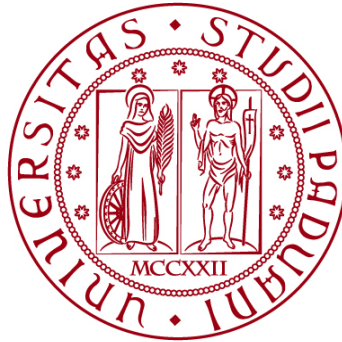


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

Analisi dell'attività del recettore astrocitario D1 nella comunicazione tra astrociti e neuroni

Relatore: Prof. Luigi Bubacco
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott.ssa Giulia Favetta
Dipartimento di Biologia

Laureando: Alessandro Zarantonello

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice:

Abstract	III
1.Introduzione	1
1.1 Dopamina	1
1.1.1 Sintesi e metabolismo	1
1.1.2 I recettori dopaminergici.....	4
1.1.3 I circuiti dopaminergici.....	8
1.2 Gli astrociti: le cellule secretorie del SNC.....	11
1.2.1 Le funzioni degli astrociti	12
1.2.2 Reattività astrocitaria e patologie	14
1.2.3 Comunicazione intercellulare: onde Ca ²⁺ e neurotrasmettitori	15
1.2.5 Il segnale dopaminergico negli astrociti	16
2. Obiettivo dello studio	20
3. Materiali e metodi	23
3.1 Colture primarie di neuroni corticali	23
3.2 Colture primarie di astrociti striatali	25
3.3 Preparazione del mezzo condizionato astrocitario (ACM)	25
3.4 Quantificazione proteica con il reattivo di Bradford	26
3.5 Trattamento dei neuroni con ACM.....	26
3.5.1 Analisi morfologica.....	26
3.5.2 Analisi sinaptica.....	27
3.6 Trasfezione	27
3.7 Lisi cellulare e western blot (WB).....	28
3.8 Immunofluorescenza (IF)	30
3.9 Analisi delle immagini	31
4. Risultati	32
4.1 Le proteine rilasciate in seguito ad attivazione del D1R astrocitario promuovono la crescita neuronale.....	32
4.2 Le proteine rilasciate in seguito ad attivazione del D1R astrocitario agiscono sulle terminazioni sinaptiche.....	45
5. Discussione.....	50
6. Bibliografia	54

Abstract

Gli astrociti sono cellule gliali che svolgono funzioni cruciali a livello del sistema nervoso centrale (SNC), tra cui la secrezione di molecole importanti per la comunicazione cellulare. È stato recentemente dimostrato che gli astrociti esprimono recettori specifici per vari neurotrasmettitori. Tuttavia, non è chiaro come gli astrociti ed i neuroni interagiscano tra loro attraverso il segnale dopaminergico.

A tal proposito, questo studio si è concentrato sul recettore D1 (D1R) astrocitario, tra i più espressi a livello striatale, e sull'effetto generato dalla sua attivazione. Gli astrociti striatali sono stati stimolati con un agonista D1R-specifico ed è stato valutato l'effetto del terreno di coltura condizionato (ACM) su crescita e sviluppo neuronali. I risultati ottenuti hanno confermato la capacità dell'ACM di favorire la crescita e complessità neuronale in modo significativo, come riportato in letteratura. In particolare, in seguito a stimolazione del D1R, il miglioramento si è dimostrato ulteriormente significativo. Inoltre, è stato evidenziato un effetto a livello sinaptico che può suggerire una regolazione della trasmissione sinaptica da parte di proteine rilasciate in seguito all'attivazione del D1R.

Uno studio più approfondito del meccanismo molecolare alla base della comunicazione astrocita-neurone mediata dalla dopamina è necessario, data la correlazione tra un alterato segnale dopaminergico e diverse patologie.

1.Introduzione

1.1 Dopamina

La dopamina, 3,4-diidrossifenilettilammina, è una molecola appartenente al gruppo delle catecolamine, che comprende anche noradrenalina e adrenalina. Le catecolamine derivano dall'amminoacido tirosina e possono agire sia come ormoni che come neurotrasmettitori. L'adrenalina è la prima molecola appartenente a questo gruppo ad esser stata identificata, in seguito ad estrazione dalla ghiandola surrenale nel 1985¹. La dopamina, invece, è stata descritta per la prima volta nel 1910 come un composto monoaminico simile all'epinefrina ipotizzando che fosse solo un precursore di altre catecolamine², ed era stata ritrovata solo in tessuti periferici e in fluidi corporei di mammiferi. In seguito al 1957, quando è stata identificata nel sistema nervoso centrale (SNC)³, si è scoperto il suo importante ruolo come neurotrasmettitore⁴ e molecola-segnale nel SNC.

1.1.1 Sintesi e metabolismo

La dopamina viene sintetizzata nei neuroni dopaminergici e in alcune cellule del sistema immunitario (come i linfociti⁵), grazie all'espressione di una serie di enzimi specifici⁶.

In particolare, la sintesi di dopamina prevede un processo a due fasi (Fig.1): nella prima fase, l'amminoacido L-tirosina subisce un'idrossilazione nell'anello fenolico mediata dall'enzima tirosina idrossilasi (TH), che genera una molecola chiamata L-DOPA. Questa fase è controllata dal cofattore tetraibiopterina, sintetizzato a partire dalla guanosina trifosfato (GTP) mediante l'enzima GTP cicloidrolasi (GTPCH). Nella seconda fase, il precursore L-DOPA viene decarbossilato in dopamina (DA) dall'enzima amminoacidi aromatici decarbossilasi (AADC)^{7,8}. Una volta prodotta, viene conservata ad alte concentrazioni all'interno di vescicole a pH acido per evitarne l'ossidazione.

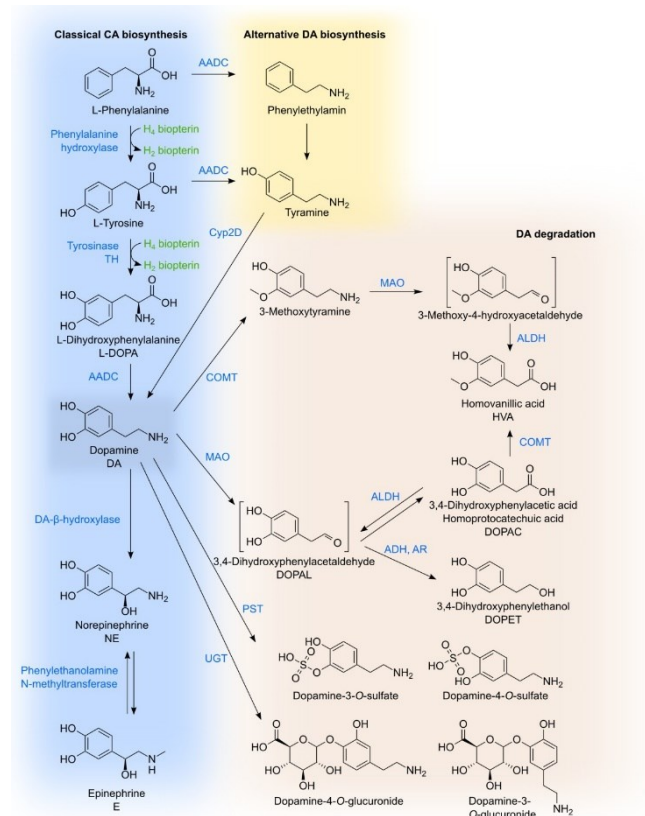


Figura 1: Rappresentazione schematica delle vie di sintesi e metabolismo della dopamina. Immagine modificata da Meiser et al., *Cell Commun. Signal*, 2013⁸

I neuroni dopaminergici possono rilasciare dopamina secondo due meccanismi principali, fasico e tonico. La trasmissione fasica consiste nel rilascio stimolato da un potenziale d'azione ed è caratterizzata da un rapido aumento della concentrazione di dopamina nell'ambiente presinaptico. La trasmissione tonica, invece, riguarda la dopamina rilasciata spontaneamente ed indipendentemente dal potenziale d'azione presinaptico. Questo rilascio genera una variazione di concentrazione di dopamina meno zona-specifico e molto meno veloce rispetto al rilascio fasico.⁹

L'eccesso di dopamina viene riconosciuto dagli stessi neuroni, che sono in grado di internalizzarla nuovamente, e dagli astrociti, responsabili del mantenimento dell'omeostasi a livello della sinapsi. Inizialmente, la dopamina viene re-internalizzata nel citoplasma grazie al trasportatore della dopamina ad alta affinità (DAT) presente nella membrana plasmatica e, successivamente, viene trasportata all'interno di vescicole grazie al trasportatore delle monoammine a bassa affinità (VMAT2) presente nella membrana vescicolare¹⁰.

Il DAT è il principale trasportatore utilizzato per eliminare la dopamina dallo spazio sinaptico, evitando che i prodotti della sua ossidazione possano generare tossicità.

Ha il compito di controllare il segnale dopaminergico nell'ambiente extracellulare e, contemporaneamente, contribuisce ai livelli citoplasmatici della molecola, permettendo ai neuroni di averne a disposizione anche in situazioni in cui la sua sintesi è ridotta. È un trasportatore di neurotrasmettitori appartenente alla famiglia genica SLC6 ed associato a una pompa $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$: sfrutta il gradiente elettrochimico generato con energia dalla pompa per trasportare dopamina contro gradiente all'interno della cellula. Il meccanismo di trasporto prevede il legame della dopamina in un sito specifico, che causa un primo cambiamento conformazionale che permette di importare la molecola all'interno della cellula, ed il legame con un secondo substrato, che causa un ulteriore cambiamento conformazionale che permette il rilascio di dopamina all'interno della cellula e riporta il trasportatore alle condizioni iniziali¹¹. Il DAT è espresso in modo eterogeneo in diverse aree del cervello, ma si trova principalmente nelle zone ricche di neuroni dopaminergici e dove questi sviluppano le loro terminazioni¹².

Il trasportatore VMAT2, invece, è espresso nelle membrane delle vescicole citoplasmatiche e permette di rimuovere la dopamina dallo spazio citoplasmatico, dove potrebbe essere soggetta ad ossidazione in chinoni o specie reattive dell'ossigeno (ROS) e generare tossicità, trasportandola all'interno di vescicole a pH acido dove può essere conservata fino al suo eventuale riutilizzo. Esistono due isoforme di questo trasportatore vescicolare: VMAT1, che è espresso in cellule endocrine e paracrine associate a intestino e stomaco e nel SN simpatico¹³, e VMAT2, che è espresso da neuroni monoaminergici del SNC¹⁴. Si tratta di un trasportatore antiporto dipendente da protoni, che permette di scambiare una molecola di dopamina citosolica con due protoni presenti nel lume delle vescicole di stoccaggio; il gradiente protonico è creato da una pompa ATP-dipendente H^+ -ATPasi che trasporta protoni nel lume vescicolare contro il gradiente elettrochimico mediante l'uso di energia fornita dall'idrolisi di ATP¹⁵ (Fig.2).

In alternativa, per contrastare un potenziale aumento dello stress ossidativo cellulare, la dopamina può essere inattivata attraverso diversi meccanismi (Fig.2): il primo meccanismo è il catabolismo in acido omovanillico (HVA)⁷ che consiste in una deaminazione ossidativa in 3,4-diidrossifenilacetaldeide (DOPAL) mediata dall'enzima monoammino ossidasi (MAO) seguita dalla deidrogenazione in acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC) mediata dall'enzima aldeide deidrogenasi (ALDH), il quale è, infine, soggetto all'O-metilazione in 3-metossitriamide operata dall'enzima catecol-O-metiltransferasi (COMT). È interessante notare che esistono 2 isoforme dell'enzima MAO, A e B, aventi il 70% di omologia, e, di queste, MAO-B è prevalentemente espressa negli astrociti¹⁶. Un altro meccanismo è la formazione di dopamina solfato¹⁶, che rappresenta la forma più comune in circolazione: questa reazione è mediata dall'enzima fenolo sulfotransferasi (PSTs)

ed è seguita dalla glucuronidazione catalizzata dall'uridina-difosfato glucuronosiltransferasi (UGTs) a formare il rispettivo coniugato inattivo¹⁷ (Fig.2).

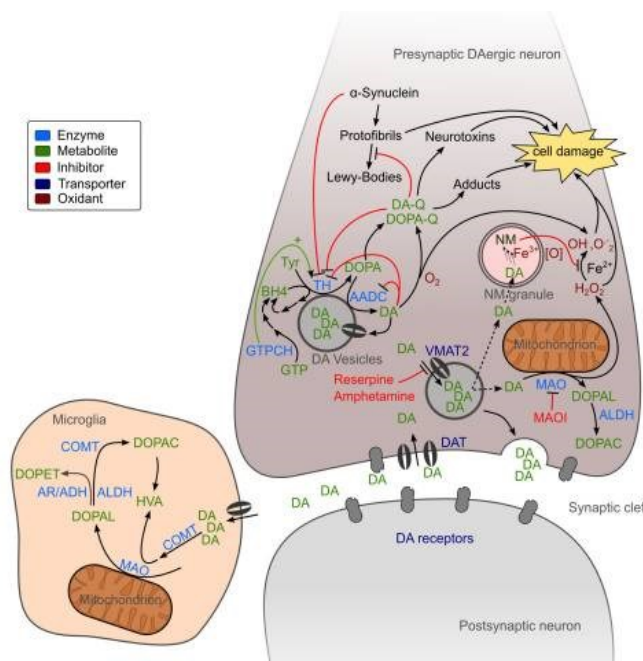


Figura 2: Principali vie metaboliche e di segnalazione nelle sinapsi di neuroni dopaminergici. Immagine modificata da Meiser et al., Cell Commun. Signal 2013⁸.

1.1.2 I recettori dopaminergici

I neuroni rilasciano, quindi, la dopamina nello spazio sinaptico dove agisce da molecola-segnales: infatti, si può legare a specifici recettori dopaminergici (DRDs) presenti sulle membrane delle cellule bersaglio, mediante i quali esprime la propria attività.

Ad oggi, è noto che la molecola agisce tramite 5 diversi recettori associati a proteine G (GPCR)¹⁸. Nel dettaglio, sono divisi in 2 sottogruppi in base alle loro proprietà strutturali, farmacologiche e biochimiche (Fig.3)^{19,20}:

- Classe D1: comprende i recettori D1 e D5, associati a proteine della famiglia $G\alpha_{s/olf}$ che stimolano la produzione di adenosina monofosfato ciclico (cAMP), i quali sono stati ritrovati esclusivamente a livello postsinaptico in neuroni recettivi per la dopamina, come i neuroni spinati medi GABA-ergici dello striato (MSN). Una volta che la dopamina si lega al recettore, viene stimolato un cambiamento conformazionale che si sviluppa fino alla proteina G, la cui subunità α rilascia una guanosina difosfato (GDP), favorendo il legame con una molecola di GTP. In questo modo, la subunità α si stacca dalle subunità β e γ e agisce sull'enzima adenilato ciclasi stimolandolo a produrre cAMP.

- Classe D2: comprende i recettori D2, D3 e D4, la cui attivazione regola negativamente l'attività dell'adenilato ciclasi. Sono associati a proteine $G\alpha_{i/o}$ e, una volta attivati, in seguito ad un cambiamento conformazionale che libera la subunità α , inibiscono l'adenilato ciclasi, risultando in una diminuzione dei livelli di cAMP all'interno della cellula. Sono espressi a livello sia postsinaptico che presinaptico, sui terminali assonici dei neuroni dopaminergici stessi²¹ (Fig.3).

DA receptor subtype	D1-like family		D2-like family		
	D1	D5	D2	D3	D4
Gene name	<i>Drd1a</i>	<i>Drd5</i>	<i>Drd2</i>	<i>Drd3</i>	<i>Drd4</i>
Number of introns	0	0	6	5	3
Splice variants	No	No	Yes (D2S, D2L)	Yes	Yes
Affinity for DA (uM) [*]	1.0–5.0	0.2–2.0	0.2–2.0	0.02–0.2	0.01–0.1
G protein coupling	$G\alpha_s, G\alpha_{olf}$	$G\alpha_s, G\alpha_q$	$G\alpha_i, G\alpha_o$	$G\alpha_i, G\alpha_o$	$G\alpha_i, G\alpha_o$
Common family-specific agonists	SKF-38393, SKF-81297		(-)Quinpirole, Cabergoline		
Common family-specific antagonists	SCH-23390, SKF-83566		(-)Sulpiride, Spiperone, Nemonapride		

**Ki* ranges for cloned human DA receptors obtained from the NIMH Psychoactive Drug

Figura 3: Caratteristiche dei recettori dopaminergici. Immagine modificata da Trisch and Sabatinil., *Neuron* 2012²⁰

1.1.2.1 La struttura dei recettori dopaminergici

I recettori della dopamina appartengono alla famiglia delle proteine a sette eliche transmembrana associati a proteine G. Dal punto di vista strutturale, i singoli recettori delle due sottoclassi presentano un alto livello di omologia nel loro dominio transmembrana. Il dominio N-terminale ha un numero simile di amminoacidi in tutti i sottotipi e presenta un numero variabile di siti di N-glicosilazione. Il dominio C-terminale è sette volte più lungo nella classe D1 rispetto alla D2 ed è ricco in serina e treonina. Negli avvolgimenti extracellulari 2 e 3 (E2 ed E3), sono presenti due residui cisteinici che formano un ponte disolfuro che permette di stabilizzare la struttura del recettore²². L'avvolgimento E3 è molto lungo nei recettori della classe D2 per permettere l'interazione con le proteine G_i e, quindi, l'inibizione della produzione di cAMP.

Dal punto di vista genico, i recettori della classe D1 non presentano introni nella regione codificante, diversamente dalla classe D2²³. La presenza di questi introni apre la possibilità di ottenere varianti di splicing alternativo: infatti, sono state trovate 2 varianti del recettore D2 distinte anatomicamente, fisiologicamente, farmacologicamente e in base alla segnalazione. Il recettore D2 corto (D2S) è più

espresso a livello presinaptico e sembra funzionare principalmente come autorecettore per i neuroni. Il recettore D2 lungo (D2L), invece, sembra essere espresso principalmente a livello postsinaptico²⁴.

Le differenze strutturali presenti tra le classi D1 e D2 si ripercuotono anche nei loro profili farmacologici ed è possibile discriminare i recettori in base alle diverse affinità per agonisti e antagonisti. Nonostante la dopamina presenti un'affinità significativamente maggiore, di dieci volte, per il D5 rispetto al D1³¹, non ci sono differenze di affinità per antagonisti e agonisti tra questi due recettori. Per quanto riguarda la classe D2, le isoforme corta e lunga del recettore D2 possono essere discriminate per una differenza nell'affinità con sulpiride e raclopride²⁵, antagonisti che si legano al recettore e ne bloccano l'attività. Per quanto riguarda il recettore D3, caratterizzato da differenze nel terzo avvolgimento intracellulare rispetto al D2²⁵, la dopamina presenta un'affinità venti volte maggiore. Altre differenze che permettono di separare questi due recettori sono riscontrabili nell'affinità per agonisti come il quinpirolo e il 7-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin (7-OH-DPAT) e per antagonisti come UH-232 AJ-76²⁶. Infine, i recettori D4 possono essere distinti dagli altri recettori grazie ad alcune molecole, come la clozapina, che presentano un'affinità maggiore²⁷.

1.1.2.2 La trasduzione del segnale

Come descritto in precedenza (Paragrafo 1.1.2), la distinzione delle due classi di recettori si basa principalmente su attivazione o disattivazione dell'attività dell'adenilato ciclasi, che porta ad una variazione dei livelli di cAMP all'interno della cellula. Queste oscillazioni nelle concentrazioni intracellulare di cAMP danno origine a cascate di segnalazione intracellulari: nel dettaglio, la presenza di cAMP influenza principalmente l'attivazione della proteina chinasi A (PKA) che porta alla trascrizione del fattore di legame di risposta al cAMP (CREB), responsabile della regolazione dell'espressione di diversi geni²⁸. Nei neuroni, un altro bersaglio dell'attivazione di PKA è la fosfoproteina controllata dalla dopamina e dal cAMP (DARPP-32), che può essere fosforilata in corrispondenza di diversi residui e, di conseguenza, mediare effetti diversi. Ad esempio, la fosforilazione nel residuo Thr³⁴ converte DARPP-32 in un potente inibitore della proteina fosfato-1 (PP-1), mentre la fosforilazione a livello del residuo Thr⁷⁵ converte DARPP-32 in un inibitore della PKA²⁹. Questa variazione del cAMP è, quindi, importante per la cellula, ma non è l'unico effetto generato dall'attivazione della cascata di segnale delle proteine G associate a questi recettori. Infatti, i DRDs possono, anche, controllare i livelli di calcio (Ca²⁺): in particolare, i recettori della classe D1 sono in grado di attivare la fosfolipasi C³⁰, causando un aumento dei livelli di Ca²⁺. Questo enzima, infatti, ha la capacità di idrolizzare il fosfatidilinositolo, formando l'inositolo-3-fosfato (IP3) che, mediante il legame con dei recettori specifici,

stimola il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico nel citoplasma. Inoltre, i livelli di Ca^{2+} intracellulare sono influenzati pure dai recettori D2, ma non D3 o D4²⁸. I recettori della classe D1 possono regolare anche l'efflusso di potassio (K^+): tramite un meccanismo cAMP-dipendente, sono in grado di influenzare l'attività di trasportatori ionici facendo aumentare l'efflusso di K^+ all'esterno della cellula e diminuendo, così, i livelli citoplasmatici^{31,32}. I recettori della classe D2, invece, presentano la funzione opposta ed influenzano i trasportatori ionici diminuendo l'efflusso di K^+ dall'interno all'esterno della cellula³³. Anche l'attività dello scambiatore Na^+/H^+ è controllata dai DRDs: questa proteina è fondamentale per la regolazione di pH e volume cellulari e viene influenzata dai recettori dopaminergici mediante la via di segnalazione che coinvolge la fosfolipasi C (PLC) e la proteina chinasi C (PKC)³⁴. Infine, è stato dimostrato che l'attivazione dei recettori D1 e D2 può provocare un'inibizione dell'attività della pompa Na^+-K^+ ATPasi³⁵, la quale si occupa di mantenere la concentrazione di sodio (Na^+) intracellulare e di potassio (K^+) extracellulare a livelli stabili ed è essenziale per il mantenimento del gradiente elettrochimico e, quindi, per l'eccitabilità (Fig.4).

Sebbene la gran parte delle vie di segnalazione intracellulari sia mediata da proteine G, esistono anche delle vie alternative indipendenti da questa famiglia di proteine. Specialmente i recettori D2, una volta attivati, possono reclutare la proteina β -arrestina, appartenente ad una famiglia caratterizzata dalla funzione di adattatore citosolico e comprendente proteine reclutabili dai recettori a sette eliche transmembrana, come i recettori dopaminergici. Nel dettaglio, una volta che il GPCR viene attivato e fosforilato da una chinasi specifica dei recettori associati a proteina G (GRK), la β -arrestina può legarsi al recettore, disaccoppiarlo dalla proteina G e reclutare proteine coinvolte nella sua internalizzazione, attenuando così l'effetto di segnalazione³⁶ (Fig.4). È stato anche visto che la famiglia delle arrestine può trasdurre il segnale dei GPCR indipendentemente dalla proteina G, attivando diverse vie intracellulari, ad esempio, mediante la fosforilazione delle chinasi regolanti il segnale extracellulare ERK1/2, ed attivando una serie di processi, tra cui la sopravvivenza, la proliferazione e la trascrizione cellulare^{37,38} (Fig.4).

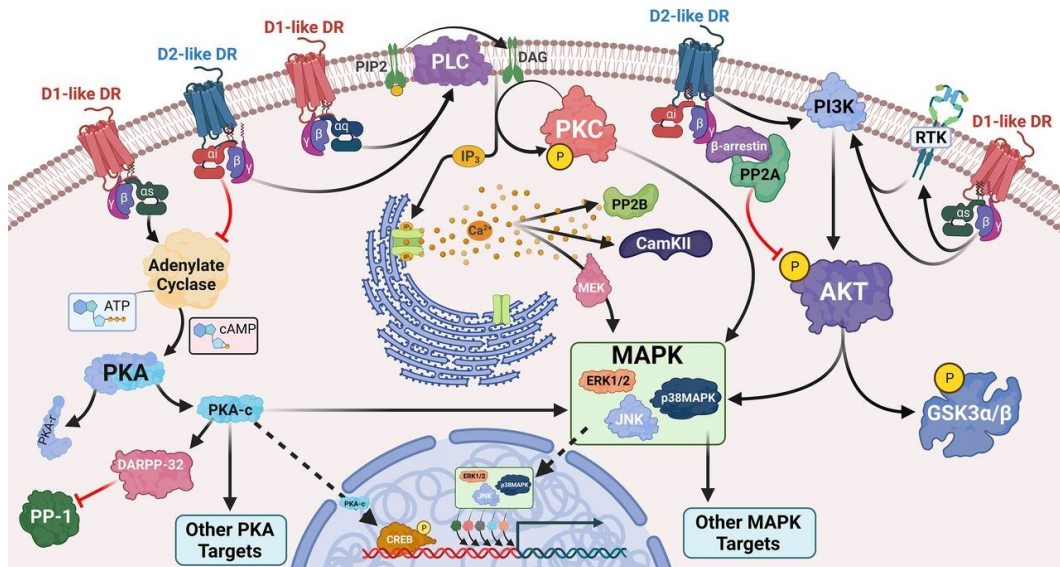


Figura 4: Schema delle principali cascate di segnalazione stimolate dai recettori dopaminergici. Immagine modificata da Channer et al., *Pharm. Rev.*, 2023³⁸.

1.1.3 I circuiti dopaminergici

I neuroni dopaminergici, unici per la loro capacità di sintesi della dopamina, sono localizzati nell'area mesencefalica ventrale e possono essere suddivisi per funzionalità e anatomia^{39,40} in quattro diversi gruppi che rispecchiano i quattro diversi circuiti dopaminergici:

- gruppo mediale A8, comprendente i neuroni che definiscono il campo retrorubrale (RRF) e da cui parte la via tuberoinfundibolare, che si dirama dai nuclei arcuato e periventricolare dell'ipotalamo fino al lobo intermedio dell'eminenza pituitaria ed è fondamentale per il controllo inibitorio della prolattina dalla porzione anteriore della ghiandola pituitaria⁴¹. I neuroni di questo gruppo fanno parte del sistema mesolimbico e sono coinvolti nella regolazione delle emozioni e del sistema di ricompensa.
- gruppo laterale A9, comprendente i neuroni localizzati nella *substantia nigra pars compacta* (SNpc) le cui terminazioni arrivano allo striato dorsale, formando la via nigro-striatale coinvolta nel controllo del movimento e delle capacità mnemoniche⁴². Questa via, infatti, ha origine nella *substantia nigra*, chiamata così per l'alta concentrazione di neuroni dopaminergici ricchi in neuromelanina che inviano fibre ascendenti ai nuclei caudato e putamen, porzione definita striato dorsale. I neuroni appartenenti a questo gruppo sono fondamentali per il controllo del movimento volontario e la loro degenerazione è legata alla comparsa della seconda malattia neurodegenerativa più frequente al mondo, il morbo di Parkinson (PD)⁴³. Questa patologia è caratterizzata da una serie di sintomi distintivi quali bradicinesia, postura sbilanciata, rigidità e tremore a riposo. Oltre alla selettiva morte dei neuroni dopaminergici

localizzati nella SNpc, le principali caratteristiche molecolari sono la presenza dei corpi di Lewy, ossia aggregati fibrillari di proteine diverse, all'interno di soma e processi neuronali e lo stato di infiammazione che caratterizza le cellule gliali. La maggiore vulnerabilità dei neuroni dopaminergici a particolari insulti rispetto a tutti gli altri tipi di neuroni può essere ricondotta alle loro caratteristiche peculiari. Infatti, presentano degli assoni molto lunghi e ramificati e hanno una lenta attività tonica, che permette loro di auto-stimolarsi ad intervalli regolari portando ad importanti variazioni di Ca^{2+} . La presenza ridotta di proteine tampone per questo elemento porta all'attivazione di canali del Ca^{2+} a livello del reticolo endoplasmatico, i quali liberano ulteriore Ca^{2+} nel citoplasma e favoriscono il suo ingresso nei mitocondri. In questi organelli, è presente un meccanismo di controllo energetico legato all'ATP, e l'ingresso del Ca^{2+} stimola la fosforilazione ossidativa e la produzione del derivato dell'adenosina. Se la stimolazione avviene in assenza di richiesta di ATP da parte della cellula, si crea iperpolarizzazione dei mitocondri, si riduce il flusso di elettroni nella rispettiva catena di trasporto e, di conseguenza, aumentano le ROS. Queste molecole danneggiano i compartimenti cellulari e i sistemi di controllo, tra cui il macchinario di controllo del processo di mitofagia (meccanismo di eliminazione selettiva di mitocondri disfunzionali), portando ad un accumulo di mitocondri danneggiati che possono stimolare l'apoptosi cellulare. Inoltre, sistemi di smaltimento di proteine compromessi facilitano l'aggregazione proteica. Questa maggiore suscettibilità allo stress ossidativo espone i neuroni dopaminergici situati nella SNpc ad un maggiore rischio di degenerazione.

- gruppo mediale A10, comprendente i neuroni che definiscono l'area tegmentale ventrale (VTA) e, insieme ai neuroni del gruppo mediale A8, innervano lo striato ventro-mediale e la corteccia prefrontale, partecipando al sistema limbico. Si tratta, quindi, di un sistema costituito da due vie, la via mesolimbica, che connette il VTA al *nucleus accumbens* (NAc) ed coinvolta nel sistema di ricompensa e motivazione⁴⁵, e la via mesocorticale, che si estende dal VTA alla corteccia prefrontale ed è responsabile del controllo di emozioni e sentimenti. L'unione delle vie mesolimbica e mesocorticale formano la via mesocorticolimbica⁴⁶ (Fig. 5).

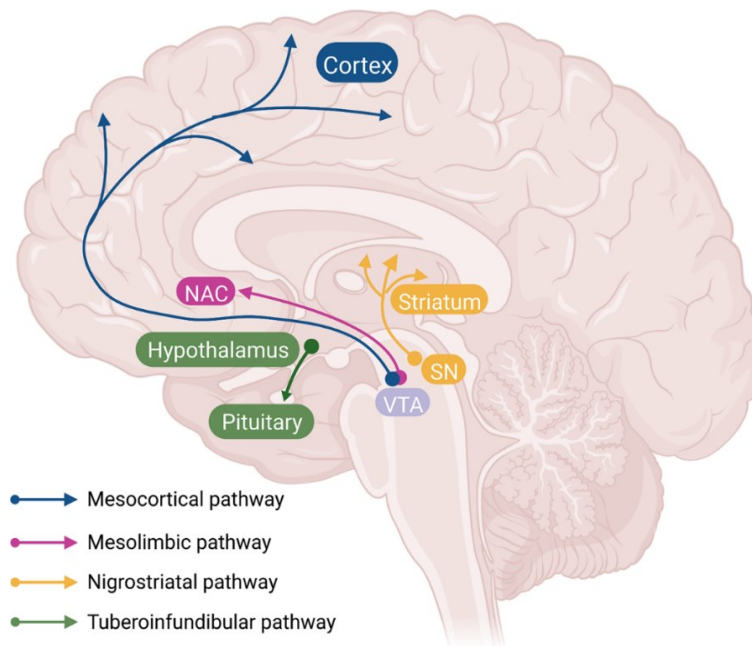


Fig.5: Rappresentazione delle quattro vie di segnalazione dopaminergica nel SNC.

Immagine modificata da Klein et al., *Cell. Mol. Neurobiol* (2019)⁹

1.1.3.1 Le funzioni della dopamina nel SNC

La dopamina è coinvolta in funzioni molto importanti sia nel SNC che nel sistema nervoso periferico (SNP) proprio grazie all'esistenza di diversi circuiti dopaminergici. Come già descritto (Paragrafo 1.1.3), la dopamina è responsabile del controllo motorio, ma è anche coinvolta nel sistema di motivazione, aspettativa di ricompensa e decisione basata sull'impegno. La dopamina sembrerebbe in grado di agire influenzando le azioni e il sistema comportamentale legato alla ricompensa: infatti, evidenze sperimentali riportano che rilasci fasici di dopamina nel NAc, tramite la via mesolimbica, sono fortemente correlati ad attività comportamentali relative all'attuazione di azioni per l'ottenimento di una ricompensa. Si è visto che la stimolazione del NAc, area in cui terminano le proiezioni dei neuroni dopaminergici provenienti dalla VTA, induce topi precedentemente addestrati a compiere una particolare azione per ricevere cibo ad attuare l'azione insegnata⁴⁷. In aggiunta, l'utilizzo di sostanze che causano il rilascio prolungato di dopamina in queste zone, come le anfetamine, aumentano l'attività psicomotoria⁴⁸.

La dopamina influenza anche comportamenti materni e riproduttivi, poiché i neuroni dopaminergici mesolimbici sono importanti bersagli della segnalazione mediata dall'ossitocina. Quest'ormone, sintetizzato nel nucleo sopraottico e paraventricolare dell'ipotalamo, viene rilasciato in varie parti dell'encefalo tramite proiezioni assionali, tra cui la VTA, a seguito di stimoli esterni, come stress e input

sociali. A livello periferico, l'ossitocina stimola le contrazioni uterine, il rilascio di latte, mentre nel SNC agisce come neurotrasmettitore ed influenza i comportamenti materni⁴⁹. A prova di questo, si è visto che la somministrazione di ossitocina nella VTA porta a deregolazione di questi comportamenti⁵⁰. Per quanto riguarda il SNP, la dopamina ricopre un ruolo fondamentale nella regolazione della motilità gastro-intestinale: i recettori dopaminergici sono presenti lungo tutto questo tratto⁵¹ e la somministrazione di dopamina nei vasi presenti a livello del tessuto gastrico stimola un rilassamento della muscolatura. Alterazioni a livello della segnalazione dopaminergica possono, quindi, portare a problemi a tutto il tratto gastro-intestinale del tubo digerente⁵². Un aspetto interessante legato a questo è che, in molti pazienti PD, sono stati riscontrati sintomi non motori legati al tratto gastrointestinale, come la costipazione⁵³. Un'altra funzione molto importante controllata dalla dopamina è legata al rilascio di prolattina, un ormone coinvolto nella produzione di lattosio: infatti, la dopamina agisce sulle cellule lattotrope della ghiandola pituitaria anteriore, le quali rilasciano l'ormone prolattina, andando ad inibire il tono di secrezione cellulare⁵⁴. Infine, la dopamina è responsabile anche del controllo della pressione sanguigna: i DRDs sono espressi a livello del sistema cardiocircolatorio e la loro attivazione permette il controllo della vasodilatazione o vasocostrizione in base al tipo di recettore attivato⁵⁵.

1.2 Gli astrociti: le cellule secretorie del SNC

Gli astrociti sono una componente specializzata delle cellule gliali del SNC, che comprendono anche microglia e oligodendrociti, e sono divisi in due tipi, protoplasmatici e fibrosi⁵⁶. Gli astrociti protoplasmatici si possono ritrovare all'interno della materia grigia, tessuto nervoso formato dai corpi cellulari dei neuroni, e presentano diverse ramificazioni principali che danno origine a numerosi processi finemente ramificati in una distribuzione uniforme. Gli astrociti fibrosi, invece, si possono ritrovare nella materia bianca, tessuto nervoso formato da tutti i processi derivanti dai corpi cellulari, e sono caratterizzati da una morfologia con molti processi lunghi simili a fibre⁵⁶. Con i loro processi, gli astrociti protoplasmatici avvolgono i vasi sanguigni e le sinapsi⁶⁰, mentre gli astrociti fibrosi, oltre ai vasi sanguigni, contattano anche i nodi di Ranvier⁵⁷.

Inizialmente, si pensava che gli astrociti fossero principalmente delle componenti di supporto all'interno del tessuto neurale, con l'unica funzione di supportare i neuroni. L'unica caratteristica rilevante era la loro reattività, considerata un indicatore affidabile e sensibile della presenza di tessuto malato⁶⁸. Solo recentemente, si è scoperta la reale importanza di queste cellule con le loro funzioni necessarie al mantenimento di una corretta omeostasi nel SNC.

1.2.1 Le funzioni degli astrociti

Gli astrociti sono dotati di trasportatori ionici, pompe e canali atti a svolgere la funzione di controllo dell'omeostasi sinaptica e cellulare, come canali K^+ , pompe Na/K^+ -ATPasi, il co-trasportatore $Na^+-K^+-Cl^-$ o gli scambiatori Na^+/H^+ e Na^+/HCO_3^- per il controllo del pH⁵⁸. I canali del K^+ degli astrociti, ad esempio, sono essenziali per il mantenimento di una corretta concentrazione extracellulare della molecola, necessaria a permettere la generazione del potenziale d'azione. È stato dimostrato che una riduzione dell'espressione del gene codificante per il canale del K^+ Kir4.1 negli astrociti ippocampali porta ad una diminuita eliminazione del K^+ nell'ambiente sinaptico⁵⁹. Gli astrociti sono, poi, dotati di vari trasportatori per neurotrasmettitori che permettono di prevenirne l'accumulo a livello sinaptico, che potrebbe provocare tossicità. Una volta internalizzato, il glutammato viene convertito dagli astrociti in glutamina, la quale può essere utilizzata dal neurone per produrre nuovi neurotrasmettitori⁶¹. Nel dettaglio, gli astrociti esprimono entrambi i trasportatori del glutammato, GLAST e GLT-1. Quest'ultimo appartiene alla famiglia dei trasportatori di amminoacidi eccitatori 2 (EAAT2) ed è il principale trasportatore del glutammato, in grado di riconoscerlo e permetterne l'internalizzazione. Alterazioni della sua funzione sono associate a varie patologie ed è stato recentemente dimostrato che astrociti esprimenti la proteina LRRK2 con la mutazione G2019S identificata nel 2% dei pazienti PD presentano una ridotta espressione di GLT-1 sulla superficie della membrana a causa di una disfunzione nel suo traffico vescicolare⁶⁰.

Gli astrociti svolgono un ruolo cruciale per il mantenimento della barriera ematoencefalica, una struttura che permette di filtrare le sostanze presenti nell'organismo lasciando passare solo le molecole fondamentali per il SNC e bloccando possibili sostanze tossiche o patogeni. È formata da cellule endoteliali dei vasi con giunzioni strette e una serie di trasportatori espressi dalle cellule che formano la barriera, che esportano e importano molecole in modo selettivo⁶⁵. Gli astrociti, con le loro estroflessioni citoplasmatiche, chiamate pedicelli astrocitari, avvolgono i vasi e impediscono il passaggio di molecole idrofobe. In seguito a specifici stimoli, sono in grado di rilasciare diversi fattori come prostaglandine, ossido nitrico e acido arachidonico, che possono influire sul diametro dei vasi sanguigni, aumentandolo o diminuendolo in base alla necessità di modulare il flusso sanguigno mediante stimolo iniziale dal SNC⁶⁶⁻⁶³. Questo stretto contatto con i vasi permette agli astrociti di prelevare il glucosio dai vasi sanguigni e rilasciarlo a diversi elementi del tessuto nervoso sotto forma di metaboliti energetici. Gli astrociti, infatti, sono il principale deposito di granuli di glicogeno nel SNC⁵⁷, utilizzati per sostenere i neuroni nei periodi di alta attività nervosa oppure in caso di ipoglicemia⁶⁷, quando può essere trasformato in lattato e trasferito ai neuroni che lo utilizzano come fonte di energia⁶². Un'altra funzione

fondamentale in cui gli astrociti sono coinvolti è la fagocitosi, meccanismo importante sia per l'attivazione della risposta immunitaria innata utile per la difesa dai patogeni che per l'eliminazione di detriti cellulari prodotti durante il neurosviluppo o a causa di traumi. Inizialmente, il ruolo fagocitico si attribuiva solo alla microglia⁶², ma recentemente si è scoperto che anche gli astrociti si occupano di eliminare detriti cellulari e cellule morte oltre a regolare la formazione delle sinapsi⁶³. Infatti, i processi astrocitari sono molto dinamici e modulano costantemente la loro associazione con le sinapsi formando dei domini a stretto contatto a livello dei quali le sinapsi prodotte in eccesso durante la crescita vanno incontro ad un processo selettivo di rimozione⁶⁴.

1.2.1.1 Gli astrociti durante lo sviluppo neuronale e sinaptico

Le prime evidenze di un coinvolgimento degli astrociti nel processo di formazione delle sinapsi (sinaptogenesi) sono state ottenute su cellule gangliari della retina, caratterizzate da un alto tasso di sopravvivenza in condizioni di purezza e in assenza di siero. È stato visto che, in assenza di astrociti, queste cellule neuronali formano dendriti e assoni e sono elettricamente eccitabili, ma non presentano una forte attività sinaptica che, al contrario, diventa cento volte più forte in presenza di astrociti⁶⁸. Più recentemente, si è visto anche che in modelli murini c'è un coordinamento tra il periodo in cui si sviluppano le sinapsi e il periodo di comparsa degli astrociti: la sinaptogenesi avviene nelle prime 2-3 settimane di vita, quando gli astrociti iniziano a crescere in modo dinamico. Tra i molteplici fattori rilasciati da queste cellule, sono state identificate diverse proteine fondamentali per lo sviluppo neuronale e sinaptico. Le più importanti sono le proteine associate alla matrice appartenenti alla famiglia delle trombospondine (TSP) 1 e 2, fondamentali per la parte strutturale della sinaptogenesi. È stato visto, infatti, che la TSP1, se utilizzata per trattare neuroni in coltura cellulare, causa un aumento dell'espressione di proteine sinaptiche, un aumento della lunghezza dei dendriti e una maggiore complessità della morfologia dei processi⁶⁹. Queste sinapsi non sono, però, funzionali se le colture vengono trattate unicamente con le trombospondine a causa dell'assenza dei recettori per l'acido α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA)⁶⁹, nonché recettori del glutammato responsabili della risposta a rapide variazioni di questo neurotrasmettitore nell'ambiente. Gli astrociti sono fondamentali anche nella maturazione funzionale delle sinapsi, grazie al rilascio di un'altra proteina, pentraxina 3 (PTX3). Questo fattore permette l'inserimento dei recettori AMPA nelle membrane, rendendo le sinapsi capaci di rispondere agli stimoli glutamatergici⁷⁰.

Gli astrociti rilasciano diverse proteine con funzioni legate alla regolazione della segnalazione delle sinapsi glutamatergiche: si tratta di proteine in grado di aumentare la presenza di AMPAR nello spazio post-sinaptico, come il fattore tumorale necrotico- α (TNF- α) e i glicopirani 4 e 6 (GPC4, GPC6), proteine che

causano un calo dell'espressione di AMPAR post-sinaptica, come la proteina acida secreta ricca in glicina (SPARC), fattori che stabilizzano gli AMPAR sulla membrana, come i condroitin solfati proteoglicani (CSPGs) e fattori che aumentano l'espressione dei recettori per N-metil-D-aspartato (NMDAR), come il fattore neurotrofico dipendente da attività (ADNF)⁷².

Oltre a proteine importanti per il processo di sinaptogenesi, gli astrociti rilasciano anche altri fattori fondamentali nello sviluppo come le neurotrofine. All'interno di questa classe di molecole, è stato dimostrato che gli astrociti secernono il fattore neurotrofico derivante dal cervello (BDNF) e il fattore neurotrofico derivante dalla glia (GDNF), fattori in grado di stimolare crescita e differenziazione di progenitori neuronali e di garantirne la sopravvivenza⁷¹. La funzione di secrezione delle cellule astrocitarie è, quindi, fondamentale per avere uno sviluppo corretto del tessuto nervoso e una corretta omeostasi visto il grande raggio di funzioni ricoperte dalle molecole secrete, dalla sinaptogenesi alla neurogenesi al funzionamento della trasmissione del segnale sinaptico.

1.2.2 Reattività astrocitaria e patologie

Il corretto funzionamento degli astrociti è molto importante per mantenere l'omeostasi del SNC ed alterazioni delle loro funzioni possono contribuire all'insorgenza e alla progressione di varie patologie, come alcune malattie neurodegenerative⁷³. Un aspetto fondamentale è l'infiammazione, che comprende la presenza di astrociti reattivi nella maggioranza dei casi di patologia⁷⁴. La reattività è uno stato in cui queste cellule vanno incontro a cambiamenti morfologici e molecolari che possono portare ad alterazioni funzionali e ad uno sbilanciamento tra le loro proprietà neuroprotettive e neurotossiche. È definita da cambiamenti molecolari, cellulari e funzionali che si verificano negli astrociti in risposta a diversi insulti e consistono in alterazioni nell'espressione molecolare, ipertrofia cellulare progressiva e, nei casi gravi, proliferazione e formazione di cicatrici. Le modifiche subite durante la reattività astroglitica hanno il potenziale per alterare le attività degli astrociti sia attraverso l'acquisizione che la perdita di funzioni che possono influire in modo benefico o dannoso sulle cellule neurali e non neurali circostanti.

La risposta infiammatoria nel SNC è gestita prevalente dalla microglia, ma gli astrociti sono fondamentali come effettori⁷⁵ e la reattività astrocitaria può essere alterata dallo stato della microglia⁷⁶ che, a sua volta, può essere alterata da vari stimoli tra cui anche il microbioma⁷⁷. Uno stato infiammatorio può quindi diffondersi facilmente nel SNC, coinvolgendo anche cellule come gli astrociti che perdono le loro normali funzioni, e alimentano ancora di più l'infiammazione favorendo lo sviluppo di patologie come il morbo di Parkinson (PD), la malattia di Alzheimer (AD) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA). In queste patologie, infatti, sembra che un primo stimolo infiammatorio generato dai neuroni si diffonda poi

nelle cellule della glia che si attivano e perdono la funzionalità generando uno stato infiammatorio in tutto il tessuto nervoso e poi degenerazione cellulare. Nei casi di pazienti affetti da AD, è noto che la neuroinfiammazione si verifichi negli stadi precoci della malattia favorendone, poi, il peggioramento. In questa patologia, è ricorrente la presenza di accumuli di proteine come tau e amiloide- β , con cui la glia interagisce evitandone l'accumulo, ma cambiamenti nella loro capacità metabolica, tipici dello stato di reattività, possono portare ad un mancato smaltimento e ad un accumulo, stimolando ulteriormente la risposta infiammatoria tramite il rilascio di citochine proinfiammatorie⁷⁸.

La proteina acida fibrillare gliale (GFAP) è diventata il principale marcatore utilizzato per l'identificazione immunohistochimica degli astrociti in condizioni patologiche.

1.2.3 Comunicazione intercellulare: onde Ca^{2+} e neurotrasmettitori

Inizialmente, gli astrociti erano considerati cellule non eccitabili in quanto, a differenza dei neuroni, non presentavano eccitabilità elettrica. Tuttavia, la presenza di canali di potassio e sodio, che consente di generare correnti in risposta a stimoli, ha permesso di rivedere la definizione di queste cellule. Infatti, ad oggi, è noto che, sebbene non siano in grado di generare potenziali d'azione, gli astrociti partecipano attivamente alla comunicazione sinaptica attraverso variazioni di concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare^{79,80}. In particolare, le riserve di Ca^{2+} conservate nel reticolo endoplasmatico vengono mobilitate e, così, la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} aumenta in modo esponenziale, andando ad agire come segnale⁷⁹, che può anche essere propagato ad altri astrociti. L'alterazione dei livelli di Ca^{2+} può avvenire come un processo spontaneo⁸¹ oppure può essere indotta da diversi stimoli, come i neurotrasmettitori⁷⁹. Infatti, gli astrociti fanno parte della sinapsi tripartita assieme alle componenti presinaptica e post-sinaptica, quadripartita se si considera anche la microglia. Questi elementi comunicano tra loro per il corretto funzionamento dell'ambiente sinaptico. Non c'è, quindi, solo un passaggio di informazioni dall'ambiente presinaptico all'ambiente postsinaptico, ma anche gli astrociti scambiano informazioni con i neuroni, rispondono all'attività neuronale e regolano la trasmissione sinaptica⁸².

Per poter comunicare all'interno dell'ambiente sinaptico, ricevere segnale e stimolare a loro volta, gli astrociti devono presentare sulla membrana dei recettori appositi. Recentemente, è stato dimostrato che, nella membrana citoplasmatica astrocitaria, sono presenti recettori per quasi tutti i neurotrasmettitori, tra cui anche i recettori dopaminergici della classe dei GPCR⁸³. Una volta rilasciati nello spazio intersinaptico, i neurotrasmettitori possono, quindi, attivare specifici recettori la cui attivazione permette all'enzima PLC di tagliare il fosfatidilinositolo (PIP) formando diacilglicerolo (DAG) e IP3. L'IP3 si lega in modo specifico a dei

recettori presenti sul reticolo endoplasmatico cellulare e favorisce il rilascio di Ca^{2+} per differenza di concentrazione tra il reticolo, in cui è altamente concentrato, e il citoplasma⁸⁴. In questo modo, il Ca^{2+} citoplasmatico aumenta in modo elevato in pochissimo tempo e può generare diversi effetti, quali il rilascio di gliotrasmettitori, termine che identifica piccole molecole rilasciate dalle cellule della glia nelle sinapsi e in grado di influire sul segnale sinaptico mediante legame con recettori specifici⁸⁵, come glutammato e l'ATP⁸².

1.2.5 Il segnale dopaminergico negli astrociti

Le cellule della glia, come già anticipato, fanno parte della sinapsi quadripartita assieme all'elemento presinaptico e al compartimento postsinaptico e, in questo modo, partecipano attivamente all'attività sinaptica rispondendo a vari neurotrasmettitori. Tra questi, è stato visto che la dopamina può essere percepita nell'ambiente extracellulare dalle cellule gliali in quanto sono stati identificati vari DRDs sia nelle cellule microgliali⁸⁶ che negli astrociti^{87,88}. Negli ultimi anni, sono stati riportati diversi effetti della trasmissione del segnale dopaminergico sulle funzioni astrocitarie e della conseguente influenza sull'ambiente sinaptico. Una delle zone più indagate è lo striato, porzione del mesencefalo ricca di innervazioni dopaminergiche. Tra le funzioni astrocitarie regolate dalla dopamina, è stato recentemente descritto il controllo dello stato infiammatorio, il rilascio di neurotrofine stimolanti la crescita e l'aumento della complessità neuronale ed il rilascio di gliotrasmettitori importanti per la regolazione della trasmissione sinaptica.

1.2.5.1 Modulazione della risposta infiammatoria

Le cellule della glia sono fondamentali nel controllo dello stato infiammatorio del tessuto nervoso. Un esempio è dato dall'attività della microglia nei casi di infortunio traumatico al cervello (TBI), condizione dovuta a urti meccanici che generano danni al cervello e che rappresenta un fattore di rischio per malattie neurodegenerative come PD e AD⁸⁹. In questa patologia, è presente uno stato di attivazione cronico della microglia, la quale favorisce l'avanzamento della patologia a stadi più avanzati mediante il rilascio di citochine pro-infiammatorie⁹⁰. Anche gli astrociti sono risultati largamente coinvolti nello stato infiammatorio del SNC: queste cellule presentano delle proteine, ritrovabili in quasi tutte le cellule, chiamate proteine dell'inflammasoma (NLRP). Una volta attivate, le proteine dell'inflammasoma sono in grado di reclutare una serie di fattori, tra cui la procaspasi 1, e una volta reclutata viene stimolata ad auto-attivarsi diventando caspasi 1. Questo fattore, a sua volta, causa la maturazione di citochine pro-infiammatorie come pro-IL-1 β e pro-IL-18 nelle loro forme attive che vengono, poi, secrete, stimolando l'infiammazione del tessuto⁹¹. Un altro ruolo della caspasi-1 è l'induzione della morte cellulare mediante piroptosi, che consiste in una rottura

precoce della membrana plasmatica che causa il rilascio di molecole associate a pericolo (DAMPs), come l'ATP, che alimentano ulteriormente l'infiammazione già presente⁹². IL-1 β e IL-18 hanno un ruolo importante nel SNC e molte cellule esprimono i recettori per esse, per cui il loro segnale stimola la cascata infiammatoria che può contribuire a generare lesioni nervose e morte cellulare⁹³, ma sono importanti anche nelle funzioni fisiologiche di cognizione, apprendimento e memoria⁹⁴. L'infiammazione nervosa può causare l'attivazione degli astrociti, i quali contribuiscono al peggioramento della condizione e possono favorire stati di disfunzione neuronale e neurodegenerazione. In questo meccanismo di segnalazione legato all'infiammazione sembrerebbe essere presente anche la dopamina, che, una volta rilasciata dai neuroni contatta gli astrociti e causa l'attivazione dei suoi recettori presenti nella superficie di queste cellule gliali. Quale sia il suo ruolo in questo processo però è tutt'ora in indagine. In alcuni studi concentrati sull'indagine delle funzionalità del segnale dopaminergico, è stato visto che l'assenza del D2R negli astrociti influenza in modo negativo la risposta immunitaria innata nel cervello e, come conseguenza, vengono causati uno squilibrio nell'omeostasi cerebrale e un aggravamento delle malattie neurodegenerative. In seguito ad esperimenti su topi, è stato dimostrato che la mancanza di D2R porta ad una maggiore responsività delle cellule gliali, soprattutto degli astrociti, e l'aumento di mediatori infiammatori. Questo aumenta, di conseguenza, la vulnerabilità dei neuroni dopaminergici e favorisce la morte neuronale in seguito a trattamento con una neurotossina chiamata MPTP. Questo processo sembra essere legato ad una proteina chiamata CRYAB, appartenente alla classe delle "heat-shock protein" e caratterizzata da funzioni neuroprotettive e antiinfiammatorie⁹⁵. Dai risultati ottenuti, l'assenza del recettore astrocitario D2R porta ad una diminuzione della sua espressione e, conseguentemente, della sua attività cellulare. Questo si riflette in un aumento della reattività astrocitaria, che porta ad un'aumentata secrezione di citochine pro-infiammatorie⁹⁶.

Uno studio successivo ha ulteriormente evidenziato come il segnale dopaminergico può avere un effetto antinfiammatorio a livello degli astrociti striatali. Il legame della dopamina con il D2R astrocitario porta ad una riduzione dell'attività dell'inflammasoma: in particolare, la stimolazione del D2R porta ad un calo significativo delle forme attive della citochina IL-1 β e della caspasi-1. Questo denota la riduzione dell'attività del complesso proteico dell'inflammasoma e, di conseguenza, una riduzione dell'infiammazione stimolata dagli astrociti⁹⁷.

Quasi contemporaneamente, in un altro studio, è stato evidenziato che questo effetto antinfiammatorio mediato dal D2R astrocitario è compromesso in presenza di α -sinucleina. È stato testato l'effetto *in vivo* dell'attivazione del D2R in

topi controllo e in topi transgenici aventi il gene dell' α -sinucleina mutato con una mutazione presente in pazienti PD. È stato dimostrato che, in topi trattati con MPTP per stimolare una risposta infiammatoria, il trattamento degli animali con un agonista del D2R, il quinpirolo, è in grado di bloccare l'aumento di produzione dei mediatori pro-infiammatori. Viene, infatti, impedita l'attivazione della cascata di segnale generata dal Toll-like receptor 4 (TLR4). Tutto questo, però, non è visibile nei topi aventi la mutazione nel gene dell' α -sinucleina, suggerendo che l'accumulo e la mutazione di questa proteina possa portare a disfunzioni nel meccanismo antinfiammatorio mediato dal D2R astrocitario.⁹⁸

1.2.5.2 Regolazione dell'attività neuronale

Il segnale dopaminergico a livello astrocitario non coinvolge solamente l'ambito infiammatorio, ma è in grado di influenzare anche il rilascio di fattori stimolanti lo sviluppo e la complessità neuronale. I fattori neurotrofici sono molecole rilasciate da varie cellule, tra cui gli astrociti, e caratterizzate da funzioni importanti per la crescita e il corretto sviluppo dei neuroni. Un esempio è rappresentato dal fattore di crescita dei nervi (NGF), necessario per la sopravvivenza e lo sviluppo del sistema nervoso periferico⁹⁹. I neuroni periferici presentano recettori specifici per NGF¹⁰⁰ che, una volta internalizzato, viene trasportato in modo retrogrado nel soma, dove stimola la sopravvivenza neuronale durante il periodo di normale morte cellulare.¹⁰¹ A livello del SNC, il GDNF presenta un'alta specificità per i neuroni dopaminergici del mesencefalo nei quali induce un effetto trofico e protettivo¹⁰², così come nei neuroni noradrenergici del *locus coeruleus*¹⁰³ e nei motoneuroni periferici¹⁰⁴.

Inoltre, è stato scoperto che la stimolazione del D1R espresso in cellule fetali astrocitarie con dopamina o agonisti specifici aumenta la quantità di GDNF rilasciato dalla cellula e la produzione del rispettivo trascritto¹⁰⁵. Il risultato ottenuto suggerisce che, nell'ambiente cellulare, la dopamina rilasciata dai neuroni viene recapitata agli astrociti che rispondono rilasciando fattori neurotrofici e promuovendo la crescita neuronale con un meccanismo a feedback. Infine, molto recentemente, è stato dimostrato che l'interazione dopamina-astrociti può essere legata anche al controllo della trasmissione sinaptica.

Andando ad esaminare la corrente eccitatoria post-sinaptica (EPSC) con e senza applicazione locale di dopamina, è stato visto che l'attivazione del D1R astrocitario porta ad una riduzione della EPSC conseguente ad un aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare. È stato dimostrato che quest'effetto è mediato dall'adenosina attiva come gliotrasmettitore. La dopamina, infatti, stimola il recettore D1 astrocitario che, tramite la cascata di segnalazione, porta ad aumentare la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare e, di conseguenza, i livelli di ATP. Quest'ultimo viene convertito in adenosina che viene rilasciata nello spazio

sinaptico dove agisce su recettori dell'adenosina A1, attivando una cascata di segnalazione che riduce l'intensità dell'EPSC⁸⁰.

2. Obiettivo dello studio

Questo progetto mira ad investigare il meccanismo di comunicazione tra astrociti e neuroni, basato sul rilascio di proteine da parte degli astrociti in seguito a un segnale dopaminergico proveniente dai neuroni.

Gli astrociti svolgono diversi ruoli cruciali per il mantenimento dell'omeostasi del SNC⁶². Negli ultimi anni, è stata scoperta la loro importanza nell'ambiente sinaptico, soprattutto per quanto riguarda la loro funzione di secrezione di fattori influenzanti sia la crescita neuronale che l'attività sinaptica in risposta a segnali neuronali. L'alterazione di questa funzione astrocitaria può portare all'insorgenza e allo sviluppo di diverse patologie¹⁰⁶.

È ormai noto che gli astrociti esprimono una vasta gamma di recettori per i neurotrasmettitori, tra cui i recettori dopaminergici⁹⁰⁻⁹¹. Questo suggerisce una capacità della dopamina di influenzare l'ambiente sinaptico mediante l'attivazione di varie cascate di segnalazione a livello astrocitario. Infatti, in letteratura, sono stati descritti alcuni effetti della segnalazione dopaminergica legata alla comunicazione tra astrocita e neurone mediante rilascio di proteine. Tuttavia, le scoperte principali si concentrano su sottocategorie specifiche di molecole, quali citochine pro-infiammatorie⁹⁹, neurotrofine¹⁰⁸ o gliotrasmettitori⁸².

In questo contesto, però, non è chiaro come il secretoma astrocitario, nonché l'intero set di proteine rilasciate dagli astrociti nell'ambiente extracellulare, possa variare in termini di composizione e quantità in seguito ad un segnale dopaminergico. Inoltre, non è ancora stato indagato l'effetto di una potenziale modulazione del secretoma astrocitario a livello neuronale e sinaptico.

Tra le zone encefaliche in cui l'importanza del segnale dopaminergico è maggiore, lo striato riscuote un particolare interesse poiché è l'area del cervello in cui arrivano maggiormente le terminazioni dopaminergiche, caratteristiche della via nigro-striatale⁸. In relazione a questo, si è deciso di utilizzare colture primarie di astrociti striatali come principale modello di studio.

Si è deciso, inizialmente, di valutare come fosse distribuita l'espressione dei recettori dopaminergici negli astrociti dell'encefalo. In seguito al confronto dell'espressione di trascritti e proteine dei vari DRDs in astrociti primari provenienti da zone diverse del cervello (corteccia, mesencefalo e striato), i dati preliminari hanno evidenziato che il recettore D1 è più espresso a livello striatale (Fig.6).

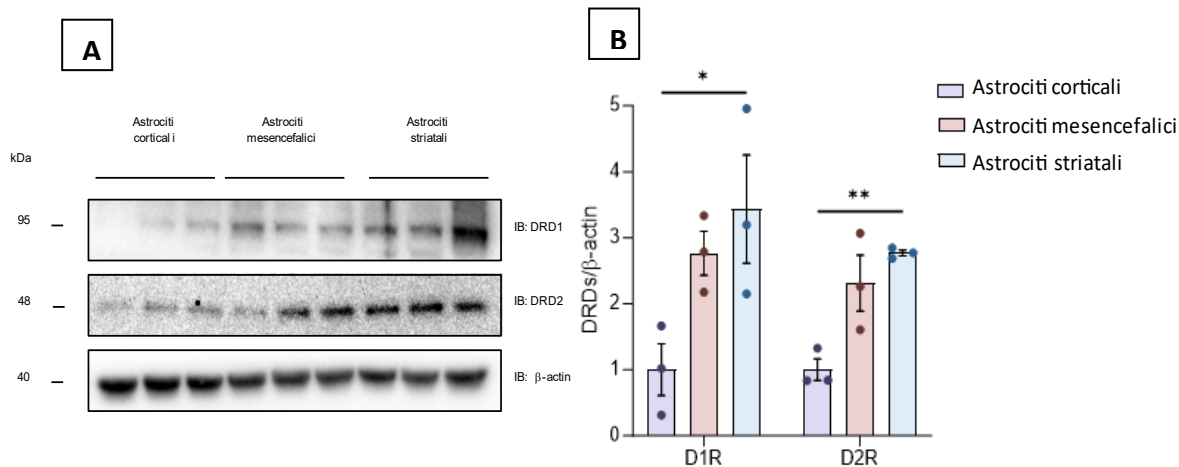


Figura 6: A) Western Blot rappresentativo per il confronto dei livelli proteici di D1R e D2R in astroцитi corticali, mesencefalici e striatali; B) Quantifica dei livelli di proteine D1R e D2R, n=3 replicati biologici analizzati con One-way Anova, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

Dal momento che il D1R astrocitario è già stato descritto come mediatore di vie di segnalazione culminanti con il rilascio di neurotrofine¹⁰⁸ e gliotrasmettitori⁸², si è deciso di investigare il suo ruolo in merito alla comunicazione astrocita-neurone mediata dal rilascio di proteine.

Dopo aver confermato la capacità di rispondere alla dopamina alle concentrazioni compatibili con una risposta mediata dal D1R, si è deciso di optare per l'utilizzo di un agonista specifico, SKF-38393¹⁰⁷, per i successivi esperimenti. La scelta di un agonista, preferito alla dopamina di per sé, è stata dettata da due fattori principali: come già descritto (Paragrafo 1.1.2), si tratta di una molecola specifica, che si lega unicamente al recettore D1, a differenza della dopamina che, invece, lega i recettori dopaminergici in modo indistinto. In questo modo, è possibile attivare una cascata di segnale con la certezza che sia mediata unicamente dal recettore D1. Inoltre, si tratta di una molecola chimicamente stabile, a differenza della dopamina che può essere facilmente ossidata.

Prima di focalizzare lo studio su uno specifico processo biologico, è stata condotta un'analisi di proteomica sul mezzo condizionato dagli astroцитi (ACM) in seguito ad attivazione del D1R. Questo approccio ha permesso di avere un quadro completo delle proteine rilasciate in modo dipendente dalla segnalazione dopaminergica e di identificare diverse molecole associate alla comunicazione coi neuroni.

Sulla base dei risultati ottenuti dagli esperimenti preliminari, quindi, si è deciso di studiare l'analisi dell'effetto dell'ACM derivante da astrociti trattati con l'agonista del D1R sulla morfologia e sullo sviluppo neuronale e sinaptico.

Nel dettaglio l'ACM è stato raccolto e concentrato in seguito al trattamento per 1 ora o 24 ore con l'agonista del D1R. Questi due tempi sono stati scelti per valutare sia un effetto dell'immediato rilascio di proteine (con un tempo breve, di 1 ora), che un effetto legato all'espressione e al rilascio di nuovi fattori (con un tempo più lungo, di 24 ore). L'ACM è stato utilizzato per supplementare (o meno) il mezzo di coltura neuronale dal giorno della semina al fine di verificare se, come indicato dai dati preliminari, con l'identificazione di proteine positivamente coinvolte nello sviluppo neuronale, l'ACM generato da astrociti in seguito ad attivazione del D1R favorisse la crescita neuronale¹⁰⁸. Per verificare questo è stato scelto come indice la complessità neuronale, analizzandola con dei software specifici, la presenza di una complessità morfologica maggiore potrebbe essere indice che l'attivazione del D1R rilascia effettivamente fattori con effetto sulla crescita neuronale.

Nella seconda parte del progetto, invece, l'ACM è stato utilizzato per trattare dei neuroni nel periodo di sviluppo e maturazione delle sinapsi al fine di verificare, tramite tecniche di western blot ed immunofluorescenza, un potenziale effetto delle proteine astrocitarie rilasciate in seguito ad attivazione di D1R.

3. Materiali e metodi

3.1 Colture primarie di neuroni corticali

Inizialmente, sono stati preparati vetrini e piastre polilisinati: i vetrini sono stati immersi in etanolo al 70% e, una volta posizionati all'interno di una piastra da 24 pozzetti, sono stati esposti per 20 minuti a luce UV per la sterilizzazione. Successivamente, ogni piastra è stata trattata con Poly-L-lisina (Sigma, P1274-100MG), una sostanza in grado di migliorare l'interazione elettrostatica tra gli ioni carichi negativamente della membrana cellulare e gli ioni superficiali carichi positivamente dei substrati utilizzati per le colture cellulari, aumentando il numero di siti disponibili per il legame cellulare. In seguito a incubazione a 37°C per 2 ore, la Poly-L-lisina è stata rimossa e sono stati eseguiti lavaggi con acqua sterile e tampone fosfato salino di Dulbecco (DPBS, Biowest L0615).

Per ottenere delle colture primarie neuronali, è stato rimosso il cervello da cuccioli appena nati (P0, postnatal day 0) C57BL/6J (wild-type) ed è stato trasferito in mezzo da dissezione freddo. Una volta completata la procedura di dissezione, le cortecce sono state triturate in pezzi più piccoli tramite pipettaggio con una pipetta P1000 e sono state trasferite in una soluzione di Papaina, dove sono state triturate nuovamente tramite un altro pipettaggio con una sierologica da 5mL. La soluzione è stata incubata per 40 minuti a 37°C, durante i quali è stata mescolata per inversione ogni 10 minuti. Successivamente, le cellule sono state risospese per 10 volte con una sierologica da 5mL e la sospensione cellulare è stata centrifugata per 5 minuti in una centrifuga a rotore ad asse mobile a 200g. Il surnatante è stato scartato e si sono aggiunti 3mL di soluzione di STOP al pellet. È stata ripetuta una triturazione tramite pipettaggio per 3 volte con una sierologica da 5mL per poi incubare a temperatura ambiente (RT) per 10 minuti: così facendo, i pezzi di tessuto non dissociati precipitano. Il surnatante è stato pipettato gentilmente goccia a goccia in 5mL di soluzione 10/10 e la soluzione è stata centrifugata per 10 minuti a 100g. Dopo aver scartato il surnatante, il pellet è stato risospeso in circa 5mL di mezzo di coltura neuronale e le cellule sono state diluite 1:10 in 0,4% di trypan blue per essere contate. Approssimativamente, 1.500.000 neuroni sono stati seminati in ogni pozzetto di una piastra da colture cellulari da 6 pozzetti e 200.000 neuroni sono stati piastrati in ogni pozzetto di una piastra da colture cellulari da 24 pozzetti. Le cellule sono state incubate a 37°C e 5% CO₂ e, dopo 4 giorni, sono state trattate con Citosina Arabinoside (Ara-C) 1μM, farmaco antimitotico che permette di bloccare la proliferazione cellulare e, quindi, di limitare la contaminazione data da cellule gliali. Al settimo giorno, il terreno è stato sostituito con metà terreno nuovo e metà terreno condizionato e filtrato con dei filtri da 0,45μm, ottenendo una miscela 1:1.

	Reagente	Concentrazione finale
Mezzo di dissezione	<ul style="list-style-type: none"> • HBSS senza rosso fenolo (H8264, Sigma) • 1M HEPES pH 7.3 (L0180-100, Biowest) • D-(+)-glucosio (G8769, Sigma) • Sodio piruvato (S8636-100mL, Sigma) 	<ul style="list-style-type: none"> • - • 10mM • 0,1% • 1X (0,11mg/ml)
Soluzione di DNasi	<ul style="list-style-type: none"> • EBSS con rosso fenolo (E7510, Sigma) • Fiala di DNase (59A18961, Worthington BioCorp) 	<ul style="list-style-type: none"> • 1mg/mL • -
Soluzione di Papaina	<ul style="list-style-type: none"> • EBSS con rosso fenolo • Fiala di Papaina (59B19123, Worthington BioCorp) • Soluzione di DNasi 	<ul style="list-style-type: none"> • - • - • -
Soluzione di inibitori della tripsina	<ul style="list-style-type: none"> • Inibitori della tripsina (T9253-5G, Sigma) • EBSS con rosso fenolo 	<ul style="list-style-type: none"> • 15,5mg/mL • -
Soluzione di STOP	<ul style="list-style-type: none"> • EBSS con rosso fenolo • Soluzione di DNasi • Soluzione di inibitori della tripsina 	<ul style="list-style-type: none"> • - • - • -
Soluzione 10/10	<ul style="list-style-type: none"> • EBSS con rosso fenolo • Inibitori della tripsina • Albumina di siero bovino (BSA, RT8076.4, Carl Roth) 	<ul style="list-style-type: none"> • - • 10µg/mL • 10µg/mL
Terreno di coltura	<ul style="list-style-type: none"> • Neurobasal (20103049, ThermoFisher) • L-Glutamine (25030, ThermoFisher) • B27™ (17504044, ThermoFisher) • Penicillina/Streptomina (PS, L0022-100, Biowest) 	<ul style="list-style-type: none"> • - • 0,5mM • 1X • 2X

Tab.1: Soluzioni per dissezione, dissociazione e coltura a partire da 5-6 cervelli con quantità dei relativi componenti.

3.2 Colture primarie di astrociti striatali

Per ottenere delle colture primarie astrocitarie, è stato rimosso il cervello da cuccioli P0-P2 C57BL/6J (wild-type) ed è stato trasferito in DPBS freddo per la dissezione. Una volta completata la procedura, il DPBS è stato rimosso ed è stato aggiunto 1mL di terreno di coltura (BME+/+) formato da Basal Medium Eagle (BME, L0042, Biowest) supplementato con siero fetale di bovino (FBS) 10% e PS 1%. Tramite pipettaggio, le porzioni dello striato sono state frammentate e trasferite al di sopra di un setaccio cellulare da 70µm posto in un tubo Falcon da 50mL. Sono stati, poi, aggiunti 24mL di BME sopra al setaccio e, con lo stantuffo di una siringa, il tessuto è stato pestellato permettendo di rimuovere eventuali residui non ancora filtrati. Successivamente, sono state eseguite 3 centrifughe da 15 minuti a 300g: al termine di ogni centrifuga, è stato scartato il surnatante ed il pellet è stato risospeso in 25mL di BME. Infine, la sospensione cellulare è stata seminata in fiasche da 75mL o 175mL, che sono state incubate a 37°C e 5% CO₂. Dopo 7 giorni, il terreno è stato completamente sostituito.

Una volta raggiunta la confluenza, il terreno di coltura è stato rimosso ed è stato eseguito un lavaggio con DPBS per eliminare gli eventuali residui di siero. Successivamente, le cellule sono state staccate dalla superficie della fiasca aggiungendo tripsina 1X supplementata con acido etildiamminotetraacetico (EDTA) 0.5mM, applicando urti meccanici. Le cellule sono state risospese in BME+/+, così da inattivare la tripsina. La sospensione cellulare è stata, quindi, trasferita in un tubo Falcon ed è stata eseguita una centrifuga a 300g per 5 minuti. Il surnatante è stato eliminato, il pellet è stato risospeso in BME+/+ e gli astrociti sono stati seminati in una piastra da 10cm per coltura cellulare.

3.3 Preparazione del mezzo condizionato astrocitario (ACM)

ACM è il terreno di coltura in cui gli astrociti crescono e rilasciano diversi fattori. Per ottenerlo, inizialmente, gli astrociti seminati in piastre Petri sono stati trattati con clodronato (LIPOSOMA, C-005) ad una concentrazione di 5µg/mL per 72 ore: questo composto permette di bloccare la proliferazione delle cellule microgliali. Successivamente, gli astrociti sono stati trattati con l'agonista del D1R 2,3,4,5-Tetraidro-7,8-diidrossi-1-fenil-1H-3-benzazepina (SKF-38393) o con il veicolo, nonché il solvente in cui l'SKF-38393 è disciolto, dimetilsolfossido (DMSO) per 1 ora o 24 ore. Nel dettaglio, sono state preparate due miscele in terreno Neurobasal supplementato con glutammina e PS 1% (Neurobasal+/+), contenenti SKF-38393 ad una concentrazione finale di 10µM o il corrispettivo volume di DMSO. Dopo aver prelevato il terreno dalla piastra, sono stati eseguiti tre lavaggi con DPBS per

rimuovere eventuali residui di siero presenti. In seguito all'ultimo lavaggio, un volume opportuno di ciascuna miscela è stato aggiunto alle rispettive piastre, che sono state incubate per 1 ora o 24 ore a 37°C, 5% CO₂. Allo scadere del trattamento, gli ACM sono stati raccolti ed è stata eseguita una prima centrifuga a 400g per 5 minuti a RT così da eliminare eventuali cellule morte. Il surnatante è stato raccolto e centrifugato una seconda volta a 4000g a 4°C per rimuovere potenziali detriti cellulari; infine, il surnatante è stato trasferito in tubi concentratori da 3kDa precedentemente equilibrati. La concentrazione del terreno è avvenuta tramite delle centrifugazioni sequenziali a 4000g a 4°C fino al raggiungimento di una concentrazione pari a circa 30 volte quella iniziale.

Infine, il contenuto di proteine in ogni ACM è stato quantificato tramite il test del reattivo di Bradford (Paragrafo 3.4).

I diversi ACM preparati e utilizzati per gli esperimenti sono:

- ACM (DMSO 1h) = gli astrociti sono stati trattati con DMSO per 1 ora;
- ACM (DMSO 24h) = gli astrociti sono stati trattati con DMSO per 24 ore;
- ACM (SKF-38393 1h) = gli astrociti sono stati trattati con SKF-38393 per 1 ora;
- ACM (SKF-38393 24h) = gli astrociti sono stati trattati con SKF-38393 per 24 ore.

3.4 Quantificazione proteica con il reattivo di Bradford

Il test del reattivo di Bradford ha un range di sensibilità che va da 0 a 1.4µg/mL di proteina. Inizialmente, sono state preparate delle diluizioni di BSA a una nota concentrazione di 0, 0.25, 0.5, 1, 1.4 µg/mL in acqua deionizzata per ottenere una retta di taratura in cui è possibile interpolare i valori di assorbanza dei campioni non noti. È stata utilizzata una piastra da 96 pozzetti e, in ogni pozzetto, sono stati aggiunti 5µL di ogni campione e di ogni diluizione di BSA in triplicato. Successivamente, sono stati aggiunti 250µL di reattivo di Coomassie Brilliant Blue G-250, un colorante che è in grado di legarsi alle proteine e assumere una conformazione che conferisce una colorazione blu alla soluzione: l'intensità della colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di proteine presenti. In seguito all'aggiunta del colorante, la piastra è stata incubata in agitazione 5 minuti a RT per poi leggerne l'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595nm.

3.5 Trattamento dei neuroni con ACM

3.5.1 Analisi morfologica

Per l'analisi dell'effetto delle proteine rilasciate dagli astrociti in seguito ad attivazione del D1R sulla morfologia neuronale, sono stati utilizzati neuroni seminati su vetrini in piastre da 24 pozzetti. Il mezzo di coltura in cui i neuroni sono

stati piastrati è stato supplementato con i diversi ACM ad una concentrazione proteica di 3µg/mL. Dal momento che, in seguito alla procedura di raccolta e concentrazione del terreno condizionato dagli astrociti, è possibile che alcune molecole di SKF-38393 rimangano nel terreno, è necessario verificarne l'effetto sulla crescita neuronale. È stata, quindi, aggiunta una condizione in cui il mezzo di coltura neuronale è stato supplementato con SKF-38393 ad una concentrazione di 5nM, corrispondente alla quantità di agonista presente nell'ACM utilizzato per il trattamento.

A DIV3 (days *in vitro*), i neuroni sono stati trasfettati (Paragrafo 3.6) con eGFP (Green Fluorescent Protein) e sono stati incubati a 37°C e 5% CO₂.

A DIV4, i neuroni sono stati fissati con paraformaldeide (PFA) 4% per poter eseguire un'analisi di immunofluorescenza (Paragrafo 3.8).

3.5.2 Analisi sinaptica

Per l'analisi dell'effetto delle proteine rilasciate dagli astrociti nell'ACM in seguito ad attivazione del D1R sulle sinapsi neuronali, sono stati utilizzati neuroni seminati su vetrini in piastre da 24 pozzetti.

A DIV4, i neuroni sono stati trasfettati (Paragrafo 3.6) con due plasmidi esprimenti eGFP e PSD95-RFP (proteina Post-Synaptic Density 95 taggata con Red Fluorescent Protein).

A DIV7, è stato eseguito un cambio di terreno (Paragrafo 3.1) e, in concomitanza, è stato effettuato un trattamento cronico mantenendo le seguenti condizioni presenti nell'analisi morfologica (Paragrafo 3.5.1): Neurobasal, 5nM SKF, ACM (DMSO 24h), ACM (SKF 24h).

I neuroni sono stati coltivati fino a DIV14, quando sono stati fissati oppure lisati.

3.6 Trasfezione

La trasfezione permette a una cellula di esprimere una proteina di interesse, tramite l'utilizzo di un plasmide come vettore contenente il gene della proteina. Sono state preparate due soluzioni, contenenti rispettivamente il DNA plasmidico e l'agente trasfettante lipofectamina (Lipo2000, #11668019, Life Technologies), in Opti-MEM (ThermoFisher, 31985070), un terreno povero di siero.

Per l'analisi morfologica, i neuroni sono stati trasfettati con 0.5µg di DNA esprimente eGFP al fine di identificare il singolo neurone. Invece, per l'analisi sinaptica, i neuroni sono stati trasfettati con 1µg di DNA esprimente due diverse proteine, eGFP e PSD95-RFP (rispettivamente, 0.4µg e 0.6µg), al fine di evidenziare la morfologia dei singoli neuroni e marcarne le terminazioni postsinaptiche.

La lipofectamina è un agente che facilita l'ingresso di DNA all'interno della cellula ed è stata aggiunta in un rapporto 1:2 µg DNA con µL lipofectamina.

Una volta preparate, le due soluzioni, contenenti DNA e lipofectamina, sono state unite e incubate per 20 minuti a RT. Al termine dei 20 minuti, la mix di trasfezione è stata aggiunta in ogni pozzetto ed i neuroni sono stati incubati per 45 minuti a 37°C, 5% CO₂. Infine, la mix di trasfezione è stata prelevata dai pozzetti e sostituita con il terreno in cui i neuroni erano stati seminati.

3.7 Lisi cellulare e western blot (WB)

Dopo aver rimosso il terreno e aver eseguito un lavaggio con DPBS al fine di rimuovere i residui di siero, i neuroni sono stati lisati in RIPA buffer 1X supplementato con inibitori di fosfatasi (Tab.2) e proteasi (1X, Sigma 1187358001). È stata eseguita una lisi meccanica in ghiaccio utilizzando un raschietto. Ogni campione è stato raccolto all'interno di provette Eppendorf, incubato per 30 minuti in ghiaccio e centrifugato alla massima velocità (20238g) per 30 minuti per chiarificare i surnatanti e rimuovere i pellet contenenti detriti cellulari. Infatti, i lisati proteici sono stati trasferiti in nuove provette Eppendorf e sono stati conservati a -80° C fino al momento dell'utilizzo.

La concentrazione proteica di ciascun lisato è stata quantificata tramite il test del reattivo Bradford (Paragrafo 3.4).

I campioni, contenenti 30µg di proteine, sono stati caricati in un gel di acrilamide al 4-20% (Bio-Rad, 4561094) e la corsa è avvenuta a 150V in TRIS-MOPS. Al termine della corsa, le proteine sono state trasferite dal gel su una membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF), precedentemente attivata in metanolo, tramite il Transfer-Blot Turbo (Bio-Rad), con protocollo "high molecular weight" (1.3 Ampere, 25 Volt, 20 minuti). Al termine del trasferimento, la membrana è stata riattivata in metanolo e risciacquata con una miscela di soluzione salina tamponata con 1% di tris(idrossimetil)amminometano cloridrato e polisorbato 20 (TBS-T) ed è stata incubata per almeno 45 minuti in una soluzione di saturazione composta da 5% latte diluito in TBS-T (Tab.2).

Successivamente, la membrana è stata incubata con i rispettivi anticorpi primari (Tab.3) per tutta la notte (overnight, o/n) a 4°C.

Il giorno seguente, i residui di anticorpo primario sono stati rimossi tramite 3 lavaggi con TBS-T da 5 minuti l'uno. Successivamente, la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario (Tab.3) per 1 ora a RT in agitazione. In seguito ad altri 3 lavaggi con TBS-T da 5 minuti l'uno, le proteine sono state sviluppate al Imager CHEMI Premium (VWR) tramite l'utilizzo dell'Immobilon (Western HRP Substrate, Millipore).

Soluzioni:	Reagenti:	Concentrazione:
RIPA buffer	<ul style="list-style-type: none"> • TRIS-HCl (pH 7.5) • NaCl • Na₂EDTA • EGTA 0,5M • NP-40 • Sodio deossicolato 	<ul style="list-style-type: none"> • 1M • 5M • 0,5M • 0,5M • 1% • 1%
Inibitori di fosfatasi	<ul style="list-style-type: none"> • Sodio pirofosfato • β-glicerofosfato • Sodio ortovanadato 	<ul style="list-style-type: none"> • 2.5mM • 1mM • 1mM
Sample buffer 4X	<ul style="list-style-type: none"> • Blu di bromofenolo • SDS • DDT • TRIS (pH 6.8) • Glicerolo • Acqua 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,4% • 8% • 400mM • 200mM • 40% • -
TBS-20X	<ul style="list-style-type: none"> • NaCl • Tris-HCl (pH 7.4) • H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> • 3M • 200mM • -
TBS-T	<ul style="list-style-type: none"> • TBS-20X • Polisorbato 20 (Tween) • H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> • 1X • 1% • -

Tab.2: Soluzioni per lisi cellulare e WB.

Anticorpi:

Tipo:	Bersaglio:	Provenienza:	Diluizione:
Primario	α-Vamp2	Topo (SYSY, 104 211)	1:1000
Primario	α-phospho (Ser ⁴⁷³) -Akt	Topo (Santa Cruz, sc-293125)	1:500
Primario	GFAP	Coniglio (Dako, Z0334)	1:20000
Primario	α-Akt	Coniglio (Cell Signaling, 9272S)	1:1000
Primario	β3-tubulina	Pollo (SYSY, 302 306)	1:1000
Primario	α-Hsp90	Topo (BD Biosciences, 610419)	1:1000

Primario	α -Iba1	Coniglio (Wako, 019- 19741)	1:300
Primario	α -PSD95	Topo (abcam, ab2723)	1:1000
Secondario	α -Coniglio	Capra (Sigma, A9169)	1:16000
Secondario	α -Topo	Coniglio (Sigma, A9044)	1:80000

Tab.3: Anticorpi e diluizioni per WB.

3.8 Immunofluorescenza (IF)

Dopo aver rimosso il terreno di coltura, i neuroni a DIV4 (per l'analisi morfologica) o a DIV14 (per l'analisi sinaptica) sono stati lavati con DPBS in modo da eliminare eventuali residui di siero. Successivamente, sono stati incubati per 20 minuti a RT in PFA 4%. Sono stati, poi, svolti 3 lavaggi in DPBS e sono state preparate due soluzioni (Tab.4): una soluzione di permeabilizzazione (P.S.) e una soluzione di saturazione (B.S.). La P.S. serve a permeabilizzare la membrana cellulare e a permettere agli anticorpi di entrare nella cellula. La B.S. serve a saturare siti aspecifici a cui gli anticorpi potrebbero legarsi. Una volta preparate le soluzioni, è stato rimosso il DPBS dai pozzetti per aggiungere la P.S. che è stata incubata per 20 minuti a RT. È stato, poi, svolto un secondo passaggio di incubazione rimuovendo la P.S e aggiungendo la B.S. per almeno 1 ora in agitazione a RT. I vetrini sono stati, quindi, incubati con una soluzione contenente l'anticorpo primario (Tab.5), diluito in B.S., o/n a 4° C.

Per l'analisi morfologica, è stato utilizzato un anticorpo primario contro la proteina β 3-tubulina, mentre, per l'analisi sinaptica, è stato utilizzato un anticorpo primario contro la proteina presinaptica VAMP2.

Il giorno successivo, i vetrini sono stati lavati con DPBS per 3 volte (5 minuti per ogni lavaggio), dopodiché sono stati incubati con una soluzione formata dall'anticorpo secondario (Tab.5), diluito in B.S., al buio per un'ora a RT. Dopo questo passaggio, sono stati svolti 3 lavaggi da 5 minuti l'uno con DPBS e, successivamente, i vetrini sono stati incubati per 5 minuti a RT con una soluzione contenente un intercalante del DNA, Hoechst-33342, diluito 1:10000 in DPBS. Dopo altri 3 lavaggi da 5 minuti con DPBS, i vetrini sono stati fissati su vetrini portaoggetti tramite una goccia di Mowiol.

Le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza confocale Leica DM6B.

Soluzioni:	Reagenti:	Concentrazioni finali:
P.S.	<ul style="list-style-type: none"> • Triton-X • DPBS 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1% • -
B.S.	<ul style="list-style-type: none"> • FBS • DPBS 	<ul style="list-style-type: none"> • 5% • -

Tab.4: Soluzioni per IF.

Anticorpi:

Tipo:	Bersaglio:	Provenienza:	Diluizione:
Primario	α -Vamp2	Coniglio	1:200
Primario	α - β 3-tubulina	Pollo (SYSY, 302 306)	1:200
Secondario associato a fluoroforo	α -Topo-568	Capra (Invitrogen, A11004)	1:200
Secondario associato a fluoroforo	α -Pollo-647	Capra (Invitrogen, A21449)	1:200

Tab.5: Anticorpi primari e secondari associati a fluorofori utilizzati per IF con rispettive diluizioni.

3.9 Analisi delle immagini

Per analizzare le immagini dei neuroni, è stato utilizzato il software Fiji di ImageJ. Inizialmente, le immagini sono state preparate per l'analisi utilizzando le funzioni base del software e delle Macro create appositamente. Poi, sono stati utilizzati dei plugin di Fiji per poter svolgere le diverse analisi.

Per l'analisi morfologica, sono stati utilizzati "Sholl Analysis" (step-size di 1 μ m), presente all'interno del plugin "Neuroanatomy", e "FracLac", che permettono di studiare la complessità morfologica delle cellule.

Per l'analisi sinaptica, sono stati utilizzati "NeuronJ" e "SynapCountJ", che permettono di quantificare la presenza di elementi presinaptici e postsinaptici all'interno di ogni neurone tracciato.

4. Risultati

4.1 Le proteine rilasciate in seguito ad attivazione del D1R astrocitario promuovono la crescita neuronale

Per investigare l'effetto della segnalazione dopaminergica negli astrociti rispetto alla comunicazione tra astrocita e neurone, è stato inizialmente valutato l'impatto delle proteine rilasciate dagli astrociti (presenti in ACM) sulla morfologia neuronale.

Per la produzione di ACM, sono stati utilizzati astrociti striatali che, secondo i dati preliminari, presentano una maggiore espressione di D1R rispetto ad astrociti provenienti da altre aree del SNC. L'ACM è stato, poi, impiegato per trattare colture primarie di neuroni corticali: si tratta di un modello semplice rispetto al reale ambiente fisiologico, che, però, ha permesso di poter analizzare l'effetto delle proteine rilasciate dagli astrociti in modo specifico.

Confrontando i dati ottenuti da neuroni di controllo cresciuti nel comune mezzo di coltura (Neurobasal, Fig.7A) e da neuroni cresciuti in presenza di ACM derivante da astrociti trattati con DMSO per 1 ora (Fig.7B), è emerso che i neuroni coltivati in ACM(DMSO1h) sviluppano un maggior numero di processi, specialmente nella zona prossimale al soma (fino a 200 μ m) rispetto ai neuroni di controllo (Fig.8). Questo risultato suggerisce che le molecole rilasciate normalmente dagli astrociti, anche dopo 1 ora di condizionamento del mezzo di coltura, sono in grado di promuovere la crescita neuronale.

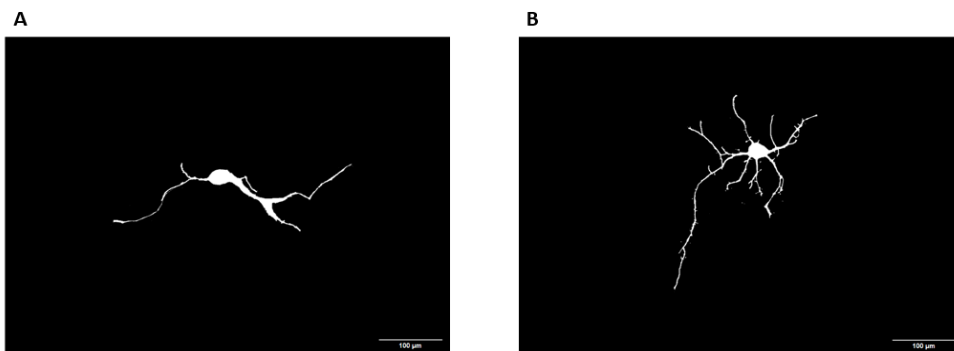


Figura 7: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in Neurobasal (A) o in ACM (DMSO1h) (B) fino a DIV4. Barra di scala 100 μ m.

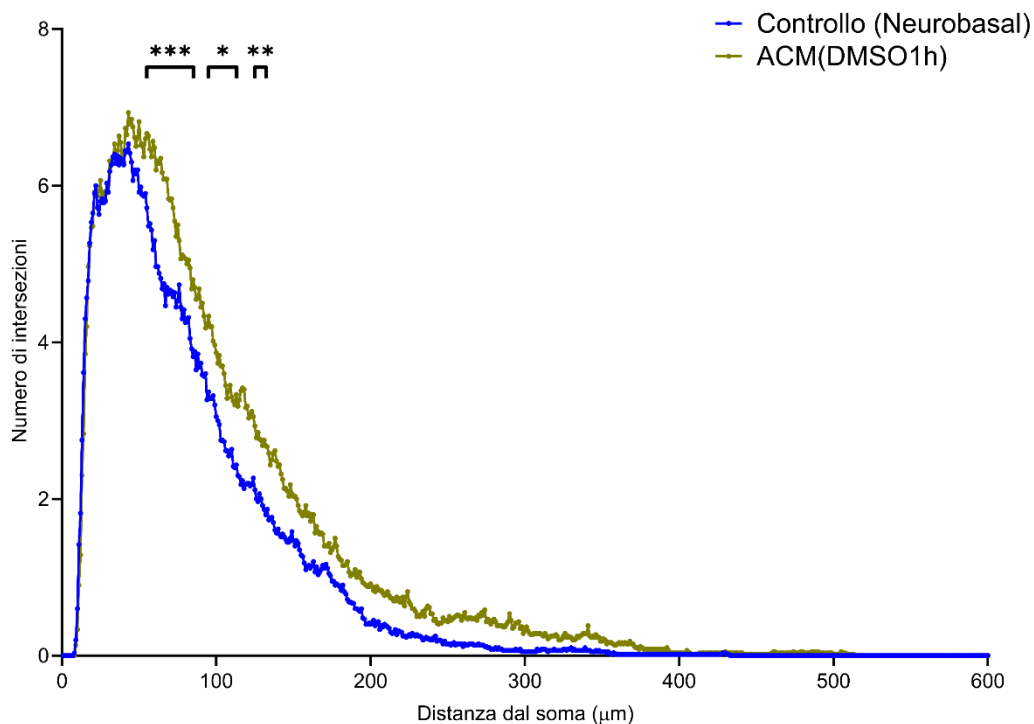


Figura 8: Grafico raffigurante i risultati della Sholl Analysis effettuata su neuroni di controllo (Neurobasal) e neuroni cresciuti in ACM(DMSO1h). È rappresentata la media del numero di intersezioni (asse y) per neurone in funzione della distanza dal corpo cellulare (asse x). $n=3$ replicati biologici, $n=60$ cellule analizzate per condizione. Two-way ANOVA, *** ($p<0.001$), ** ($p<0.01$), * ($p<0.1$).

A questo punto, dal momento che, generalmente, l'accumulo di molecole rilasciate nel mezzo di coltura è direttamente proporzionale al tempo di condizionamento, è stato valutato se ci potesse essere differenza trattando con lo stesso mezzo per più tempo. Il tempo di trattamento è quindi passato a 24 ore così che in tempi più lunghi sarebbe stato possibile raccogliere più proteine e quindi migliorare l'effetto generato dall'ACM sui neuroni visto a 1 ora di trattamento.

Confrontando i dati ottenuti da neuroni cresciuti in ACM proveniente da astrociti trattati con DMSO per 1 ora (Fig.9A) o in ACM derivante da astrociti condizionati con DMSO per 24 ore (Fig.9B), non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nei due gruppi. Condizionare il terreno per 1 ora o 24 ore con DMSO non causa un cambiamento rilevante nei fattori che vengono rilasciati (Fig.10), di conseguenza neanche la crescita neuronale varia.

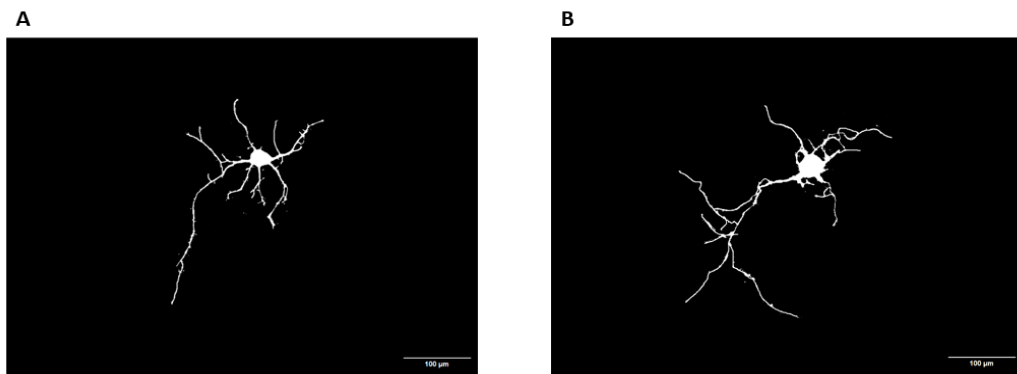


Figura 9: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in ACM (DMSO1h) (A) o in ACM (DMSO24h) (B) fino a DIV4. Barra di scala 100 μ m.

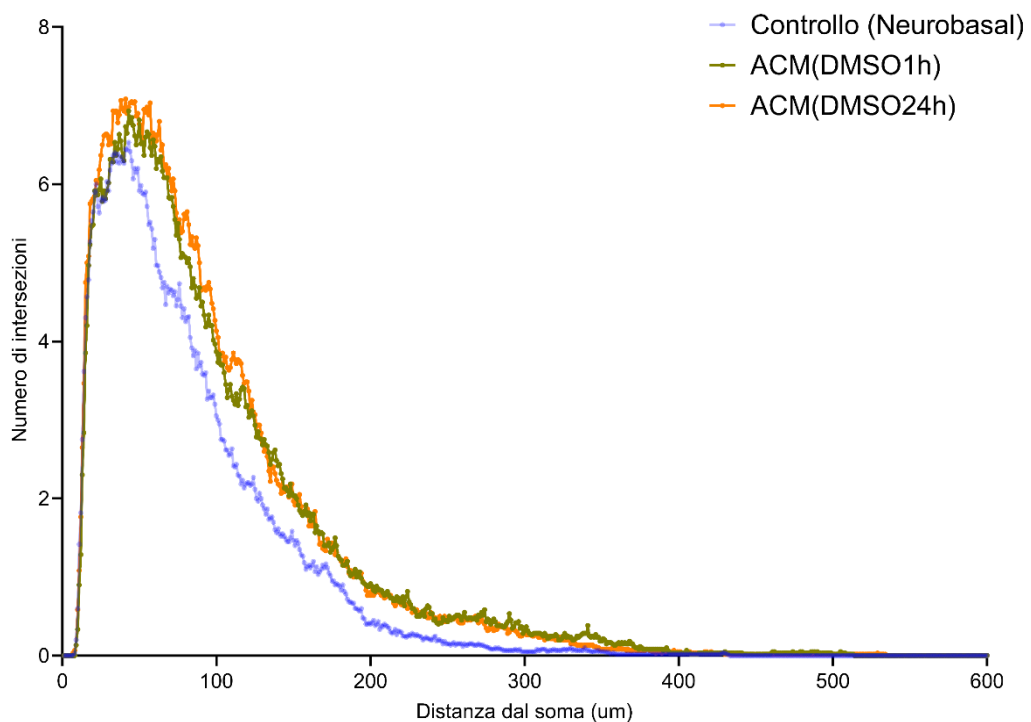


Figura 10: Grafico raffigurante i risultati della Sholl Analysis effettuata su neuroni cresciuti in ACM(DMSO1h) o in ACM(DMSO24h).

n=3 replicati biologici, *n*=60 cellule analizzate per condizione.

Two-way ANOVA.

Prima di valutare l'effetto dell'ACM ottenuto da astrociti trattati con l'agonista del D1R (SKF-38393), è stato necessario verificare che la concentrazione residua di questa molecola chimica non impattasse sulla morfologia neuronale (Paragrafo 3.5.1). Un volume appropriato di SKF-38393, tale da ottenere una concentrazione finale di 5nM (nettamente al di sotto della costante di dissociazione), è stato aggiunto al mezzo di coltura neuronale non trattato nel quale sono stati seminati neuroni (SKF 5nM, Fig.11b). Confrontando questa condizione con il controllo

rappresentato da neuroni coltivati nel classico mezzo di coltura (Neurobasal, Fig.11a), non sono state riscontrate differenze significative ad eccezione dei processi neuronali compresi tra $39\mu\text{m}$ e $58\mu\text{m}$ (Fig.12). Questo risultato, in realtà, deriva da una grande variabilità tra i replicati biologici analizzati: infatti, un replicato fornisce dati completamente diversi dagli altri due proprio in corrispondenza della regione più prossimale al soma. Inoltre, in base all'effetto di SKF-38393 su neuroni primari descritto in letteratura¹, si dovrebbe vedere un aumento della complessità dendritica, contrariamente ai dati ottenuti. È, quindi, necessario aumentare il numero di replicati biologici per poter escludere definitivamente qualsiasi effetto di SKF-38393 alla concentrazione di 5nM sulla morfologia neuronale.

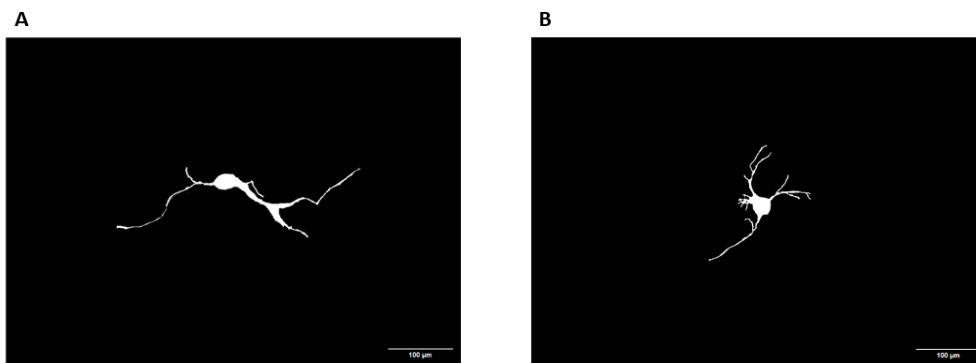


Figura 11: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in Neurobasal(A) o nel mezzo di coltura supplementato con SKF-38393 alla concentrazione di 5nM (B) fino a DIV4. Scala $100\mu\text{m}$.

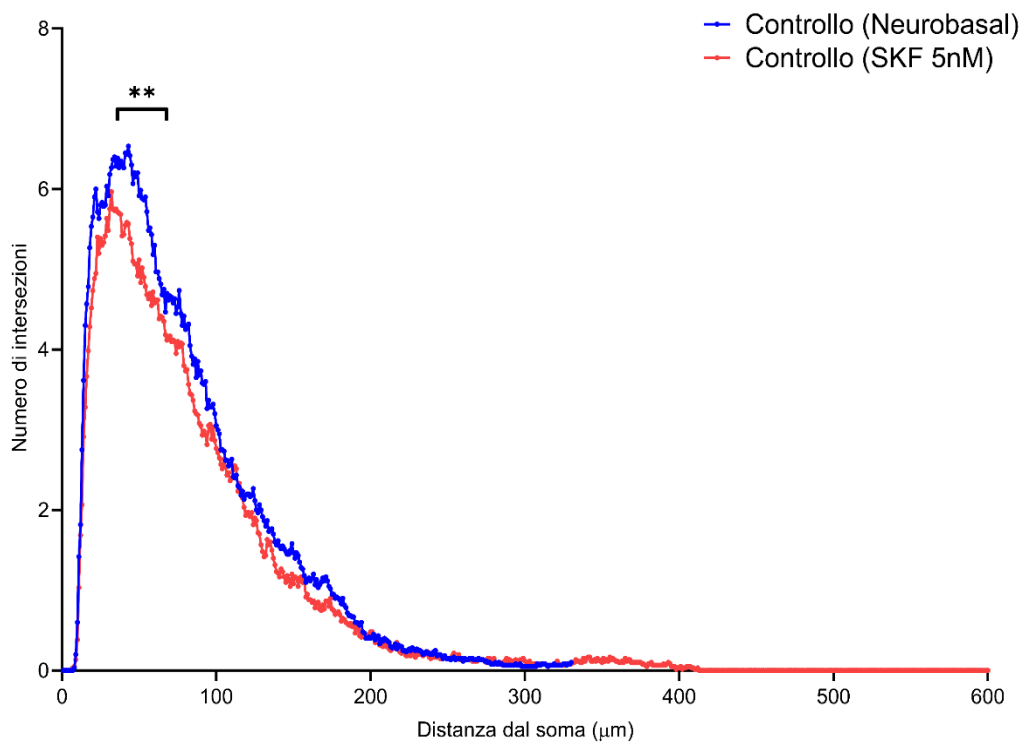


Figura 12: Grafico raffigurante i risultati della Sholl Analysis effettuata su neuroni di controllo (Neurobasal) e neuroni cresciuti in presenza di SKF-38393 5nM. $n=3$ replicati biologici, $n=60$ cellule analizzate per condizione. Two-way ANOVA, ** ($p<0.01$).

Infine, è stato confrontato l'effetto dell'ACM prodotto da astrociti trattati con l'agonista del D1R, SKF-38393, per 1 ora (ACM(SKF1h)) o 24 ore (ACM(SKF24h)) con il rispettivo effetto dell'ACM derivante da astrociti non trattati (ACM(DMSO1h) o ACM(DMSO24h).

Per quanto riguarda i neuroni cresciuti in presenza di ACM raccolti dopo 1 ora con e senza SKF-38393 (Fig.13), non sono state rilevate differenze significative (Fig.14). L'attivazione del D1R per 1 ora di trattamento sembra non portare a grandi variazioni nel rilascio di fattori astrocitari importanti nella crescita e sviluppo dei neuroni. Questo breve tempo di trattamento è sufficiente a stimolare il rilascio di fattori già pronti all'interno della cellula e, dato che non sono state riscontrate differenze morfologiche nelle cellule, probabilmente, non sono coinvolti fattori di questo tipo.

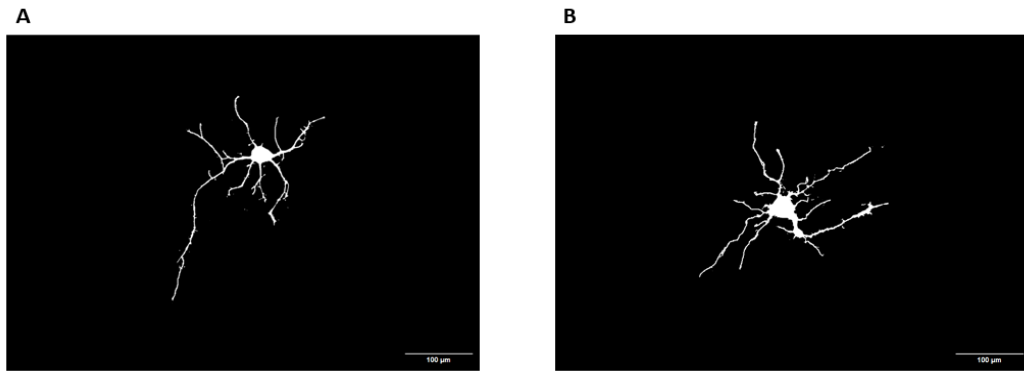


Figura 13: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in ACM(DMSO1h) (A) o in ACM(SKF1h) (B) fino a DIV4. Scala 100μm.

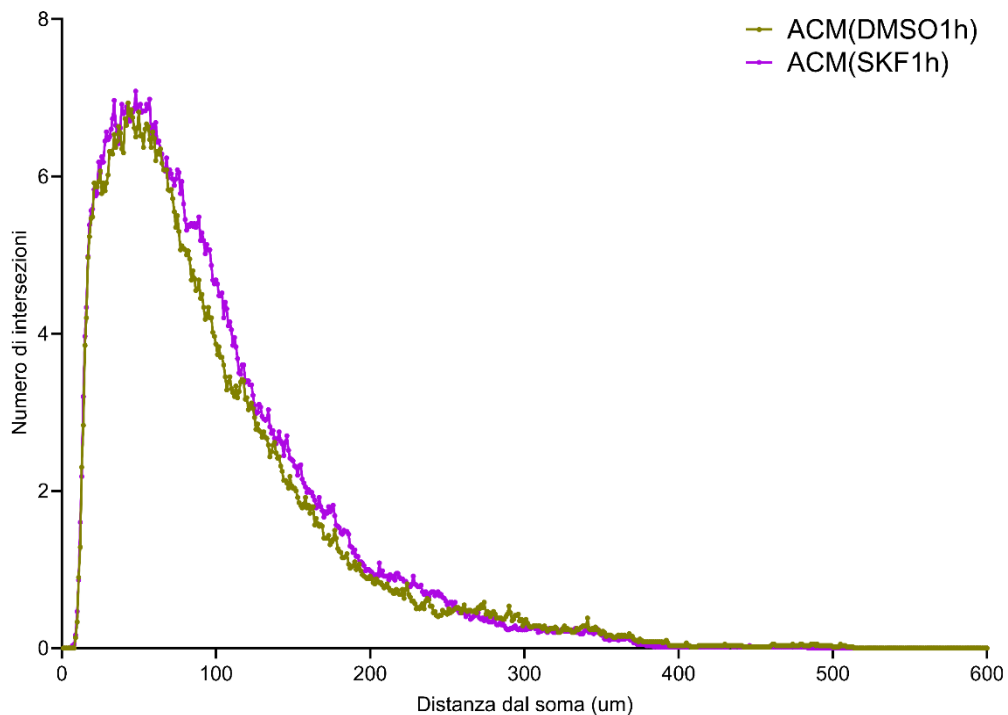


Figura 14: Grafico raffigurante i risultati della Sholl Analysis effettuata su neuroni cresciuti in ACM (DMSO1h) e neuroni cresciuti in ACM(SKF1h).
n=3 replicati biologici, *n*=60 cellule analizzate per condizione.
 Two-way ANOVA.

Confrontando i gruppi di neuroni trattati con ACM ricavato dopo 24 ore di trattamento con e senza SKF-38393 (Fig.15), è emerso che l'attivazione del D1R risulta nel rilascio di proteine che, rispetto all'ACM di per sé, incrementano ulteriormente la complessità strutturale (Fig.16). Infatti, il numero di intersezioni aumenta significativamente in corrispondenza dell'intervallo tra 100 e 200 μm nei

neuroni cresciuti in presenza di ACM(SKf24h). Questo risultato indica che il trattamento di 24 ore con l'agonista del recettore D1 stimola negli astrociti l'espressione e il rilascio di fattori che influenzano positivamente la crescita neuronale.

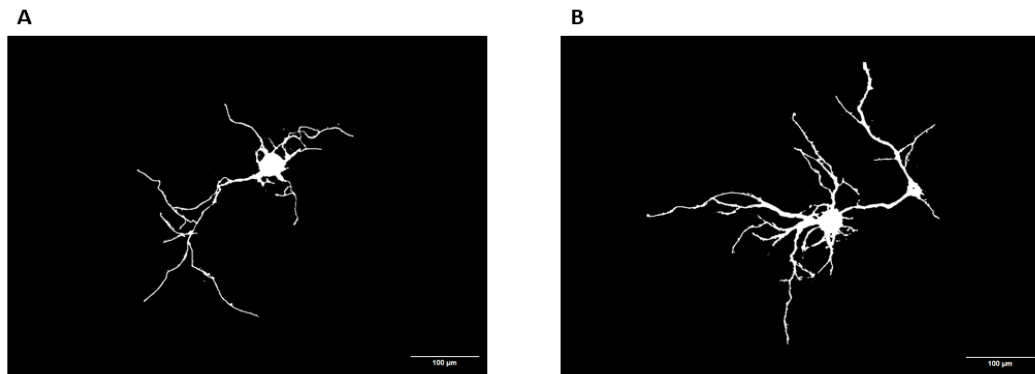


Figura 15: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in ACM(DMSO24h) (A) o in ACM(SKf24h) (B) fino a DIV4. Scala 100µm.

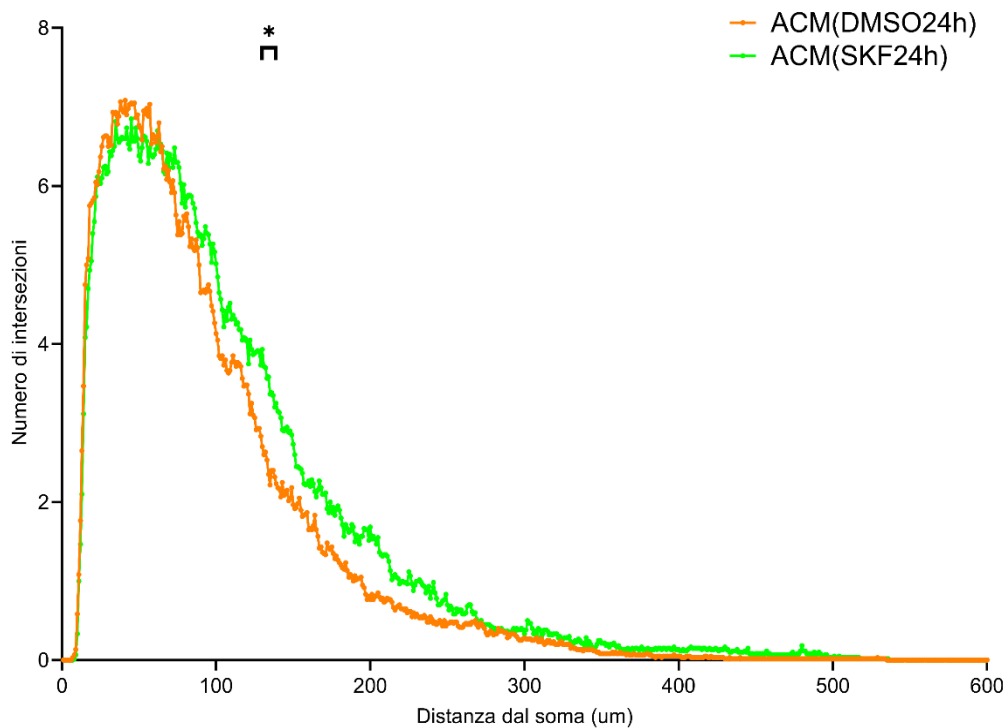


Figura 16: Grafico raffigurante i risultati della Sholl Analysis effettuata su neuroni cresciuti in ACM(DMSO24h) e neuroni cresciuti in ACM(SKf24h).
n=3 replicati biologici, *n*=60 cellule analizzate per condizione.
 Two-way ANOVA, * (*p*<0.1).

Per avere una maggiore certezza sui risultati ottenuti è stato necessario verificare nuovamente i dati mediante l'utilizzo di un'analisi indipendente dalla precedente, ma che fornisce la stessa informazione. I neuroni sono stati quindi nuovamente

analizzati mediante l'analisi frattale (Paragrafo 3.9), confrontando gli stessi gruppi di trattamenti e controlli.

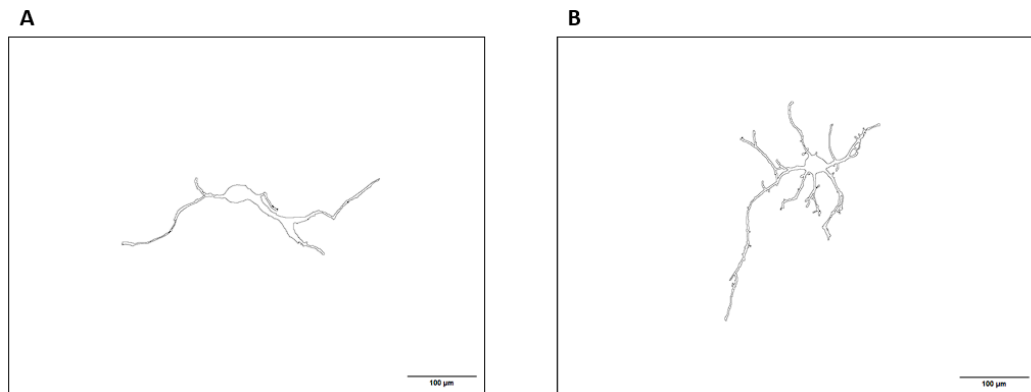


Figura 17: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in Neurobasal (A) o in ACM(DMSO1h) (B) fino a DIV4 e sottoposto ad analisi frattale. Scala 100µm.

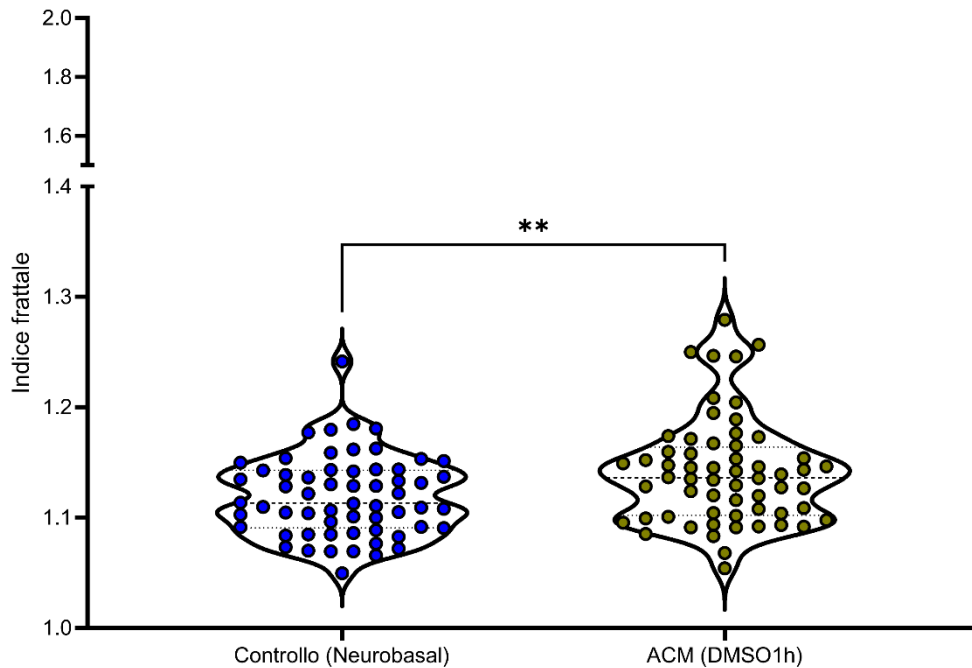


Figura 18: Grafico raffigurante i risultati dell'analisi frattale neuroni di controllo (Neurobasal) e neuroni cresciuti in ACM(DMSO1h). È rappresentata la media degli indici frattali per ogni condizione.

$n=3$ replicati biologici, $n=60$ cellule analizzate per condizione.
Unpaired t-test, ** ($p<0.01$).

Dall'analisi (Fig.18) riguardante il primo gruppo di neuroni analizzati, quelli cresciuti unicamente in Neurobasal contro il gruppo cresciuto con ACM proveniente da astroцитi condizionati per 1 ora con DMSO, risulta che i neuroni trattati con ACM (DMSO1h) presentano in generale una maggiore complessità rispetto ai neuroni di controllo (Neurobasal). Questo risultato è lo stesso ritrovato nell'analisi precedente, e conferma l'attività positiva dell'ACM sui neuroni.

Dopo aver ottenuto i risultati sull'effetto dell'ACM, anche in questo caso si è voluto verificare se un maggior tempo di condizionamento potesse permettere di aumentare il numero di proteine rilasciate, e di conseguenza aumentare l'effetto visto sui neuroni condizionati per 1 ora. Sono stati per questo confrontati i due gruppi di neuroni cresciuti in ACM di astrociti condizionati con DMSO ai due tempi diversi, ma dai risultati ottenuti (Fig. 20), non c'è differenza significativa tra i due gruppi di neuroni.

Si tratta di un risultato coerente con ciò che è emerso in seguito alla Sholl Analysis: un condizionamento degli astrociti con DMSO per 1 ora o 24 ore non influenza poi i fattori rilasciati nell'ACM relativamente alla crescita neuronale.

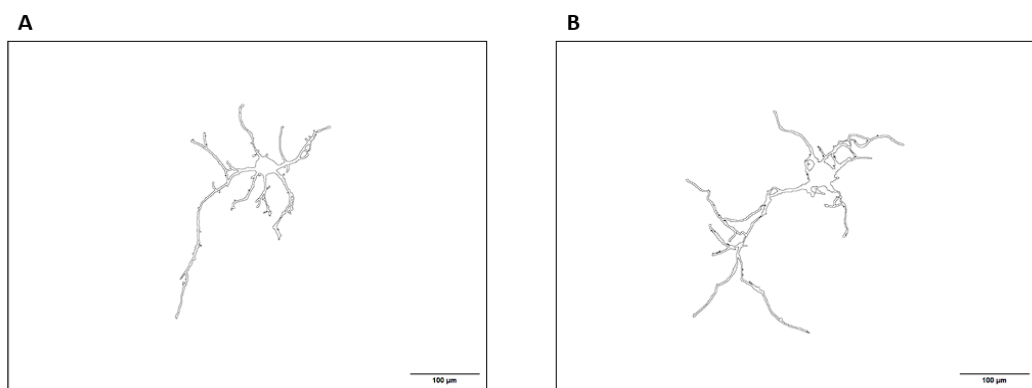


Figura 19: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in ACM(DMSO1h) (A) o in ACM(DMSO24h) (B) fino a DIV4 e sottoposto ad analisi frattale. Scala 100µm.

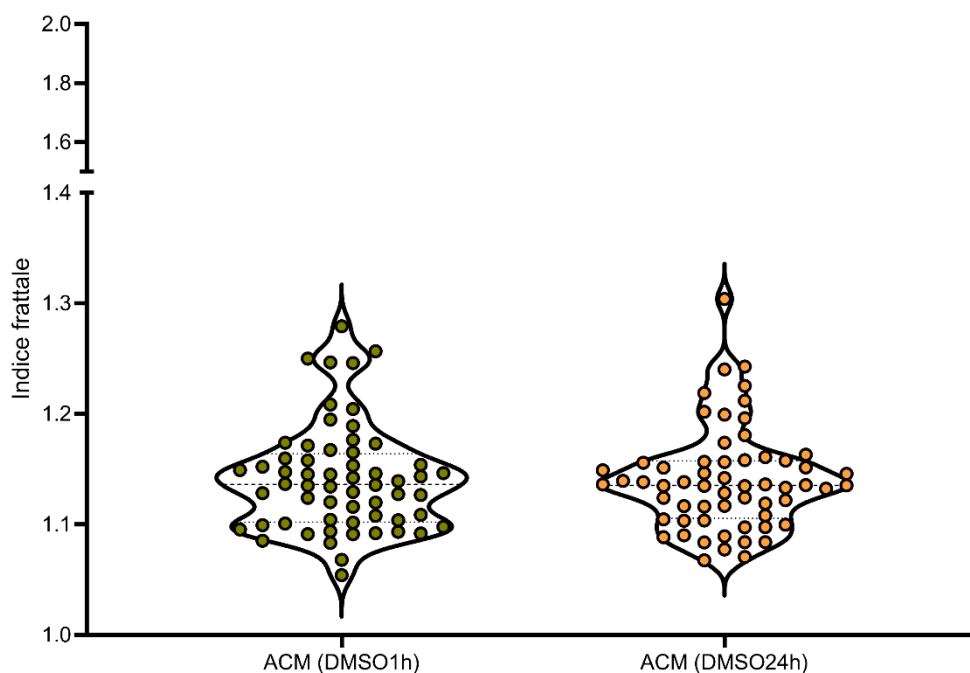


Figura 20: Grafico raffigurante i risultati dell'analisi frattale effettuata su neuroni cresciuti in ACM(DMSO1h) e neuroni cresciuti in ACM(DMSO24h). È rappresentata la media degli indici frattali per ogni condizione.

n=3 replicati biologici, *n*=60 cellule analizzate per condizione.

Unpaired t-test.

Il successivo confronto è stato fatto per verificare se la presenza di residui di SFK-38393 potesse influire sull'analisi morfologica, come spiegato già in precedenza (Fig.21).

Diversamente dal risultato ottenuto con la precedente analisi, dove era stata vista una differenza significativa ma che non convince da un punto di vista teorico, in quest'analisi non c'è una differenza significativa nella complessità strutturale, rafforzando l'idea che il dato visto in precedenza fosse effettivamente causato da uno dei replicati biologici (Fig.22). La molecola a quella concentrazione è di molto inferiore alla sua costante di dissociazione per il recettore D1, di conseguenza non influenza la morfologia neuronale.

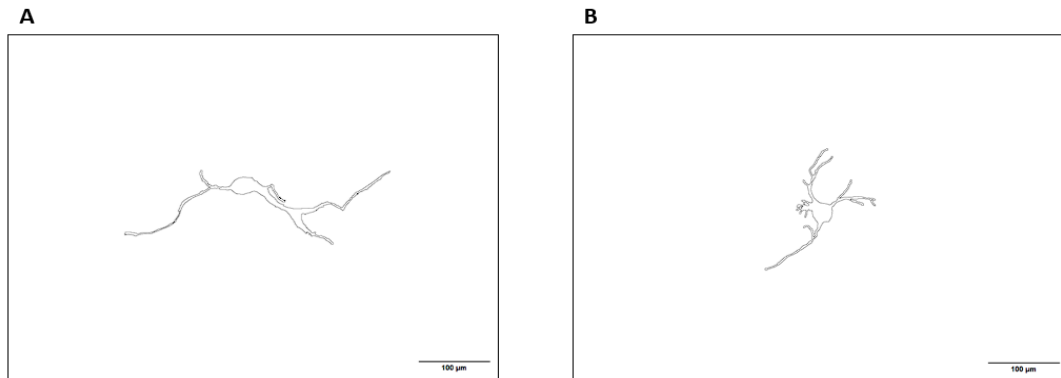


Figura 21: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in Neurobasal (A) o nel mezzo di coltura supplementato con SKF-38393 alla concentrazione di 5nM (B) fino a DIV4 e sottoposto ad analisi frattale. Scala 100µm.

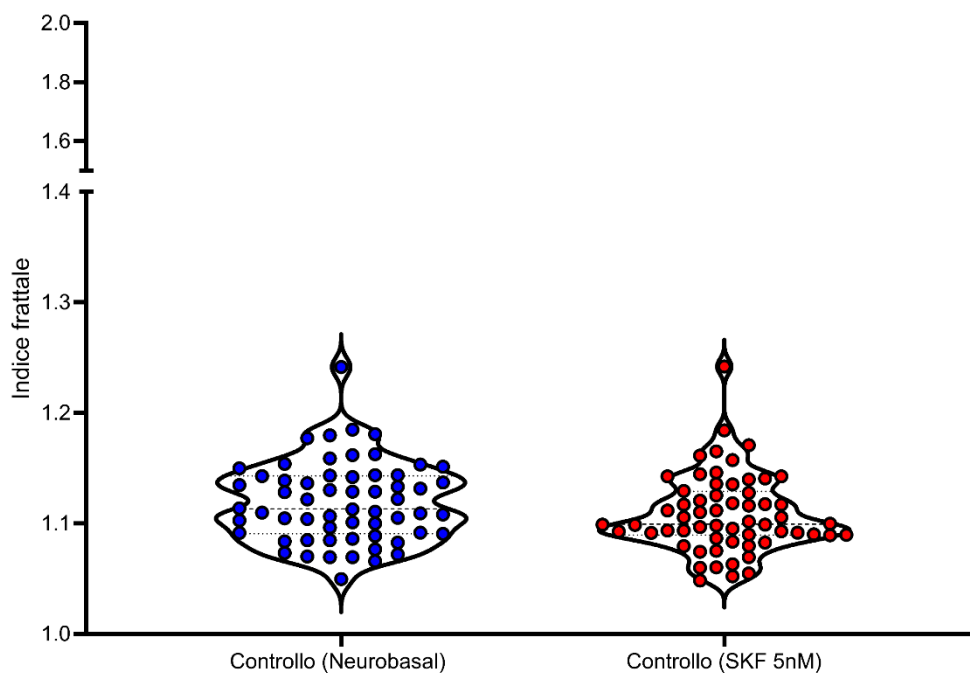


Figura 22: Grafico raffigurante i risultati dell'analisi frattale effettuata su neuroni di controllo (Neurobasal) e neuroni cresciuti in Neurobasal supplementato con SKF-38393 5nM. È rappresentata la media degli indici frattali per ogni condizione. $n=3$ replicati biologici, $n=60$ cellule analizzate per condizione. Unpaired t-test.

Successivamente, per controllare l'effetto dell'attivazione del D1R sulla morfologia neuronale, sono stati confrontati i dati dei neuroni cresciuti in ACM derivante da astrociti trattati con SKF-38393 quelli ottenuti da neuroni coltivati in ACM ottenuto da astrociti non trattati ai diversi tempi di 1 ora (Fig.23) e 24 ore (Fig.25).

Partendo dall'osservazione dei dati riferiti al trattamento di 1 ora (Fig.24), l'ACM(SKf1h) sembra non indurre variazioni morfologiche significative rispetto al controllo ACM(DMSO1h), confermando anche in questo caso i dati ottenuti dall'analisi precedente. Un'ora di trattamento non sembra effettivamente portare differenze nei fattori rilasciati.

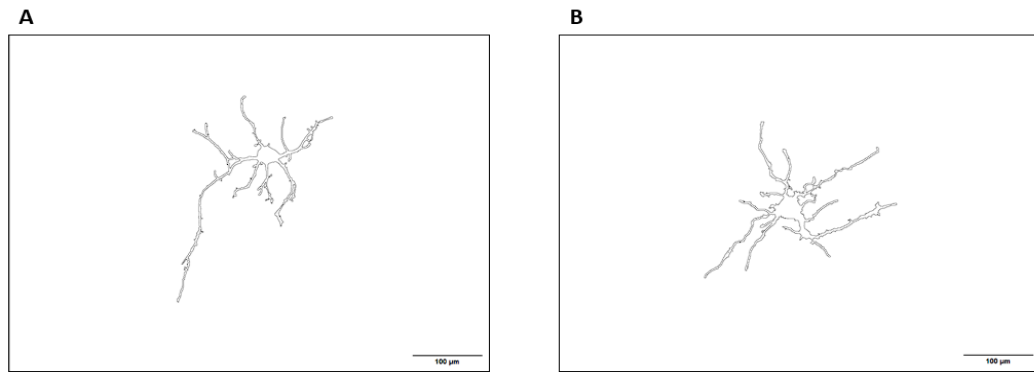


Figura 23: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in ACM (DMSO 1h) (A) o in ACM(SKf1h) (B) fino a DIV4 e sottoposto ad analisi frattale. Scala 100µm.

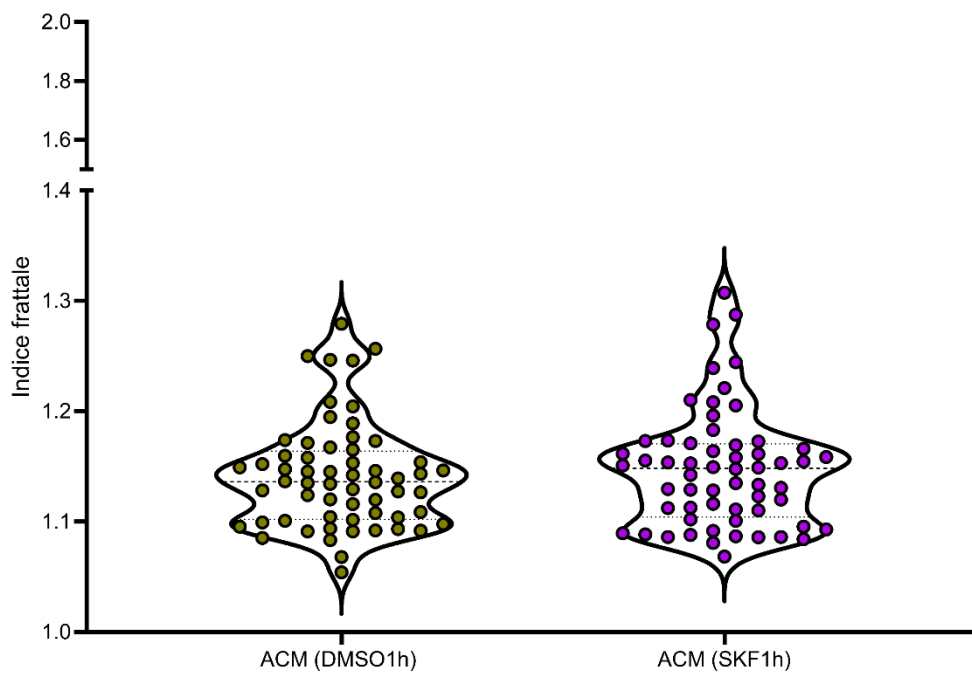


Figura 24: Grafico raffigurante i risultati dell'analisi frattale effettuata su neuroni cresciuti in ACM(DMSO1h) e neuroni cresciuti in ACM(SKf1h). È rappresentata la media degli indici frattali per ogni condizione.

$n=3$ replicati biologici, $n=60$ cellule analizzate per condizione.

Unpaired t-test.

I neuroni cresciuti in ACM raccolto dopo 24 ore di trattamento degli astrociti con l'agonista del D1R presentano una differenza morfologica significativa rispetto al trattamento con ACM (DMSO24h, Fig.26). Quindi, l'attivazione del recettore dopaminergico D1 per 24 ore negli astrociti stimola gli stessi a rilasciare proteine che agiscono positivamente sulla crescita neuronale, così come era stato riportato anche dall'analisi precedente.

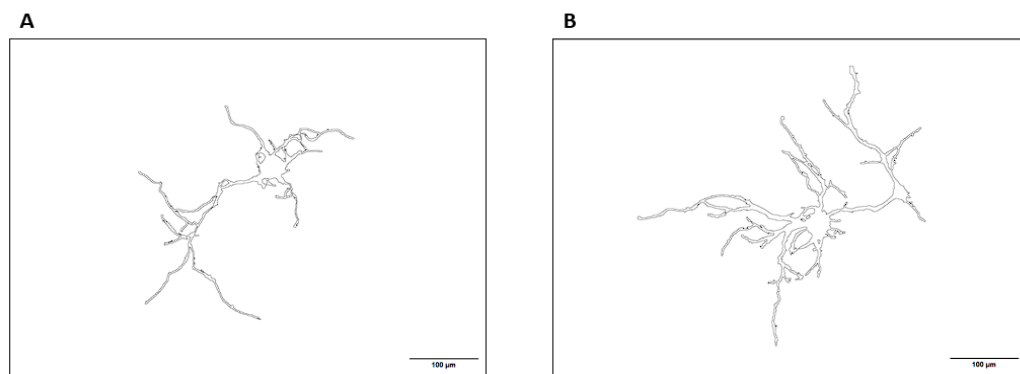


Figura 25: Immagine rappresentativa di un neurone cresciuto in ACM(DMSO24h) (A) o in ACM(SKF24h) (B) fino a DIV4 e sottoposto ad analisi frattale. Scala 100µm.

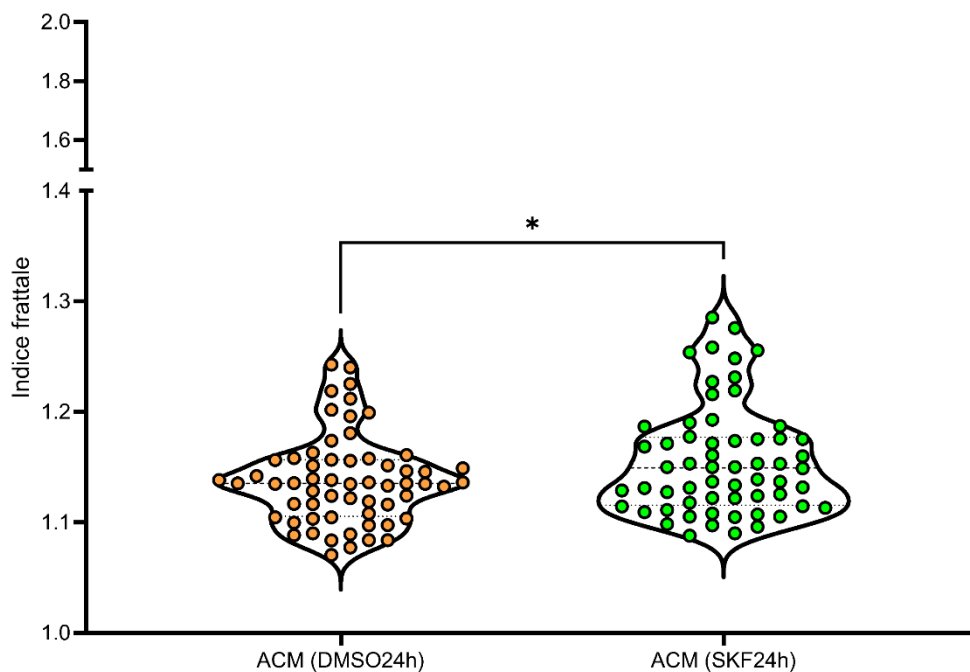


Figura 26: Grafico raffigurante i risultati dell'analisi frattale effettuata su neuroni cresciuti in ACM(DMSO24h) e neuroni coltivati in ACM(SKF24h). È rappresentata la media degli indici frattali per ogni condizione.

n=3 replicati biologici, *n*=60 cellule analizzate per condizione.

Unpaired t-test, * ($p < 0.1$).

Tutti i risultati ottenuti dall'analisi frattale trovano corrispondenza con i dati ottenuti dall'analisi precedente, la Sholl analysis, ad eccezione del controllo

negativo per SKF -38393 5nM in cui le due analisi restituiscono risultati diversi, per cui il dato non è affidabile.

In conclusione, dai risultati ottenuti dall'analisi morfologica eseguita con due metodi indipendenti, è stato possibile vedere che, come riportato in letteratura¹⁰⁸, l'ACM stimola positivamente i neuroni in coltura a sviluppare un maggior numero di processi caratterizzati da una maggiore lunghezza rispetto ai neuroni cresciuti nel normale mezzo di coltura. C'è, quindi, un aumento della complessità generale dato dal trattamento dei neuroni con terreno di coltura di astrociti, rimarcando l'importanza del loro ruolo fisiologico nel tessuto nervoso. Per quanto riguarda il terreno condizionato raccolto in seguito alla stimolazione dopaminergica legata al recettore D1, c'è un aumento significativo della complessità neuronale grazie ai fattori rilasciati dagli astrociti. Questo effetto è, però, visibile unicamente dopo un trattamento della durata di 24 ore.

A partire da queste evidenze, è possibile ipotizzare che l'attivazione del D1R non stimoli il rilascio di proteine già pronte per essere secrete con un impatto su crescita e complessità neuronale dopo 1 ora di trattamento. D'altra parte, la presenza di un effetto visibile dopo 24 ore di trattamento suggerisce che l'attivazione del recettore D1 possa attivare una cascata di segnali, i quali si concretizzano nell'aumentata espressione e nel successivo rilascio nello spazio extracellulare di proteine coinvolte nella segnalazione astrocita-neurone aventi un effetto trofico per le cellule neuronali.

4.2 Le proteine rilasciate in seguito ad attivazione del D1R astrocitario agiscono sulle terminazioni sinaptiche

In seguito ai risultati ottenuti dall'analisi morfologica, era interessante andare a vedere se i fattori rilasciati dagli astrociti in seguito ad attivazione del D1R potessero avere anche un effetto su neuroni maturi, influenzandoli a livello sinaptico e, quindi, nella trasmissione dell'impulso nervoso. Per affrontare questa domanda biologica, sono stati analizzati i livelli di espressione di alcuni marcatori specifici tramite Western Blot.

Inizialmente, è stato necessario valutare la purezza delle colture primarie neuronali (Fig.27). A questo proposito, sono stati saggiati marker di cellule gliali come GFAP, specifico per rilevare possibili contaminazioni astrocitarie. È risultata presente una contaminazione di astrociti solo nel in un replicato biologico, per il quale era stato omissso il trattamento con Ara-C, molecola con funzione di bloccare la proliferazione cellulare che impedisce alle cellule di dividersi e quindi alla microglia e gli astrociti che potrebbero esserci in coltura di proliferare. Come marcatore del citoscheletro neuronale, è stata utilizzata la proteina β 3-tubulina, che è risultata espressa maggiormente nei neuroni trattati con ACM(SKF24h)

(Fig.28). Questo risultato potrebbe essere legato al fatto che si è vista una maggiore complessità morfologica in questi neuroni cresciuti fino a DIV 4, potrebbe esserci quindi un mantenimento di quell'effetto anche nei giorni successivi, in questo caso fino a DIV14.

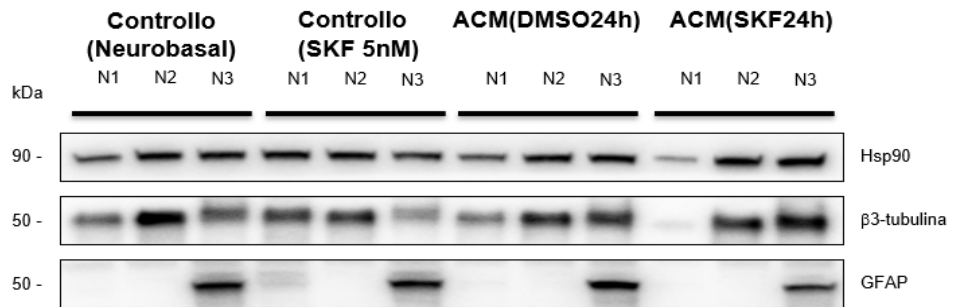


Figura 27: Rappresentazione del Western Blot di neuroni corticali di controllo (Neurobasal e 5nM SKF-38393) e neuroni trattati con ACM derivante da astrociti condizionati per 24 ore (con DMSO or SKF-38393) da DIV7 a DIV14. Nel dettaglio, sono rappresentati i quantitativi di Hsp90, housekeeping, b 3-tubulina, marcatore neuronale, e GFAP, marcatore astrocitario.

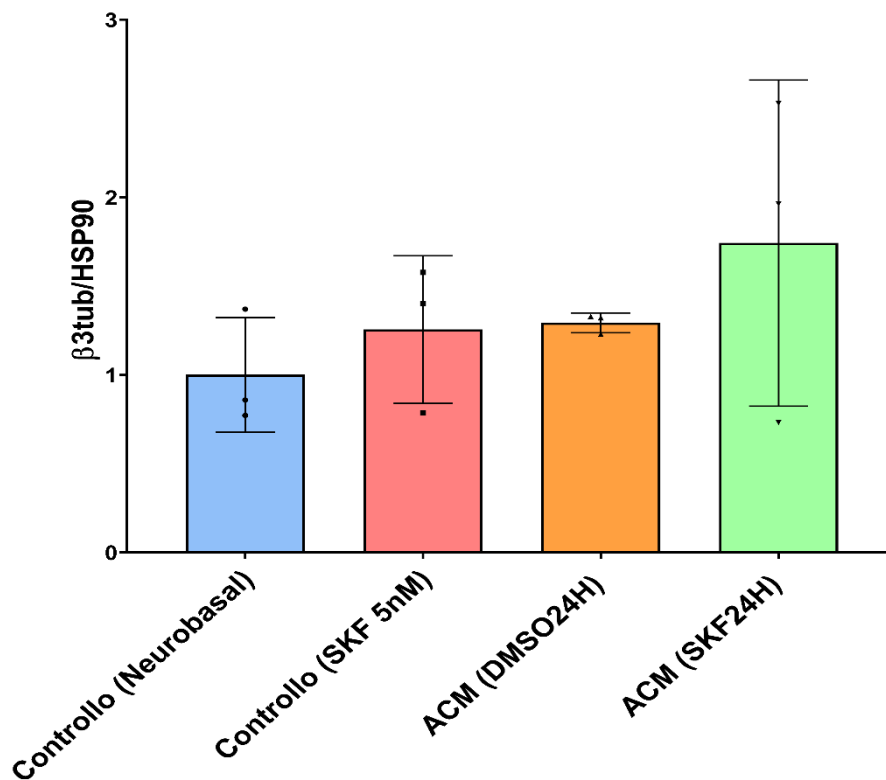


Figura 28: Grafico relativo al Western Blot in Fig.27, nel quale è rappresentata la quantificazione dei livelli di b3-tubulina nelle varie condizioni (media±SEM). I dati sono stati ottenuti normalizzando il quantitativo di proteina su Hsp90, housekeeping.

Come marcatori sinaptici, sono stati analizzati Vamp2 e PSD-95(Fig.29): in particolare, Vamp2 è una proteina presinaptica appartenente al complesso di proteine SNARE, mentre PSD-95 è una proteina appartenente allo spazio postsinaptico. Non sono state riscontrate differenze nei livelli di Vamp2 tra le varie condizioni di trattamento, per cui l'attivazione del D1R astrocitario sembra non influenzare le terminazioni presinaptiche (Fig.30 A). Per quanto riguarda PSD-95, invece, si vede una riduzione dei livelli della proteina nei neuroni trattati con ACM di per sé rispetto ai controlli negativi (Fig.30 B). Mediante questa analisi basata sulla tecnica del WB, non è possibile dire se la riduzione dei livelli di PSD95 è dato da una riduzione numerica o dimensionale delle terminazioni post-sinaptiche. È un dato che deve essere confermato tramite analisi di immunofluorescenza, così da poter osservare la situazione reale dello stato sinaptico.

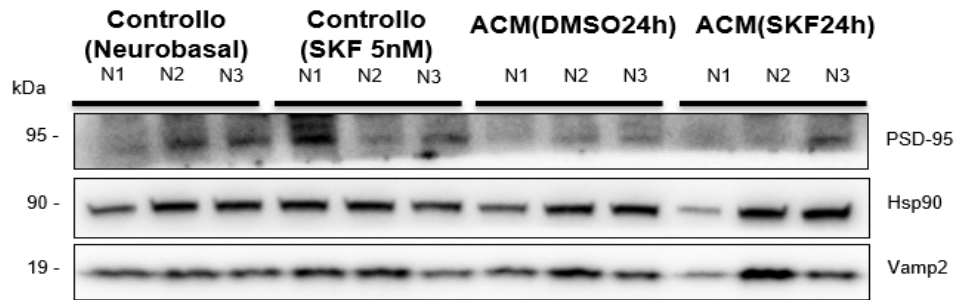


Figura 29: Rappresentazione del Western Blot di neuroni corticali di controllo (Neurobasal e 5nM SKF-38393) e neuroni trattati con ACM derivante da astrociti condizionati per 24 ore (con DMSO or SKF-38393) da DIV7 a DIV14. Nel dettaglio, sono rappresentati i quantitativi di HSP-90, housekeeping, PSD-95, proteina marcatore delle strutture postsinaptiche e Vamp2, proteina marcatore delle strutture presinaptiche.

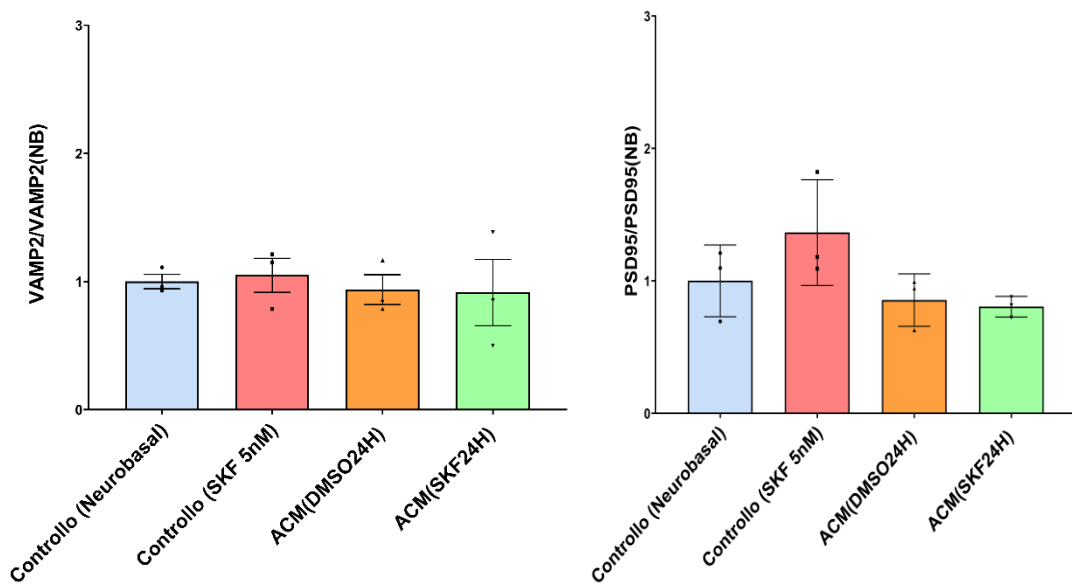


Figura 30: Grafici relativi al Western Blot Fig.29. A) livelli di Vamp2 nelle diverse condizioni (media \pm SEM). I dati sono stati ottenuti normalizzando il quantitativo di proteina per ogni condizione sul suo quantitativo presente nel controllo (Neurobasal). B) livelli di Vamp2 nei diversi trattamenti (media \pm SEM). I dati sono stati ottenuti normalizzando il quantitativo di proteina per ogni condizione sul suo quantitativo presente nel controllo (Neurobasal).

Infine, si è deciso di analizzare Akt, una proteina presente in uno svariato numero di cascate di segnalazione all'interno della cellula. La sua attivazione rappresenta un segnale generico di attività cellulare. (Fig.31).

È stato possibile osservare un aumento nei livelli di proteina fosforilata in neuroni trattati con ACM(SKF24h) rispetto al controllo. Questa variazione potrebbe indicare che, nei neuroni, in seguito all'esposizione all'ACM di per sé e, maggiormente, in seguito all'esposizione all'ACM raccolto post-stimolazione del D1R astrocitario, si attivano processi di segnalazione cellulare (Fig.31).

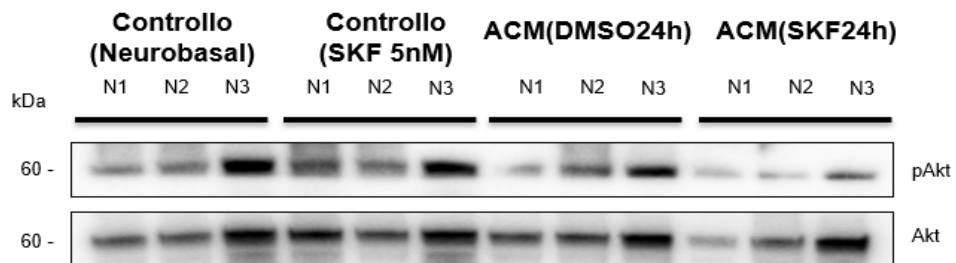


Figura 31: Rappresentazione di un Western Blot di neuroni corticali trattati con ACM nelle diverse condizioni e i controlli Neurobasal e SKF 5nM da DIV7 a DIV14. In immagine sono rappresentati i quantitativi di proteina di Akt, proteina inattiva legata a diverse cascate di segnalazione intracellulare e pAkt, la forma attiva della proteina.

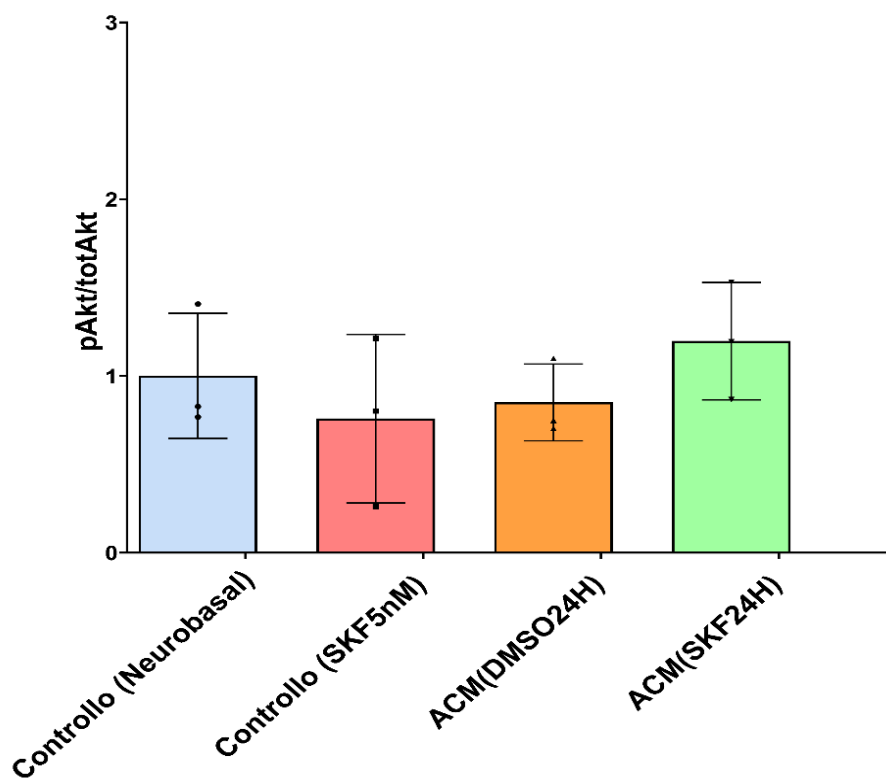


Figura 32: Grafico relativo al Western Blot in Fig.31, riferito ai livelli di pAkt nei diversi trattamenti (media \pm SEM). I grafici sono stati ottenuti normalizzando il quantitativo di proteina sui livelli totali di Akt.

In conclusione, dai risultati del Western blot i risultati sono stati diversi: c'è una maggiore espressione della proteina citoscheletrica neuronale β -3 tubulina nei neuroni trattati con ACM (SKF24h), dato probabilmente correlabile a ciò che era già stato visto nell'analisi morfologica. Dopodiché, mediante la proteina Akt è stato possibile verificare che il segnale generato dagli astrociti una volta stimolati con l'agonista del D1R attiva effettivamente delle cascate segnalatorie nei neuroni. Infine, a livello sinaptico il trattamento dopaminergico negli astrociti causa un rilascio di fattori che influenzano l'ambiente sinaptico, infatti è visibile una riduzione della proteina postsinaptica PSD-95. Questa riduzione potrebbe influenzare poi la capacità segnalatoria dei neuroni stessi.

5. Discussione

Il SNC è uno dei sistemi più complessi sia per composizione che per varietà di funzioni svolte. È, infatti, composto da diversi elementi cellulari, raggruppabili in due macro-gruppi, i neuroni e le cellule gliali.

Storicamente, i neuroni hanno suscitato un grande interesse in quanto sono cellule fondamentali per la trasmissione, l'elaborazione e la ricezione di tutti gli stimoli esterni e interni all'organismo. Sono, infatti, cellule elettricamente eccitabili in grado di elaborare e trasferire segnali alle altre cellule: in questo modo, regolano varie funzioni nell'organismo, quali il movimento muscolare, la memorizzazione di informazioni o il rilascio di determinati fattori come gli ormoni. La comunicazione tra i neuroni e le altre cellule è possibile grazie ad un'intricata rete di fibre nervose collegate da sinapsi, nonché giunzioni funzionali a livello delle quali i segnali, chimici o elettrici, vengono trasferiti. L'elemento sinaptico è costituito da tre componenti principali: la cellula presinaptica, lo spazio intersinaptico e la cellula postsinaptica. Tuttavia, negli ultimi anni, è stato introdotto il concetto di sinapsi quadripartita per descrivere la stretta associazione fisica e funzionale delle terminazioni presinaptica e postsinaptica con le cellule gliali, rappresentate da astrociti e microglia. Questi elementi comunicano fra loro controllando finemente la segnalazione cellula-cellula⁸².

Tra i diversi neuroni, un gruppo specifico è rappresentato dai neuroni dopaminergici, definiti così per la loro capacità di produrre e rilasciare dopamina nell'ambiente sinaptico, dove agisce come molecola-segnale⁶. L'ampio spettro di attività regolate dalla segnalazione dopaminergica spazia dal controllo motorio al coinvolgimento nel sistema di motivazione e ricompensa⁹. Alterazioni nel segnale dopaminergico rappresentano un elemento chiave in diverse patologie, quali il morbo di Parkinson⁴³, caratterizzato da una perdita selettiva di neuroni dopaminergici della via nigro-striatale, patologie legate al disturbo dell'attenzione (ADHD), ma anche casi di schizofrenia.

La sua azione è mediata dai DRDs, recettori a sette eliche transmembrana associati a proteine G che si occupano di trasformare il legame della dopamina in un segnale all'interno della cellula. Sono divise in due classi, D1 e D2, in base al tipo di segnalazione che generano all'interno della cellula. Queste proteine sono state identificate anche a livello delle cellule gliali⁸⁶⁻⁸⁷ implicando, quindi, un coinvolgimento dell'astroglia nella risposta o mediazione della segnalazione dopaminergica. A questo proposito, le vie di segnalazione controllate dalla dopamina sono rimaste, negli anni, oggetto di studio, e, sebbene la sua attività nella comunicazione neurone-neurone sia abbastanza nota, non è ancora chiaro quale sia il ruolo della segnalazione dopaminergica a livello delle cellule gliali e, in particolare, negli astrociti.

Gli astrociti svolgono funzioni fondamentali nel SNC, come la regolazione dell'equilibrio ionico o la fagocitosi di organismi estranei. Il loro ruolo è cruciale proprio a livello dello spazio sinaptico, dove sono attivamente coinvolti nella trasmissione e nella plasticità sinaptica. Come la dopamina rilasciata dai neuroni possa agire mediante l'interazione con l'astroglia nella sinapsi quadripartita, però, non è del tutto chiaro. Ad oggi, è stato dimostrato un ruolo della dopamina nel controllo della funzione secretoria degli astrociti in merito al rilascio di neurotrofine¹⁰², gliotrasmettitori⁸⁰ e citochine infiammatorie⁹⁷.

Nonostante, quindi, l'importanza della dopamina come molecola-segnaletica e l'evidente coinvolgimento degli astrociti nella segnalazione dopaminergica, non è noto come il secretoma astrocitario, nonché l'intero set di proteine rilasciate dagli astrociti nell'ambiente extracellulare, possa variare in termini di composizione e quantità in seguito ad un segnale dopaminergico.

Quindi, con questo progetto, si vuole indagare la comunicazione tra astrociti e neuroni mediata da proteine rilasciate in seguito a stimolazione dei recettori dopaminergici astrocitari.

Considerando che la maggior parte delle terminazioni di neuroni dopaminergici costituisce la via nigro-striatale e che, proprio a livello dello striato, vengono rilasciate grandi quantità di dopamina, si è deciso di focalizzare lo studio su astrociti striatali.

Dati preliminari hanno evidenziato una maggiore espressione del D1R a livello di astrociti striatali rispetto ad astrociti provenienti da altre zone del SNC. Inoltre, è stata rilevata una risposta degli astrociti ad una concentrazione di dopamina compatibile con l'attivazione del D1R.

Per indagare eventuali variazioni nel secretoma astrocitario, gli astrociti striatali sono stati stimolati mediante un agonista molto specifico del D1R, SKF-38393, molecola chimicamente stabile a differenza della dopamina. Sono stati effettuati trattamenti ai tempi di 1 ora, per rilevare fattori pronti al rilascio, e 24 ore, per valutare il rilascio di molecole di nuova sintesi. In seguito ad un'analisi proteomica sul surnatante raccolto post-attivazione del D1R, sono state identificate delle proteine coinvolte nella comunicazione astrocita-neurone.

Sulla base dei dati preliminari, con questo progetto, si vuole approfondire l'effetto dei fattori rilasciati dagli astrociti, in seguito all'attivazione del D1R, sui neuroni da un punto di vista morfologico e funzionale.

Come primo parametro, è stato deciso di valutare eventuali variazioni morfologiche neuronali. Per farlo, l'ACM prodotto in seguito ai trattamenti con l'agonista del D1R per 1 ora o 24 ore è stato utilizzato per trattare neuroni da DIV 0 a DIV 4. È stato scelto questo tempo in quanto, nei primi 7 giorni, i neuroni

crescono e completano il loro sviluppo, per cui risulta più facile apprezzare differenze morfologiche. L'analisi è stata effettuata mediante due metodi indipendenti, Sholl Analysis ed analisi frattale, che permettono di verificare coerenza e solidità dei risultati.

Le due analisi indipendenti hanno fornito quasi sempre gli stessi risultati: innanzitutto, è stato confermato che, come riportato in letteratura¹⁰⁸, l'ACM di per sé favorisce la crescita neuronale. Inoltre, non è stata riscontrata alcuna differenza morfologica nei neuroni cresciuti in ACM raccolto dopo 1 ora o 24 ore di condizionamento: questo significa che non è necessario un accumulo tempo-dipendente di proteine astrocitarie per determinare un cambiamento morfologico nei neuroni. È, quindi, possibile affermare che in un ambiente fisiologico la presenza degli astrociti e la secrezione dei loro fattori favorisce lo sviluppo neuronale. Confrontando i neuroni cresciuti in ACM derivante da astrociti trattati o non trattati con SKF-38393 per 1 ora, è stato visto che non ci sono differenze significative a livello morfologico. Questo risultato indica che l'attivazione del D1R non porta a variazioni importanti nella secrezione di proteine pronte per essere rilasciate dagli astrociti. Al contrario, l'ACM ottenuto in seguito al trattamento degli astrociti con l'agonista del D1R per 24 ore promuove ulteriormente la crescita e lo sviluppo dei neuroni. Infatti, i risultati ottenuti hanno evidenziato una maggiore complessità dei neuroni cresciuti in ACM(SKF24h). Quindi, la stimolazione dopaminergica negli astrociti attiva vie di segnalazione che portano alla sintesi ed al rilascio di proteine importanti per promuovere la crescita e lo sviluppo neuronale.

Per indagare ulteriormente l'effetto dell'ACM prodotto in seguito a stimolazione dopaminergica, si è investigata anche la maturazione neuronale: in particolare, è stata analizzata la formazione dei terminali pre- e post- sinaptici e la presenza di sinapsi attive.

Pertanto, i neuroni sono stati coltivati fino a DIV14 e, a partire da DIV7, sono stati sottoposti ad un trattamento cronico con l'ACM raccolto dopo 24 ore. È stata condotta un'analisi generale sulla variazione dei livelli di proteine coinvolte nella segnalazione sinaptica tramite la tecnica del Western Blot. Sono state, infatti, analizzate sia proteine espresse a livello sinaptico che proteine coinvolte nella segnalazione intracellulare, per verificare una potenziale risposta neuronale ai fattori rilasciati dagli astrociti.

I risultati hanno evidenziato un aumento dell'espressione di β -3 tubulina nei neuroni trattati con ACM(SKF 24h) rispetto alle altre condizioni. Questa proteina è specifica per il citoscheletro neuronale e una sua maggiore espressione potrebbe essere data dal fatto che, come è stato visto nell'analisi morfologica, l'ACM prodotto a seguito di stimolazione del D1R, favorisce una maggiore complessità strutturale. Successivamente, è stata indagata anche l'espressione di Akt, proteina

coinvolta in diverse cascate di segnalazione, la cui fosforilazione costituisce un segnale generico di attivazione di vie intracellulari. Come risultato del Western Blot, la proteina risulta maggiormente fosforilata nei neuroni trattati con ACM (SKF 24h), si può quindi dire che i fattori rilasciati dagli astrociti in seguito alla stimolazione del D1R attivino delle cascate di segnale nella cellula soprattutto a 24 ore di trattamento. Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione di proteine sinaptiche, sono state considerate Vamp2, espressa a livello presinaptico, e PSD-95, espressa a livello postsinaptico. Non sono presenti variazioni significative nei livelli di Vamp2, per cui il segnale dopaminergico sembra non portare al rilascio di fattori astrocitari in grado di agire a livello presinaptico. Molto più interessante è stato il risultato ottenuto guardando alla proteina postsinaptica, PSD-95. È, infatti, emersa una notevole riduzione dei livelli di PSD-95 in neuroni soggetti al trattamento con ACM derivante da astrociti trattati con SKF-38393. Questo dato grezzo, però, non permette di capire se la riduzione della proteina sia causata da una diminuzione del numero di terminazioni postsinaptiche neuronali, oppure dalla riduzione delle dimensioni di queste. È necessario approfondire il risultato ottenuto mediante delle analisi più specifiche, basate su altre tecniche quali l'immunofluorescenza, per poter visualizzare gli elementi pre- e post- sinaptici nelle varie condizioni di trattamento. È possibile, comunque, che la stimolazione del D1R negli astrociti stimoli il rilascio di fattori in grado di far variare lo stato proteico sinaptico, influenzando così la trasmissione del segnale neuronale.

In conclusione, in questo lavoro, è stato visto che il segnale dopaminergico mediato dal D1R astrocitario influenza il rilascio di proteine legate alla comunicazione astrocita-neurone, le quali stimolano in modo positivo crescita e sviluppo neuronali, come dimostrato dall'analisi morfologica svolta con metodi indipendenti. Inoltre, potrebbero essere implicate anche in un meccanismo di controllo della trasmissione del segnale sinaptico. I risultati preliminari derivanti dall'analisi di WB, però, andrebbero verificati e confermati mediante delle analisi più mirate e specifiche. Avere un'idea più precisa delle proteine coinvolte nella comunicazione astrocita-neurone in seguito ad un segnale dopaminergico astrocitario permetterebbe sicuramente di capire meglio i meccanismi regolatori controllati dalla dopamina nel SNC. Infatti, considerate le recenti dimostrazioni di espressione dei DRDs nelle cellule gliali, tra cui gli astrociti, è auspicabile un loro coinvolgimento nella segnalazione dopaminergica. Capire in che modo agisca la dopamina, anche in relazione al ruolo dell'astroglia, permetterebbe anche di comprendere in che modo le alterazioni dei suoi livelli portino poi all'insorgenza di varie patologie, quali PD o ADHD, e, di conseguenza, garantirebbe una maggiore consapevolezza riguardo alle strategie terapeutiche.

6. Bibliografia

1. O funkcji nadnercza : wykład Prof. N. Cybulskiego, wygłoszony d. 6 marca 1895 r. w Towarzystwie Lekarskim Krakowskim : (podług stenogramu). <https://crispa.uw.edu.pl/object/files/155062/display/Default>.
2. Hornykiewicz, O. A Quarter Century of Brain Dopamine Research. in Dopaminergic Systems and their Regulation (eds. Woodruff, G. N., Poat, J. A. & Roberts, P. J.) 3–18 (Palgrave Macmillan UK, 1986). doi:10.1007/978-1-349-07431-0_1.
3. Montagu, K. A. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 180, 244–245 (1957).
4. Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T. & Waldeck, B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127, 471 (1958).
5. Musso, N. R., Brenci, S., Setti, M., Indiveri, F. & Lotti, G. Catecholamine content and in vitro catecholamine synthesis in peripheral human lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 3553–3557 (1996).
6. Nolan, R. A., Muir, R., Runner, K., Haddad, E. K. & Gaskill, P. J. Role of macrophage dopamine receptors in mediating cytokine production: Implications for neuroinflammation in the context of HIV-associated neurocognitive disorders. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 14, 134–156 (2019).
7. Blaschko: The specific action of L-dopa decarboxylase - Google Scholar. [https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=J+Physiol+\(Lond\)&title=The+specific+action+of+L-dopa+decarboxylase&author=H+Blascko&volume=96&issue=50&publication_year=1939&pages=50-51&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=J+Physiol+(Lond)&title=The+specific+action+of+L-dopa+decarboxylase&author=H+Blascko&volume=96&issue=50&publication_year=1939&pages=50-51&).
8. Meiser, J., Weindl, D. & Hiller, K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal. CCS* 11, 34 (2013).
9. Klein, M. O. et al. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39, 31–59 (2019).
10. Chaudhry, F. A., Edwards, R. H. & Fonnum, F. Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 277–301 (2008).
11. Shi, L., Quick, M., Zhao, Y., Weinstein, H. & Javitch, J. A. The Mechanism of a Neurotransmitter: Sodium Symporter—Inward Release of Na⁺ and Substrate Is Triggered by Substrate in a Second Binding Site. *Mol. Cell* 30, 667–677 (2008).
12. Ciliax, B. J. et al. The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J. Neurosci.* 15, 1714–1723 (1995).

13. Peter, D. et al. Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 6179–6188 (1995).
14. Schuldiner, S., Shirvan, A. & Linial, M. Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol. Rev.* 75, 369–392 (1995).
15. Inoue, T. et al. Structure and Regulation of the V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 393–398 (2005).
16. Levitt, P., Pintar, J. E. & Breakefield, X. O. Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 6385–6389 (1982).
17. Itäaho, K. et al. Dopamine is a low-affinity and high-specificity substrate for the human UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 768–775 (2009).
18. Niznik, H. B. & Van Tol, H. H. Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 17, 158–180 (1992).
19. Tiberi, M. et al. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7491–7495 (1991).
20. Andersen, P. H. et al. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 231–236 (1990).
21. Tritsch, N. X. & Sabatini, B. L. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76, 33–50 (2012).
22. Dohlman, H. G., Caron, M. G., DeBlasi, A., Frielle, T. & Lefkowitz, R. J. Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* 29, 2335–2342 (1990).
23. Gingrich, J. A. & Caron, M. G. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 299–321 (1993).
24. Usiello, A. et al. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408, 199–203 (2000).
25. Castro, S. W. & Strange, P. G. Differences in the ligand binding properties of the short and long versions of the D2 dopamine receptor. *J. Neurochem.* 60, 372–375 (1993).
26. Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M. P., Bouthenet, M. L. & Schwartz, J. C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347, 146–151 (1990).
27. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. & Caron, M. G. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* 78, 189–225 (1998).

28. Beaulieu, J.-M., Espinoza, S. & Gainetdinov, R. R. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br. J. Pharmacol.* 172, 1–23 (2015).
29. Svenningsson, P. et al. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 269–296 (2004).
30. Undie, A. S. & Friedman, E. Stimulation of a dopamine D1 receptor enhances inositol phosphates formation in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 987–992 (1990).
31. Laitinen, J. T. Dopamine stimulates K⁺ efflux in the chick retina via D1 receptors independently of adenylyl cyclase activation. *J. Neurochem.* 61, 1461–1469 (1993).
32. Kitai, S. T. & Surmeier, D. J. Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv. Neurol.* 60, 40–52 (1993).
33. Einhorn, L. C., Gregerson, K. A. & Oxford, G. S. D2 dopamine receptor activation of potassium channels in identified rat lactotrophs: whole-cell and single-channel recording. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 11, 3727–3737 (1991).
34. Dhanasekaran, N., Prasad, M. V., Wadsworth, S. J., Dermott, J. M. & van Rossum, G. Protein kinase C-dependent and -independent activation of Na⁺/H⁺ exchanger by G alpha 12 class of G proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 11802–11806 (1994).
35. Bertorello, A. M., Hopfield, J. F., Aperia, A. & Greengard, P. Inhibition by dopamine of (Na⁺)+K⁺)ATPase activity in neostriatal neurons through D1 and D2 dopamine receptor synergism. *Nature* 347, 386–388 (1990).
36. Gainetdinov, R. R., Premont, R. T., Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 107–144 (2004).
37. Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512–517 (2005).
38. Channer, B. et al. Dopamine, Immunity, and Disease. *Pharmacol. Rev.* 75, 62–158 (2023).
39. Carlsson, A., Falck, B. & Hillarp, N. A. Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 56, 1–28 (1962).
40. Chan-Palay, V., Záborszky, L., Köhler, C., Goldstein, M. & Palay, S. L. Distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the hypothalamus of rats. *J. Comp. Neurol.* 227, 467–496 (1984).
41. Matt, S. M. & Gaskill, P. J. Where Is Dopamine and how do Immune Cells See it?: Dopamine-Mediated Immune Cell Function in Health and Disease. *J.*

- Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol. 15, 114–164 (2020).
42. Hikosaka, O., Nakamura, K., Sakai, K. & Nakahara, H. Central mechanisms of motor skill learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 217–222 (2002).
 43. Savitt, J. M., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J. Clin. Invest.* 116, 1744–1754 (2006).
 44. Surmeier, D. J., Obeso, J. A. & Halliday, G. M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 101–113 (2017).
 45. Horvitz, J. C. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96, 651–656 (2000).
 46. Kelley, A. E. & Berridge, K. C. The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. *J. Neurosci.* 22, 3306–3311 (2002).
 47. Milner, P. M. The discovery of self-stimulation and other stories. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13, 61–67 (1989).
 48. Hamid, A. A. et al. Mesolimbic dopamine signals the value of work. *Nat. Neurosci.* 19, 117–126 (2016).
 49. Numan, M. & Sheehan, T. P. Neuroanatomical circuitry for mammalian maternal behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 807, 101–125 (1997).
 50. Pedersen, C. A., Caldwell, J. D., Walker, C., Ayers, G. & Mason, G. A. Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behav. Neurosci.* 108, 1163–1171 (1994).
 51. Serio, R. & Zizzo, M. G. The multiple roles of dopamine receptor activation in the modulation of gastrointestinal motility and mucosal function. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 244, (2023).
 52. Van Nueten, J. M., Ennis, C., Helsen, L., Laduron, P. M. & Janssen, P. A. J. Inhibition of dopamine receptors in the stomach: An explanation of the gastrokinetic properties of domperidone. *Life Sci.* 23, 453–457 (1978).
 53. Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., Schapira, A. H. V., & National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson’s disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5, 235–245 (2006).
 54. Fitzgerald, P. & Dinan, T. G. Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 22, 12–19 (2008).
 55. Goldberg, L. I., Volkman, P. H. & Kohli, J. D. A comparison of the vascular dopamine receptor with other dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18, 57–79 (1978).

56. RAMON: Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et... - Google Scholar.
https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Histologie+du+systeme+nerveux+de+l%E2%80%99homme+et+des+vertebres&author=Y+Ramon&author=S+Cajal&publication_year=1909&.
57. Peters: In: The fine structure of the nervous system - Google Scholar.
https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The+fine+structure+of+the+nervous+system&author=A+Peters&author=SL+Palay&author=HD+Webster&publication_year=1991&.
58. Cahoy, J. D. et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 264–278 (2008).
59. Haj-Yasein, N. N. et al. Evidence that compromised K⁺ spatial buffering contributes to the epileptogenic effect of mutations in the human Kir4.1 gene (KCNJ10). *Glia* 59, 1635–1642 (2011).
60. Iovino, L. et al. Trafficking of the glutamate transporter is impaired in LRRK2-related Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 144, 81–106 (2022).
61. Bak, L. K., Schousboe, A. & Waagepetersen, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 98, 641–653 (2006).
62. Jana, M., Palencia, C. A. & Pahan, K. Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 7254–7262 (2008).
63. Fricker, M. et al. MFG-E8 mediates primary phagocytosis of viable neurons during neuroinflammation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 2657–2666 (2012).
64. Jung, Y.-J. & Chung, W.-S. Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains. *Biomol. Ther.* 26, 350–357 (2018).
65. Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178–201 (2008).
66. Gordon, G. R. J., Mulligan, S. J. & MacVicar, B. A. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55, 1214–1221 (2007).
67. Brown, A. M. & Ransom, B. R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55, 1263–1271 (2007).
68. Pfrieger, F. W. & Barres, B. A. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277, 1684–1687 (1997).
69. Christopherson, K. S. et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433 (2005).

70. Rupareliya, V. P., Singh, A. A., Butt, A. M., A, H. & Kumar, H. The “molecular soldiers” of the CNS: Astrocytes, a comprehensive review on their roles and molecular signatures. *Eur. J. Pharmacol.* 959, 176048 (2023).
71. Quesseveur, G. et al. BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Transl. Psychiatry* 3, e253 (2013).
72. Chung, W.-S., Allen, N. J. & Eroglu, C. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020370 (2015).
73. Booth, H. D. E., Hirst, W. D. & Wade-Martins, R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson’s Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci.* 40, 358–370 (2017).
74. Miklossy, J. et al. Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Exp. Neurol.* 197, 275–283 (2006).
75. Han, R. T., Kim, R. D., Molofsky, A. V. & Liddelow, S. A. Astrocyte-immune cell interactions in physiology and pathology. *Immunity* 54, 211–224 (2021).
76. Liddelow, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487 (2017).
77. Rothhammer, V. et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* 557, 724–728 (2018).
78. Kwon, H. S. & Koh, S.-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl. Neurodegener.* 9, 42 (2020).
79. Perea, G. & Araque, A. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38, 375–382 (2005).
80. Corkrum, M. et al. Dopamine-Evoked Synaptic Regulation in the Nucleus Accumbens Requires Astrocyte Activity. *Neuron* 105, 1036-1047.e5 (2020).
81. Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J. F., Carmona, M. A. & Soriano, E. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 9430–9444 (2002).
82. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. & Haydon, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215 (1999).
83. Zanassi, P., Paolillo, M., Montecucco, A., Avvedimento, E. V. & Schinelli, S. Pharmacological and molecular evidence for dopamine D(1) receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J. Neurosci. Res.* 58, 544–552 (1999).
84. Agulhon, C. et al. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59, 932–946 (2008).

85. Harvey, J. & Lacey, M. G. A postsynaptic interaction between dopamine D1 and NMDA receptors promotes presynaptic inhibition in the rat nucleus accumbens via adenosine release. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 5271–5280 (1997).
86. Färber, K., Pannasch, U. & Kettenmann, H. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 128–138 (2005).
87. Zanassi, P., Paolillo, M., Montecucco, A., Avvedimento, E. V. & Schinelli, S. Pharmacological and molecular evidence for dopamine D1 receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J. Neurosci. Res.* 58, 544–552 (1999).
88. Harris, K. L., Mason, S. L., Vallin, B. & Barker, R. A. Reduced expression of dopamine D2 receptors on astrocytes in R6/1 HD mice and HD post-mortem tissue. *Neurosci. Lett.* 767, 136289 (2022).
89. Hernandez-Ontiveros, D. G. et al. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front. Neurol.* 4, 30 (2013).
90. Turtzo, L. C. et al. Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. *J. Neuroinflammation* 11, 82 (2014).
91. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 137–161 (2012).
92. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013–1022 (2014).
93. Alboni, S., Cervia, D., Sugama, S. & Conti, B. Interleukin 18 in the CNS. *J. Neuroinflammation* 7, 9 (2010).
94. Tsai, S.-J. Effects of interleukin-1beta polymorphisms on brain function and behavior in healthy and psychiatric disease conditions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 37, 89–97 (2017).
95. Ousman, S. S. et al. Protective and therapeutic role for α B-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 448, 474–479 (2007).
96. Shao, W. et al. Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via α B-crystallin. *Nature* 494, 90–94 (2013).
97. Zhu, J. et al. Dopamine D2 receptor restricts astrocytic NLRP3 inflammasome activation via enhancing the interaction of β -arrestin2 and NLRP3. *Cell Death Differ.* 25, 2037–2049 (2018).
98. Du, R.-H. et al. α -Synuclein disrupts the anti-inflammatory role of Drd2 via interfering β -arrestin2-TAB1 interaction in astrocytes. *J. Neuroinflammation* 15, 258 (2018).

99. Levi-Montalcini, R. & Angeletti, P. U. Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Dev. Biol.* 6, 653–659 (1963).
100. Sutter, A., Riopelle, R. J., Harris-Warrick, R. M. & Shooter, E. M. Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J. Biol. Chem.* 254, 5972–5982 (1979).
101. Dumas, M., Schwab, M. E. & Thoenen, H. Retrograde axonal transport of specific macromolecules as a tool for characterizing nerve terminal membranes. *J. Neurobiol.* 10, 179–197 (1979).
102. Lin, L.-F. H., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S. & Collins, F. GDNF: a Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons. *Science* 260, 1130–1132 (1993).
103. Arenas, E., Trupp, M., Åkerud, P. & Ibáñez, C. F. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 15, 1465–1473 (1995).
104. Zurn, A. D., Baetge, E. E., Hammang, J. P., Tan, S. A. & Aebischer, P. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport* 6, 113–118 (1994).
105. Kinor, N., Geffen, R., Golomb, E., Zinman, T. & Yadid, G. Dopamine increases glial cell line-derived neurotrophic factor in human fetal astrocytes. *Glia* 33, 143–150 (2001).
106. Blanco-Suárez, E., Caldwell, A. L. M. & Allen, N. J. Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. *J. Physiol.* 595, 1903–1916 (2017).
107. Neumeyer, J. L., Kula, N. S., Bergman, J. & Baldessarini, R. J. Receptor affinities of dopamine D1 receptor-selective novel phenylbenzazepines. *Eur. J. Pharmacol.* 474, 137–140 (2003).
108. Wang, X. F. & Cynader, M. S. Effects of astrocytes on neuronal attachment and survival shown in a serum-free co-culture system. *Brain Res. Protoc.* 4, 209–216 (1999).
109. Takamura, N. et al. The effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 50, 116–124 (2014).