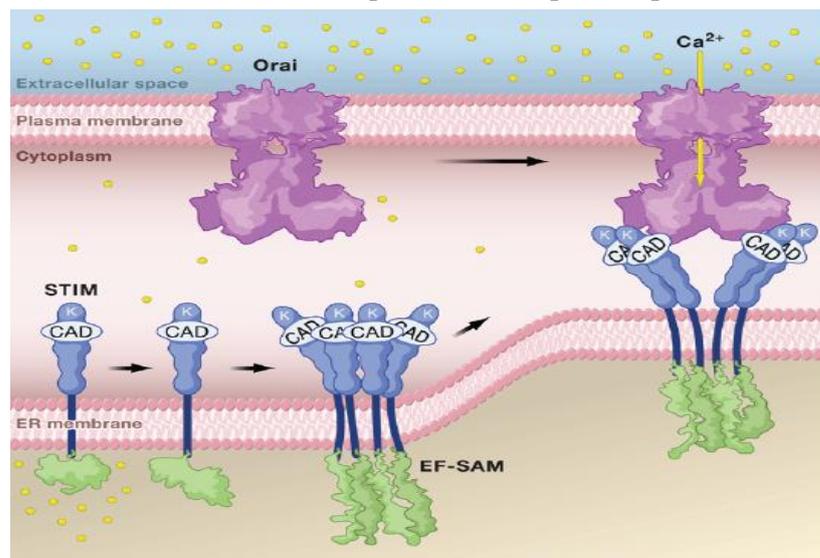


Figura 9: schema del meccanismo alla base del CCE. Interazione tra i domini CAD della proteina STIM e i canali Ora1 (Clapham *et al.*, 2009).

Recentemente gli studi di Park *et al.* (2009) hanno evidenziato la possibilità che il CCE venga attivato attraverso un'interazione proteina-proteina, ma che non coinvolge l'IP₃R. L'interazione molecolare sembra infatti avvenire tra una proteina trans membrana del RE, nota come STIM1 (*Stromal-interaction-molecule-1*), e il canale selettivo per il Ca²⁺ Ora1, presente sulla membrana plasmatica (Clapham *et al.*, 2009). STIM1 è caratterizzata da domini ricchi di lisina esposti verso il citosol, e da domini EF-hand a

livello del lume del RE. Quando il Ca^{2+} viene rilasciato dal RE, STIM1 si aggrega in complessi tetramericici che si accumulano in punti del RE localizzati a 25nm di distanza dalla membrana plasmatica. Questi complessi proteici sono in grado di interagire con i canali Orai1: l'interazione tra i domini CAD (*CRAC-activation-domain*) presenti nella proteina STIM1 e l'estremità di Orai1 portano all'apertura del canale, con conseguente ingresso di Ca^{2+} dentro la cellula (CCE) (figura 9).

3.4 Metodi per misurare le concentrazioni intracellulari di calcio

La complessità delle vie di trasduzione del segnale modulate da alterazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} (indotte a loro volta da stimoli fisiologici) richiede la valutazione, in maniera estremamente precisa, delle variazioni di questo ione sia in termini spaziali che temporali. Per poter misurare tali variazioni sono state sviluppate negli ultimi decenni metodologie di monitoraggio basate sull'uso di varie sonde, sintetiche o di natura proteica, in grado di legarsi al Ca^{2+} in maniera selettiva e reversibile.

Tali molecole sono caratterizzate da variazioni di assorbanza e/o emissione di fluorescenza a seconda che le sonde si trovino in forma libera o legata al Ca^{2+} che risultano proporzionali alle concentrazioni dello ione stesso (Pozzan *et al.*, 2003). Una volta misurate le intensità luminose delle sonde è possibile, conoscendo la loro costante di dissociazione (K_d), e tramite opportune equazioni matematiche, risalire alla concentrazione di Ca^{2+} . Le sonde utilizzate in questa tesi sfruttano le proprietà fluorescenti delle varianti della GFP (*Green fluorescent protein*).

3.4.1 GFP

La proteina GFP nativa (o *wyld type*) fu isolata nel 1962 da Shimomura *et al.* dalla medusa *Aequorea victoria*. In questa specie, la GFP è coinvolta in un fenomeno di bioluminescenza, in cui funge da accettore dell'emissione luminosa della proteina equorina. GFP (figura 10) è una proteina di 30kDa composta da 238 aminoacidi; è costituita da 11 foglietti- β disposti a cilindro e da un cromoforo tripeptidico al centro. Il picco di eccitazione di questa proteina è 395nm, quello di emissione è 509nm (Inouye *et*

al., 1994). Una delle applicazioni più importanti della GFP è stato il suo impiego come biosensore per seguire processi cellulari complessi, come le dinamiche di piccole molecole messaggero (Ca^{2+} , cAMP), l'attivazione enzimatica e le interazioni proteina-proteina. GFP è stata utilizzata anche per visualizzare compartimenti subcellulari, come il nucleo o il RE, sfruttando come segnali di localizzazione le sequenze aminoacidiche di proteine endogene cellulari indirizzate a diversi organelli. Appare chiaro come la GFP abbia iniziato così ad essere considerata lo strumento più idoneo per lo studio dei processi cellulari *in vivo* (Inouye *et al.*, 1994).

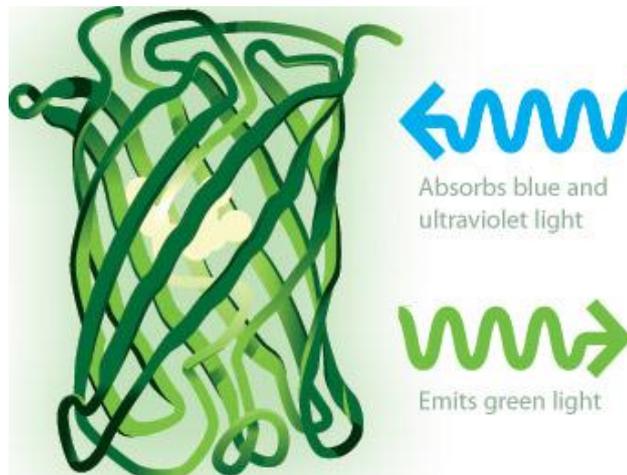


Figura 10: struttura della proteina GFP (green fluorescent protein) (dal sito staff.science.uva.nl)

3.4.2 Mutanti delle GFP

A partire dalla GFP nativa (GFP *wild type*), sono state create varianti fluorescenti con differenti proprietà spettrali. Riportiamo in seguito i fluorofori maggiormente utilizzati per studi cellulari *in vivo*:

- la *blue fluorescent protein* (BFP o GFP(Y66H/Y145F)), che emette luce blu se eccitata con luce UV;
- la *cyano fluorescent protein* (CFP o GFP(Y66W)), che emette luce turchese;
- la *yellow fluorescent protein* (YFP o GFP(T203Y)) che appare gialla (Heim *et al.*, 1995).

Inizialmente i mutanti della GFP-*wt* sono stati ottenuti per mutagenesi casuale, ma in seguito alla risoluzione cristallografica della GFP e all'analisi della sua struttura

tridimensionale è stato possibile tramite tecniche di mutagenesi sito specifica. Sono state modificate varie proprietà della GFP-*wt*, tra cui la brillantezza, gli spettri di eccitazione ed emissione (creando così nuove varianti di colore), la resistenza al pH, la velocità di ripiegamento e l'efficienza d'espressione. I biosensori così sviluppati possono rilevare eventi biochimici intracellulari con maggiore precisione e fornire informazioni sui secondi messaggeri (come ad esempio il Ca^{2+}) in termini di:

- localizzazione subcellulare (ovvero da dove vengono estrusi e dove vanno ad agire);
- variazioni di concentrazione all'interno della cellula o dei suoi organelli;
- velocità e frequenza di rilascio (Pozzan *et al.*, 2003).

Al momento esistono tre tipi principali di indicatori geneticamente codificati derivati da GFP: i Camgaroos, i Pericams, i Cameleons; solo questi ultimi possiedono due fluorofori posti ad estremità opposte nello stesso polipeptide (figura 11).

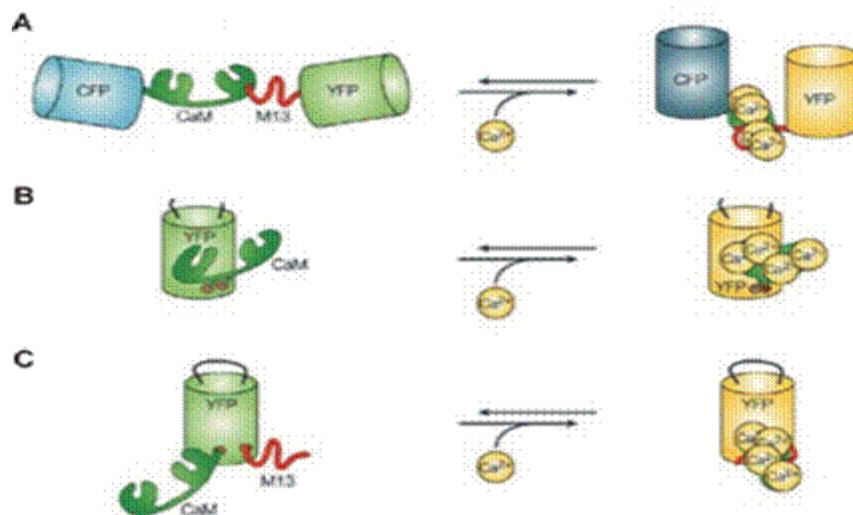


Figura 11: cambiamenti conformazionali indotti dal legame tra la CaM ed il Ca^{2+} nelle sonde: a) Cameleon, in cui si possono notare i due fluorofori (CFP e YFP), la CaM ed il peptide M13; b) Camgaroos; c) Pericams, (Myawaki et al., 1997)

Queste tre sonde utilizzano tutte la CaM come interruttore molecolare: in seguito a legame con il Ca^{2+} ; la CaM è in grado di determinare un cambiamento conformazionale che altera l'emissione fluorescente dei cromofori e consente di risalire alla $[\text{Ca}^{2+}]$ (Rudolf *et al.*, 2003). Nelle sonde Camgaroos e Pericams, il cambiamento conformazionale indotto dal legame tra la CaM ed il Ca^{2+} porta ad un aumento della fluorescenza dell'unico cromoforo presente (YFP solitamente) dovuta ad una modifica

dello stato di protonazione del cromoforo stesso (Palmer *et al.*, 2006). In generale, le sonde per il Ca^{2+} si possono suddividere in due categorie: indicatori raziometrici, in cui la concentrazione di Ca^{2+} viene determinata in base al rapporto tra due valori di intensità di fluorescenza (come i Cameleons), ed indicatori non raziometrici, in cui si risale alla concentrazione dello ione dalla variazione di una singola intensità di fluorescenza (Rudolf *et al.*, 2003). La figura sottostante (figura 12) riporta le principali caratteristiche che differenziano indicatori raziometrici e non e le rispettive equazioni per risalire all'effettiva concentrazione di Ca^{2+} .

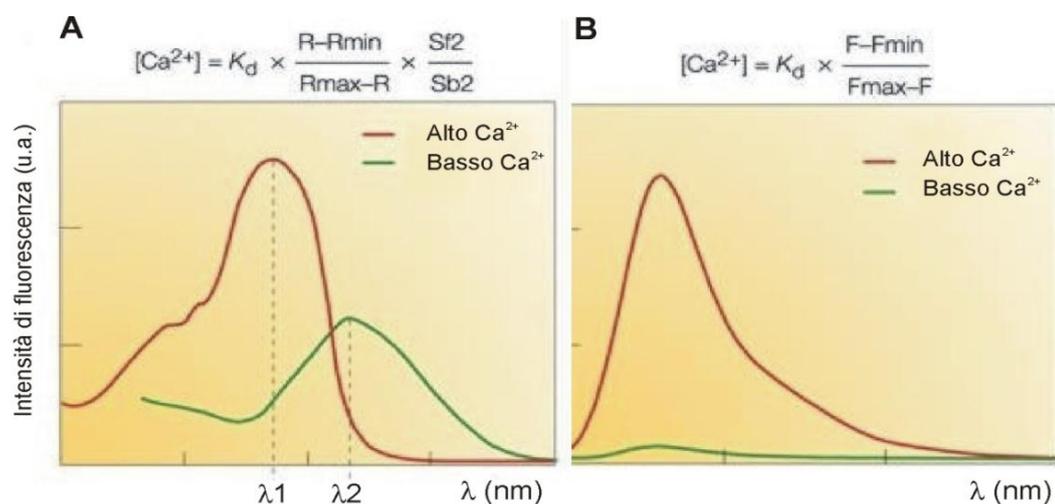


Figura 12: equazioni per risalire alla $[\text{Ca}^{2+}]$ in indicatori raziometrici (A) e non raziometrici (B). F = intensità di fluorescenza; F_{\max} = F alla saturazione di $[\text{Ca}^{2+}]$; F_{\min} = F in assenza di Ca^{2+} ; K = costante di dissociazione; R = rapporto tra due lunghezze d'onda; R_{\max} = R alla saturazione di Ca^{2+} ; R_{\min} = R in assenza di Ca^{2+} ; Sb_2 = valore in condizioni di saturazione della Ca^{2+} per la lunghezza d'onda 2; Sf_2 = valore in assenza di Ca^{2+} per la lunghezza d'onda 2 (Rudolf *et al.*, 2003)

Gli indicatori raziometrici presentano un notevole vantaggio rispetto agli altri, poiché la misura della variazione della concentrazione di Ca^{2+} viene ricavata da un rapporto, che permette di correggere le misure effettive della $[\text{Ca}^{2+}]$ dagli artefatti derivanti da una concentrazione intracellulare omogenea dell'indicatore, da movimenti, dallo spostamento del piano di fuoco.

3.4.3 Le sonde Cameleon

I Cameleon sono indicatori raziometrici fluorescenti di natura proteica e geneticamente codificati, costituiti da due cromofori differenti. Nei primi Cameleon generati era

presente un mutante ciano (CFP) ed uno giallo (YFP) della GFP-*wt*, posti rispettivamente alle estremità N- e C- terminale di un costrutto lineare al cui centro si trovano la CaM ed il peptide M13, ovvero il dominio legante la CaM della chinasi della catena leggera della miosina (Miyawaki *et al.*, 1997). Nei Cameleon, a differenza di quanto accade nei Camgaros e nei Pericams, il legame del Ca²⁺ alla CaM porta ad un'interazione tra la CaM stessa ed il peptide M13, con una conseguente modifica conformazionale che avvicina, dopo il ripiegamento, i due fluorofori. La loro vicinanza dà origine ad un fenomeno noto come "FRET" (*fluorescence resonance energy transfer*). Il fenomeno noto come FRET consiste in un trasferimento non radiativo di energia di fluorescenza per risonanza, dovuto ad una interazione tra due fluorofori A e B, con caratteristiche spettrali tali per cui lo spettro di emissione di A si sovrappone allo spettro di eccitazione di B. In tal modo un fluoroforo si comporta come donatore e l'altro come accettore: l'eccitazione del donatore causa emissione luminosa del secondo fluoroforo con relativa diminuzione di emissione del primo. Questo processo avviene solo se i due fluorofori si trovano sufficientemente vicini e presentano un adeguato orientamento spaziale (Piston *et al.*, 2007). Il FRET è descritto dall'equazione di Förster, che mostra come l'efficienza di FRET (E_{FRET}) vari al variare della sesta potenza della distanza tra le due molecole:

$$E_{\text{FRET}} = 1 / [1 + (r/R_0)^6]$$

dove R_0 è la tipica distanza alla quale l'efficienza del FRET è al 50%.

Il FRET rappresenta un fenomeno non distruttivo che può essere utilizzato per misurare interazioni molecolari anche in cellule viventi, misurando il rapporto delle intensità di emissione del donatore e dell'accettore. Perché FRET possa verificarsi, i fluorofori possono essere completamente separati oppure uniti nella stessa macromolecola. Nel caso dei Cameleon (figura 13) i due fluorofori si trovano nella stessa molecola: il cambiamento conformazionale indotto dal legame della CaM con il Ca²⁺ determina una variazione degli spettri di emissione dei due fluorofori, il cui rapporto è proporzionale alla variazione delle concentrazioni di Ca²⁺ (Miyawaki, 1999).

Negli anni, le prime forme di Cameleons sono state modificate per migliorarne alcune

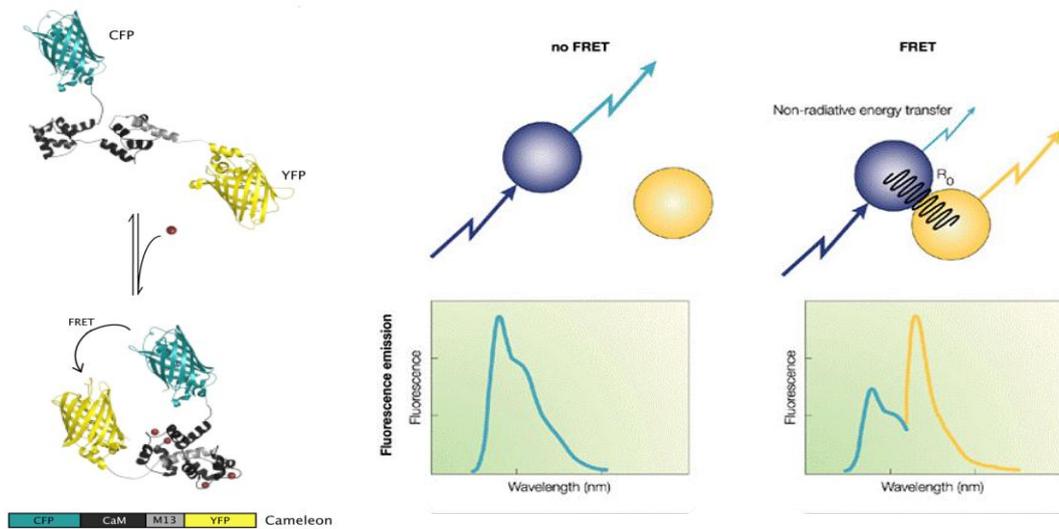


Figura 13: il fenomeno FRET nella sonda cameleon (McCombs et al., 2008); la figura adiacente illustra il trasferimento non radiativo di energia da un cromoforo donatore (in azzurro) ad un accettore (in giallo). Si può notare dai grafici come l'emissione luminosa del donatore ecciti il fluoroforo accettore, che a sua volta emette luce alla propria lunghezza d'onda (Rudolf et al., 2003).

caratteristiche. L'ultima generazione di queste sonde, realizzata in seguito a studi di analisi computazionale, presenta i seguenti cambiamenti:

- possibilità da parte della sonda di localizzarsi in compartimenti subcellulari ben precisi (quali RE, mitocondri, nucleo, membrana plasmatica, Golgi) grazie all'innesto di specifiche sequenze di riconoscimento;
- riduzione della sensibilità al pH intracellulare: in tal modo la sonda è in grado di sopportare un ambiente intracellulare fino a pH 6, senza variare la propria emissione luminosa;
- minore capacità di interagire con le CaM endogene, responsabili di legami aspecifici;
- aumento dell'intensità dell'emissione di fluorescenza del fluoroforo accettore grazie all'incorporazione nella sonda della variante yellow cpVenus (*circularly permuted Venus*);
- variazione dell'affinità per il Ca^{2+} (Nagai et al., 2004; Palmer et al., 2006).

Per tutte queste caratteristiche, ad oggi i biosensori Cameleons sono uno strumento molto efficace per misurare e caratterizzare le variazioni dell'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} indotte da stimoli fisiologici.

4. RUOLO DEGLI ORMONI STEROIDEI NELLA REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI INTRACELLULARE DEL CALCIO

Numerose evidenze sperimentali mettono in luce il ruolo fondamentale che gli ormoni steroidei ricoprono nella modulazione di molteplici processi cellulari. Molti di questi sono mediati da vie di segnale intracellulare che coinvolgono il Ca^{2+} come secondo messaggero. E2 e T possono influenzare la modulazione dei flussi di Ca^{2+} attraverso due differenti meccanismi molecolari: un'azione genomica, ovvero il legame dell'E2 o del T con entrambe le isoforme del recettore che portano ad esempio all'induzione o alla repressione di numerosi canali per il Ca^{2+} , ed attraverso un'azione non genomica, solitamente innescata dal legame ormone-recettore a livello della membrana plasmatica e che promuove l'attivazione di processi di trasduzione del segnale.

Per quanto riguarda le risposte lente, molti studi evidenziano come gli ormoni steroidei (ed in particolare l'estradiolo) influenzino, appunto, soprattutto l'espressione di canali per il Ca^{2+} . Ad esempio, da un lavoro di Gu *et al.* (2001) emerge che l'E2 induce l'espressione delle subunità α_{1C} e α_{1D} dei canali voltaggio dipendenti di tipo L nella linea cellulare MLO-Y4 (osteociti di topo). Anche nel lavoro di Qiu *et al.* (2006) si mette in luce il ruolo degli estrogeni nella regolazione dell'espressione degli mRNA delle subunità α_{1G} dei VOCCs di tipo T, attraverso un aumento del rilascio di neurotrasmettitori in neuroni ipotalamici. Ritchie *et al.* (2008) riportano un incremento della densità canali LVA sulla membrana di cellule dell'ipofisi anteriore della linea GH3 dopo trattamento con E2. Anche il T sembra avere un ruolo nel modulare l'espressione dei VOCCs: Scragg *et al.* (2007) riportano come questo ormone, impiegato come vasodilatatore in pazienti affetti da patologia coronarica arteriosa (CAD), influenzi l'attività dei VOCCs di tipo L, agendo da antagonista. Uno studio condotto da Liu *et al.* (2007) su cellule cardiache H9C2 (una linea cellulare embrionale di ratto) dimostra che l'E2 somministrato a diverse concentrazioni può influenzare l'espressione e l'attività delle pompe SERCA e della Na^+/K^+ ATPasi, e descrive la possibilità di utilizzare gli estrogeni a scopo terapeutico in quanto potrebbero svolgere un ruolo protettivo nel cuore. Er *et al.* (2007) illustrano gli effetti opposti che il T, somministrato in maniera sia acuta che cronica, esercita sui VOCCs di tipo L in cardiomiociti di ratto. Mentre la somministrazione cronica sembra aumentare

significativamente l'espressione e l'attività di questi canali, il dosaggio acuto pare bloccare l'attività di questi canali. Come già detto, oltre ad un effetto sull'espressione genica, E2 e T possono modificare significativamente anche l'attività delle molecole coinvolte nell'omeostasi del Ca^{2+} . Lo studio di Dick *et al.* (2003) evidenzia un altro meccanismo con cui gli steroidi influenzano l'omeostasi del Ca^{2+} : trattando le cellule per 24 ore con T o estradiolo, non si è rilevata alcuna variazione dell'espressione proteica della PMCA, nonostante l'aumentata attività della pompa stessa. Muchekehu *et al.* (2007) riportano invece come l'E2 sia in grado di indurre rapidamente, attraverso un meccanismo d'azione non genomico, il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari, attraverso i recettori per la rianodina.

Oltre ad un ruolo nei normali processi fisiologici cellulari, è stato riportato che gli steroidi possono svolgere un ruolo anche nella patogenesi di varie malattie. Simpkins *et al.* (2005) descrivono le proprietà citoprotettive degli estrogeni in alcune patologie neurodegenerative, come il Parkinson e l'Alzheimer, in cui sono implicati stress ossidativo e collasso mitocondriale. L'attività di molte proteine mitocondriali, come ad esempio la piruvato, α -ketoglutarato e isocitrato deidrogenasi, dipendono da un corretto influsso di ioni Ca^{2+} . Un ingresso eccessivo di Ca^{2+} , oltre una certa soglia, può tuttavia compromettere la stessa funzionalità mitocondriale, attivando la morte cellulare programmata (Giacomello *et al.*, 2007). Lo studio condotto da Simpkins illustra come gli estrogeni prevengano sia un'eccessiva entrata di Ca^{2+} , bloccando l'attivazione della morte cellulare programmata, sia la produzione di ROS (*reactive-oxygen-species*). Le proprietà anti-apoptotiche dell'E2 emergono anche dallo studio condotto da Linford *et al.* (2002), dove gli autori hanno indicato come trattamenti con E2 e ginisteina (un fitoestrogeno derivato dalla soia), possano prevenire l'apoptosi indotta da Tapsigargina in colture primarie di neuroni corticali di ratto. Tra gli altri processi modulati dagli steroidi, di particolare importanza risulta la regolazione della secrezione di insulina e glucagone mediata da variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_i$: il lavoro pubblicato da Nadal *et al.* (2004) illustra gli effetti opposti dell'E2 sulla $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cellule α e β del pancreas. In ambedue i tipi cellulari l'E2 porta ad una depolarizzazione della membrana plasmatica tramite diminuzione dell'attività dei canali per il K^+ : mentre nelle cellule β questo comporta l'apertura dei VOCCs con un conseguente aumento dei flussi di Ca^{2+} , nelle

cellule α la depolarizzazione inattiva la conduttanza di membrana abolendo le oscillazioni intracellulari di Ca^{2+} .

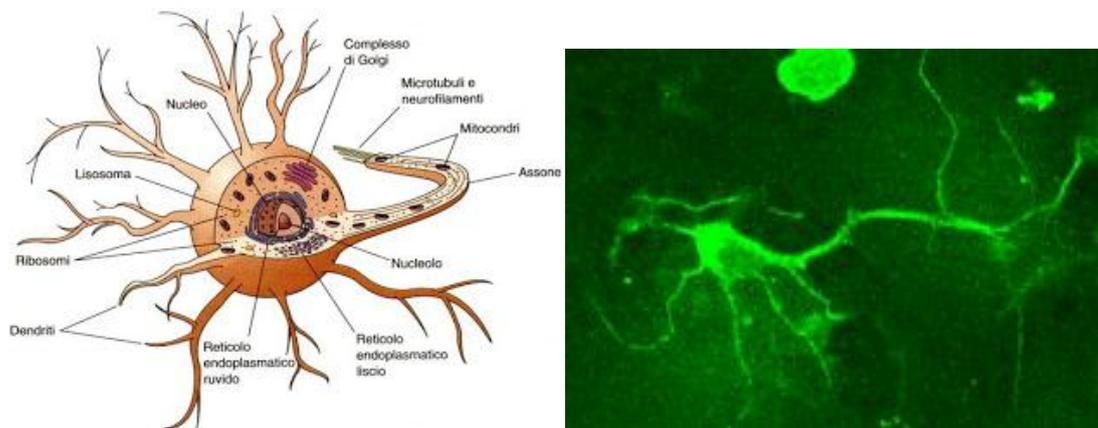
L'effetto degli estrogeni è stato principalmente studiato nelle cellule eccitabili. Infatti, gli estrogeni svolgono un ruolo di primo piano nella regolazione del livello di Ca^{2+} intracellulare in cellule neurali: Huang *et al.* (2004) hanno dimostrato che gli estrogeni modulano rapidamente l'ingresso di Ca^{2+} indotto da glutammato in neuroni primari di ippocampo di ratto. Tuttavia studi recenti hanno dimostrato che questi steroidi possono anche agire su cellule non-eccitabili, tra cui fibroblasti del derma e cellule endoteliali (Arnal *et al.*, 2010; Salazar-Colocho *et al.*, 2008). Alcuni lavori suggeriscono che l'endotelio capillare e la muscolatura liscia ad esso associato sono controllati dal livello di ormoni steroidei circolanti e dagli steroidi sintetizzati in loco. Sempre più evidenze sperimentali indicano che l'E2 esercita un effetto protettivo attraverso un meccanismo mitocondriale nelle cellule endoteliali cerebrali (Guo *et al.*, 2010). Altri dati invece mostrano come l'E2 abbia effetti significativi sulla migrazione di fibroblasti della pelle nella specie umana (Stevenson *et al.*, 2009).

Nell'insieme, tutte queste evidenze sperimentali mettono in luce l'importanza di questi ormoni nel regolare il benessere fisiologico di un organismo. In conclusione, dai lavori sopra citati, risulta come gli ormoni steroidei regolino, attraverso variazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} , molteplici funzioni cellulari come l'espressione genica, la neuroprotezione, il funzionamento mitocondriale, il differenziamento neuronale, la regolazione del bilancio energetico, eccetera. Le correlazioni tra gli stimoli evocati dagli ormoni steroidei e le risposte mediate dalle vie del Ca^{2+} , sia in cellule eccitabili (come neuroni, muscoli, cellule cardiache), che in cellule non eccitabili (cellule endoteliali e fibroblasti), e negli organelli subcellulari (reticolo endoplasmatico e mitocondri), rendono estremamente interessante lo studio di variazioni di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nei diversi tipi cellulari.

5. LE ARBORIZZAZIONI DENDRITICHE

I neuroni sono cellule eccitabili del tessuto nervoso specializzate nella ricezione, nell'integrazione e nella trasmissione degli stimoli e degli impulsi nervosi. Dal corpo cellulare del neurone (denominato soma) hanno origine diversi prolungamenti

citoplasmatici, detti neuriti, distinguibili in assoni (che conducono il segnale nervoso verso altre cellule) e dendriti (figura 14 e figura 15). Questi ultimi sono ramificazioni afferenti di forma tubolare, deputati alla conduzione degli stimoli nervosi dalla periferia della cellula verso il soma. Alcuni neuroni possiedono un solo dendrite, mentre altri si caratterizzano per ramificazioni altamente articolate: la complessità dell'albero dendritico rappresenta uno dei principali determinanti della morfologia neuronale. Inoltre, la superficie di un dendrite può essere ulteriormente estesa dalle cosiddette spine dendritiche su ognuna delle quali prende contatto sinaptico un assone proveniente da un altro neurone. La funzione primaria dei dendriti e delle loro spine è amplificare la superficie della cellula neuronale: attraverso i dendriti i neuroni ricevono, elaborano ed integrano gli input che ricevono dai loro partner pre-sinaptici.



*Figura 14: schema di una cellula neuronale (dal sito mappementaliblog.blogspot.com).
Figura 15: esempio di arborizzazioni dendritiche in cellule neuronali embrionali di cervelletto di feto bovino positive all'anticorpo anti- β III tubulina.*

Nelle prime fasi dello sviluppo dell'encefalo, i dendriti sono costituiti da forme immature di protrusioni denominate filopodi. I filopodi mostrano un'elevata motilità strutturale (come ad esempio allungamento e retrazione) attraverso un meccanismo basato sulla riorganizzazione dei filamenti di actina; secondo i dati presentati nel lavoro di Ziv and Smith (1996) questo processo è considerato un tentativo da parte dei neuroni immaturi in via di sviluppo di intrecciare nuovi contatti con assoni confinanti allo scopo di creare, una volta raggiunto il differenziamento, configurazioni stabili e durature che porteranno alla formazione dei bottoni sinaptici. Proprio per questa ragione, la motilità esibita dai filopodi è considerata uno dei processi cruciali nella formazione delle

arborizzazioni dendritiche mature, della formazione delle spine e quindi della sinaptogenesi.

Le spine dendritiche sono composte anch'esse da microfilamenti di actina e rappresentano, a loro volta, elementi cellulari integrativi multifunzionali e specializzati che determinano la formazione della rete sinaptica. Le spine sono il sito principale da cui partono gli stimoli eccitatori verso i neuroni; inoltre esse aumentano esponenzialmente la superficie della membrana postsinaptica, contengono diverse classi di recettori per diversi neurotrasmettitori e sono in grado di regolare i processi biochimici e biofisici dei dendriti (Schwarz *and* McCarthy 2008, Arpini *et al.*, 2010).

Le alterazioni nella conformazione sinaptica delle spine dendritiche sono direttamente connesse al grado di arborizzazione dei dendriti neuronali. Attraverso un rimodellamento del citoscheletro di actina, sia la forma delle arborizzazioni dendritiche sia la forma e la densità delle loro spine possono subire durante la vita di una cellula neuronale cambiamenti significativi. E' stato dimostrato infatti che quando si formano le sinapsi, mentre il numero dei filopodi declina bruscamente, aumenta il quantitativo di spine dendritiche (Xu *et al.*, 2010; Ziv *and* Smith, 1996): questa osservazione rappresenta la base dell'idea che vede i filopodi come diretti precursori delle spine dendritiche (Ziv *and* Smith, 1996).

Le modifiche che avvengono nello sviluppo e nell'accrescimento delle arborizzazioni dendritiche durante lo sviluppo embrionale sono responsabili in maniera significativa sia dell'elaborazione che dell'immagazzinamento delle informazioni sensoriali: questo fenomeno è visto come una tappa fondamentale nello sviluppo dei circuiti neuronali del SNC ed è stato associato all'apprendimento ed alla memoria (Giretti *and* Simoncini 2008; Sanchez *and* Simoncini, 2010; Schwarz *and* McCarthy, 2008; de Lacalle, 2006).

6. RUOLO DEGLI ESTROGENI NELLO SVILUPPO DELLE ARBORIZZAZIONI NEURONALI EMBRIONALI

Alla base del concetto di plasticità neuronale c'è l'abilità delle cellule neuronali di poter modellare le proprie interconnessioni. Nel momento in cui un neurone modifica la propria forma avviene una riorganizzazione dello scheletro di actina e si formano specifiche protrusioni di membrana note come filopodi: queste strutture generano la

forza propulsiva nelle cellule migranti e sono fondamentali nel generare le interconnessioni tra cellule. E' ampiamente riconosciuto che estrogeni ed androgeni sono, in diverse linee cellulari, modulatori chiave della morfologia e della motilità cellulare: è stato dimostrato infatti che la conseguenza primaria del neurotrofismo indotto da E2 nelle fasi precoci dello sviluppo dell'encefalo è proprio la formazione dei filopodi (Sanchez *and* Simoncini, 2010; de Lacalle, 2006). Durante lo sviluppo dell'encefalo, inoltre, grazie all'opera dei neurosteroidi si compie la maturazione in senso maschile o femminile dell'encefalo; questo implica la realizzazione stabile delle differenze sesso-specifiche nella morfologia delle ramificazioni dendritiche e nello sviluppo delle specifiche connessioni interneuronali e sinaptiche (Sanchez *and* Simoncini 2010; Yokosuka *et al.*, 2008).

Dai lavori presenti in letteratura si evince che gli effetti degli ormoni steroidei sono molteplici, talvolta opposti, e dipendono dalla specie presa in esame, dalla regione del SNC e dal tipo cellulare. Numerosi studi hanno riportato che l'E2, a seconda delle diverse regioni dell'encefalo in cui agisce, è in grado sia di aumentare che di diminuire il livello di arborizzazione dei dendriti e la densità delle loro spine; inoltre questo ormone continua ad agire anche sui neuroni completamente sviluppati regolando la loro plasticità strutturale a livello delle sinapsi (Sanchez *et al.*, 2009; Giretti *and* Simoncini 2008; Sanchez *and* Simoncini, 2010).

La maggior parte dei lavori presenti in letteratura trattano del ruolo chiave che gli estrogeni, il cui effetto è mediato dall'enzima P450Arom e dagli ERs, svolgono nelle aree maggiormente interessate dall'effetto dei neurosteroidi: l'ipotalamo (la principale area dimorfica del SNC), l'ippocampo e la corteccia (la regioni principalmente coinvolte nelle funzioni cognitive e nella memoria) (de Lacalle, 2006; Peruffo *et al.*, 2011).

I meccanismi d'azione degli estrogeni prevedono l'attivazione di vie citoplasmatiche di trasduzione del segnale innescate sulla membrana extracellulare in seguito al legame dell'ormone con il proprio recettore (Sanchez *and* Simoncini, 2010). In uno studio condotto da Xu *et al.* (2010), un'esposizione di 30 minuti con E2 10nM causa un aumento transiente dei contatti tra dendriti ed assoni; la causa di ciò è attribuita ad un aumento del numero di filopodi che si ramificano nel mezzo esterno per individuare potenziali partner sinaptici. Un lavoro di Carrer *et al.* (2005) descrive che, nelle fasi

finali dello sviluppo di neuroni di ipotalamo di ratto maschio, un trattamento con E2 altera la crescita dei neuriti e la densità delle sinapsi: quest'effetto è esercitato attraverso un recettore di membrana che promuove la via della trasduzione di segnale indotta da MAPK.

Le alterazioni nelle ramificazioni neuronali indotte da E2 sono anche conseguite attraverso il classico effetto genomico. Staffend *et al.* (2011) illustrano come in femmine di criceto di 3-5 mesi, un trattamento con E2 somministrato con la dieta (10µg disciolti in olio per 2 giorni) produce una diminuzione significativa della densità delle spine dendritiche e altera la morfologia del nucleo *accumbens*, senza invece produrre alcun effetto sulle spine dendritiche del nucleo caudato. Zhang *et al.* (2000) invece hanno esaminato l'effetto sia di T che di E2 a diverse concentrazioni (10, 50 and 100nM) e somministrati a diversi intervalli di tempo (4, 24 and 48 ore) in colture di neuroni di corteccia di embrione di ratto: i risultati suggeriscono che T ed E differiscono nell'esercitare i propri effetti sulla differenziazione cellulare embrionale. Le colture che ricevono E complessivamente sviluppano un maggior numero di neuroni con un maggior numero di neuriti rispetto alle colture di controllo, attraverso un'azione che però non sembra mediato dagli ER. Le cellule trattate per 24 h con T, invece, attraverso un effetto mediato dai propri recettori, mostrano un minor numero di neuroni ed un minor tasso di differenziazione.

7. IL CERVELLETTO E GLI ORMONI STEROIDEI

Nel paragrafo precedente si è illustrato come l'E2 possa regolare la plasticità neuronale e promuovere la sinaptogenesi in diverse regioni dell'encefalo, come la corteccia, l'ippocampo e l'ipotalamo. Al contrario, molto meno si conosce sugli effetti che l'E2 esercita nel cervelletto. Il cervelletto è una regione del SNC che svolge una funzione chiave nel controllare l'equilibrio, la postura, la coordinazione motoria, la scelta di tempo nel compiere azioni come pure numerosi altri processi cognitivi. Patologie come l'autismo e la schizofrenia sono riconducibili a disfunzioni del cervelletto (Dean *and* McCarthy, 2008) e danni a questa zona del SNC si riflettono in disturbi nel movimento, disturbi dell'equilibrio, disturbi posturali e dell'apprendimento motorio.

Le cellule del Purkinje sono un tipo di neurone cerebellare che gioca un ruolo essenziale nei processi di apprendimento e nella memoria. Recentemente è stato scoperto che in cellule del Purkinje di mammifero due neurosteroidi (il progesterone e l'estradiolo) vengono sintetizzati *de novo* dal colesterolo durante la vita neonatale: questi neurosteroidi, attraverso i propri recettori nucleari, promuovono la crescita e la maturazione dei dendriti, la spinogenesi e la sinaptogenesi (Tsutsui, 2008) che nell'insieme portano alla formazione dei circuiti nervosi cerebellari. In un lavoro condotto da Sakamoto *et al.* (2003), gli autori hanno studiato gli effetti degli estrogeni su cellule del Purkinje in ratti adulti e neonati. Viene dimostrato che cellule del Purkinje di ratti neonati posseggono i recettori beta degli estrogeni ed esprimono l'enzima chiave per la formazione dell'estradiolo, l'enzima P450arom. I risultati mostrano che un trattamento *in vivo* con estrogeni può influenzare direttamente le cellule del Purkinje (attraverso un meccanismo di tipo genomico mediato dagli ER β) attivando la crescita dendritica e la spinogenesi. Questo effetto stimolatorio si attua in maniera dose-dipendente, con una concentrazione soglia compresa tra 1 e 10nM; l'aggiunta di tamoxifene, al contrario, inibisce lo sviluppo dei dendriti indotto da estrogeni. In un lavoro pubblicato dagli stessi autori qualche anno dopo (Sasahara *et al.*, 2007), è stato approfondito il significato funzionale che assume l' E2 in cellule del Purkinje durante la vita neonatale su topi knock-out per l'enzima P450arom (ArKO). E' risultato che in questi soggetti la mancanza di E2 determina in maniera significativa una diminuzione della crescita dendritica, della spinogenesi e della sinaptogenesi. Al contrario, la somministrazione di E2 a soggetti neonatali sia *wild type* che ArKO causa un aumento dell'ontogenesi dendritica attraverso la via del BDNF (*brain-derived-neurotrophic-factor*). Pertanto questi dati indicano che in neuroni di cervelletto di ratti di età neonatale l'E2 viene prodotto localmente tramite l'azione della P450arom e che la sua azione influisce sulla crescita dendritica e sinaptica. In un altro interessante lavoro (Gottfried-Blacmore *et al.*, 2007) gli autori hanno isolato e caratterizzato una linea cellulare derivata da cervelletto di embrione di topo (*embryonic day 17*) che mostra caratteristiche tipiche delle cellule neurali progenitrici e dei neuroni granulari. Queste cellule esprimono ER α ed ER β degli estrogeni e l'enzima P450arom; tuttavia il trattamento con E2 10nM a 24 e 36 ore non ha indotto in questo caso la maturazione delle proteine sinaptiche tipiche di una cellula adulta (come la sinaptofisina, la

sintassina e la spinofilina). Gli autori hanno così verificato che mentre l'E2 funziona come un modulatore delle proteine sinaptiche nei neuroni maturi, nelle cellule immature/progenitrici l'E2 10nM da solo non è in grado di svolgere quest'effetto, concludendo che nonostante l'espressione dei specifici recettori, queste cellule isolate a questo stadio embrionale sono refrattarie all'azione dell'E2 mediata dalla P450arom.

Sebbene sia provato che i neurosteroidi (ed in particolar modo l'E2 prodotto dall'enzima P450arom) siano fondamentali nel regolare lo sviluppo cellulare nel cervelletto, questa regione del SNC è tradizionalmente considerata, sia da un punto di vista strutturale che da uno fisiologico, una regione monomorfica con differenze trascurabili tra i due sessi. Negli anni sono stati pubblicati in letteratura dati incompleti e spesso discordanti, che, complessivamente, non forniscono prove convincenti a dimostrare che il cervelletto sia una regione dimorfica (Dean *and* McCarthy, 2008).

Tuttavia, è stato dimostrato che, nell'uomo, patologie causate da anomalie nel tessuto cerebellare (come, appunto, autismo e schizofrenia) presentano un'incidenza molto diversa a seconda del sesso degli individui: i maschi sono più soggetti a questo tipo di malattie rispetto alle femmine e la risposta fisiologica a danni del tessuto cerebellare è diversa a seconda del sesso degli individui (Andreasen *and* Black, 2001; Keller *et al.*, 2003). Le ragioni di queste diversità sono, tuttavia, ad oggi non ancora conosciute, ma alcuni studiosi ritengono che per comprendere come trattare queste patologie sia necessario approfondire le differenze legate al sesso che potrebbero emergere durante lo sviluppo (Abel *et al.*, 2011).

Due lavori pubblicati recentemente portano, invece, prove dell'esistenza nel cervelletto di zone sessualmente dimorfiche. In un recente studio condotto da Fan *et al.* (2010) gli autori hanno individuato, in soggetti della popolazione cinese di età compresa tra 18 e 33 anni, delle significative differenze volumetriche tra individui di sesso opposto nella materia grigia di alcune zone del cervelletto.

Abel *et al.* (2011) hanno invece individuato, in cellule di cervelletto di topo, delle differenze legate al sesso nella quantità della proteina calbindina. Questa proteina svolge un ruolo chiave nel mantenere l'omeostasi del Ca^{2+} nei neuroni ed è comunemente usata come *biomarker* nei nuclei sessualmente dimorfici dell'ipotalamo, dove soggetti di sesso maschile presentano una maggiore quantità di proteina rispetto alle femmine. Anche nelle cellule del Purkinje del cervelletto la calbindina è espressa in

grandi concentrazioni e gli autori hanno osservato un profilo di espressione dimorfico: è stato dimostrato che nelle femmine esiste una maggiore quantità sia di mRNA che di proteina espressa rispetto ai maschi e che questo dimorfismo è attribuibile ai geni presenti nei cromosomi sessuali.

Tutte queste evidenze sperimentali rendono il cervelletto un interessante area di studio in cui approfondire il ruolo svolto dagli ormoni steroidei (ed in particolare dell'E2) nel dirigere la crescita delle cellule neuronali e, eventualmente, verificare se possano produrre o meno differenze morfometriche legate al sesso degli individui.

8. IL BOVINO COME ANIMALE MODELLO

Le colture cellulari neurali sono un modello sperimentale ampiamente diffuso nella ricerca biomedica. Le colture presentano dei vantaggi in termini di riproducibilità e standardizzazione delle procedure sperimentali se paragonate alle sperimentazioni condotte *in vivo*, ma soprattutto non richiedono alcun sacrificio di vite animali. Come si è più volte menzionato in questa tesi, la maggior parte dei dati sperimentali presenti in letteratura che trattano gli effetti degli ormoni steroidei sullo sviluppo del SNC derivano da esperimenti condotti su roditori (per lo più topo e ratto, ma anche criceto, cavie, etc.). Anche la classe degli uccelli, in particolare con la quaglia giapponese, è stata impiegata in studi di questo tipo per svelare come l'E2 possa regolare lo sviluppo dell'encefalo. Nei primati invece, sia nella specie umana che in altre, gli effetti degli estrogeni non sono stati ancora pienamente scoperti.

Per effettuare gli esperimenti descritti in questo elaborato sono state utilizzate come modello sperimentale colture cellulari derivate da *Bos taurus*; l'utilizzo di colture primarie neurali derivate da cervello di feto bovino è, nella produzione scientifica, estremamente sporadico. Il bovino presenta alcune peculiarità che lo rendono particolarmente interessante e che possono fornire informazioni complementari rispetto a quelle ottenute dai classici animali da laboratorio (i roditori). Per prima cosa il periodo di gestazione, che nel bovino ha una durata di 9 mesi mentre nei roditori è di 19-23 giorni: questo permetterebbe di paragonare lo sviluppo embrionale del bovino con quello dell'uomo. A differenza dei roditori che sono lissencefali, il bovino presenta un encefalo di grandi dimensioni e presenta un mantello neocorticale convoluto. Inoltre,

sempre rispetto ai roditori, i vitelli neonati sono considerati prole atta e relativamente matura, in quanto sono immediatamente in grado di stare in piedi, muoversi e relazionarsi col mondo esterno. Infine, campioni freschi di tessuti o di organi di bovino sono costantemente reperibili presso qualsiasi mattatoio. L'utilizzo di animali destinati alla macellazione permette di evitare l'allestimento di uno stabulario, riducendo notevolmente i costi sperimentali da sostenere ed il sacrificio di animali destinati alla sperimentazione.

Un'altra caratteristica del bovino è l'esistenza di intersessi naturali: i *freemartin*. Il "freemartinismo" si manifesta in alcuni casi di gravidanze gemellari dizigotiche in cui le placente di due feti di sesso diverso si fondono, permettendo lo scambio dei costituenti del sangue attraverso anastomosi vascolare. I *freemartin* sono individui geneticamente femmine, il cui sviluppo embrionale è influenzato dagli ormoni prodotti dal feto maschile; presentano un fenotipo caratterizzato da organi sessuali vestigiali e mascolinizzazione dell'apparato sessuale, perciò risultano essere soggetti ideali per condurre studi *in vivo* sul differenziamento sessuale. In questo modo è possibile analizzare come un ambiente ormonale maschile influenzi lo sviluppo e il differenziamento del SNC di un individuo geneticamente femmina (Peruffo *et al.*, 2004).

Per tutte le caratteristiche sopra menzionate, questo modello sperimentale *in vitro* rappresenta una più che valida alternativa per studiare il ruolo che gli ormoni steroidei sessuali ricoprono nel modulare la morfologia neuronale e nel differenziare il SNC in senso maschile o femminile durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale.

SCOPO DELLA TESI

In questo elaborato mi sono dedicato all'approfondimento di due diversi temi di ricerca che hanno come obiettivo lo studio del ruolo degli ormoni steroidei (ed in particolare dell'ormone estradiolo) nel regolare, a livello genomico, l'omeostasi intracellulare dello ione Ca^{2+} e nell'esercitare un effetto trofico nelle cellule neuronali e nelle loro arborizzazioni dendritiche.

La maggior parte dei dati presenti in letteratura inerenti a queste tematiche sono stati ottenuti da studi condotti su roditori. In questa tesi, in alternativa ai comuni animali da laboratorio, ho scelto di utilizzare come modello sperimentale colture cellulari derivate da cervelletto di feto bovino, il quale, per le caratteristiche precedentemente menzionate, ritengo rappresenti un modello di studio adeguato per la ricerca biomedica. Il primo filone di ricerca che ho approfondito riguarda l'effetto genomico esercitato dagli ormoni E2 e T sulla regolazione dell'omeostasi intracellulare dello ione Ca^{2+} . Numerose evidenze sperimentali hanno messo in luce come l'azione prodotta da questi due ormoni steroidei nella regolazione dei flussi di Ca^{2+} sia fondamentale nel modulare diversi processi fisiologici in diverse linee cellulari. Per questo primo argomento di studio ho utilizzato un modello sperimentale basato su una linea cellulare stabilizzata derivata da cellule endoteliali isolate da cervelletto di feto bovino. L'obiettivo è studiare la risposta cellulare genomica indotta da E2 e T caratterizzando le variazioni di flussi di Ca^{2+} nei principali organelli citoplasmatici deputati al controllo dell'omeostasi di questo secondo messaggero. Per far ciò ho effettuato esperimenti di *live-imaging*, impiegando sonde Cameleon di ultima generazione specifiche per citoplasma, reticolo endoplasmatico e mitocondri (Palmer *et al.*, 2006). Per verificare se l'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} viene alterata dal trattamento con E2 o T, ho somministrato gli ormoni a diverse concentrazioni (E2 1, 10 and 100nM; T 10nM) a diversi intervalli di tempo (8, 24 e 48 ore). Per confermare che l'effetto causato dall'E2 fosse mediato dai ER, ho testato l'effetto dell'ormone in presenza dell'ICI 182,780, un noto antagonista non selettivo di questi recettori. Quindi per verificare un possibile ruolo svolto dal PTP, un canale della membrana interna del mitocondrio che influenza significativamente il metabolismo cellulare e la vitalità cellulare, ho trattato le cellule con ciclosporina A (CsA), uno specifico inibitore del PTP (Rasola *et al.*, 2010). Infine ho verificato se le

alterazioni nei flussi di Ca^{2+} dovute all'E2 comportassero alterazioni nel potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) monitorando le cellule in presenza del *tetra-methyl-rhodamine-methylester* (TMRM), dato che una perdita di $\Delta\Psi_m$ renderebbe le cellule prive di riserve energetiche ed innescherebbe la morte cellulare (Joshi *and* Bakowska, 2011).

Terminata questa prima fase del lavoro, mi sono dedicato allo studio degli effetti che i neurosteroidi esercitano sulla morfologia delle cellule neuronali. È noto dalla letteratura che gli effetti degli ormoni steroidei (e dell'E2 in particolar modo) sulle cellule del SNC in via di sviluppo sono molteplici e comprendono il differenziamento dell'encefalo in senso maschile o femminile, la sopravvivenza cellulare, ma soprattutto una regolazione significativa della crescita e del differenziamento cellulare. In letteratura è possibile trovare diversi lavori incentrati su quest'argomento che affermano l'importanza dell'ormone E2 nel regolare la forma ed il volume delle cellule, nonché il grado di arborizzazione dei prolungamenti dendritici di una cellula neuronale. L'obiettivo di questo secondo filone di ricerca consiste nel caratterizzare le variazioni indotte da un trattamento a lungo termine con E2 sulla crescita dei neuroni e sullo sviluppo dei loro prolungamenti dendritici. Inoltre, ritengo interessante verificare se, nel modello sperimentale che ho adottato, l'effetto trofico dell'E2 possa produrre risultati differenti in individui di sesso opposto. Per questo tipo di analisi ho utilizzato colture cellulari primarie di neuroni derivate da cervelletto di feti di bovino di entrambi i sessi. Per mettere in evidenza le alterazioni morfologiche nei neuroni in seguito all'aggiunta dell'ormone ho effettuato esperimenti di immunocitochimica in fluorescenza usando uno specifico anticorpo per neuroni immaturi, la β III-tubulina, confrontando gli effetti dell'E2 in cellule trattate rispetto a neuroni di controllo. Come parametri morfometrici per l'indagine ho scelto: area e perimetro del corpo cellulare, numerosità, lunghezza e diametro dei prolungamenti che dipartono dal corpo cellulare e dai prolungamenti stessi (dettagliatamente suddivise in prolungamenti primari, secondari, terziari e quaternari).

MATERIALI E METODI

1. COLTURE CELLULARI PRIMARIE

Le colture cellulari utilizzate in questo lavoro derivano tutte da cervelletto di feto bovino. I feti di bovino sono stati ottenuti da macelli della zona in seguito a macellazione accidentale di animali in stato di gravidanza. Gli animali sono stati trattati secondo le direttive Europee in vigore (*European Community Council Directive, 86/609/EEC*) riguardanti il *welfare* degli animali durante il processo di macellazione, in costante presenza di personale veterinario qualificato. L'età dei feti è stata stabilita misurando la lunghezza vertice-sacro degli animali e confrontandola con opportune tabelle di riferimento (McGeady *et al.*, 2006).

Le colture cellulari primarie sono state ottenute seguendo un protocollo di laboratorio prestabilito. I tessuti di cervelletto sono stati raccolti in condizioni di sterilità ed immersi in soluzione tampone sterile al fosfato (PBS, NaCl 8,7 g/l, NaH₂PO₄ 0,156 g/l, Na₂HPO₄ 1,234 g/l in H₂O). Per dissociare i tessuti ed ottenere colture di cellule isolate (figura 16) è stato utilizzato un kit commerciale che usa l'enzima papaina (*papain-based-dissociation-kit*, Worthington *Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA*) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

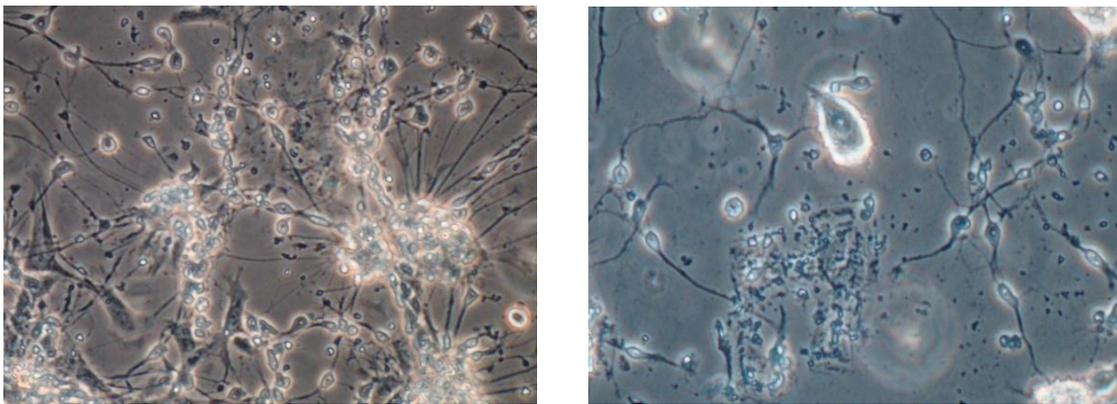


Figura 16: colture primarie neurali miste derivate da cervelletto di feto bovino

Le cellule sono state piastrate alla densità di 4×10^5 per vetrino; le piastre erano state precedentemente ricoperte da uno strato di polilisina per favorirne l'adesione (0.1 mg/ml poli-L-lisina). Le colture sono state fatte crescere in DMEM-F12 con l'aggiunta di FBS (10%), NGF (2×10^{-4} %), B27 (2%), penicillina (30 mg/l), streptomicina (50

mg/l), insulina (10 µg/ml), transferrina (10 µg/ml), e sodio selenite (10^{-8} M). Metà del mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni.

1.1 Immortalizzazione, caratterizzazione e mantenimento della linea endoteliale

La linea cellulare utilizzata per monitorare i flussi di Ca^{2+} è una linea stabilizzata che, dopo caratterizzazione (vedi risultati), ha mostrato caratteristiche endoteliali. Questa linea è stata ottenuta presso questo laboratorio a partire da un frammento di cervelletto prelevato da un encefalo di feto bovino maschio di 3 mesi. Per ottenere una linea stabilizzata le cellule sono state immortalizzate seguendo il protocollo presentato nel lavoro di Takenouchi *et al.* (2007). In dettaglio, la coltura primaria di cervelletto fetale è stata trasfettata dopo due giorni con il plasmide PSV3-NEO (LGC Promochem, Teddington, UK) utilizzando il catione lipidico Lipofectamina-2000 (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA); questo plasmide contiene la proteina SV40 *large-T-antigen* (il cui effetto, ampiamente documentato in letteratura, porta ad immortalizzazione delle cellule) ed i geni di resistenza ad antibiotici di selezione. In seguito è stato aggiunto mezzo di selezione con antibiotico G418 400 µg/ml (Gibco, Life Technologies, BRL) e sono state selezionate le colonie resistenti. Queste ultime sono state periodicamente testate con vari *marker* specifici per la caratterizzazione della linea cellulare utilizzando un protocollo di laboratorio prestabilito (Peruffo *et al.*, 2008). Le colture sono state fissate in paraformaldeide al 4% a temperatura ambiente per 20 minuti. Dopo fissazione, le cellule sono state lavate delicatamente con PBS 1x, permeabilizzate con Triton X-100 0.3% per 10 minuti a 4°, quindi incubate con BSA 5% in PBS 1x per 30 minuti a temperatura ambiente per bloccare la formazione di legami aspecifici. La linea è stata testata per l'analisi immunocitochimica con anticorpi specifici contro marker di cellule neurali ed endoteliali: anti *neurofilament-200* (N-200, Sigma–Aldrich, diluizione 1:40), anti *glial-fibrillary-acidic-protein* (GFAP, DakoCytomation, Glostrup, Denmark, diluizione 1:200), anti integrina α M (SantaCruzBiotechnology, Santa Cruz, Calif., USA, diluizione 1:200), anti vimentina (Sigma–Aldrich, diluizione 1:100), anti *von-Willebrand-factor* (vWF, Sigma–Aldrich, diluizione 1:250) e infine anti *endothelial-NO-sintasiynthase* (e-NOS, Abcam, diluizione 1:250). Dopo incubazione *overnight* con gli anticorpi primari le cellule sono state incubate con anticorpi secondari coniugati ai

fluorofori *IgG-tetra-methyl-rhodamine-iso-thio-cyanate* (TRITC, DakoCytomation, diluizione 1:100) e *IgG-fluorescein-iso-thio-cyanate* (FITC, Santa Cruz Biotechnology, diluizione 1:100). Le colture così marcate sono state osservate ad un microscopio confocale Leica TCS. I controlli negativi sono stati fatti sostituendo l'anticorpo primario con albumina di siero bovino in PBS. Quindi la linea cellulare stabilizzata, in seguito denominata come CR10, è stata coltivata nel mezzo di coltura D-MEM-F12 (SIGMA), con aggiunta di FCS al 10%, glutammina (2mM), penicillina (30 mg/l), streptomina (50 mg/l), G418 (400 µg/ml). Le cellule vengono mantenute in coltura in fiasche di plastica sterile in un incubatore termostato a 37° con il 5% di CO₂. Queste condizioni assicurano un pH stabile attorno a 7,2-7,4 e un corretto grado di umidità. Una volta giunte a confluenza, le cellule vengono lavate con PBS 1x e poi incubate a 37° per 1 minuto con una soluzione contenente 0,1% Tripsina (SIGMA) ed EDTA (0,025%) in PBS 1x. L'azione della tripsina viene bloccata dall'aggiunta di mezzo di coltura fresco che, oltre alle altre proteine del siero, contiene anche l'inibitore della tripsina. La sospensione di cellule si centrifuga a 1000 rpm per 5 minuti, si elimina il surnatante e si risospesce il precipitato in un volume opportuno di terreno completo; si procede poi ad una diluizione 1:5 su una fiasca nuova. Per rendere sempre disponibile la coltura stabilizzata e poterla ripropagare in caso di inquinamento, dopo aver staccato le cellule mediante tripsinizzazione, parte del pellet risospeso dopo centrifugazione viene diluito in una soluzione crio-conservante composta da una soluzione al glucosio (D-glucosio 20% in DMEM-F12 e DMSO 7% in H₂O MilliQ in rapporto 3:2) e FBS in rapporto 1:3, e conservato a -80 °C per circa 2 giorni prima dello stoccaggio in azoto liquido in appositi criotubi (Sterilin).

2. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI DEGLI ESTROGENI E DEI GENI DI IMMORTALIZZAZIONE NELLA LINEA CELLULARE CR10

Nelle linee cellulari utilizzate in questo lavoro è stata verificata la presenza dei recettori degli ormoni steroidei e dei geni di immortalizzazione tramite analisi di biologia molecolare: estrazione dell'RNA, retro trascrizione, PCR ed elettroforesi su gel d'agarosio.

2.1 Estrazione dell'RNA e retro trascrizione

Il protocollo di purificazione dell'RNA utilizzato prevede di far crescere su piastra le colture cellulari, quindi raccogliere le cellule con un piccolo "raschietto" ("*cell scraper*") in presenza di Trizol (Invitrogen). Questa soluzione, contenente fenolo e guanilina isotiocianato, assieme al movimento meccanico dello *scraper*, porta alla lisi cellulare, e quindi alla fuoriuscita sia delle proteine intracellulari che degli acidi ribonucleici. La successiva aggiunta di cloroformio, seguita da centrifugazione a 12000 g per 15 minuti a 4°, porta alla separazione di due fasi: una fase inferiore proteica, ed una fase superiore, acquosa, contenente l'RNA. Quest'ultima viene quindi isolata tramite successive centrifugate ed aggiunta di isopropanolo ed etanolo; l'RNA depositatosi sul fondo della provetta viene poi risospeso in H₂O DEPC. Per determinare la concentrazione dell'RNA totale di ogni campione è stata effettuata la lettura dell'assorbanza a 260nm con spettrofotometro V630 (Jasco) diluendo 1µl di campione in 69µl di H₂O, moltiplicando poi il valore per l'opportuno fattore di correzione. L'RNA così ottenuto viene poi retrotrascritto a cDNA, tramite la tecnica della trascrizione inversa (o retrotrascrizione); ho utilizzato un Kit commercializzato dalla ditta Invitrogen, contenente la retrotrascrittasi Super-Script TM III RT. Prima di ogni retrotrascrizione viene misurata nuovamente la concentrazione di RNA totale di ogni campione, come sopra descritto, per assicurarsi di retrotrascrivere sempre la stessa quantità di RNA (nel nostro caso 2µg). Al volume di ogni campione contenente tale peso (x) è stata aggiunto un volume di H₂O DEPC pari a (12-x) µl, 1.5µl di 10X *DNase I Reaction Buffer* (Invitrogen), 1.5µl di *DNase I Amplification Grade 1* U/µl (Invitrogen). Dopo un'incubazione di 15 minuti a RT è stata inattivata la DNasi I aggiungendo ad ogni campione 1.5µl di EDTA 25mM e incubando a 65° per 10 minuti. Poi sono stati aggiunti 1µl di *Random Hexamer Primer* 10µM (Fermentas) e 1µl di dNTPs (soluzione contenente dATP, dCTP, dTTP e dGTP 10mM) e i campioni sono stati incubati per 5 minuti a 65°. Successivamente ad ogni campione sono stati aggiunti 4µl di *5X First Strand Buffer* (Invitrogen), 1µl di DTT 100mM, 1µl di RNase OUT 40 U/µl (Invitrogen) e 1µl di *SuperScript III Reverse Transcriptase* 200 U/µl. Dopo una prima incubazione a RT per 5 minuti ne è seguita una seconda per 1 ora a 50° e una

terza a 70° per 15 minuti (per inattivare la trascrittasi inversa), infine i campioni sono stati conservati a -20° fino al successivo utilizzo

2.2 PCR ed elettroforesi su gel d'agarosio

Da ognuno dei campioni di cDNA ottenuti è stata prelevata un'aliquota pari a 2µl, a cui sono stati aggiunti 12.7µl H₂O DEPC, 2µl di 10X *PCR Rxn Buffer*, 0.8µl di MgCl₂ 50mM, 0.4µl di dNTPs, 1µl degli opportuni primer “senso” (*forward*) e “antisenso” (*reverse*) 20µM e 0.1µl di *Taq DNA Polymerase* 5 U/µl. In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati i seguenti *primers*:

ER- α *forward*: 5' ggtggttgaacctgagaagc 3'; *reverse*: 5' agacagtgcacgcgacgaga 3'

ER- β *forward*: 5' tcagcctgtacgaccaagtg 3'; *reverse*: 5' gccaggagcatgtcaaagat 3'.

SV40 T-antigen *forward*: 5' gtgtcctggaagcttgaacagag 3'

SV40 T-antigen *reverse*: 5' caaagtcagcctgtccaaggca 3'

Anche in questo caso sono stati utilizzati prodotti della ditta Invitrogen (*Taq DNA Polymerase*; 10x *PCR Buffer*; dNTPs; MgCl₂), e la reazione è stata svolta secondo il seguente protocollo: 3 minuti a 95°; 32 cicli a: 95° per 30s, 53° per 45s, 72° per 45s; 2 minuti a 72°. Per eseguire la PCR è stato utilizzato un termociclatore TC-312 (Techne). La presenza delle sequenze amplificate tramite PCR è stata verificata tramite elettroforesi su gel di agarosio; l'agarosio (Sigma) è stato sciolto in un tampone di corsa (TAE 1x, Gibco) a cui è stato aggiunto bromuro di etidio (Invitrogen). L'acido nucleico viene caricato con un colorante 1x (*loading dye solution* 6x, Fermentas). La corsa elettroforetica è stata effettuata ad un voltaggio di 100V, per 30'.

3. MISURE DEI FLUSSI INTRACELLULARI DI CALCIO

3.1 Plasmidi utilizzati

Per effettuare gli esperimenti descritti in questa tesi sono stati utilizzati dei plasmidi contenente il cDNA codificante per le proteine di fusione “Cameleons”, indirizzate a vari compartimenti subcellulari (Palmer *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2006). Il cDNA

opportuno vettore. Il vettore da noi scelto presenta origini di replicazione sia batteriche che di mammifero. In questa tesi, sono stati utilizzati batteri *DH5alpha* (Invitrogen). Dopo averli incubati con 300-500ng di cDNA, sono stati lasciati in ghiaccio per 20 minuti, messi per 30 secondi a 42° e lasciati per altri 5 minuti in ghiaccio. Questo shock termico consente di aumentare la permeabilità della membrana batterica. Successivamente i batteri sono stati messi a crescere in 2ml di terreno per colture batteriche (brodo Luria-Bertani, LB), per 60 minuti a 37°, poi piastrati su capsule Petri contenenti terreno solidificato (LB-Agar 1,5%), in presenza dell'antibiotico di selezione (ampicillina 8 µg/ml) e lasciati crescere a 37° *overnight*.

3.3 Isolamento su vasta scala di DNA plasmidico (Maxi-Prep)

Allo scopo di amplificare il plasmide, una colonia batterica viene raccolta dalla piastra Petri mediante un'ansa, messa a crescere in continua agitazione (180rpm) per 5-6 ore a 37° in 2ml di terreno LB a cui viene addizionato l'opportuno antibiotico; successivamente, i batteri vengono trasferiti in una beuta contenente 100ml di LB e antibiotico, e mantenuti in agitazione *overnight* a 37°C. Le operazioni successive vengono eseguite utilizzando un Kit commerciale (*GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit*, SIGMA) contenente colonne con filtri in grado di legare il DNA e varie soluzioni. Il protocollo prevede la lisi dei batteri con una soluzione a base di sodio-dodecil-solfato (SDS), la neutralizzazione di questa reazione (per evitare che anche il DNA di interesse venga danneggiato), la filtrazione (con una pompa a vuoto) attraverso un'apposita colonna contenente resina di silicio a scambio anionico, a cui si lega il DNA; dei "lavaggi" con soluzioni contenenti etanolo per eliminare i contaminanti e l'eluizione del DNA stesso con acqua. Il DNA viene poi quantificato allo spettrofotometro, misurando l'assorbanza a 260nm, e conservato a -20°C. Questa misura viene effettuata per via spettrofotometrica misurando l'assorbanza a 260nm di una soluzione di DNA opportunamente diluita (1:70, nel nostro caso). Noto il valore di assorbanza a 260nm di una soluzione di acido nucleico a concentrazione incognita, si può facilmente risalire alla sua concentrazione, sapendo che l'assorbanza di una soluzione contenente 50 µg/ml di DNA, misurata alla stessa lunghezza d'onda, è uguale

a 1. Lo spettrofotometro utilizzato durante lo svolgimento di questo lavoro di tesi è lo strumento V630 SR707 (ditta Jasco).

3.4 Trasfezione

Dopo essere state piastrate ad una densità di 1×10^5 cellule per vetrino (diametro 24mm), le cellule sono state trasfettate con il cDNA dei diversi Cameleons, indirizzati rispettivamente a citosol (D3cpv), reticolo endoplasmatico (D1ER) e mitocondri (4mtD3cpv), ovvero i principali siti intracellulari deputati al controllo dello ione Ca^{2+} (Palmer *et al.*, 2004, 2006). Per questa linea cellulare endoteliale è stata scelta la tecnica del calcio-fosfato; la trasfezione viene effettuata 48 ore prima di procedere con gli esperimenti di *imaging*, quando le cellule sono al 70-80% di confluenza. Per ogni campione si utilizzano $2\mu\text{g}$ di DNA totale. Il DNA viene diluito in una soluzione di Tris-EDTA (TE) per un volume totale di $90\mu\text{l}$ per vetrino; a questi si aggiungono $10\mu\text{l}$ di CaCl_2 2,5M sterile. In un tubo separato si preparano $100\mu\text{l}$ per vetrino di HBS 2x sterile (NaCl 280mM, HEPES 50mM, Na_2HPO_4 1,5mM, pH 7,12 con 0,5M NaOH). Il passaggio successivo prevede l'aggiunta del mix DNA-TE all'HBS, goccia a goccia, sotto continua agitazione tramite un *vortex*: si forma così un precipitato che rende la soluzione leggermente torbida. Questa soluzione, dopo una incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente, viene aggiunta goccia a goccia direttamente al terreno di coltura, precedentemente sostituito con terreno fresco. Questa metodologia permette di ottenere, in questa linea cellulare, un'efficienza di trasfezione del 60-70%. Le piastre vengono poi lasciate in incubatore a 37° per circa 24 ore, quindi le cellule vengono lavate più volte con PBS 1x (per eliminare il precipitato di fosfato di calcio residuo) e viene aggiunto nuovo terreno.

3.5 Esperimenti di “live-imaging”

Il giorno degli esperimenti di *imaging*, i vetrini a cui sono adese le cellule trasfettate vengono applicati in appositi supporti di metallo; le cellule vengono quindi immerse in una soluzione salina fisiologica (NaCl 135mM, KCl 5mM, KH_2PO_4 0.4mM, MgCl_2 1mM, glucosio 5.5mM, HEPES 20mM) con aggiunta di EGTA $200\mu\text{M}$. Gli esperimenti

sono stati condotti ad una temperatura di 37° grazie alla presenza di una camera termostatica che ha permesso di registrare esperimenti di “*live-imaging*” in condizioni controllate e riproducibili in termini di: temperatura (camera termostatica di incubazione del vetrino a 37°), pH 7,4 a 37°, luminosità (tramite filtro luminoso, *neutral density filter* n/8 per evitare *bleaching* e fototossicità), durata dell’esperimento, acquisizione delle immagini (il tempo di esposizione per *frame* scelto è stato 340ms), stimoli utilizzati (ATP, CPA, FCCP).

Per svolgere gli esperimenti descritti in questa tesi è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza (Nikon TE2000-E stage, figura 18), presso il Dipartimento di Anatomia e Fisiologia dell’Università di Padova. Il microscopio è dotato di un obiettivo 60X ad olio (Plan Apochromat TIRF 60x/1.45 oil), di un *beamsplitter* (Optical Electronic Solutions, Padova) con una combinazione apposita di filtri di emissione per YFP e CFP (535/30nm per la YFP, 470/30nm per la CFP, figura 19), e un filtro dicroico (505LD). La telecamera con cui sono stati registrati gli esperimenti è una CCD camera MicroMax 512 BFT (Princeton Instruments, USA).



Figura 18: Apparecchiatura utilizzata per gli esperimenti di “live-imaging”; microscopio a fluorescenza Nikon TE2000-E stage

I valori dell’intensità di fluorescenza dei due fluorofori sono stati poi utilizzati per calcolarne il Rapporto (*Ratio*, R), proporzionale alla concentrazione di Ca²⁺, secondo la seguente formula:

$$R = (F_{cpv} - F_{bgcpv}) / (F_{cfp} - F_{bgcfp})$$

dove F_{cpv} è l'intensità di fluorescenza della cpVenus; F_{bgcpv} è l'intensità di fluorescenza della regione di background della cpVenus; F_{cfp} è l'intensità di fluorescenza della CFP; F_{bgcfp} è l'intensità di fluorescenza della regione di background della CFP.

I valori di *Ratio* sono stati poi successivamente normalizzati secondo la formula $\Delta R/R_0$; ΔR indica l'aumento o la diminuzione di emissione di fluorescenza in ogni istante mentre R_0 è l'intensità di fluorescenza di ciascuna cellula (ossia il valore di *Ratio* presente all'inizio di ogni esperimento) prima della stimolazione. L'analisi dei dati è stata effettuata con i software NIS-elements AR e HCSImage (Hamamatsu, Japan).

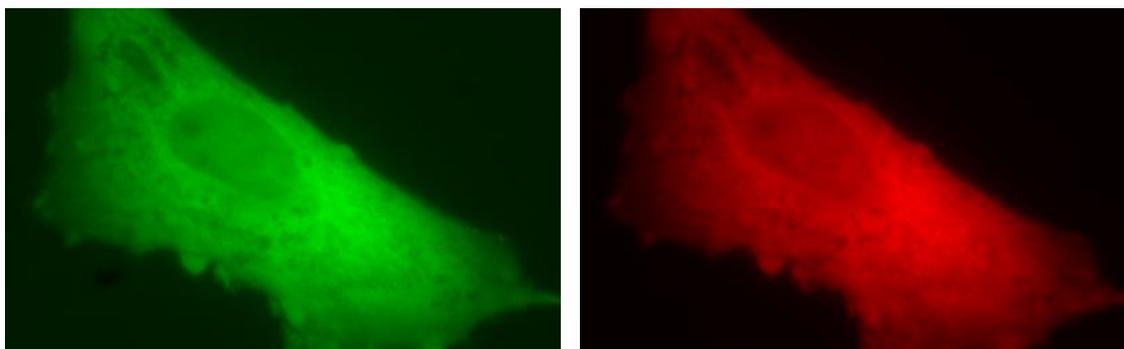


Figura 19: cellula endoteliale trasfettata con il cDNA della sonda citosolica D3cpv. Le immagini (che rappresentano la stessa cellula) sono state acquisite con appositi filtri per la lunghezza d'onda di emissione della cpV (immagine in rosso) e della CFP (immagine in verde).

4. ANALISI MORFOLOGICA DELLE COLTURE NEURONALI

Le misurazioni morfometriche sono state effettuate tramite esperimenti di immunocitochimica in fluorescenza su colture neuronali primarie ottenute da 4 diversi individui (2 feti di sesso maschile e 2 di sesso femminile).

Le colture sono state fatte crescere per 120 ore dopo la semina su vetrini ricoperti di polilisina in terreno DMEM-F12, con l'aggiunta di FBS (10%), NGF (2×10^{-4} %), B27 (2%), penicillina (30 mg/l), streptomina (50 mg/l), insulina (10 μ g/ml), transferrina (10 μ g/ml), e sodio selenite (10^{-8} M). Metà del mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni. Quindi le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% a temperatura ambiente per 20 minuti; dopo fissazione, le cellule sono state lavate delicatamente con PBS 1x, permeabilizzate con Triton X-100 0.3% per 10 minuti a 4°, quindi incubate con BSA 5% in PBS 1x per 30 minuti a temperatura ambiente per bloccare la formazione di legami aspecifici; infine sono state incubate *overnight* con un anticorpo primario anti

β III tubulina (Sigma Aldrich), diluito 1:250. Il giorno successivo all'incubazione con l'anticorpo primario, le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) con diluizione 1:100.

Da ogni coltura sono stati ricavati almeno 7 differenti campioni (almeno 4 vetrini di controllo e 3 trattati con E2) e per ogni campione sono stati selezionati 10 campi casuali ognuno contenente almeno una cellula identificabile (vedi tabella 4.1).

	campioni di controllo	campioni trattati	numero di cellule di controllo misurate	numero di cellule trattate misurate
CR 78, F, 3 mesi	4	4	249	213
CR 81, F, 3 mesi	6	6		
CR 80, M, 3 mesi	4	3	229	168
CR 86, M, 3 mesi	4	3		

Tabella 4.1 dati relativi ai campioni analizzati

Le colture immunoreattive sono state fotografate usando un microscopio confocale Leika TCS. Tutte le immagini raccolte sono state acquisite con ingrandimento 63x con obiettivo a immersione, e registrate con risoluzione 1024x1024. Le immagini sono la media di 30 sezioni raccolte sull'asse Z, con acquisizione ogni 0.12 μ m circa. L'analisi morfologica è stata fatta usando il software per analisi d'immagine ImageJ, utilizzando le funzioni di segmento manuale, area e perimetro. Prima di effettuare l'analisi morfologica delle cellule neuronali, sono stati stabiliti precisi criteri di misurazione per definire cosa è identificabile come "ramificazione neuronale" idonea per la misurazione.

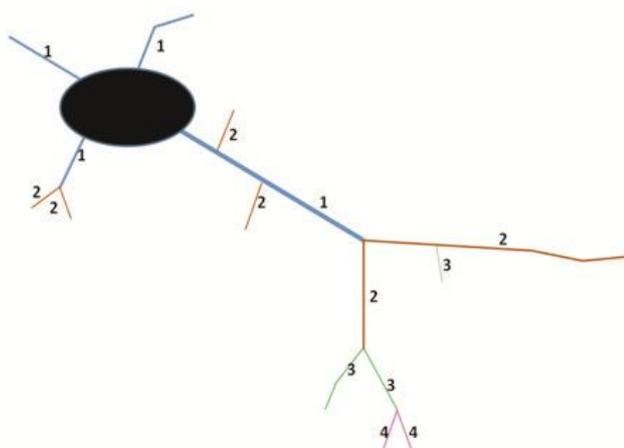


Figura 20: schema utilizzato per descrivere la gerarchia delle ramificazioni di una cellula neuronale; 1 = prolungamenti primari, 2 = prolungamenti secondari, 3 = prolungamenti terziari, 4 = prolungamenti quaternari

In questo modello sperimentale non abbiamo fatto distinzione tra assoni e dendriti. Per stabilire un sistema gerarchico di ramificazione abbiamo adottato un sistema di classificazione centrifugo (vedi figura 20): abbiamo definito ramificazioni di tipo primario, secondario, terziario e quaternario. La lunghezza delle ramificazioni è stata misurata disegnando una linea dal punto di origine della ramificazione (un'inserzione o una ramificazione) fino al proprio termine sia che fosse un punto di ramificazione successiva, sia che fosse il termine della ramificazione. Il diametro di una ramificazione invece corrisponde alla sua larghezza.

Nel modello di cellula neuronale abbiamo stimato: l'area ed il perimetro della cellula neuronale (le dimensioni del soma); la percentuale di cellule che presentano i vari tipi di ramificazione (primarie, secondarie, terziarie, quaternarie); il numero totale di ramificazioni per ogni cellula per ordine di ramificazione; la media e la somma totale della lunghezza delle ramificazioni per ogni cellula per ordine di ramificazione; la media e la somma totale del diametro delle ramificazioni per ogni cellula per ordine di ramificazione. Le misurazioni raccolte nelle cellule trattate con E2 sono state comparate con quelle delle cellule di controllo. Sono state considerate anche le risposte diversificate tra i due sessi e le differenze di trattamento in individui dello stesso sesso.

5. TRATTAMENTO CON ESTRADIOLO E TESTOSTERONE

Tutti gli esperimenti di *live-imaging* sono stati condotti 48 ore dopo la trasfezione con il cDNA codificante le sonde Cameleon. Nelle cellule trasfettate con le sonde D3cpv (per il citosol) ed ERD1 (per il ER), l'E2 o il T (Sigma-Aldrich, Milano, Italy) sono stati addizionati al mezzo di coltura per 8, 24 e 48 ore alla concentrazione finale di 10nM. Nelle cellule trasfettate con la sonda 4mtD3cpv (per i mitocondri) il T è stato aggiunto 8, 24 e 48 ore alla concentrazione di 10nM; l'E2 è stato aggiunto 8 e 24 ore alla concentrazione di 10nM, e per 48 ore alla concentrazione di 1, 10 e 100nM. Per raggiungere 48 ore di trattamento l'E2 è stato aggiunto al momento della trasfezione. Per l'esposizione a 24 ore, l'E2 è stato aggiunto dopo 24 ore, mentre per l'esposizione a 8 ore l'E2 è stato aggiunto 40 ore dopo la trasfezione. In una serie di esperimenti, prima degli esperimenti di *imaging*, le cellule sono state trattate contemporaneamente con E2 (10nM) e con ICI 182,780 (10nM; Sigma-Aldrich) per 48 ore per verificare che fossero

effettivamente i recettori degli estrogeni a mediare l'effetto dell'E2. Per verificare l'eventuale presenza di differenze nel potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) tra controlli e trattati con E2 10nM per 48 ore, le cellule sono state monitorate in presenza di TMRM 20nM e Ca^{2+} 1mM e stimulate con *fluorocarbonyl-cyanide-phenylhydrazone* (FCCP) 5 μ M. Infine, in un'altra serie di esperimenti atti a verificare il ruolo del PTP, cellule trattate con E2 10nM per 48 ore sono state incubate per 30 minuti prima di effettuare gli esperimenti di *imaging* con CsA 0.8 μ M (Sigma-Aldrich).

Per caratterizzare il meccanismo genomico indotto dall' E2 sulla morfologia delle cellule endoteliali e neuronali, l'ormone è stato aggiunto al mezzo di coltura il giorno stesso in cui le cellule venivano piastrate alla concentrazione 100nM, e mantenuto nel terreno per 5 giorni, cioè fino al giorno delle misurazioni al microscopio confocale.

6. ANALISI STATISTICA

Per questo lavoro abbiamo scelto di adottare un'analisi statistica di tipo non parametrico usando la *permutation-based one-way analysis of variance* (ANOVA) *and post-hoc pairwise comparisons* (Basso *et al.*, 2009; Pesarin *and* Salmaso, 2010), supportati dal software NPC Test R10. I test di permutazione sono applicati al posto della classica ANOVA parametrica e del t-test, poiché rappresentano un metodo inferenziale esatto valido per numerosità di campioni di qualsiasi tipo, perché permettono di eludere l'assunzione dell'ipotesi di normalità da parte delle variabili risposta ed infine perché elimina eventuali errori casuali. Negli esperimenti di *live-imaging* tutti i dati sperimentali sono rappresentativi di almeno 7 esperimenti distinti; i valori sono espressi in media \pm SEM. Negli esperimenti di analisi morfometrica, sono state effettuate in totale 4 diverse colture cellulari (2 colture da feto di maschio e 2 colture da feto di femmina). Per ogni coltura sono stati piastrati almeno 7 differenti campioni (4 controlli e 3 trattati con E2), per ogni campione sono stati selezionati 10 campi casuali. I valori sono espressi in media \pm SEM.

RISULTATI

1. CARATERIZZAZIONE DELLA LINEA IMMORTALIZZATA

La linea cellulare sottoposta a immortalizzazione (figura 21) è stata caratterizzata tramite analisi immunocitochimica.

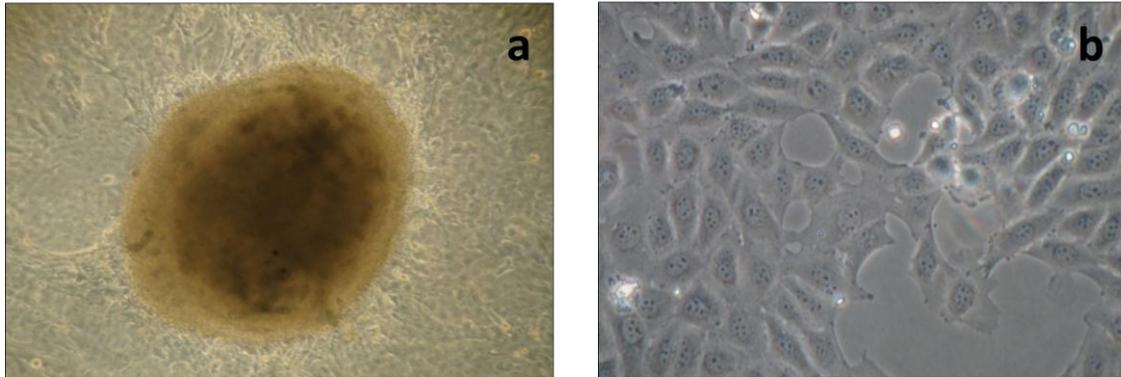


Figura 21: le figure mostrano le cellule ottenute dopo il protocollo di trasfezione con il plasmide ps-V3neo (a: foci di trasfezione; b: coltura endoteliale in monolayer)

Gli esperimenti condotti con anticorpi contro *markers* neuronali (anti N-200), gliali (anti GFAP) e oligodendritici (anti integrin- α M) non hanno esibito immunoreattività (dati non mostrati). Le cellule sono invece risultate positive agli anticorpi contro la vimentina (Blose and Meltzer, 1981; Salazar-Colocho *et al.*, 2008), contro l'e-NOS e contro il vWF (figura 22), tutti marcatori tipici di cellule dell'endotelio vascolare.

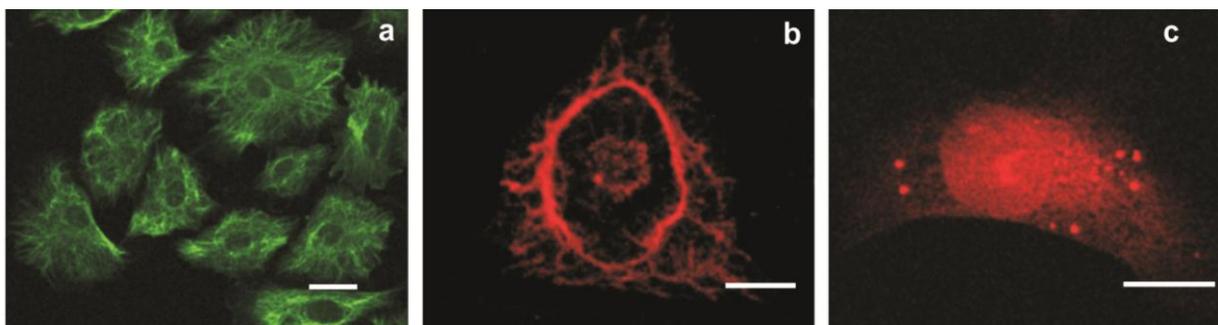


Figura 22: Immunocitochimica confocale di cellule endoteliali CR10 positive alla vimentina (a), all' e-NOS (b), e al vWf (c) (barra = 10 μ m)

L'immunocaratterizzazione eseguita con l'anticorpo anti-vWF, una proteina strettamente specifica delle cellule endoteliali, ha infatti rivelato positività perinucleare

esibendo le tipiche strutture ad uncino, in accordo con la concentrazione di questa proteina nei corpi di Weibel-Pallade, tipici appunto delle cellule endoteliali (Wagner *et al.*, 1982; Nightingale *et al.*, 2009). Quindi abbiamo confermato la caratterizzazione della linea endoteliale usando l'anticorpo anti e-NOS, un enzima che interagisce con l'actina del citoscheletro delle cellule endoteliali (Mi *et al.*, 2011). In conclusione, è stata isolata e stabilizzata con successo una linea cellulare derivata da cervelletto di feto bovino con caratteristiche tipiche dell'endotelio vascolare. Tale linea è stata denominata CR10.

2. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI DEGLI ESTROGENI E DEI GENI DI IMMORTALIZZAZIONE NELLA LINEA CELLULARE CR10

L'elettroforesi in gel d'agarosio ha evidenziato la presenza sia delle bande corrispondenti ai recettori degli ormoni steroidei, sia quelle relative ai geni d'immortalizzazione (figure non mostrate). La linea cellulare CR10 inoltre è stata propagata con successo oltre il 30° passaggio e continua tutt'oggi ad essere mantenuta nel nostro laboratorio, conservando tutte le caratteristiche tipiche delle cellule dell'endotelio vascolare.

3. EFFETTI DELL'ESTRADIOLO E DEL TESTOSTERONE SULL'OMEOSTASI INTRACELLULARE DEL CALCIO

L'effetto degli ormoni steroidei sull'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} è stato studiato con sonde geneticamente codificate note come Cameleons. Questi indicatori proteici sono stati sovra-espressi transientemente nelle cellule della linea stabilizzata denominata CR10. I diversi cDNA dei Cameleons impiegati per questo lavoro contengono ciascuno una sequenza specifica di indirizzamento a diversi compartimenti subcellulari. In particolare, sono state utilizzate sonde indirizzate al citoplasma, ai mitocondri ed al reticolo endoplasmatico (vedi materiali e metodi). Dopo la trasfezione, effettuata con la tecnica del calcio fosfato, gli ormoni steroidei sono stati aggiunti al mezzo di coltura alle concentrazioni 1, 10, 100nM per l'E2 e 10nM per il T ed incubate a intervalli di tempo diversi (per 8, 24 e 48 ore). Successivamente, sono stati effettuati

esperimenti di “*live-imaging*” in singola cellula, seguendo diversi protocolli a seconda della sonda utilizzata. Nel caso delle sonde D3cpv e 4mtD3cpv le cellule sono state stimulate con ATP. Questa molecola, in seguito all’interazione con il proprio recettore, porta all’attivazione della fosfolipasi C, con conseguente produzione di IP₃ e rilascio di Ca²⁺ dai depositi intracellulari. Nel caso della sonda D1ER, il protocollo applicato prevede l’utilizzo di CPA, un bloccante delle pompe SERCA che causa rilascio continuo e passivo di Ca²⁺ dall’organello. Per ciascun esperimento è stata selezionata una singola cellula e sono stati registrati contemporaneamente, grazie al *beamsplitter* (vedi materiali e metodi), due filmati: uno per monitorare le variazioni della fluorescenza emessa dalla cpVenus (citrina nel caso di D1ER, Palmer *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2006) e uno per le variazioni di fluorescenza della CFP. Per ogni cellula sono poi state selezionate alcune regioni d’interesse (ROI; rispettivamente 4 regioni nel caso di D3cpv e D1ER, 8 regioni nel caso di 4mtD3cpv), dalle quali sono state misurate le variazioni dell’intensità di fluorescenza emessa rispettivamente da cpVenus e CFP. Per ciascun esperimento sono state anche selezionate e sottratte ai valori di fluorescenza due regioni di *background* (una per ciascun fluoroforo). I valori dell’intensità di fluorescenza dei due fluorofori sono stati poi utilizzati per calcolarne il Rapporto (*Ratio*, R), proporzionale alla concentrazione di Ca²⁺, secondo la formula riportata nella sezione “Materiali e Metodi” al paragrafo 3.5.

Per ciascun esperimento è stato quindi possibile ricavare dei grafici che rappresentano le variazioni di R (proporzionali a variazioni delle concentrazioni di Ca²⁺ nei vari compartimenti subcellulari) in seguito a stimolazione con ATP o CPA. I valori di R sono stati successivamente normalizzati rispetto al valore medio basale ($\Delta R/R_0$) dell’intensità di fluorescenza di ciascuna cellula, ossia il valore di *Ratio* presente all’inizio di ogni esperimento prima della stimolazione.

3.1 Sonda citosolica D3cpv

Per verificare l’eventuale presenza alterazioni nei flussi di Ca²⁺ citosolici dovuti a trattamento con E2 e T, le cellule endoteliali sono state trasfettate transientemente con il cDNA della sonda Cameleon D3cpv, specifica per il citosol (figura 23a). Gli effetti dell’E2 e del T sul rilascio di Ca²⁺ dai compartimenti intracellulari sono stati misurati

registrando il valore di fluorescenza basale (indicativo del livello citosolico basale di Ca^{2+}) in un mezzo *calcium-free* a cui è stato aggiunto EGTA 200 μM ; le cellule sono state stimulate dopo 15 secondi (un tempo sufficiente a registrare il valore basale) con ATP 200 μM (figura 23b).

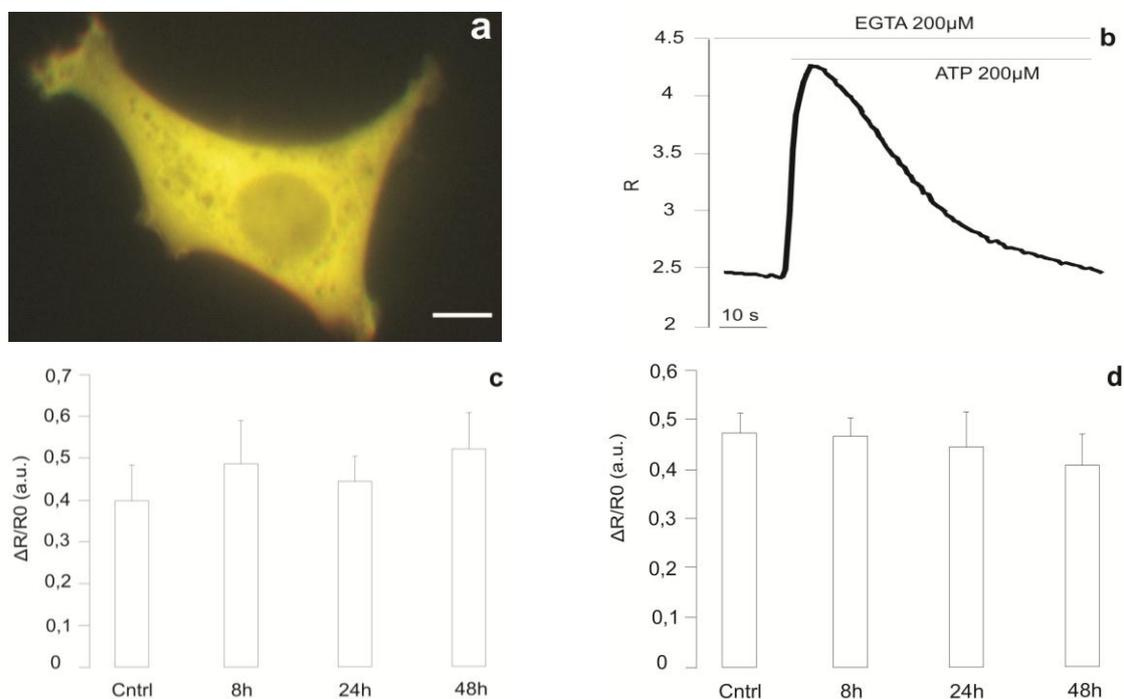


Figura 23: a) cellula endoteliale trasfettata con il cDNA codificante per la sonda citosolica D3cpv (Barra = 10 μm). b) La traccia rappresenta le variazioni del rapporto di fluorescenza tra i fluorofori YFP e CFP corretti per i valori di background. Le cellule sono state immerse in una soluzione a cui è stato aggiunto 200 μM EGTA e stimulate dopo 15 secondi con 200 μM ATP. In ordinata sono riportati i valori di Ratio (R) e in ascissa il numero delle immagini acquisite durante l'esperimento (tempo). Le immagini sono state registrate ogni 340ms. c-d) Gli istogrammi rappresentano i valori medi normalizzati di R registrati al picco ($\Delta R/R0$; a.u. = arbitrary units) dopo stimolazione con ATP in cellule trattate con E2 (c) e T (d) per 8, 24, or 48 ore. I dati sono presentati come media \pm SEM. Ogni colonna è rappresentativa di almeno 7 esperimenti indipendenti.

Questo agonista è in grado di indurre il rilascio di Ca^{2+} dai compartimenti con recettori per l' IP_3 ; questo evento è rappresentato nella curva dall'aumento transiente del segnale di fluorescenza che culmina al valore di picco. I confronti tra le cellule di controllo e le cellule trattate con E2 e T sono riassunti nei due istogrammi in figura 23c e 23d; i valori medi di picco nel citosol registrati dopo stimolazione con ATP non sono stati alterati dal trattamento con E2. Per quanto riguarda invece cellule trattate con T, non c'è alcuna

differenza significativa, sebbene si possa rilevare una lieve tendenza alla diminuzione dopo un trattamento di 48 ore.

3.2 Sonda del reticolo endoplasmatico DIER

Per misurare l'azione effettiva che gli steroidi esercitano sul contenuto totale di Ca^{2+} nei depositi intracellulari, abbiamo utilizzato un protocollo sperimentale diverso dal precedente ed una sonda (DIER) specifica per questo organello (Palmer *et al.*, 2004) (figura 24a).

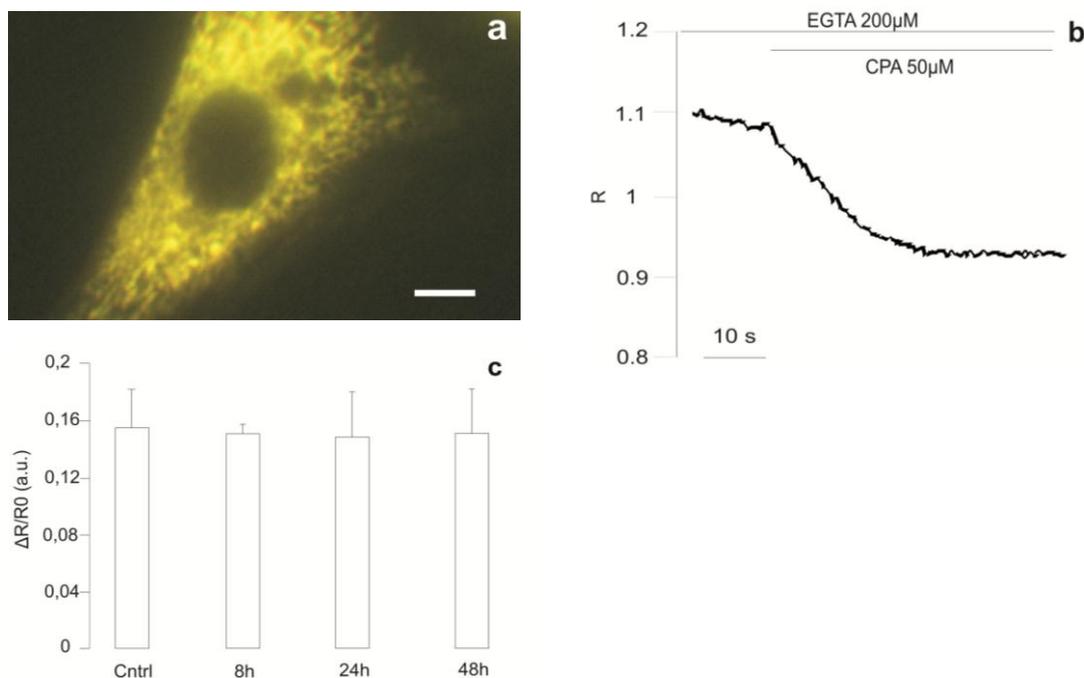


Figura 24: a) cellula endoteliale trasfettata con il cDNA codificante per la sonda di reticolo DIER (Barra = $10\mu\text{m}$). b) La traccia rappresenta le variazioni del rapporto di fluorescenza tra i fluorofori YFP e CFP corretti per i valori di background. Le cellule sono state immerse in una soluzione a cui è stato aggiunto $200\mu\text{M}$ EGTA e stimolate dopo 15 secondi con acido ciclopiazonico (CPA). In ordinata sono riportati i valori di Ratio (R) e in ascissa il numero delle immagini acquisite durante l'esperimento (tempo). Le immagini sono state registrate ogni 340ms. c) L'istogramma rappresenta i valori medi normalizzati di R registrati al plateau ($\Delta R/R0$; a.u. = arbitrary units) dopo stimolazione con CPA in cellule trattate con E2 per 8, 24, or 48 ore. I dati sono presentati come media \pm SEM. Ogni colonna è rappresentativa di almeno 7 esperimenti indipendenti.

Le cellule sono state stimolate con CPA $50\mu\text{M}$, uno specifico inibitore della pompa ATP-asi per il Ca^{2+} SERCA, in un mezzo extracellulare privato di Ca^{2+} . Il protocollo

sperimentale applicato per queste misurazioni è rappresentato nella traccia della figura 24b. Il CPA causa uno svuotamento continuo e passivo dei depositi intracellulari di Ca^{2+} , fino allo svuotamento del compartimento. Le differenze medie tra i valori di partenza ed i valori ottenuti al *plateau*, raccolti dopo la stimolazione, in cellule trattate con E2 sono riportati in figura 24c. I confronti tra le tracce dei valori dei campioni di controllo ed i valori dei trattati con E2 e T (dati non mostrati), non hanno dato alcuna differenza statisticamente significativa nella quantità totale di Ca^{2+} rilasciata dal RE.

3.3 Sonda mitocondriale 4mtD3cpv

L'ultimo compartimento oggetto di studio in questo lavoro di tesi è il complesso *network* mitocondriale.

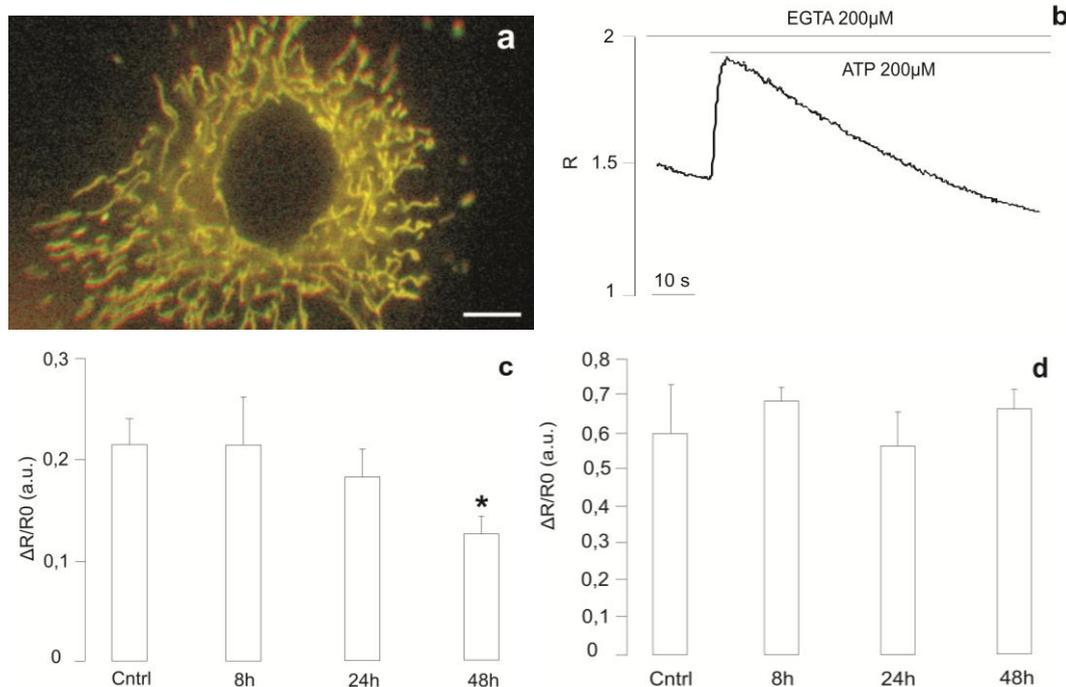
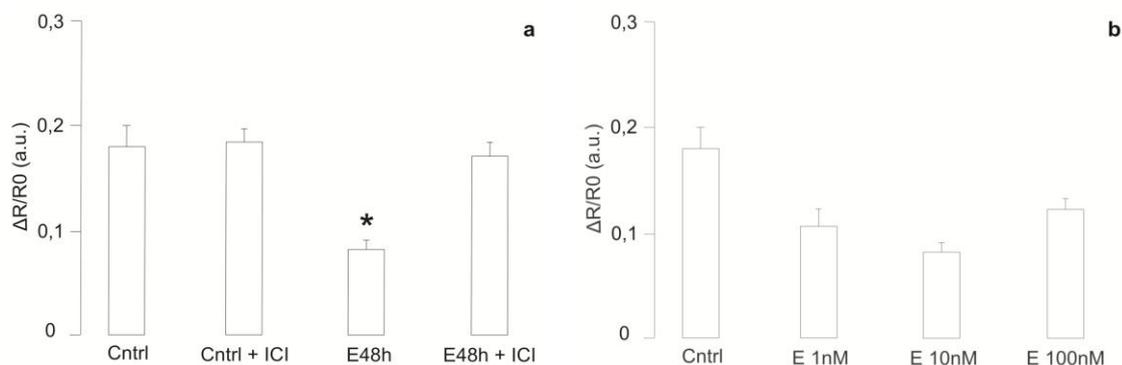


Figura 25: a) cellula endoteliale trasfettata con il cDNA codificante per la sonda mitocondriale 4mtD3cpv (Barra = 10 μm). b) Cinetica delle variazioni del rapporto (R) di fluorescenza tra i fluorofori YFP e CFP corretti per i valori di background. Le cellule sono state immerse in una soluzione contenente 200 μM EGTA e stimolate dopo 15 secondi con 200 μM ATP. In ordinata sono riportati i valori di R e in ascissa il numero delle immagini acquisite durante l'esperimento (tempo). Le immagini sono state registrate ogni 340ms. c-d) Gli istogrammi rappresentano i valori medi normalizzati di R registrati al picco ($\Delta R/R_0$; a.u. = arbitrary units) dopo stimolazione con ATP in cellule trattate con E2 (c) e T (d) per 8, 24, or 48 ore. I dati sono presentati come media \pm SEM. Ogni colonna è rappresentativa di almeno 8 esperimenti indipendenti. * = $p < 0.05\%$

Abbiamo esaminato, in cellule endoteliali trasfettate con la specifica sonda 4mtD3cpv, gli effetti dell'E2 e del T sull'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale in risposta a stimolazione con ATP (figura 25a e 25b). In questa serie di esperimenti è stato applicato lo stesso protocollo sperimentale adottato per analizzare le cellule trasfettate con la sonda D3cpv. Per quanto riguarda gli esperimenti effettuati con cellule trattate con T, non abbiamo potuto rilevare alcuna differenza significativa in alcuno dei vari parametri (figura 25d). I valori di picco misurati in cellule trattate con E2 10nM per 24 ore erano invece inferiori, seppur non statisticamente significativi, in confronto con le tracce di controllo. Al contrario, il trattamento con E2 10nM a 48 ore ha mostrato una diminuzione significativa dei picchi di Ca^{2+} dopo l'aggiunta dello stimolo (figura 25c).



*Figura 26: a) Valori medi normalizzati ($\Delta R/R0$; a.u. = arbitrary units) registrati al picco di ATP in mitocondri di cellule incubate: per 48 ore con E2 10nM (E48h), per 48 ore con E2 10nM a cui è stato aggiunto ICI 182,780 10nM 48 ore (E48h + ICI) prima di effettuare gli esperimenti, in cellule di controllo (Cntrl), in cellule di controllo a cui è stato aggiunto ICI 182,780 10nM 48 ore (Cntrl + ICI) prima di effettuare gli esperimenti. Le cellule sono state immerse in una soluzione a cui è stato aggiunto 200 μM EGTA. I dati sono presentati come media \pm SEM. Ogni colonna è rappresentativa di almeno 8 esperimenti indipendenti. * = $p < 0.01\%$. b) Valori medi normalizzati ($\Delta R/R0$; a.u. = arbitrary units) registrati al picco di ATP (200 μM) in mitocondri di cellule incubate per 48 ore con E2 alle concentrazioni 1nM, 10nM, 100nM. Le cellule sono state immerse in una soluzione a cui è stato aggiunto 200 μM EGTA. I dati sono presentati come media \pm SEM. Ogni colonna è rappresentativa di almeno 8 esperimenti indipendenti. * = $p < 0.05\%$.*

L'effetto del trattamento con E2 sui picchi del Ca^{2+} mitocondriale dopo la stimolazione con ATP, è stato invece annullato quando insieme all'E2 è stato aggiunto ICI 182,780 10nM, uno specifico antagonista non selettivo dei recettori degli estrogeni (figura 26a) confermando quindi che l'effetto misurato è mediato dagli ER.

Altre due concentrazioni di E2 (1nM e 100nM), somministrate alle cellule endoteliali sempre per 48 ore, hanno dato risultati analoghi, mostrando una diminuzione

significativa dei picchi di Ca^{2+} . Tuttavia, un'analisi statistica accurata ha dimostrato che, tra le tre concentrazioni testate (1nM, 10nM e 100nM), non c'è differenza di valore nell'effetto provocato sui trattati, mentre tutti e tre sono significativi rispetto ai controlli (figura 26b).

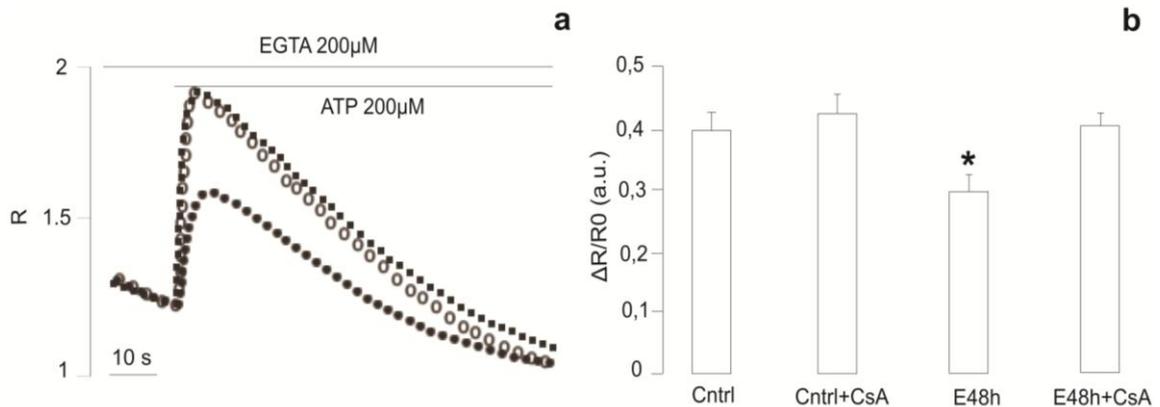


Figura 27: a) Cinetica delle variazioni del rapporto (R) di fluorescenza tra i fluorofori YFP e CFP corretti per i valori di background in cellule esprimenti la sonda mitocondriale 4mtD3cpv (cerchi vuoti: controlli; quadrati pieni: cellule trattate con E2 per 48 ore a cui è stata aggiunta CsA 0.8 μM per 30 minuti prima dell'inizio degli esperimenti; cerchi pieni: cellule trattate con E2 per 48 ore). Le cellule sono state immerse in una soluzione a cui è stato aggiunto 200 μM EGTA e stimulate dopo 15 secondi con 200 μM ATP. In ordinata sono riportati i valori di R e in ascissa il numero delle immagini acquisite durante l'esperimento (tempo). Le immagini sono state registrate ogni 340ms. b) L'istogramma illustra i valori medi normalizzati ($\Delta R/R_0$; a.u. = arbitrary units) registrati al picco di ATP (200 μM) in mitocondri di cellule incubate: per 48 ore con E2 10nM (E48h), per 48 ore con E2 10nM a cui è stato aggiunto 0.8 μM CsA 30 minuti prima dell'inizio degli esperimenti (E48h + CsA), in cellule di controllo (cntrl), ed in cellule di controllo a cui è stato aggiunto 0.8 μM CsA (cntrl +CsA) 30 minuti prima dell'inizio degli esperimenti. I dati sono presentati come media \pm SEM. Ogni colonna è rappresentativa di almeno 15 esperimenti indipendenti. * = $p < 0.01\%$.

Per valutare se la diminuzione dei picchi di Ca^{2+} mitocondriale in seguito a trattamento fosse dovuta da un coinvolgimento del PTP, le cellule sono state incubate con lo specifico inibitore CsA 0.8 μM per 30 minuti prima di effettuare gli esperimenti. I risultati evidenziano che la CsA riporta i valori dei picchi dei trattati con E2 per 48 ore (figura 27a e 27b) ai valori controllo.

Per accertare se una diminuzione dell'uptake di Ca^{2+} potesse influire sul potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$, il cui mantenimento è necessario per garantire il funzionamento della catena respiratoria che genera ATP) abbiamo monitorato cellule di controllo e cellule trattate con E2 per 48 ore in presenza del TMRM. Il TMRM è un indicatore non raziometrico a singola lunghezza d'onda, che si accumula nella

membrana interna mitocondriale che è a carica fortemente negativa. Il TMRM aumenta o diminuisce la propria intensità di fluorescenza in maniera proporzionale allo stimolo che aumenti o diminuisca i livelli di $\Delta\Psi_m$ (Joshi *and* Bakowska, 2011).

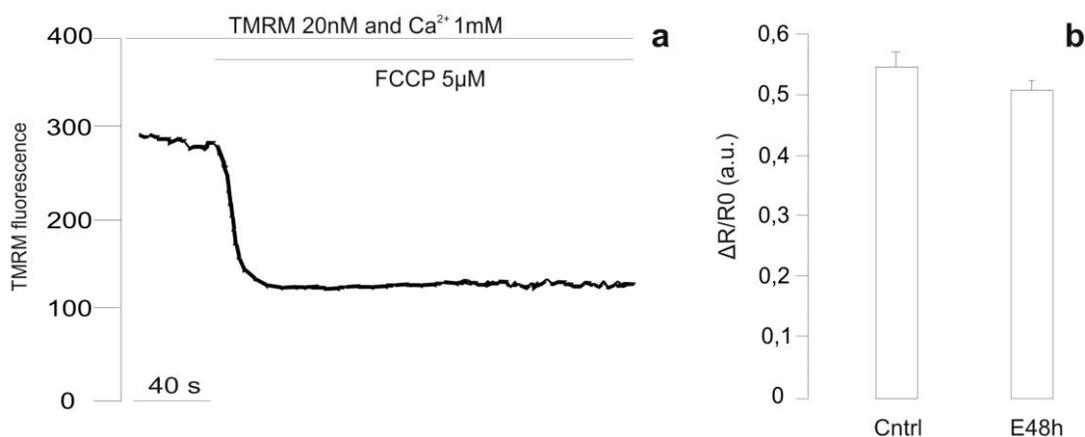


Figura28: a) Cinetica delle variazioni di fluorescenza in cellule caricate con la sonda a singola lunghezza d'onda TMRM. Le cellule sono state immerse a temperatura ambiente in oscurità totale per 30 minuti in una soluzione fisiologica con TMRM 20nM e Ca^{2+} 1mM. Le cellule sono state depolarizzate dopo 40 secondi con il protonoforo FCCCP (5 μ M). La diminuzione di fluorescenza del TMRM dopo stimolazione è proporzionale alla depolarizzazione del $\Delta\Psi_m$. In ordinata sono riportati i valori di intensità di fluorescenza della sonda e in ascissa il numero delle immagini acquisite durante l'esperimento (tempo). b) Valori medi normalizzati ($\Delta R/R_0$; a.u. = arbitrary units) delle differenze registrate tra il valore basale e quello raggiunto al plateau dopo stimolazione in cellule trattate con E2 per 48 h (E48h) e in cellule di controllo (Cntrl). I dati sono presentati come media \pm SEM. Ogni colonna è rappresentativa di almeno 58 esperimenti indipendenti.

Per verificare la presenza di eventuali alterazioni nel $\Delta\Psi_m$, le cellule sono state immerse a temperatura ambiente in totale oscurità con soluzione fisiologica a cui è stato aggiunto TMRM 20nM e Ca^{2+} 1mM. Quindi, le cellule sono state stimulate con *fluorocarbonyl-cyanide-phenylhydrazone* (FCCP) 5 μ M, un disaccoppiante della catena di trasporto elettronica mitocondriale e della fosforilazione ossidativa e che come effetto produce una significativa depolarizzazione della membrana mitocondriale (figura 28a). La durata di questi esperimenti di *imaging* è 4 minuti e le immagini sono state registrate ogni 2 secondi con tempo di esposizione 500ms. Quindi sono stati calcolati i valori, corretti per il background, della differenza tra il valore medio basale dell'intensità di fluorescenza del TMRM (cioè il valore prima dell'applicazione dello stimolo) ed il valore medio di intensità di fluorescenza raggiunto a plateau (cioè dopo l'aggiunta dell'FCCP). La perdita del $\Delta\Psi_m$ determina una fuoriuscita del TMRM dal mitocondrio, determinando una diminuzione dell'intensità di fluorescenza. I dati che abbiamo

raccolto sulle variazioni del $\Delta\Psi_m$ indicano che non ci sono variazioni di alcun tipo tra cellule di controllo e cellule trattate con E2 (figura 28b).

Riassumendo questa prima parte del lavoro svolto, i risultati ottenuti dal monitoraggio dei flussi di Ca^{2+} intracellulare dimostrano che in seguito a trattamento con ormoni steroidei:

- 1) tra i vari compartimenti cellulari analizzati solo quello mitocondriale mostra una variazione nei flussi di Ca^{2+} in seguito a trattamento con E2; questa differenza è caratterizzata da una diminuzione della quantità di Ca^{2+} accumulata nella matrice;
- 2) l'effetto degli estrogeni è mediato dai propri recettori;
- 3) le concentrazioni 1, 10 e 100nM di E2 producono lo stesso effetto suggerendo un possibile effetto di saturazione dell'ormone già alla concentrazione 1nM;
- 4) la CsA inverte l'effetto dell'E2 suggerendo che questo ormone svolga un ruolo regolatore sul MPTP (*mitochondrial permeability transition process*);
- 5) nonostante la diminuzione di Ca^{2+} nei mitocondri il $\Delta\Psi_m$ non viene alterato nei campioni trattati con E2.

4. EFFETTI DELL'ESTRADIOLO SULLA MORFOLOGIA DELLE CELLULE NEURONALI

Per caratterizzare l'effetto del trattamento ormonale a lungo termine sulla morfologia cellulare sono stati effettuati esperimenti di immunocitochimica in fluorescenza con l'obiettivo di ricercare differenze nello sviluppo delle arborizzazioni dendritiche tra cellule di controllo e cellule trattate con E2 100nM per 120 ore.

Per misurare le variazioni morfometriche delle cellule neuronali, è stato scelto un anticorpo contro la β III-tubulina. La β III-tubulina è un composto della classe III dei microtubuli espressa esclusivamente nei neuroni del tessuto nervoso, ed è considerato un *marker* specifico per cellule neuronali immature (Moody *et al.*, 1989).

Per questa indagine abbiamo utilizzato colture cellulari primarie derivate da cervelletto di feto bovino da individui di entrambi i sessi (2 di sesso femminile e 2 di sesso maschile), di età 3 mesi (periodo che rientra nel secondo bimestre dello sviluppo embrionale). In questa analisi ci siamo concentrati nel verificare la presenza di

differenze tra campioni di controllo e campioni trattati con ormone all'interno dello stesso sesso, e tra i due sessi.

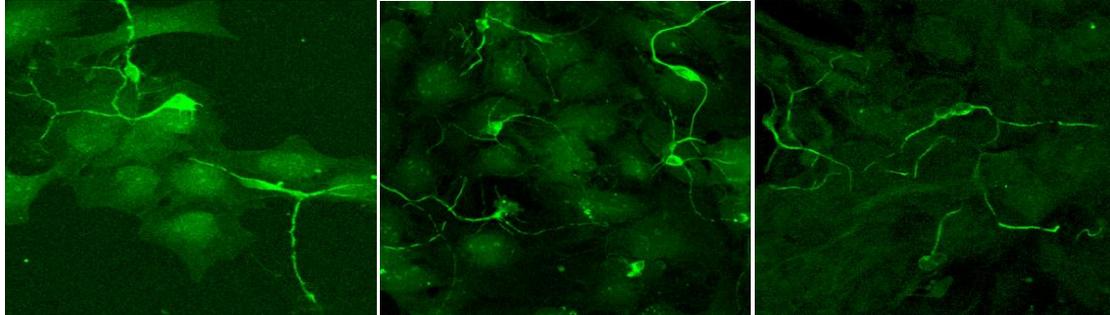


Figura 29: cellule neuronali di cervelletto di feto bovino positive alla β III tubulina

I parametri che ho considerato in quest'indagine sono stati innanzitutto l'area ed il perimetro delle cellule neuronali, quindi ho descritto lo sviluppo delle ramificazioni dendritiche considerando numerosità, lunghezza e diametro di ogni singolo prolungamento. In dettaglio, ho calcolato la lunghezza media dei prolungamenti 1, 2, 3, 4 (vedi figura 20), dividendo la somma totale delle lunghezze di tutti i prolungamenti per il numero totale di prolungamenti contati. Dividendo la somma totale delle lunghezze per il numero di cellule neuronali ho invece ottenuto la misura della media della somma delle lunghezze dei prolungamenti 1, 2, 3 e 4 per singola cellula. Infine, dividendo tra di loro questi due valori (media della somma delle lunghezze e lunghezza media) ho ottenuto il numero medio di prolungamenti per neurone. Calcoli analoghi sono stati fatti per i valori relativi al diametro dei prolungamenti. Ho deciso di calcolare i valori relativi alla somma totale delle lunghezze e dei diametri in quanto questi due valori offrono un dato più preciso sull'effetto trofico esercitato dall'ormone sulla cellula neuronale (vedi discussione).

Per semplificare l'esposizione dei risultati i dati saranno presentati seguendo il criterio di confronti adottato durante l'analisi statistica. Per primo sarà presentato il confronto tra i dati collettivi dei controlli e dei trattati; quindi saranno confrontati i dati delle cellule derivate dai feti femminili con quelli maschili.

4.1 Confronto tra cellule neuronali di controllo e cellule trattate

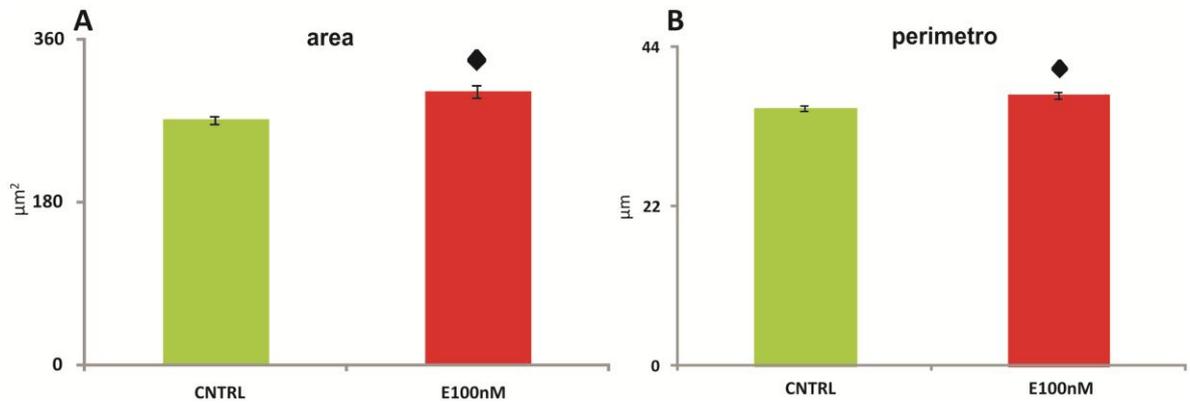


Grafico 4.1.1: area media (A) del soma e perimetro medio (B) del soma (verde CNTRL, $n = 478$; rosso E100nM, $n = 381$; ♦ = P value < 0.05 ; i dati sono presentati come media \pm SEM).

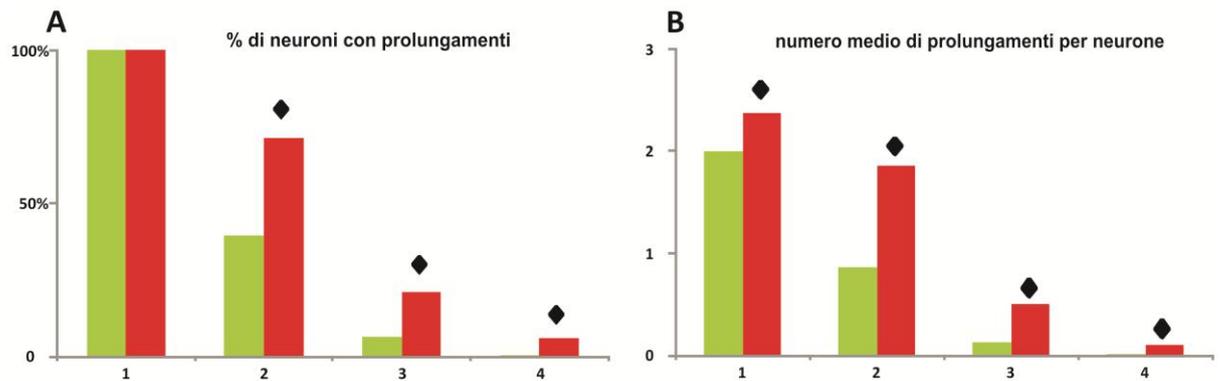


Grafico 4.1.2: percentuale di neuroni con prolungamenti (A) e numero medio di prolungamenti per neurone (B); in ascissa: 1 = prolungamenti primari, 2 = prolungamenti secondari, 3 = prolungamenti terziari, 4 = prolungamenti quaternari (verde CNTRL, $n = 478$; rosso E100nM, $n = 381$; ♦ = P value < 0.05).

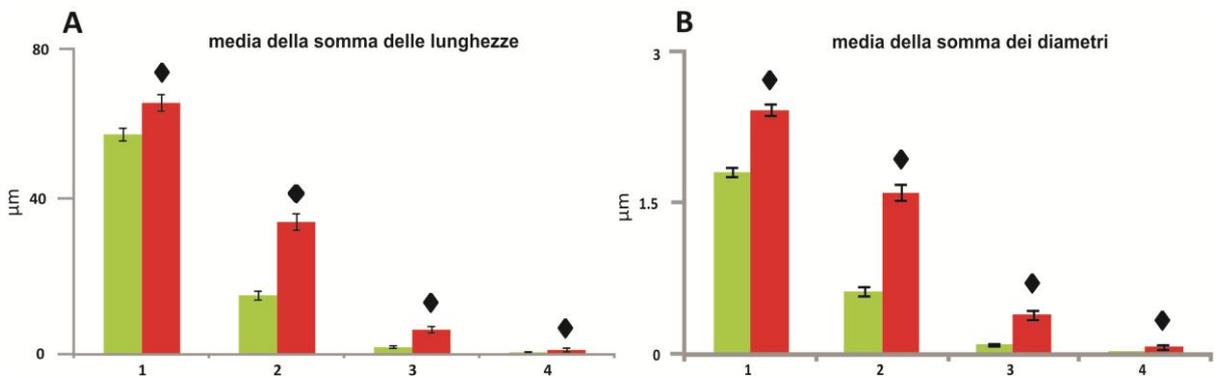


Grafico 4.1.3: media della somma delle lunghezze (A) e media della somma dei diametri (B) dei prolungamenti per neurone (verde CNTRL, $n = 478$; rosso E100nM, $n = 381$; ♦ = P value < 0.05 ; i dati sono presentati come media \pm SEM).

		1	2	3	4
Numero totale di prolungamenti contati	CNTRL	956	413	65	4
	E100nM	903	705	191	38
% di cellule con prolungamenti	CNTRL	100%	39.7%	6.4%	0.4%
	E100nM	100%	71.1% (*)	21.2% (*)	6% (*)
Numero di prolungamenti per neurone	CNTRL	2	0.86	0.13	0.008
	E100nM	2.4 (*)	1.85 (*)	0.5 (*)	0.99 (*)
Lunghezza media	CNTRL	29.2	17.8	11.1	6.4
	E100nM	28.2	19.1 (*)	13.4 (*)	13.7 (*)
Media della somma delle lunghezze	CNTRL	58.5	15.3	1.5	0.05
	E100nM	67.5 (*)	35.5 (*)	6.7 (*)	1.4 (*)
Diametro medio	CNTRL	0.89	0.72	0.65	0.53
	E100nM	1.01 (*)	0.84 (*)	0.8 (*)	0.73 (*)
Media della somma dei diametri	CNTRL	1.78	0.62	0.09	0.004
	E100nM	2.4 (*)	1.59 (*)	0.4 (*)	0.07 (*)

Tabella 4.1 riassunto dei dati statistici relativi ai prolungamenti primari (1), secondari (2), terziari (3) e quaternari (4) misurati in cellule di controllo (n = 478) ed in cellule trattate con E100nM (n = 381); () = P value < 0.05.*

Dopo il trattamento con E2 area (4.1.1 A) e perimetro (4.1.1 B) del soma dei neuroni crescono in maniera significativa rispettivamente del 12% e del 10% rispetto ai controlli.

Poiché nel modello sperimentale adottato ho scelto di misurare cellule che presentassero almeno un prolungamento, risulta scontato che il 100% di neuroni abbia almeno un prolungamento primario. Dai grafici, invece, appare evidente come l'E2 determini un forte effetto di arborizzazione nelle cellule in quanto sia la percentuale di cellule con prolungamenti 2, 3, 4 (4.1.2 A) sia il numero medio di prolungamenti per neurone (4.1.2 B) aumentano in maniera significativa. Dall'analisi è anche emerso che E2 accresce in maniera significativa sia la lunghezza media dei prolungamenti 2, 3, 4 (ma non di quelli 1) (vedi tabella 4.1) sia la media della somma delle lunghezze di tutti e quattro i tipi di prolungamento (4.1.3 A). Come per i valori della lunghezza, anche i valori relativi al diametro (sia il valore medio che la media della somma) risultano tutti aumentati dopo l'aggiunta dell'ormone (4.1.3 B). Complessivamente, da questa prima analisi effettuata confrontando la totalità delle cellule di controllo con quelle trattate possiamo concludere che l'E2 esercita un effetto trofico significativo sulle cellule incubate con l'ormone.

A questo punto, nonostante la bassa numerosità dei feti dei due sessi, ho condotto un'analisi preliminare cercando differenze nell'effetto esercitato dall'E2 tra i campioni di femmina ed in quelli di maschio. A questo scopo l'indagine statistica è stata stratificata secondo la variabile trattamento, per poter individuare il diverso comportamento dei campioni dello stesso sesso prima e dopo l'aggiunta dell'ormone e secondo la variabile sesso, in modo da poter analizzare separatamente le cellule ottenute da feti dei due sessi.

4.2 Confronto tra cellule neuronali di controllo e cellule trattate nei due sessi

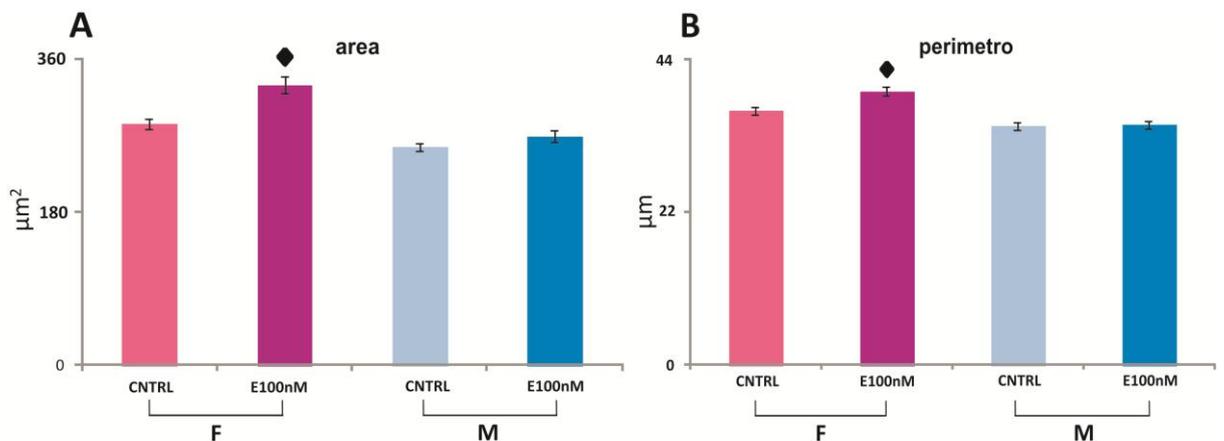


Grafico 4.2.1: : area media (A) e perimetro medio (B) del soma in neuroni di femmina (rosa chiaro CNTRL, $n = 249$; rosa scuro E100nM, $n = 213$;) e in neuroni di maschio (azzurro chiaro CNTRL, $n = 229$; blu E100nM, $n = 168$); $\blacklozenge = P \text{ value} < 0.05$; i dati sono presentati come media \pm SEM.

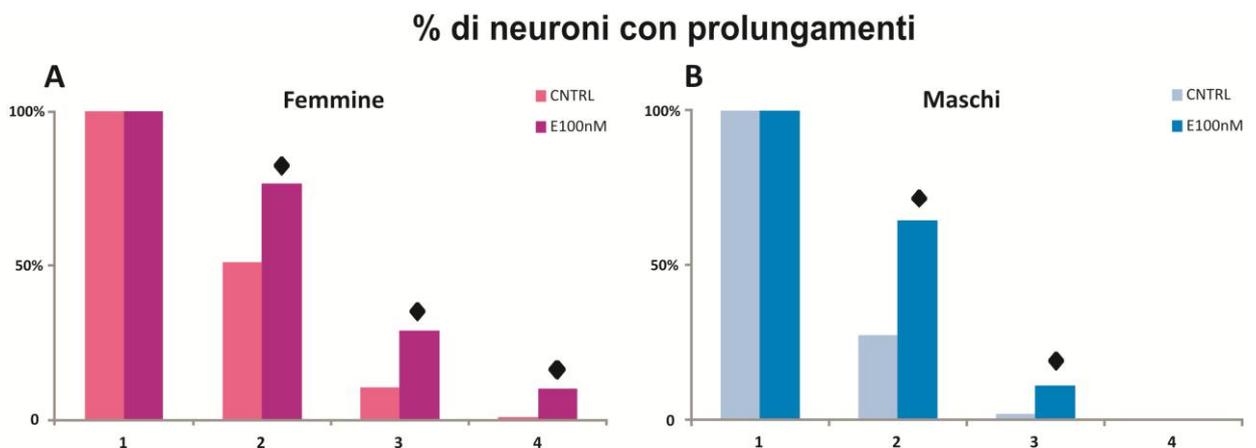


Grafico 4.2.2: percentuale di neuroni con prolungamenti in neuroni di femmina (rosa chiaro CNTRL, $n = 249$; rosa scuro E100nM, $n = 213$;) e in neuroni di maschio (azzurro chiaro CNTRL, $n = 229$; blu E100nM, $n = 168$); $\blacklozenge = P \text{ value} < 0.05$; i dati sono presentati come media \pm SEM.

numero medio di prolungamenti per neurone

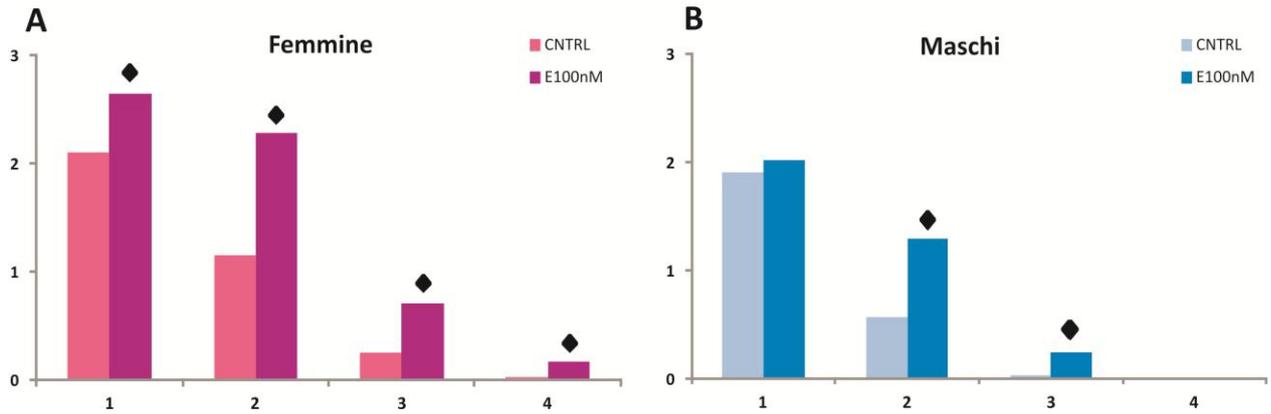


Grafico 4.2.3: numero medio di prolungamenti per neurone in neuroni di femmina (rosa chiaro CNTRL, $n = 249$; rosa scuro E100nM, $n = 213$;) e in neuroni di maschio (azzurro chiaro CNTRL, $n = 229$; blu E100nM, $n = 168$); $\blacklozenge = P \text{ value} < 0.05$; i dati sono presentati come media \pm SEM.

media della somma delle lunghezze

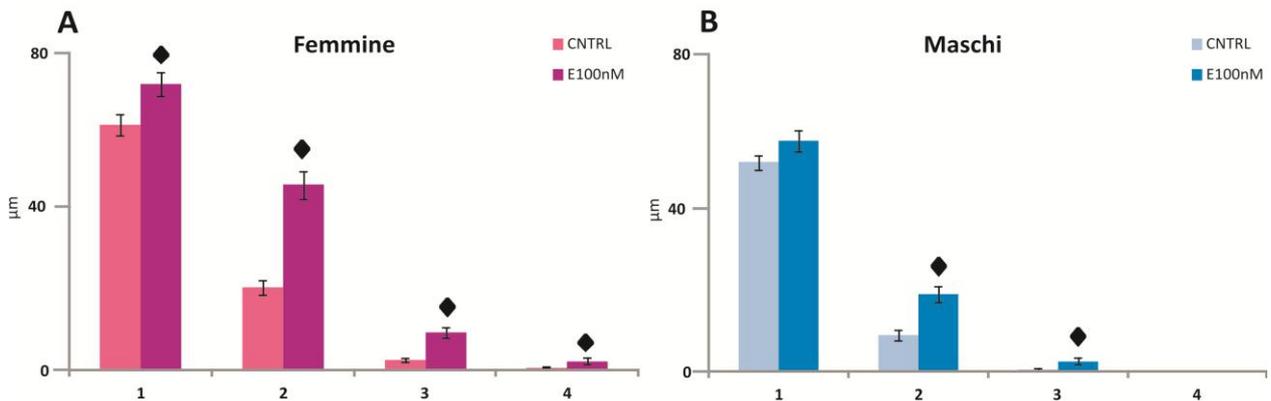


Grafico 4.2.4: media della somma delle lunghezze dei prolungamenti in neuroni di femmina (rosa chiaro CNTRL, $n = 249$; rosa scuro E100nM, $n = 213$;) e in neuroni di maschio (azzurro chiaro CNTRL, $n = 229$; blu E100nM, $n = 168$); $\blacklozenge = P \text{ value} < 0.05$; i dati sono presentati come media \pm SEM.

media della somma dei diametri

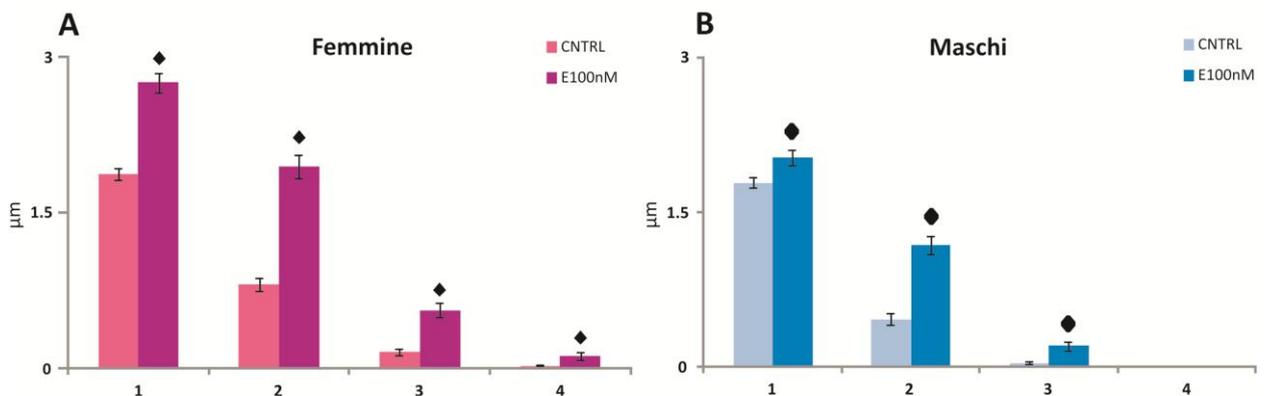


Grafico 4.2.5 (pagina precedente): media della somma dei diametri dei prolungamenti in neuroni di femmina (rosa chiaro CNTRL, n = 249; rosa scuro E100nM, n = 213;) e in neuroni di maschio (azzurro chiaro CNTRL, n = 229; blu E100nM, n = 168); ♦ = P value < 0.05; i dati sono presentati come media ± SEM.

			1	2	3	4
Numero totale di prolungamenti	CNTRL	F	518	283	58	4
		M	438	130	7	-
	E100nM	F	564	487	151	36
		M	339	218	40	0
% di cellule con prolungamenti	CNTRL	F	100	51	10.4	0.8
		M	100	27.5	2.1	-
	E100nM	F	100	76.5	29.1	10.3
		M	100	64.2	11.3	-
Numero medio di prolungamenti per neurone	CNTRL	F	2	1.1	0.2	0.01
		M	1.9	0.5	0.03	-
	E100nM	F	2.6	2.3	0.7	0.2
		M	2	1.3	0.2	-
Media della somma delle lunghezze	CNTRL	F	62.9	21.1	2.3	0.1
		M	53.9	9.6	0.67	-
	E100nM	F	73.8	47.8	9.8	2.4
		M	59.4	20	2.8	-
Lunghezza media dei prolungamenti	CNTRL	F	30,2	18.5	9.9	6.4
		M	28.1	16.8	22.2	-
	E100nM	F	27.9	20.9	13.8	14.1
		M	29.4	15.4	12	-
Media della somma dei diametri	CNTRL	F	1.8	0.8	0.15	0.08
		M	1.7	0.45	0.02	-
	E100nM	F	2.7	1.9	0.5	0.13
		M	2	1.2	0.2	-
Diametro medio dei prolungamenti	CNTRL	F	0.88	0.69	0.64	0.53
		M	0.91	0.78	0.77	-
	E100nM	F	1.01	0.84	0.79	0.73
		M	0.99	0.9	0.84	-

Tabella 4.1 riassunto dei dati statistici relativi ai prolungamenti primari (1), secondari (2), terziari (3) e quaternari (4) misurati in neuroni di femmina (controllo = 249, E100nM = 213) e di maschio (controllo = 229, E100nM = 168).

Area (4.2.1 A) e perimetro (4.2.1 B) del soma dei neuroni di femmina aumentano in maniera significativa dopo il trattamento rispettivamente del 16% e del 10%; nei neuroni di maschio, al contrario, area e perimetro rimangono inalterate dopo l'aggiunta dell'ormone.

Dai grafici 4.2.1, inoltre, si evince che l'area ed il perimetro del soma dei neuroni di controllo di femmina sono maggiori rispetto a quelli dei maschi rispettivamente del 10% e del 6%, condizione che si accentua dopo il trattamento con E2 (30% per l'area e 15% per il perimetro) in quanto, appunto, nei neuroni da feto di maschio area e perimetro non subiscono variazioni (vedi grafico 4.2.1).

Come per l'analisi effettuata nell'insieme complessivo di dati, dai valori presentati nei grafici 4.2.2 e 4.2.3, si osserva che l'E2 esercita un effetto trofico sia nelle cellule di femmina che in quelle di maschio, dal momento che sia la percentuale di cellule con prolungamenti, tanto quanto il numero medio di prolungamenti per singola cellula crescono in maniera significativa in entrambi i sessi.

Anche la media della somma delle lunghezze (4.2.4), esattamente come la media della somma dei diametri (4.2.5), aumentano in maniera significativa dopo l'aggiunta dell'E2 in entrambi i sessi.

Complessivamente da questa analisi si conclude che il trattamento con E2 produce un effetto trofico sia nei neuroni di femmina che in quelli di maschio, ma confrontando questo effetto nei due sessi emergono delle differenze significative (vedi discussione).

I dati relativi ai campioni di sesso femminile rispecchiano totalmente la statistica in cui sono stati esaminati i dati complessivi: tutti i parametri analizzati aumentano in maniera significativa dopo il trattamento con E2. Nelle cellule dei campioni di sesso maschile, invece, alcuni valori non subiscono variazioni dopo l'aggiunta dell'ormone (area, perimetro, somma lunghezza dei prolungamenti 1, numero di prolungamenti 4) o diminuiscono (lunghezza media dei prolungamenti 2 e 3).

Riassumendo questa seconda parte del lavoro, i risultati ottenuti dall'analisi morfologica su cellule neuronali primarie suggeriscono che, in seguito a trattamento a lungo termine con E2:

- 1) si osserva un effetto trofico sia in neuroni ottenuti da femmina che in neuroni ottenuti da maschio, in quanto la maggior parte dei parametri analizzati aumentano in modo significativo
- 2) esistono delle differenze morfologiche significative tra cellule di individui di sesso opposto, sia prima che dopo l'aggiunta dell'ormone (vedi discussione).

DISCUSSIONE

Il primo obiettivo di questa tesi era valutare l'effetto degli ormoni E2 e T nella regolazione dell'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} in una linea cellulare stabilizzata derivata da cervelletto di feto bovino. Lo ione Ca^{2+} è un secondo messaggero fondamentale nel regolare svariati processi fisiologici e metabolici all'interno della cellula ed è dimostrato che disfunzioni legate ad alterazioni nei flussi e nelle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare sono associate a diverse patologie.

Il protocollo applicato per ottenere una linea stabilizzata ha portato all'isolamento, a partire da una coltura primaria neurale mista, di una linea immortalizzata che ha mostrato, grazie alla positività agli anticorpi e-NOS e vWf, caratteristiche tipiche dell'endotelio vascolare. La ragione per cui abbiamo ottenuto una linea con queste caratteristiche potrebbe risiedere nel fatto che cellule endoteliali presentino una maggiore resa di trasfezione rispetto alle cellule neuronali. Una linea endoteliale immortalizzata presenta diversi vantaggi: per prima cosa cellule immortalizzate rappresentano dei cloni cellulari, in altre parole offrono la possibilità di usufruire indefinitamente di un modello sperimentale stabile e riproducibile; inoltre, questo tipo di cellula è facile da mantenere in coltura e presenta un'elevata resa di trasfezione, caratteristica fondamentale per i protocolli sperimentali da noi adottati.

Alla luce di queste considerazioni, riteniamo che la linea endoteliale CR10 isolata nel nostro laboratorio, si presti ad essere un ottimo modello di studio di cellula non eccitabile.

In letteratura diverse evidenze sperimentali sottolineano l'importanza del ruolo svolto dalle cellule dell'endotelio vascolare nel SNC. Queste cellule infatti ricoprono una funzione estremamente importante soprattutto nel mediare gli effetti degli ormoni steroidei sintetizzati a livello locale. Cellule endoteliali nelle arterie cerebrali infatti esprimono enzimi coinvolti nel metabolismo degli ormoni sessuali (Gonzales *et al.*, 2007). In aggiunta, un lavoro recentemente pubblicato da Krause *et al.* (2011) ha stabilito che gli stessi vasi sanguigni dell'encefalo possono essere influenzati dagli steroidi sessuali in modi differenti. Estrogeni ed androgeni possono alterare il tono e la funzionalità dell'endotelio vascolare, lo stress ossidativo e la risposta infiammatoria attraverso specifici recettori vascolari (Razmara *et al.*, 2008).

L'approccio metodologico scelto in questa prima parte del lavoro prevede il confronto di dati ricavati da cellule sottoposte a trattamento con gli ormoni E2 e T a diversi intervalli di tempo (incubazione a 8, 24 e 48 ore) rispetto a cellule non trattate (campioni di controllo). L'espressione transiente in cellule endoteliali immortalizzate di varie tipologie di Cameleons (sonde proteiche per il Ca^{2+} localizzate a diversi compartimenti subcellulari tramite appositi segnali di indirizzamento) ha permesso la misurazione delle variazioni delle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare; nel nostro modello sperimentale sono state utilizzate la sonda citosolica D3cpv, la sonda localizzata al reticolo endoplasmatico D1ER, la sonda mitocondriale 4mtD3cpv.

E' noto che gli ormoni steroidei (in particolare l'estradiolo) possono influenzare la fisiologia cellulare modulando l'omeostasi intracellulare dello ione Ca^{2+} in vari tipi cellulari (McCarthy, 2008). Ad esempio, l'E2 può regolare le funzioni dei mitocondri coordinando tra loro l'attività delle cellule neuronali ed endoteliali: è stato dimostrato che nell'endotelio vascolare un trattamento cronico con E2 porta ad un aumento della fosforilazione ossidativa e ad una diminuzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno. Inoltre l'E2 è in grado di facilitare l'utilizzo del glucosio ed in parallelo aumentare il sistema di difesa da radicali liberi per poter sostenere la vitalità stessa delle cellule neuronali (Brinton, 2008; Duckles *et al.*, 2006). Moreira *et al.* (2011) hanno valutato e comparato gli effetti del trattamento con E2 sul metabolismo bioenergetico ed ossidativo di mitocondri di fegato, cuore e cervello isolati da femmine di ratto ovariectomizzate dimostrando che gli effetti provocati dall'ormone sono tessuto specifici. L'E2 mostra effetti positivi sui mitocondri di encefalo, supportando l'idea che gli estrogeni hanno un ruolo nel sostenere l'integrità dei neuroni e nel prevenire malattie neurodegenerative legate a disfunzioni mitocondriali. Al contrario gli estrogeni diminuiscono in maniera significativa l'efficienza di fosforilazione di mitocondri di cuore e diminuisce in maniera significativa la capacità sia del fegato che del cuore di accumulare Ca^{2+} . Altre evidenze sperimentali dimostrano che gli ormoni steroidei alterano la concentrazione intracellulare del Ca^{2+} , agendo sull'espressione o sull'attività della pompa PMCA (Dick *et al.*, 2003) o sulla concentrazione di Ca^{2+} nel RE (Thor *et al.*, 2010). L'E2 può anche regolare l'espressione dell'mRNA dei canali Ca^{2+} T-type nell'ipofisi di femmine ovariectomizzate di *Cavia porcellus* (Qiu *et al.*, 2006). Lavori pubblicati da altri autori (Kirkwood *et al.*, 1996) hanno messo in luce come l'E2 possa

alterare l'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare modulando l'espressione degli IP_3R o regolando l'attività di pompe citosoliche o di reticolo tramite un aumento della loro espressione (Liu *et al.*, 2007). Più in dettaglio, in quest'ultimo lavoro gli autori hanno dimostrato che l'incubazione con E2 (a concentrazioni di 1 e 100nM) di cellule H9C2 aumenta l'attività e l'espressione di due delle proteine chiave per il mantenimento dell'equilibrio osmotico all'interno della cellula: la Na^+/K^+ -ATPasi, una proteina multifunzionale coinvolta nelle vie metaboliche della fosfatidilinositol-3-chinasi (PI3K) e della Src-chinasi, e la SERCA, deputata al ripristino del contenuto di Ca^{2+} del RE.

Sebbene gli "effetti veloci" degli ormoni steroidei possono essere implicati in fenomeni di regolazione dei flussi intracellulari di Ca^{2+} , in questo lavoro di tesi mi sono focalizzato nel caratterizzare la risposta cellulare genomica (dato che una risposta significativa appare evidente dopo 48 ore) indotta da E2 e T nella regolazione dei flussi dello ione Ca^{2+} in una linea cellulare endoteliale stabilizzata.

I dati sperimentali che abbiamo raccolto dimostrano che il trattamento con T non altera le quantità di Ca^{2+} in nessuno dei tre compartimenti analizzati. Allo stesso modo i flussi citosolici e la quantità di Ca^{2+} nel reticolo in cellule incubate con E2 rimangono inalterate. L'assenza di variazioni statisticamente significative indotte da E2 nei meccanismi coinvolti nell'omeostasi del Ca^{2+} in citosol e in reticolo differisce da quanto riportato nel lavoro di Liu *et al.* (2007) precedentemente menzionato. La mancanza di un effetto nei nostri esperimenti in questi due compartimenti potrebbe essere spiegata considerando gli effetti tessuto-specifici degli steroidi nei processi cellulari o nei processi di trasduzione del segnale (Murphy *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 1986).

Da ultimo, abbiamo analizzato l'effetto dell' E2 nei mitocondri, organelli subcellulari molto importanti nella modulazione non solo dell'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} , ma anche di svariati altri processi fisiologici come, ad esempio, l'apoptosi o la neuroprotezione mediata dagli steroidi (Simpkins *et al.*, 2005). A questo scopo abbiamo utilizzato la sonda 4mtD3cpv e, contrariamente da quello che avviene nel citosol e nel RE i risultati indicano una diminuzione significativa della quantità di Ca^{2+} accumulata all'interno della matrice in cellule incubate con E2 per 48 ore. Per le cellule trattate a 8 e 24 ore non abbiamo invece riscontrato alcuna variazione (figura 25).

In letteratura, è stato riportato che alterazioni nei flussi mitocondriali di Ca^{2+} sono coinvolte non solo nella modulazione dell'attività metabolica dell'organello (si ricordi che le proteine piruvato, isocitrato e α -chetoglutarato deidrogenasi possono venire attivate dal Ca^{2+}) ma svolgono anche un effetto protettivo antiapoptotico (Scorrano *et al.*, 2003), che potrebbe essere implicato sia nell'eziologia di malattie neurodegenerative (come morbo di Parkinson e morbo di Alzheimer) (Simpkins *et al.*, 2005) ma anche nello sviluppo e nel differenziamento dell'encefalo in via di sviluppo.

Alla luce di questi risultati ho deciso di approfondire l'effetto dell'E2 sulla regolazione dell'omeostasi mitocondriale per caratterizzare nel modo più dettagliato possibile le conseguenze che potrebbero insorgere dalla diminuzione di Ca^{2+} misurata all'interno della matrice nel modello sperimentale che ho adottato. E' infatti largamente riconosciuto che questi organelli svolgono un ruolo di primaria importanza nel benessere fisiologico dell'intera cellula, attraverso una modulazione delle variazioni dei flussi citosolici dello ione ed agendo come *buffers* per il Ca^{2+} (Berridge *et al.*, 2003; Rizzuto *et al.*, 1993); disfunzioni nel corretto *uptake* di Ca^{2+} mitocondriale possono difatti causare danni cellulari significativi.

Per verificare il coinvolgimento dei recettori degli estrogeni sulla regolazione del Ca^{2+} mitocondriale, le cellule sono state incubate con E2 10nM in presenza ed assenza dell'antagonista degli ER ICI 182,780. La diminuzione di calcio registrata al picco in seguito a stimolazione con ATP (vedi figura 25b) è stata annullata da questo specifico antagonista, confermando che l'azione dell'E2 è mediata dall'attivazione delle isoforme dei suoi recettori. La concentrazione di ICI 182,780 (10nM) che ha annullato l'effetto dell'ormone non ha invece alterato la regolazione dei flussi mitocondriali di Ca^{2+} nei campioni non trattati con E2.

Dove gli effetti degli estrogeni sono mediati dai propri recettori, possono essere presi in considerazione eventuali eventi di saturazione del recettore. Per esaminare ulteriormente questo aspetto abbiamo testato altre due concentrazioni di E2 (1nM and 100nM): abbiamo constatato che questi due trattamenti producono effetti simili alla prima concentrazione testata, provocando anch'essi una diminuzione dei picchi di Ca^{2+} misurati dopo stimolazione. Tuttavia, sebbene in tutti e tre i casi si osservi una significativa diminuzione della quantità di calcio rispetto ai controlli, tra le tre concentrazioni testate non c'è differenza di valore nell'effetto provocato sui trattati; si

può pertanto ipotizzare di essere in presenza di saturazione del recettore già alla concentrazione 1nM.

Poiché la struttura e la distribuzione dei mitocondri all'interno della cellula possono influire sulla loro funzionalità e sulla capacità di regolare il Ca^{2+} intracellulare (Rizzuto *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2003), abbiamo ipotizzato che potesse esistere una correlazione tra la morfologia mitocondriale o la distribuzione intracellulare di questi organelli con l'abbassamento della quantità di Ca^{2+} mitocondriale registrata all'interno della matrice. I mitocondri sono strutture dinamiche tubulari ampiamente interconnesse tra di loro all'interno della cellula (Rizzuto *et al.*, 2009) e la loro morfologia è mantenuta grazie all'azione di molte proteine coinvolte nei processi di fusione e fissione mitocondriale (Dimmer *and* Scorrano, 2006; Campello *and* Scorrano, 2010). L'utilizzo di sonde fluorescenti per il Ca^{2+} indirizzate ai mitocondri ci ha permesso di monitorare sia la morfologia che la distribuzione dei mitocondri all'interno della cellula. Da una prima analisi di tipo qualitativo, nel nostro modello sperimentale il trattamento con E2 non sembra causare ri-arrangiamenti evidenti né sulla morfologia né sulla distribuzione di questi organelli (dati non mostrati). Tuttavia per poter confermare questa osservazione sarebbe indicata un'analisi di *imaging* più approfondita.

Moro *et al.* (2010) hanno recentemente riportato che la mancanza di estrogeni può influenzare le proprietà funzionali di mitocondri di fegato di topo, in particolar modo attraverso una modulazione del poro di transizione di permeabilità (PTP). Abbiamo di conseguenza ipotizzato che le alterazioni del flusso di Ca^{2+} osservate a livello dei mitocondri potessero coinvolgere il PTP. Per verificare quest'ipotesi abbiamo effettuato esperimenti utilizzando la ciclosporina A (CsA), uno specifico inibitore del PTP mitocondriale in grado di legarsi alla molecola chaperone di matrice ciclofilina-D, una peptidil-prolil isomerasi in grado di modulare l'apertura di questo complesso proteico (Rasola *et al.*, 2010). Se effettivamente il trattamento con E2 causa un aumento del flusso di Ca^{2+} in uscita dal mitocondrio, possiamo attenderci una maggiore quantità di Ca^{2+} nei campioni trattati con E2 a cui è stata aggiunta la CsA, rispetto ai campioni trattati con E2 dove l'inibitore non viene somministrato. Effettivamente i risultati sperimentali che abbiamo raccolto confermano proprio questa ipotesi: la CsA è stata in grado di invertire l'effetto dell'E2, riportando i valori dei trattati a quelli dei controlli e

suggerendo che l'ormone possa svolgere un ruolo chiave nel processo di transizione di permeabilità mitocondriale (PTPM).

E' ampiamente risaputo che il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) è cruciale per mantenere la vitalità cellulare. Una caduta nel $\Delta\Psi_m$ pregiudica la funzionalità della catena respiratoria compromettendo il metabolismo energetico della cellula. Di conseguenza per verificare lo stato funzionale dei mitocondri abbiamo misurato il potenziale di membrana mitocondriale con la sonda TMRM. La depolarizzazione della membrana interna mitocondriale innescata dall'aggiunta del protonoforo FCCP causa la fuoriuscita della sonda non raziometrica dal mitocondrio, determinando una diminuzione nell'intensità di fluorescenza. I nostri risultati indicano che non avviene alcun cambiamento statisticamente significativo nel $\Delta\Psi_m$ in cellule trattate con E2 rispetto a cellule di controllo. Prove sperimentali riportate nel lavoro di Petronilli *et al.* (2001) dimostrano che quando l'apertura del PTP è transiente il potenziale di membrana mitocondriale viene mantenuto inalterato. Dati presentati da Dumas *et al.* (2009) evidenziano, infatti, come l'apertura del PTP in cellule integre può portare o meno a depolarizzazione mitocondriale in base alla durata stessa in cui il PTP si trova nella conformazione aperta.

Alla luce dei risultati che abbiamo discusso in questa prima parte del lavoro, possiamo asserire che, nella nostra linea cellulare endoteliale immortalizzata, l'effetto esercitato dall'E2 può influenzare l'apertura del PTP senza causare una perdita nel potenziale di membrana mitocondriale.

Questi dati sono in accordo con quelli presentati da Moreira *et al.* (2011), i quali dimostrano che avviene una diminuzione nella capacità di mitocondri di cuore e fegato di accumulare Ca^{2+} a causa di una maggiore durata nella conformazione aperta del PTP. Inoltre Moro *et al.* (2010) hanno trovato che in mitocondri isolati di topo la mancanza di estrogeni inibisce il processo di transizione di permeabilità mitocondriale e che la somministrazione di E2 ristabilisce questo processo.

In conclusione, i dati presentati suggeriscono fortemente che l'E2 è coinvolto nella regolazione del poro di transizione di permeabilità mitocondriale e che, probabilmente, l'effetto genomico osservato è associato all'espressione di proteine che modulano l'apertura del PTP. E' stato dimostrato che l'E2 può influenzare l'espressione di numerose proteine che interagiscono con i mitocondri, di molecole regolatrici e di

componenti stessi del PTP come le proteine antiapoptotiche Bcl-2 (Fan *et al.*, 2008; Moro *et al.*, 2010; Zhi *et al.*, 2007) e le proteine *adenine-nucleotide-translocator* (Too *et al.*, 1999; Moro *et al.*, 2010). Se nel nostro modello sperimentale la modulazione dell'E2 sull'apertura del PTP possa avere un ruolo nell'attivazione dei processi pro-apoptotici rimane da verificare con ulteriori indagini.

Per approfondire ulteriormente gli effetti dell'E2 sul flusso di Ca^{2+} in uscita dai mitocondri potrebbe essere interessante effettuare esperimenti sui profili d'espressione delle proteine coinvolte nella modulazione del PTP, allo scopo di comprendere l'effettivo meccanismo molecolare tramite cui l'E2 influenza il PTPM attraverso la regolazione dell'apertura del PTP.

Per rafforzare ulteriormente questi risultati, sarà interessante anche verificare se il trattamento con E2 possa alterare o meno il flusso in entrata nei mitocondri. Anche in questo caso si potrebbe verificare questa ipotesi analizzando l'espressione genica o l'attività delle proteine responsabili del flusso in entrata nei mitocondri (come ad esempio l'uniporto mitocondriale), o delle molecole in grado di modulare la loro espressione o la loro attività, come ad esempio le PKC β , PKC δ , PKC ζ . (Pinton *et al.*, 2004).

In questo elaborato ho già più volte citato gli effetti che gli ormoni steroidei producono in svariati processi fisiologici e metabolici (dalla regolazione dello sviluppo sessuale e riproduttivo dell'individuo, alla sopravvivenza cellulare e la prevenzione dell'apoptosi, etc). In questo secondo filone di ricerca portato avanti durante la mia esperienza di dottorato, ho voluto studiare l'effetto trofico che l'ormone E2 esercita sulle cellule nervose misurando la crescita del soma e lo sviluppo delle arborizzazioni dendritiche su colture primarie di neuroni di cervelletto bovino.

Nelle fasi precoci dello sviluppo embrionale, i neuroni non ancora sviluppati presentano sulla loro superficie forme immature di protrusioni cellulari denominate filopodi, i quali possiedono un'elevata motilità strutturale basata sull'actina. Si ritiene che questa caratteristica sia la strategia evoluta dalle cellule per cercare adeguati partner presinaptici allo scopo di creare contatti che durante lo sviluppo porteranno alla formazione di circuiti neurali stabili; è stato infatti sperimentalmente provato (Cooper *and* Smith, 1992) che in neuroni di ippocampo, a mano a mano che si sviluppano le

sinapsi mature, diminuisce il numero di filopodi ed aumenta il numero delle spine dendritiche.

Gli effetti esercitati dagli ormoni steroidei sulle cellule nervose sono molteplici, talvolta opposti, e variano a seconda del tipo cellulare e dalla regione del SNC considerati. Le alterazioni nella morfologia cellulare che avvengono nei primi stadi dello sviluppo embrionale sono considerate la fonte della plasticità neuronale e sono associate all'apprendimento e alla memoria. Anomalie presenti nei dendriti e nelle spine di cellule mature sono state riscontrate in numerose patologie nell'uomo, tra cui il ritardo mentale, l'epilessia ed alcuni disturbi neurodegenerativi (Shimada *et al.*, 1998). Studiare la funzione esercitata dai neurosteroidi nel dirigere lo sviluppo e l'organizzazione strutturale nel SNC immaturo potrebbe svelare le conseguenze fisiologiche e patologiche che assumeranno questi assetti morfologici nel corso della vita di un individuo. Inoltre, analizzare dettagliatamente questi processi biologici precoci chiarirebbe come la plasticità neuronale sia legata alla plasticità nel comportamento (de Lacalle, 2006).

Tra i fattori che possono influenzare l'ontogenesi dendritica sono compresi la composizione della matrice extracellulare, i fattori di crescita e gli ormoni. E' stato dimostrato che proprio l'E2 produce un effetto trofico sulle cellule nervose in via di sviluppo e configura la morfologia dell'encefalo regolando lo sviluppo dei dendriti tramite la crescita e lo sviluppo dei filopodi (Shimada *et al.*, 1998). Tuttavia, l'effetto esercitato dagli estrogeni sullo sviluppo e sulla maturazione delle arborizzazioni dendritiche nelle fasi precoci dello sviluppo embrionale è stato scarsamente investigato. Allo stesso modo, l'area del cervelletto è stata spesso posta in secondo piano per privilegiare gli studi delle classiche zone dell'encefalo che esibiscono un marcato dimorfismo sessuale. Come già citato in precedenza, in letteratura la maggior parte dei lavori sono incentrati sul ruolo che l'E2 esercita in zone come l'ipotalamo (la principale area dimorfica del SNC), l'ippocampo e la corteccia (de Lacalle, 2006; Peruffo *et al.*, 2011).

Il cervelletto regola numerosi processi cognitivi e controlla diverse funzioni vitali per un organismo, come l'equilibrio, la postura e la coordinazione motoria. In questa regione del SNC i neurosteroidi, ed in particolar modo l'E2 tramite l'azione dell'enzima P450arom, vengono prodotti localmente e lo sviluppo cellulare viene influenzato dal

loro effetto (Tsutsui, 2008). Gli ormoni steroidei possono regolare il differenziamento sessuale del SNC in via di sviluppo determinando differenze volumetriche macroscopiche di intere strutture o di intere regioni del SNC oppure differenze microscopiche osservabili nella morfometria di singole cellule. La presenza di aree dimorfiche nel cervelletto è un argomento controverso. La maggior parte delle prove sperimentali presenti in letteratura suggeriscono che il cervelletto sia una struttura monomorfica. Tuttavia, alcuni lavori hanno dimostrato che in quest'area esistono differenze strutturali e fisiologiche legate al sesso degli individui: differenze volumetriche nella materia grigia di alcune zone del cervelletto tra individui di sesso opposto nella popolazione cinese (Fan *et al.*, 2010), e profili di espressione dimorfici, sia di mRNA che di proteine espresse, per la proteina calbindina nelle cellule del Purkinje in colture da cervelletto di topo attribuibili ai geni presenti nei cromosomi sessuali (Abel *et al.*, 2011). Inoltre, nella specie umana, patologie determinate da disfunzioni cerebellari (come l'autismo e la schizofrenia) hanno un'incidenza molto diversa nei maschi e nelle femmine (Andreassen *and* Black, 2001; Keller *et al.*, 2003).

Per nostra conoscenza, non sono ancora stati presi in esame gli effetti trofici dell'ormone E2 in cellule neuronali di cervelletto di feto bovino: questo è il primo lavoro che analizza il ruolo dell'E2 nel promuovere la crescita cellulare e lo sviluppo delle arborizzazioni dendritiche nelle fasi precoci dello sviluppo morfologico in questa specie.

Per questa ricerca ho utilizzato come modello sperimentale cellule neuronali primarie derivate da cervelletti di feti di bovino di entrambi i sessi. Abbiamo selezionato due individui di sesso maschile e due individui di sesso femminile di età 3 mesi in quanto, nella specie *Bos taurus*, questa finestra temporale rappresenta un periodo critico in cui gli ormoni steroidei svolgono un ruolo chiave nello sviluppo di altre zone del SNC come ad esempio l'ipotalamo (Peruffo *et al.*, 2011).

Per evidenziare le alterazioni nella morfologia cellulare indotte dal trattamento ormonale ho effettuato esperimenti di immunocitochimica in fluorescenza usando uno specifico anticorpo diretto contro la β III tubulina, un *marker* ideale per neuroni immaturi.

Poiché dalla letteratura risulta che in neuroni embrionali di cervelletto di topo (Gottfried-Blackmore *et al.*, 2007) la concentrazione 10nM somministrata per 24 ore

non è risultata sufficiente a stimolare la maturazione delle cellule abbiamo deciso di somministrare una dose ormonale superiore (100nM), concentrazione altrettanto comunemente impiegata per colture neuronali *in vitro*. L'incubazione per 120 ore è stata invece necessaria affinché le cellule del nostro modello *in vitro* potessero stabilizzarsi, differenziarsi e sviluppare i processi dendritici.

Dall'analisi effettuata confrontando la totalità delle cellule di controllo con quelle trattate con l'ormone, si è visto che l'E2 esercita un effetto trofico significativo sui neuroni del nostro modello sperimentale, in quanto aumentano in maniera significativa tutti i parametri misurati: l'area ed il perimetro del soma, la percentuale di cellule che sviluppano prolungamenti, il numero medio di prolungamenti per neurone, la media della somma delle lunghezze e dei diametri dei prolungamenti, così come la loro lunghezza media ed il loro diametro medio.

Sebbene la numerosità dei feti analizzati (due feti di sesso femminile e due di sesso maschile) sia piuttosto bassa, per caratterizzare in maniera più approfondita il risultato del trattamento ormonale su questo modello cellulare *in vitro*, ho condotto un'analisi statistica esaminando separatamente l'effetto dell'E2 in individui dello stesso sesso e tra i due sessi.

I risultati di questa indagine preliminare (che necessiterà in futuro un incremento del numero di individui analizzati) suggeriscono che l'effetto trofico sia più marcato nelle femmine rispetto ai maschi. Infatti, dai campioni di sesso femminile si osserva che tutti i parametri analizzati si accrescano in maniera significativa, rispecchiando fedelmente i risultati osservati nella statistica complessiva; al contrario, nei campioni di sesso maschile l'effetto trofico è limitato solo ad alcuni parametri.

Confrontando le cellule di femmina con quelle di maschio prima della somministrazione dell'E2 (condizione di controllo che rispecchia lo stato "naturale" delle cellule) emergono in maniera evidente delle differenze significative nel tasso di arborizzazione cellulare e nelle dimensioni del soma. I campioni di controllo delle femmine presentano sia una maggiore percentuale di cellule che sviluppano prolungamenti 2, 3 e 4, sia un maggior numero medio di prolungamenti per cellula, condizione che si mantiene anche dopo l'aggiunta dell'E2. Da rilevare che le cellule di controllo da feto di maschio hanno pochissimi prolungamenti 3 rispetto alle femmine (7 contro 58) e non sviluppano prolungamenti 4 né prima né dopo l'incubazione con ormone. Come poc'anzi

accennato, anche le dimensioni del soma dei neuroni (sia l'area che il perimetro) risultano maggiori nelle cellule di controllo di femmina, condizione che viene mantenuta anche dopo l'incubazione con E2 in quanto nelle cellule di maschio non si osserva alcuna variazione.

La media della somma delle lunghezze e la media della somma dei diametri sono due parametri che offrono un dato preciso sull'effetto trofico esercitato dall'ormone sullo sviluppo dei prolungamenti dendritici, in quanto considerano contemporaneamente i valori della lunghezza o del diametro dei prolungamenti rispetto al numero di prolungamenti contati in una cellula. Entrambi i parametri aumentano in maniera significativa dopo l'aggiunta dell'E2 in entrambi i sessi, rafforzando i dati osservati in precedenza che suggeriscono che l'E2 produca un effetto trofico in entrambi i sessi. Coerentemente con le differenze tra maschi e femmine relative al numero medio dei prolungamenti per cellula, i neuroni femminili mostrano sempre valori maggiori rispetto a quelli dei maschi in ogni categoria di prolungamenti sia nei controlli che nei trattati.

Tuttavia, analizzando in dettaglio i valori relativi alla somma delle lunghezze e dei diametri bisogna registrare alcune discrepanze tra le cellule di controllo relative ai valori di lunghezza media e di diametro medio (risultati, tabella 4.2). Nei campioni di sesso femminile la lunghezza media dei prolungamenti 2, 3, 4 (ma non di quelli 1) ed il diametro medio di tutti i prolungamenti aumentano dopo il trattamento. Nelle cellule di maschio, invece, mentre il diametro medio di tutti i prolungamenti aumenta dopo l'incubazione con E2, la lunghezza media dei prolungamenti 2 e 3 diminuisce in maniera significativa (tabella 4.2). La differenza tra la lunghezza media dei prolungamenti 1 prima e dopo il trattamento invece non è risultata alterata. Inoltre, mentre la lunghezza media dei prolungamenti 2 risulta maggiore nella femmina, la lunghezza media dei prolungamenti 3, come pure il diametro medio dei prolungamenti 2 e 3 risultano maggiori nelle cellule da maschio.

Relativamente ai prolungamenti 3 bisogna però, come già detto in precedenza, tener conto delle forti differenze di numerosità tra i campioni di sesso opposto (risultati, tabella 4.2): nelle femmine sono stati contati 58 prolungamenti terziari, mentre nel maschio solo 7 e questa differenza potrebbe condurre a conclusioni non corrette. Infatti, dopo l'aggiunta dell'E2 la lunghezza media dei prolungamenti 2, 3 e 4 risulta nuovamente maggiore nelle cellule da feto di femmina; ciò non avviene confrontando

invece i valori del diametro medio dei prolungamenti 2 e 3, che rimane maggiore nei neuroni ottenuti da colture di maschi, consolidando il dato statistico osservato nelle cellule di controllo.

Alla luce di questi dati preliminari, raccolti avendo a disposizione solo 4 individui, possiamo concludere che un incubazione per 120 ore con E100nM produce un effetto trofico sul soma e sulle arborizzazioni dendritiche di neuroni di cervelletto di feto bovino, ma con risultati diversi nelle femmine (nelle quali l'effetto apparirebbe più marcato) rispetto ai maschi. Come più volte menzionato in questa tesi, diversi lavori suggeriscono la presenza di zone e caratteri dimorfici nel cervelletto, sia da un punto di vista strutturale (Fan *et al.*, 2010) sia da un punto di vista fisiologico (Abel *et al.*, 2011). Nell'insieme, le osservazioni sperimentali presentate in questo lavoro sembrano indicare che, in questo stadio dello sviluppo embrionale, neuroni di sesso opposto, prima dell'incubazione con E2, presentano una morfologia cellulare differente e che questa condizione è mantenuta anche dopo il trattamento. Possiamo di conseguenza ipotizzare che, in questa fase dello sviluppo embrionale nella specie *Bos taurus*, possa esistere nella morfologia dei neuroni in quest'area del SNC in via di sviluppo un dimorfismo sessuale. Questo dato preliminare dovrà essere confermato per prima cosa aumentando la numerosità degli individui analizzati, quindi effettuando lo stesso tipo di indagine in feti di età diversa e in individui di diverse età post-natali.

BIBLIOGRAFIA

Andreasen N.C. and Black D.W. (2001). Introductory textbook of psychiatry. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc. Vol. 3.

Abel J.M., Witt D.M. and Rissman E.F. (2011) Sex Differences in the Cerebellum and Frontal Cortex: Roles of Estrogen Receptor Alpha and Sex Chromosome Genes. *Neuroendocrinology* 93(4): 230–240.

Acconcia F. and Kumar R. (2005). Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Letters*; 20: 1-14.

Arnal J.F., Fontaine C, Billon-Galés A., Favre J., Laurell H., Lenfant F., Gourdy P. (2010). Estrogen receptors and endothelium. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*; 30: 1506–1512.

Arpini M., Castro Menezes I., Dall'Oglio A., Rasia-Filho A. (2010). The density of Golgi-impregnated dendritic spines from adult rat posterodorsal medial amygdala neurons displays no evidence of hemispheric or dorsal/ventral differences. *Neuroscience Letters*; 469: 209–213.

Basso D., Pesarin F., Salmaso L., Solari A. (2009). *Permutation tests for stochastic ordering and ANOVA: theory and applications with R*. Springer; Heidelberg.

Bernardi P. (1999). Mitochondria in muscle cell death. *Italian Journal of Neurological Science*, 20: 395-400

Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Molecular Cell Biology*; 4: 517-529.

- Beyer, C., Tramonte, R., Hutchinson, R. E., Sharp, P. J., Barker, P. J., Huskisson, N. S., Hutchinson, J. B. (1994). Aromatase-immunoreactive neurons in the adult female chicken brain detected using a specific antibody. *Brain Research Bulletin*; 33: 583-588.
- Beyer C. (1999). Estrogen and the developing of mammalian brain. *Anatomy and embryology*; 199: 379-390.
- Beyer C., Pawlak J., Karolczak M. (2003). Membrane receptors for oestrogen in the brain. *Neurochemistry*; 87: 545-550.
- Blose S.H., Meltzer D.I. (1981). Visualization of the 10-nm filament vimentin rings in vascular endothelial cells in situ: close resemblance to vimentin cytoskeletons found in monolayers in vitro. *Experimental Cell Research*; 135: 299–309.
- Brinton R.D. (2008). Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: therapeutic implications for prevention of Alzheimer’s disease. *Advance Drug Delivery Review*; 60: 1504–1511.
- Campello S., Scorrano L. (2010). Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Reports*; 11: 678–684.
- Carafoli E. (1992). The Ca^{2+} Pump of the Plasma Membrane. *The Journal of biological chemistry*; 267: 2115-2118.
- Carrer H.F., Cambiasso M.J, Gorosito S. (2005). Effects of estrogen on neuronal growth and differentiation. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 93: 319–323.
- Clapham D.E. (2009). A stimulus Package Puts Orai Calcium Channels to Work. *Cell*; 136: 814-816.
- Conley A., Hinshelwood M. (2001). Mammalian aromatase. *Reproduction*; 121: 685-695.

Cooper M.W. and Smith S.J. (1992). A real-time analysis of growth cone target cell interactions during the formation of stable contacts between hippocampal neurons in culture. *Journal of Neurobiology*; 23: 814-828.

Da Silva C. and Guse A.H., (2000). Intracellular Ca²⁺ release mechanism: multiple pathways having multiple functions within the same cell type? *Biochimica et Biophysica Acta*; 1498: 122-133.

Dean S.L. and McCarthy M. (2008). Steroids, sex and the cerebellar cortex: implications for human disease. *Cerebellum*; 7(1): 38–47.

de Lacalle S. (2006). Estrogen Effects on Neuronal Morphology. *Endocrine*; 29 n° 2: 185–190.

Dick I.M., Liu J., Glendenning P., Prince R.L. (2003). Estrogen and androgen regulation of plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 212: 11-18.

Dimmer K.S. and Scorrano L. (2006). (De)constructing mitochondria: what for? *Physiology*; 21: 233–241.

Duckles S.P., Krause D.N., Stirone C., Procaccio V. (2006) Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Molecular Interventions*; 6: 26–35.

Dumas J.F., Argaud L., Cottet-Rousselle C., Vial G., Gonzalez C., Detaille D., Leverve X., Fontaine E. (2009). Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells. *The Journal of Biological Chemistry*; 284: 15117–15125.

Er F., Michels G., Brandt M.C., Khan I., Haase H., Eicks M., Lindner M. and Hoppe U.C. (2007). Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell calcium*; 41: 467-477.

Fan L., Pandey S.C., Cohen R.S. (2008). Estrogen affects levels of Bcl-2 protein and mRNA in medial amygdala of ovariectomized rats. *The Journal of Neuroscience Research*; 86: 3655–3664.

Fan L., Tang Y., Sun B., Gong G., Chen Z.J., Lin X., Yu T., Li Z., Evans A.C., Liu S. (2010) Sexual dimorphism and asymmetry in human cerebellum: An MRI-based morphometric study. *Brainresearch*, 1353: 60-73.

Fasolato C., Innocenti B. and Pozzan, T. (1994). Receptor-activated Ca²⁺ influx: how many mechanism for how many channels? *Trends in Pharmacological Sciences*; 15: 77-82.

Filippin L., Magalhaes P.J., Di Benedetto G., Coltella M. and Pozzan, T. (2003). Stable interactions between mitochondria and endoplasmatic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*; 278: 39224-39234.

Giacomello M., Drago I., Pizzo P. and Pozzan, T. (2007). Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death and Differentiation*; 14: 1267-1274.

Giretti M.S., Simoncini T. (2008). Rapid regulatory actions of sex steroids on cell movement through the actin cytoskeleton. *Steroids*; 73: 895–900.

Gonzales R.J., Ansar S., Duckles S.P., Krause D.N. (2007). Androgenic/estrogenic balance in the male rat cerebral circulation: metabolic enzymes and sex steroid receptors. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*; 27: 1841–1852.

Gottfried-Blackmore A., Croft G., Clark J., McEwen B.S., Peter H. JellincK P.H., Bulloch K. (2007). Characterization of a cerebellar granule progenitor cell line, EtC.1, and its responsiveness to 17-β-estradiol. *Brain Research*; 1186: 29-40.

Gu Y., Preston M.R., Magnay J., El Haj A. J. and Publicover S.J. (2001). Hormonally-Regulated Expression of Voltage-Operated Ca²⁺ Channels in Osteocytic (MLO-Y4) Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 282: 536-542.

Guo J., Krause D.N., Horne J., Weiss J.H., Li X., Duckles S.P. (2010). Estrogen-receptor-mediated protection of cerebral endothelial cell viability and mitochondrial function after ischemic insult in vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 3: 545–554.

Heim R., Cubitt A.B. and Tsien R. Y., (1995). Improved green fluorescent. *Nature*; 373: 663-664.

Hofmann T., Alexander G., Obukhov A.G., Schaefer M., Harteneck C., Gudermann T. and Schultz G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*; 397: 259-263.

Hunter T. (2000). Signalling-2000 and Beyond. *Cell*; 100, 113-127.

Hutchinson J.B., Beyer C., Green S. and Wozniak A. (1994). Brain formation of estrogen in the mouse: sex dimorphism in aromatase development. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 49: 407-415.

Jones K.J., McEwen B.S., Pfaff D.W. (1986). Regional specificity in estradiol effects on [3H] uridine incorporation in rat brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 45: 57–63.

Joshi D.C., Bakowska J.C. (2011). Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. *Journal of Visualized Experiments*; 51: 2704, doi:10.3791/2704

Kawata M., Nishi M., Sakamoto H., Kaku N., Masugi-Tokita M., Fujikawa K., Hirahara-Wada Y. and Mori H. (2008). Steroid Receptor Signalling in the Brain – Lessons Learned from Molecular Imaging. *Journal of Neuroendocrinology*; 20: 673-676.

Keller A., Castellanos F.X., Vaituzis A.C., Jeffries N.O., Giedd J.N., Rapoport J.L. (2003). Progressive loss of cerebellar volume in childhood-onset schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*; 160: 128–33.

Kelly M.J., Ronneklev O.K. (2012). Membrane-initiated actions of estradiol that regulate reproduction, energy balance and body temperature. *Frontiers in Neuroendocrinology*; 33(4): 376-387.

Kirkwood K.L., Dziak R., Bradford P.G. (1996). Inositol trisphosphate receptor gene expression and hormonal regulation in osteoblastlike cell lines and primary osteoblastic cell cultures. *Journal of Bone and Mineral Research*; 11: 1889–1896.

Krause D.N., Duckles S.P., Gonzales R.J. (2011). Local oestrogenic/androgenic balance in the cerebral vasculature. *Acta Physiologica*; 203: 181–186.

Inouye S. and Tsuji F.I. (1994). Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters*; 341: 277-280.

Linford N.J. and Dorsa D.M. (2002). 17 β -Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids*; 67: 1029-1040.

Liu C.G., Xu K.Q., Xu X., Huang J.J., Xiao J.C., Zhang J.P. and Song H.P. (2007). 17 β -Oestradiol regulates the expression of Na⁺/K⁺-ATPase β 1-subunit, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and carbonic anhydrase IV in H9C2 cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 34: 998-1004.

Meldolesi J. and Pozzan T. (1998). The endoplasmatic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends in Biochemical Science*; 23: 10-14.

McCarthy M.M. (2008). Estradiol and the Developing Brain. *Physiological Reviews*; 88: 91-124

McCombs J.E., Palmer A.E., (2008). Measuring calcium dynamics in living cells with genetically encodable calcium indicators. *Methods*; 46(3): 152-159.

McGeady T.A., Quinn P.J., FitzPatrick E.S., Ryan M.T. (2006). *Veterinary embryology*. Blackwell, Oxford.

Mi Q., Chen N., Shaifta Y., Xie L., Lu H., Liu Z., Chen Q., Hamid C., Becker S., Ji Y., Ferro A. (2011). Activation of endothelial nitric oxide synthase is dependent on its interaction with globular actin in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 51: 419–427.

Minin A.A. and Moldaver M.V. (2008). Intermediate Vimentin Filaments and Their Role in Intracellular Organelle Distribution. *Biochemistry (Moscow)*; 73 (13): 1453-1466.

Miyawaki A., Lliops J., Heim R., McCaffery J.M., Adams J.A., Ikura M. and Tsien R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*; 388: 882-887.

Miyawaki A., Griesbeck O., Heim R. and Tsien R. Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 96: 2135-2140.

Michels C. and Hoppe U.C. (2008). Rapid actions of androgens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29: 182-198.

Moody S.A., Quigg M.S., Frankfurter A. (1989). Development of the peripheral trigeminal system in the chick revealed by an isotype-specific anti-beta-tubulin monoclonal antibody. *Journal of Comparative Neurology*; 279: 567–580.

Moreira P.I., Custódio J.B., Nunes E., Oliveira P.J., Moreno A., Seica R., Oliveira C.R., Santos M.S. (2011). Mitochondria from distinct tissues are differently affected by 17 β -estradiol and tamoxifen. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 123: 8–16.

Moro L., Arbini A.A., Hsieh J.T., Ford J., Simpson E.R., Hajibeigi A., Oz O.K. (2010). Aromatase deficiency inhibits the permeability transition in mouse liver mitochondria. *Endocrinology*; 151: 1643–1652.

Muchekehu R.W. and Harvey B.J. (2007). 17 β -Estradiol rapidly mobilizes intracellular calcium from ryanodine-receptor-gated stores via a PKC-PKA-Erk-dependent pathway in the human eccrine sweat gland cell line NCL-SG3. *Cell Calcium*; 44: 276-288.

Murphy H.S., Sun Q., Murphy B.A., Mo R., Huo J., Chen J., Chensue S.W., Adams M., Richardson B.C., Yung R. (2004). Tissue-specific effect of estradiol on endothelial cell-dependent lymphocyte recruitment. *Microvascular Research*; 68: 273–285.

Nadal A., Ropero A.B., Fuentes E., Soria B. and Ripoll C. (2004). Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. *Steroids*; 69: 531-536.

Nagai T., Iyata K., Park E.S., Kubota M., Mikoshiba K. and Miyawaki A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*; 20:87-90.

Nightingale T.D., Pattni K., Hume A.N., Seabra M.C., Cutler D.F. (2009). Rab27a and MyRIP regulate the amount and multimeric state of vWF released from endothelial cells. *Blood*; 113: 5010–5018.

Palmer A., Jin C., Reed J.C., Tsien R.Y. (2004). Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *PNAS*; 101: 17404–17409.

Palmer A.E., Giacomello M., Kortemme T., Hires S.A., Lev-Ram V., Baker, D. and Tsien R.Y. (2006). Ca²⁺ Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs. *Chemistry & Biology*; 13: 521-530.

Parekh A.B. and Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiological Reviews*; 77: 901-930.

Parekh A.B. and Putney J.W.Jr. (2005). Store Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*; 85: 757-810.

Park C.Y., Hoover P.J., Mullins F.M., Bachhawat P., Covington E.D., Raunser S., Walz T., Garcia K.C. and Dolmetsch R.S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*; 136: 876-90.

Peruffo A., Massimino M.L., Ballarin C., Carmignoto G., Rota A. and Cozzi B. (2004) Primary culture from fetal bovine brain. *Neuroreport*; 15 (2): 1-4.

Peruffo A., Buson G., Cozzi B., Ballarin C. (2008). Primary cell cultures from fetal bovine hypothalamus and cerebral cortex: a reliable model to study P450Arom and alpha and beta estrogen receptors in vitro. *Neuroscience Letters*; 434: 83–87.

Peruffo A., Giacomello M., Montelli S., Corain L., Cozzi B. (2011). Expression and localization of aromatase P450AROM, estrogen receptor- α , and estrogen receptor- β in the developing fetal bovine frontal cortex. *General and Comparative Endocrinology*; 172: 211-217.

Pesarin F., Salmaso L. (2010). *Permutation tests for complex data—theory and software*. Wiley, Chichester.

- Petronilli V., Penzo D., Scorrano L., Bernardi P., Di Lisa F. (2001). The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *The Journal of Biological Chemistry*; 276: 12030–12034.
- Pietrobon D., Di Virgilio F. and Pozzan T. (1990). Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *European Journal of Biochemistry*; 193: 599-622.
- Pinton P., Pozzan T. and Rizzuto R. (1998). The Golgi apparatus is an 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal*; 17: 5298-5308.
- Pinton P., Leo S., Wicowsky M.R., Di Benedetto G. and Rizzuto R. (2004). Long-term modulation of mitochondrial Ca^{2+} signals by protein kinase C isozymes. *The Journal of Cell Biology*; 165: 223-32.
- Piston D.W. and Kremers G.J. (2007). Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *TRENDS in Biochemical Sciences*; 32: 407-414.
- Pizzo P. and Pozzan T. (2007). Mitochondria–endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *TRENDS in Cell Biology*; 17 (10): 511-517.
- Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P. and Meldolesi J. (1994). Molecular and Cellular Physiology of Intracellular Calcium Stores. *Physiological Reviews*; 74: 595-636.
- Pozzan T., Mongillo M. and Rudolf R. (2003). Investigating signal transduction with genetically encoded fluorescent probes. *European Journal of Biochemistry*; 270: 2343-2352.

Prossnitz E.R., Oprea T.I., Sklar L.A. and Arterburn J.B. (2008). The ins and outs of GPR30: A transmembrane estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 109: 350-353.

Qiu J., Bosch M.A., Jamali K., Xue C., Kelly M.J. and Rønnekleiv O.K. (2006). Estrogen Upregulates T-Type Calcium Channels in the Hypothalamus and Pituitary. *The Journal of Neuroscience*; 43: 11072-11082.

Rasola A., Sciacovelli M., Pantic B., Bernardi P. (2010). Signal transduction to the permeability transition pore. *FEBS Letters*; 584: 1989–1996.

Razmara A., Sunday L., Stirone C., Wang X.B., Krause D.N., Duckles S.P., Procaccio V. (2008). Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor alpha in brain endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*; 325: 782–790.

Ritchie A.K. (2008). Estrogen Increases Low Voltage-Activated Calcium Current Density in GH₃ Anterior Pituitary Cells. *Endocrinology*; 132: 1621-1629.

Rizzuto R., Brini M. and Pozzan T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*; 262: 744-747.

Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F.S., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Tuft R.A. and Pozzan T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*; 280: 1763-1766.

Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., Aguiari P., Bononi A., De Stefani D., Giorgi C., Leo S., Rimessi A., Siviero R., Zecchini E., Pinton P. (2009). Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1787: 1342–1351.

Rudolf R., Mongillo M., Rizzuto R. and Pozzan T. (2003). Looking forward to seeing calcium. *Molecular Cell Biology*, 4: 579-586.

Sakamoto H., Mezaki Y., Shimiki H., Ukena K., Tsutsui K (2003). Dendritic Growth and Spine Formation in Response to Estrogen in the Developing Purkinje Cell. *Endocrinology*; 144(10): 4466–4477.

Salazar-Colocho P., Del Río J., Frechilla D. (2008). Involvement of the vascular wall in regenerative processes after CA1 ischemic neuronal death. *International Journal of Developmental Neuroscience*; 26: 541–550.

Sanchez A.M., Flamini M.I., Fu X.D., Mannella P., Giretti M.S., Goglia L, Genazzani A.R. and Simoncini T. (2009). Rapid Signaling of Estrogen to WAVE1 and Moesin Controls Neuronal Spine Formation via the Actin Cytoskeleton. *Molecular Endocrinology*; 23(8): 1193–1202.

Sanchez A.M., Simoncini T. (2010). Extra-nuclear signaling of ER α to the actin cytoskeleton in the central nervous system. *Steroids*; 75: 528–532.

Santo-Domingo J., Demaurex N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797(6-7): 907-12.

Sasahara K., Shikimi H., Haraguchi S., Sakamoto H., Honda S., Harada N. and Tsutsui K. (2007). Mode of Action and Functional Significance of Estrogen-Inducing Dendritic Growth, Spinogenesis, and Synaptogenesis in the Developing Purkinje Cell. *The Journal of Neuroscience*; 27 (28): 7408 –7417.

Schwarz JM and McCarthy M 2008 Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *Journal of Neurochemistry*, 105: 1561-1572.

Scorrano L., Oakes S.A., Opferman J.T., Cheng E.H., Sorcinelli M.D. and Pozzan T. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*; 300: 135–139.

Scragg J.L., Dallas M.L. and Peers C. (2007). Molecular requirements for L-type Ca^{2+} channel blockade by testosterone. *Cell Calcium*; 42: 11-15.

Shimada A., Mason C.A. and Morrison M.E. (1998). TrkB Signaling Modulates Spine Density and Morphology Independent of Dendrite Structure in Cultured Neonatal Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience*; 18(21): 8559–8570.

Shimomura O., Johnson F.H. and Saiga Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Biochemistry*; 13: 2656-2662.

Sinchak K., Wagner E.J., (2012). Estradiol signaling in the regulation of reproduction and energy balance. *Frontiers in Neuroendocrinology*; 33: 342–363.

Simpkins J.W., Wang J., Wang X., Perez E., Prokai L. and Dykens J. (2005). Mitochondria Play a Central Role in Estrogen-Induced Neuroprotection. *Current Drug Targets–CNS & Neurological Disorders*; 4: 69-83.

Staffend N.A., Loftus C.M., Meisel R.L. (2011). Estradiol reduces dendritic spine density in the ventral striatum of female Syrian hamsters. *Brain Structure and Function*: 215: 187–194.

Stevenson S., Sharpe T.D., Thronton J. (2009). Effects of oestrogen agonists on human dermal fibroblasts in an in vitro wounding assay. *Experimental Dermatology*; 18: 988–990.

Sugawara H., Kurosaki M., Takata M. and Kurosaki T. (1997). Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *The EMBO Journal*; 16: 3078-3088.

Syntichaki P. and Nektarios Tavernarakis N. (2003). The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nature Reviews Neuroscience*; 4: 672-684.

Takenouchi T., Iwamaru Y., Sato M., Yokoyama T., Shinagawa M., Kitani H. (2007). Establishment and characterization of SV40 large T antigen-immortalized cell lines derived from fetal bovine brain tissues after prolonged cryopreservation. *Cell Biology International*; 31: 57–64.

Thor D., Uchizono J.A., Lin-Cereghino G.P., Rahimian R. (2010). The effect of 17 beta-estradiol on intracellular calcium homeostasis in human endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*; 630: 92–99.

Too C.K., Giles A., Wilkinson M. (1999). Estrogen stimulates expression of adenine nucleotide translocator ANT1 messenger RNA in female rat hearts. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 150: 161–167.

Toran-Allerand C.D. (2004). Estrogen and the brain: beyond ER-alpha and ER-beta. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 39:1579-86.

Trapman J., Klaassen P., Kuiper G.G., Van Der J.A., Faber P.W., Van Rooij H.C., Geurts van Kessel A., Voorhorst M.M., Mulder E. and Brinkmann A.O. (1988). Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochemical and biophysical research communications*; 153: 241–248.

Tsutsui K. (2008) Neurosteroids in the Purkinje Cell: Biosynthesis, Mode of Action and Functional Significance. *Molecular Neurobiology*; 37: 116–125.

Vasudevan N. and Pfaff D.W. (2008). Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*; 29: 238-257.

Wagner D.D., Olmsted J.B., Marder V.J. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*; 95: 355–360.

Wang G.J., Jackson J.G., Thayer S.A. (2003). Altered distribution of mitochondria impairs calcium homeostasis in rat hippocampal neurons in culture. *Journal of Neurochemistry*; 87:85–94.

Xu X., Ye Y., Li T., Chen L., Tian D., Luo Q., Lu M. (2010) Bisphenol-A rapidly promotes dynamic changes in hippocampal dendritic morphology through estrogen receptor-mediated pathway by concomitant phosphorylation of NMDA receptor subunit NR2B. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 249: 188–196.

Yokosuka M., Ohtani-Kaneko R., Yamashita K., Muraoka D., Kuroda Y., Watanabe C. (2008). Estrogen and environmental estrogenic chemicals exert development effects on rat hypothalamic neurons and glia. *Toxicology in Vitro*; 22: 1–9.

Zhang L., Chang Y.H., Barker J.L., Hu Q., Zhang L., Maric D., Lid B.L, Rubinowa D.L. (2000). Testosterone and estrogen affect neuronal differentiation but not proliferation in early embryonic cortex of the rat: the possible roles of androgen and estrogen receptors. *Neuroscience Letters*; 281: 57-60.

Zhi X., Honda K., Sumi T., Yasui T., Nobeyama H., Yoshida H., Ishiko O. (2007) Estradiol-17beta regulates vascular endothelial growth factor and Bcl-2 expression in HHUA cells. *International Journal of Oncology*; 31: 1333–1338.

Ziv N.E. and Smith S.J. (1996). Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation *Neuron*. 17: 91–102.